

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung des muskulären Metabolismus von
Patienten mit familiärer partieller Lipodystrophie mittels
³¹P- und ¹H-Magnetresonanzspektroskopie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eike Hoff

aus Berlin

Gutachter : 1. Prof. Dr. med. H. Schmidt
 2. Prof. Dr. med. J. Köbberling
 3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Ventz

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Laminopathien	2
1.1.1 FPLD und metabolisches Syndrom	2
1.2 Darstellung der eigenen Untersuchungen und Herleitung der Fragestellungen	6
2 Methodik	9
2.1 Patienten und Vergleichsprobanden	9
2.2 Untersuchungsdesign	11
2.3 Testmethoden	12
2.3.1 Genetische Untersuchungen	12
2.3.1.1 Extraktion humaner DNA	12
2.3.1.2 Sequenzierung	13
2.3.1.3 Restriktionsverdau	14
2.3.2 Kernspinspektroskopische Untersuchungen	15
2.3.2.1 ³¹ P-NMR-Untersuchungen	16
2.3.2.2 ¹ H-NMR-Untersuchungen	20
2.3.2.3 Auswertung der NMR-Spektren	22
2.3.3 Fahrradergometer-Tests	24
2.4 Statistik	25
3 Ergebnisse	26
3.1 Ergebnisse der genetischen Untersuchung	26
3.2 Kernspinspektroskopische Ergebnisse	28
3.2.1 Ergebnisse der ³¹ P-Ruhemessungen	29
3.2.2 Ergebnisse der ³¹ P-Belastungsmessungen	33
3.2.2.1 Aerober 5-Minuten-Belastungstest	34
3.2.2.2 Stufenförmig ansteigender Ausbelastungstest	39
3.2.3 Ergebnisse der ¹ H-Ruhemessungen	42
3.3 Leistungsdiagnostische Ergebnisse	46
3.4 Korrelation kernspinspektroskopischer Ergebnisse mit klinischen und leistungsdiagnostischen Daten	47

4 Diskussion	50
4.1 Einschränkungen der Studie und Methodenkritik	51
4.2 Genetische, klinisch-laborchemische und leistungsphysiologische Ergebnisse	52
4.3 Kernspinspektroskopische Ergebnisse	53
4.3.1 Kernspinspektroskopische Messungen der ruhenden Muskulatur	53
4.3.2 Kernspinspektroskopische Belastungsmessungen	55
4.3.3 Protonenspektroskopische Messungen	56
4.3.4 Schlussfolgerungen und klinische Relevanz der gefundenen Ergebnisse	58
5 Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis	63
A Zeitlicher Ablauf der Versuche	76
B Messparameter für die kernspinspektroskopischen Untersuchungen	78
C Auswertungsablauf für die kernspinspektroskopischen Untersuchungen	80
Danksagung	85
Lebenslauf	86
Eidesstattliche Erklärung	90

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
B ₀	äußeres Magnetfeld
BLK	Blutlaktatkonzentration
dNTP	Desoxynukleotide
ddNTP	Didesoxynukleotide
EMCL	extramyozelluläre Lipidkonzentration
FID	<i>Free Induction Decay</i> (kernspinspektroskopisches Rohsignal)
FPLD	familiäre partielle Lipodystrophie Typ Dunnigan-Köbberling
h	Stunde
¹ H	Wasserstoffisotop
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl.: <i>High Density Lipoprotein</i>)
HF	Herzfrequenz
Hz	Hertz
IMCL	intramyozelluläre Lipidkonzentration
KG	Körpergewicht
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (engl.: <i>Low Density Lipoprotein</i>)
M	Magnetisierungsvektor
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
MRT	Magnetresonanztomograph (= Kernspintomograph)
MRS	Magnetresonanzspektroskopie (= Kernspinspektroskopie)
MVC	<i>Maximal Voluntary Contraction</i> (= isometrische Maximalkraft)
n	Anzahl
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Magnetresonanzfrequenz)
³¹ P	Phosphorisotop
P _i	anorganisches Phosphat
PCr	Phosphokreatin (engl.: <i>phosphocreatin</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (= Polymerasekettenreaktion)
PDE	Phosphodiester
PME	Phosphomonoester
PPAR _γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren Subtyp γ
s	Sekunde(n)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
STEAM	<i>Stimulated Echo Aquisition Mode</i>
T	Tesla (Maßeinheit der magnetischen Feldstärke)
v.	vastus (Muskelbauch)
Wo	Woche
<i>h</i>	Plancksches Wirkungsquantum
μ	magnetisches Moment
ν	Kernresonanzfrequenz

*Nuclear Magnetic Resonance - A "Magnetic Eye on Metabolism".
Griffith & Iles, 1980*

1 Einleitung und Fragestellung

Die familiäre partielle Lipodystrophie Typ Dunnigan-Köbberling (FPLD) stellt ein seltenes genetisches Krankheitsbild dar, das als Modell für das Verständnis der Pathogenese von Hyperlipidämien, insulinresistentem Diabetes mellitus und Verteilungsstörungen von Adipozyten (Adipositas) dient [30, 39, 52, 77, 128]. Die Symptome bei dieser familiären Form der Lipodystrophie haben in vielerlei Hinsicht Ähnlichkeit mit denen des metabolischen Syndroms (Syndrom X), bei dem eine Resistenz der Insulinregulation der muskulären Glukoseaufnahme sowie eine Lipolyse in den Adipozyten bestehen [117]. Die molekularen Grundlagen der Insulinresistenz und der Störungen des Fettstoffwechsels beim metabolischen Syndrom sind bislang nur ungenügend verstanden. Ein Ansatz zur Identifizierung der zugrunde liegenden Mechanismen einer Erkrankung stellt die Untersuchung einer genetisch charakterisierten Extremform dieses Erkrankungskomplexes dar. Dies ist bei der familiären Hypercholesterinämie als Modellerkrankung realisiert worden. Durch die Identifizierung des LDL-Rezeptors wurde erstmals exemplarisch die rezeptor-medierte Endozytose untersucht, durch Charakterisierung klinischer Mutationen eine Struktur-/Funktions-Analyse dieses Rezeptors ermöglicht und in der Folge der gesamte intrazelluläre Cholesterinmetabolismus aufgedeckt [29]. Letztlich führten diese Forschungsarbeiten zur Entwicklung neuer medikamentöser Behandlungsmöglichkeiten, die heute als Standard in der Therapie eingesetzt werden. Die auf *LMNA*-Mutationen beruhende familiäre partielle Lipodystrophie Typ Dunnigan-Köbberling repräsentiert für den Erkrankungskomplex der Insulinresistenz-Syndrome eine vergleichbare Extremform einer genetischen Modellerkrankung. Die Arbeitsgruppe um Garg [112] und die um Shackleton, Trembath und Schmidt [73] konnten 1998 zeitgleich ausgehend vom klinischen Phänotyp anhand von Familienuntersuchungen verschiedene Mutationen des *LMNA*-Gens als Ursache der Erkrankung identifizieren. In der Folgezeit konnte dies von anderen Arbeitsgruppen bestätigt und weiter differenziert werden [30, 54, 67, 131]. Das *LMNA*-Gen kodiert für die nukleären Proteine Lamin A und die Splicevariante Lamin C. Veränderungen dieser Filamente - unter dem Begriff der so genannten Laminopathien zusammengefasst (siehe Kap. 1.1) - sind auch ursächlich für verschiedene Formen von Muskeldystrophien und Neuropathien [21]. Diverse Untersuchungen zur klinischen Charakterisierung der FPLD [5, 39, 52, 66, 77, 149] legen nahe, dass strukturelle Veränderungen der Lamine A und C zu metabolischen Veränderungen in Myozyten und Adipozyten führen. Die genauen pathophysiologischen und molekularbiologischen Zusammenhänge sind bislang noch ungenügend erforscht.

1.1 Laminopathien

Zum heutigen Zeitpunkt sind 7 autosomal-dominant und 5 autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen bekannt, die auf einer Mutation im *LMNA*-Gen beruhen und als so genannte primäre Laminopathien bezeichnet werden [157]. Davon abzugrenzen sind die sekundären Laminopathien z.B. auf der Grundlage einer Mutation in der Zink Metalloproteinase (*ZMPSTE24*), welche post-translationale Veränderungen des Prä-Lamin A zur Folge haben [14, 74]. Zu den primären Laminopathien gehören zwei Formen der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD), die Limb-Girdle-Muskeldystrophie Typ 1B (LGMD) und die Dilatative Kardiomyopathie Typ 1A (DCM), die alle im Wesentlichen durch den lokalen Rückgang von Myozyten charakterisiert sind, sowie die familiäre partielle Lipodystrophie Typ Dunnigan-Köbberling (FPLD), die primär durch eine Reduktion bzw. das Fehlen von subkutanem Fettgewebe geprägt ist [21, 28, 41, 46, 107, 109]. Des Weiteren zählen dazu zwei Erkrankungen aus dem Syndromkomplex vorzeitigen Alterns, das Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom [42, 125] und das Werner Syndrom [33]. Durch Aminosäuresubstitution im Exon 5 des *LMNA* kommt es zu einer axonalen Neuropathie, die zu einer Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2B1 (CMT2) führt [35, 142]. Als weitere Erkrankungen sind die Restriktive Dermopathie und die Mandibuloakrale Dysplasie Typ A (MAD) beschrieben [13, 44, 74, 106].

Der Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Mutationen auf einem Gen und dem Auftreten derartig verschiedener Erkrankungen, also der Pathomechanismus der jeweils resultierenden Funktionsstörung des Lamin A/C, ist bislang ungeklärt. Interessanterweise ähneln sich die Erkrankungen in ihrem Erscheinungsbild, lediglich der betroffene Zelltyp variiert. Eine eindeutige Zuordnung zwischen klinischem Phänotyp einer der genannten Erkrankungen und einem betroffenen Genabschnitt des *LMNA* ist bislang noch nicht gelungen. Im Folgenden wird auf die familiäre partielle Lipodystrophie und die Gemeinsamkeiten zum metabolischen Syndrom eingegangen.

1.1.1 FPLD und metabolisches Syndrom

Es werden zwei Formen der familiären partiellen Lipodystrophie beschrieben, die phänotypisch gleich sind, aber auf unterschiedlichen genetischen Veränderungen beruhen. Für die FPLD2 sind Mutationen im *LMNA*-Gen in den Exonen 8 und 11 bekannt [65, 69, 149]; die FPLD3 beruht auf einem genetischen Defekt, der zu einer Mutation im PPAR γ -Rezeptor (*peroxisomal proliferator-activated receptor γ*) führt [69, 92, 93]. In Nordeuropa wird die Prävalenz der Erkrankung auf ca. 1:100.000 geschätzt [69]. Die familiäre partielle Lipodystrophie ist charakterisiert durch eine allmähliche Atrophie des subkutanen Fettgewebes, beginnend im Bereich der Unterschenkel, die sich im Verlauf auf die Extremitäten und den Körperstamm ausdehnt. Überschüssige Fettablagerungen können nachfolgend im Gesicht, Halsbereich und Abdomen im Sinne eines cushingoiden Aussehens sichtbar werden (Abb. 1.1 und 1.2). Das mechanisch relevante Baufett (z.B. an den Fußsohlen) ist nicht betroffen. Die Abbildungen 1.1-1.3 zeigen jeweils ein Beispiel einer Patientin, eines Patienten und einer jugendlichen FPLD-Patientin. Des Weiteren kommt es zu einer Hypertrophie der Extremitätenmuskulatur, auch hier beginnend und im Verlauf am stärksten ausgeprägt an den Unterschenkeln (Abb. 1.4). Im Verlauf der Erkrankung kann es bei den Patienten zu Dauerschmerzen in der hypertrophierten Muskulatur kommen [36, 134, 154].



Abbildung 1.1 : **Patientin mit FPLD (Stammbaum A-III-2) im Verlauf über 5 Jahre (links vs. rechts)**

Neben der charakteristischen Lipatrophie im Bereich des Abdomens und der Extremitäten, sowie des cushingoiden Habitus ist die zunehmende Muskelhypertrophie besonders im Bereich der Waden auffällig.



Abbildung 1.2 : **Männlicher FPLD Patient (Stammbaum A-III-3) im zeitlichen Verlauf über 5 Jahre (links vs. rechts)**



Abbildung 1.3 : **Jugendliche Patientin mit genetisch gesicherter FPLD im Alter von 13 Jahren** (Stammbaum: A-IV-2) Bei noch fehlenden anderen klinischen Zeichen der FPLD fällt bereits in diesem Alter die beginnende Hypertrophie der Wadenmuskulatur auf, die mit Myalgien verbunden ist.



Abbildung 1.4 : **Ausgeprägte Muskelhypertrophie und auffällige Venenzeichnung als Folge der Atrophie des subkutanen Fettgewebes (Pseudovenomegalie) im Bereich der unteren Extremitäten einer Patientin mit FPLD**

Trotz des kräftigen Aussehens geben viele Patienten an, wenig belastbar zu sein und schnell zu ermüden. Durch die Reduktion oder das Fehlen des Unterhautfettgewebes und die Muskelhypertrophie kommt es zu einer verstärkten Venenzeichnung, die als Pseudovenomegalie bezeichnet wird (Abb. 1.4). Die typischen Symptome entwickeln sich in der Regel erst während der Pubertät oder im jungen Erwachsenenalter (vgl. Abb. 1.3 mit Abb. 1.1). Biochemisch fallen eine Hyperlipidämie, meist Hypertriglyceridämie im Sinne einer Hyperlipoproteinämie Typ IV nach Fredrickson sowie ein insulinresistenter Diabetes mellitus auf. Betroffene Frauen können einen Hirsutismus, Menstruationsanomalien und polycystische Ovarien entwickeln. Fakultativ kann weiterhin eine Acanthosis nigricans auftreten. Als weitere - wahrscheinlich sekundär auftretende - Symptome finden sich gehäuft eine Steatosis hepatis [94] und ein arterieller Hypertonus [14, 74].

Die Patienten versterben charakteristischer Weise an kardiovaskulären Ereignissen. Sowohl Myokardinfarkt, Apoplex als auch Herzversagen im Rahmen einer hypertrophen Kardiomyopathie wurden als Todesursache benannt. In vielen in der Literatur beschriebenen Fällen ist die Todesursache allerdings unbekannt oder ungenannt. Als Ursache für die im Vordergrund stehende kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität wird die Akkumulation verschiedener Risikofaktoren diskutiert. Das Vorliegen einer meist ausgeprägten und medikamentös äußerst schwierig einzustellenden Hyperlipidämie und eines Diabetes mellitus mit Hyperinsulinämie, sowie die arterielle Hypertonie können die frühzeitige Morbidität und konsekutive Mortalität erklären. Die betroffenen Frauen sterben in der Regel im Alter zwischen 40 und 50 Jahren; männliche Patienten erreichen oft das 70. Lebensjahr. Zur Zeit steht lediglich eine symptomatische Therapie zur Verfügung. Tabelle 1.1 zeigt die obligaten und variablen Krankheitssymptome im Überblick.

Tabelle 1.1 : **Obligate und variable Krankheitssymptome, aus Schmidt et al. [128]**

Obligat	Variabel
Lipodystrophie	Myalgien
Muskelhypertrophie	Hyperlipoproteinämie Typ IIa, IIb, IV, V
Fettstoffwechselstörungen	Acanthosis nigricans
Insulinresistenz	Diabetes mellitus
„Herztod“	Polycystische Ovarien

Die FPLD zeigt in der Kombination der Symptome hohe Übereinstimmung mit dem metabolischen Syndrom (Syndrom X). Dabei handelt es sich um den Symptomkomplex aus Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, insbesondere Hypertriglyceridämie in Verbindung mit erniedrigten HDL-Serumkonzentrationen, Hyperurikämie, arterieller Hypertonie und Adipositas. Das Übergewicht gilt als Schrittmacher des metabolischen Syndroms, weshalb es auch als Zivilisationskrankheit oder „Wohlstandssyndrom“ in Folge von Überernährung bezeichnet wird. Das Vollbild der Erkrankung mit Ausprägung aller Symptome findet sich selten. In der westlichen Welt nimmt das metabolische Syndrom einen wachsenden Anteil an der Genese von Herzkreislauferkrankungen ein. Der Diabetes mellitus entwickelt sich auf dem Boden einer Insulinresistenz. Als weitere Parallele zur Lipodystrophie findet sich eine Fettverteilungsstörung, typischer Weise die androide (abdominale, zentrale, viszerale, Stammfettsucht, Apfelform) und nicht die gynoide (gluteal-femorale, Birnenform) Form. Weitere Symptome sind die Steatosis hepatis und eine Cholezystolithiasis. Aufgrund der (zunehmenden) Prävalenz des metabolischen Syndroms in Europa

und den USA und seiner Bedeutung als Faktor oder Co-Faktor bei der Ausbildung von Krankheiten mit hoher Morbidität und Mortalität, ist die Erforschung molekularer Zusammenhänge, die den Pathomechanismus aufklären und damit Grundlage neuer Therapien sein können, von allergrößter Wichtigkeit.

1.2 Darstellung der eigenen Untersuchungen und Herleitung der Fragestellungen

Die Muskulatur spielt als größtes "Stoffwechselorgan" des menschlichen Körpers eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der peripheren Insulinresistenz und der Hyperlipidämie. Untersuchungen zu Veränderungen des Energie- und Fettstoffwechsels der Skelettmuskulatur auf molekularer Ebene von Patienten mit FPLD, bei denen diese Symptome stark ausgeprägt sind, können dazu beitragen, den Pathomechanismus der Entstehung dieser metabolischen Veränderungen zu verstehen. Der Goldstandard, Informationen über die biochemischen Vorgänge in der Muskulatur zu gewinnen, ist die histologische Untersuchung einer Gewebeprobe, die mittels Feinnadelbiopsie aus dem Muskel gewonnen wird. Dieses Verfahren hat mehrere Nachteile. Zum einen erlaubt es nur eine Momentaufnahme der metabolischen Vorgänge, z.B. bei der Energiebereitstellung oder Laktatbildung im Muskel. Zum anderen ist die entnommene Gewebeprobe sehr klein. Die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den gesamten Muskel ist aufgrund der Heterogenität innerhalb eines Muskels nur bedingt möglich [147]. Wegen der Invasivität ist das Verfahren für Längsschnittuntersuchungen nicht geeignet oder zumindest ethisch umstritten. Zudem kann die Feinnadelbiopsie nur unter Ruhebedingungen durchgeführt werden.

Die Magnetresonanztomographie ist ein modernes Verfahren zur nichtinvasiven Untersuchung des Stoffwechsels [37, 78]. Mit dieser Methode können kontinuierlich und wiederholt metabolische Zustände und Veränderungen in der (arbeitenden) Muskulatur bestimmt werden. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden ^{31}P -MRS (^{31}P -MRS) und Protonen- (^1H -MRS) Magnetresonanztomographie verwendet.

Die ^{31}P -MRS hat sich zur Untersuchung des Energiestoffwechsels sowohl von gesunden Probanden und Sportlern, als auch bei Patienten mit unterschiedlichen Myopathien und Belastungsstörungen etabliert [11, 80, 140]. Über den Gehalt und das Verhältnis der energiereichen Phosphate in Ruhe und unter Belastung können Rückschlüsse auf die Muskelfaserzusammensetzung, die aerobe und anaerobe Kapazität, bzw. deren Pathologie, sowie Veränderungen der Ultrastruktur des Muskels mit Auswirkungen auf den Stoffwechsel - z.B. Membrananomalien gezogen werden. Patienten mit bestimmten Muskelerkrankungen weisen zum Teil spezifische, zum Teil unspezifische Veränderungen der phosphorspektroskopischen Ruheverteilungsmuster oder Belastungsreaktionen auf, aus denen man auf den molekularen Pathomechanismus, z.B. Störung der Glykolyse/Glykogenolyse oder der Mitochondrienfunktion schließen kann [88, 6, 8, 9, 78]. Bemerkenswert ist, dass pathologische Veränderungen in den Spektren proportional zur Ausprägung des jeweiligen Krankheitsbildes auftreten und in der Regel auch schon bei asymptomatischen Genträgern nachweisbar sind [72, 79], was in der Diagnostik und Verlaufskontrolle - z.B. nach Therapie - von größter Bedeutung ist [61, 138].

Mit der ^1H -MRS können die Konzentrationen intra- und extramyozellulärer Lipide (IMCL und EMCL) in Ruhe, deren Depletion unter Belastung und Regeneration in der Erholungsphase erfasst werden [17,

70, 90, 103, 120, 144]. Es liegen zahlreiche ^1H -MRS-Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Fettstoffwechselstörungen und peripherer Insulinresistenz vor [15, 26, 27, 75, 84, 104, 111, 143]. Die Konzentration intramyozellulärer Lipide korreliert mit dem Körpergewicht, dem Fettverteilungsmuster sowie der Hyperinsulinämie positiv [133, 143]. Die Konzentrationen an zirkulierenden freien Fettsäuren und Insulin scheinen dabei den entscheidenden Einfluss auf die IMCL-Konzentration zu haben [4, 24].

MRS-Studien aus dem Krankheitskomplex der Laminopathien oder an Patienten mit genetisch oder pharmakologisch bedingter Lipodystrophie z.B. bei HIV liegen nur vereinzelt, mit äußerst geringen Probandenzahlen und uneinheitlichen Ergebnissen vor [45, 53, 97]. Die Arbeitsgruppe um Barbiroli [45] konnte bei drei Patienten mit autosomal dominanter Limb-Girdle-Myopathie und histologisch nachgewiesenen *ragged-red fibers* sowie vorliegender Kardiomyopathie histologische und phosphorspektroskopische Veränderungen im Sinne einer mitochondrialen Myopathie nachweisen, während Lodi und Mitarbeiter [97] bei ihren Patienten (n=7) im Frühstadium einer autosomal rezessiv vererbten Limb-Girdle-Muskeldystrophie bis auf eine pH-Wert-Erhöhung in Ruhe keine weiteren Veränderungen der Phosphorspektren, weder in Ruhe noch unter aerober Belastung feststellen konnten. Garg und Stray-Gundersen [53] haben Muskelbiopsien des M. quadriceps femoris von Patienten mit angeborener generalisierter Lipodystrophie (*acquired generalised lipodystrophy* - AGL) (n=3) sowie deren Muskelkraft, aerobe Kapazität und Muskelmetabolismus untersucht. Sie fanden eine Erhöhung des Typ-II-Faseranteils bei deutlicher Reduktion des Faserquerschnitts, sowohl für Typ-I- als auch für Typ-II-Fasern. Bei reduzierter Maximalkraft und maximaler Sauerstoffaufnahme zeigten die ^{31}P -MRS-Untersuchungen weder in Ruhe, noch unter statischen oder dynamischen Belastungsbedingungen Auffälligkeiten gegenüber Normalpersonen. Brechtel und Mitarbeiter [25] fanden bei Patienten mit Lawrence Syndrom, einer sehr seltenen Erkrankung mit generalisierter Lipodystrophie, um 14% erniedrigte IMCL-Konzentrationen in der Wadenmuskulatur gegenüber Gesunden. Die Resonanz für extrazelluläre Fette war nicht nachweisbar. Weitere ^1H -MRS-Studien wurden bislang nicht veröffentlicht.

Es liegen weder ^{31}P noch ^1H magnetresonanzspektroskopische Untersuchungen der Muskulatur von Patienten mit FPLD vor. Beide Methoden bieten wie oben beschrieben herausragende Möglichkeiten, um metabolische Zustände und Veränderungen der Skelettmuskulatur zu erfassen. Aufgrund der ausgeprägten morphologischen und laborchemischen Pathologie bei Patienten mit FPLD sind Unterschiede gegenüber Normalpersonen sowohl in Ruhe- als auch unter Belastungsbedingungen zu erwarten.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, anhand kernspinspektroskopischer Ruhe- und Belastungsmessungen, den Metabolismus der Beinmuskulatur von Patienten mit FPLD zu untersuchen und Veränderungen gegenüber Normalpersonen herauszuarbeiten. Die Analyse dieser Daten im Kontext laborchemischer Parameter und mit Ergebnissen aus leistungsphysiologischen Tests diene der weiteren Charakterisierung des klinischen Phänotyp, um mögliche Zusammenhänge zwischen genetischem Defekt, klinischem Erscheinungsbild und Veränderungen des Energie- und Fettstoffwechsels der Skelettmuskulatur auf molekularer Ebene zu entdecken.

Durch die umfangreichen Familienuntersuchungen der Gruppe um Schmidt in der Charité Berlin [56, 95, 94, 92, 93, 10, 57, 130, 128, 129, 131, 134] zur Charakterisierung des genetischen, klinischen und biochemischen Profils von Patienten (Phänotyp) bestanden gute Voraussetzungen, um eine ausreichende Anzahl von Patienten mit diesem seltenen Krankheitsbild für die speziellen und zeit-

aufwändigen Muskeluntersuchungen zu gewinnen. Außerdem konnten auf diese Weise die erhobenen Daten zum muskulären Profil direkt mit den klinisch erhobenen Parametern korreliert werden.

Folgende Hypothesen werden mittels der im Anschluss dargestellten Untersuchungen bearbeitet:

1. ^{31}P -Ruhe- und Belastungsspektren der Beinmuskulatur von Patienten mit FPLD weisen charakteristische Veränderungen gegenüber gesunden Probanden auf.
2. Patienten mit FPLD haben ein differentes Verteilungsmuster intra- zu extramyozellulärer Fette der Wadenmuskulatur (^1H -MRS) gegenüber gesunden Probanden.
3. Die Ergebnisse aus der Magnetresonanztomographie korrelieren mit klinischen bzw. leistungsphysiologischen Parametern.

2 Methodik

Für eine Gruppe von Patienten mit dem klinischen Bild einer FPLD (unterschiedlicher Ausprägung) wurden kernspinspektroskopischen Messungen der Beinmuskulatur durchgeführt und mit denen gesunder Probanden verglichen. Im folgenden Kapitel erfolgt eine Charakterisierung der Probanden und Patienten, inklusive der Beschreibung des genetischen Screenings bezüglich der FPLD. Anschließend werden die kernspinspektroskopischen Untersuchungen, der fahrradergometrische Stufentest und die statistischen Methoden beschrieben.

2.1 Patienten und Vergleichsprobanden

Untersucht wurden 19 Patienten aus 9 Familien mit dem klinischen Bild einer familiären partiellen Lipodystrophie Typ Dunnigan-Köbberling. Im genetischen Screening der übrigen Familienmitglieder wurden weitere Patienten mit dem Krankheitsbild und asymptotische Genträger identifiziert (siehe Stammbäume in Kap. 3.1, Abbildung 3.3). Wegen der großen räumlichen Distanz zur Charité war diesen Patienten die Fahrt nach Berlin aus beruflichen und finanziellen Gründen nicht möglich. Sie konnten nicht mit in die Untersuchung einbezogen werden, weil die technisch-apparativen Voraussetzungen für diese Untersuchungen nicht unter standardisierten Bedingungen an anderen Orten verfügbar waren. Eine Patientin konnte aufgrund eines Herzschrittmachers nicht im Kernspintomographen untersucht werden.

In der Tabelle 2.1 sind die anthropometrischen und klinisch relevanten Parameter der Patienten zusammengestellt. Die klinisch-internistische Untersuchung und die Erhebung der biochemischen Laborwerte erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Schmidt.

Zum Vergleich der kernspinspektroskopischen Daten mit denen Gesunder wurden die Ergebnisse von insgesamt 11 männlichen Probanden (Proband 1-11; Kontrollgruppe) herangezogen. Aufgrund der Muskelhypertrophie der Extremitätenmuskulatur der Patienten wurden die Daten außerdem mit denen von 6 Schnellkraftsportlern (Sportler 1-6) mit ähnlich großer Muskelmasse verglichen. Die anthropometrischen Daten der Vergleichsprobanden sind in Tabelle 2.2 enthalten.

Alle Untersuchungen erfolgten freiwillig und unentgeltlich nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Aufklärung sowie schriftlicher Einverständniserklärung. Das Votum der Ethikkommission der Charité Berlin lag vor.

Tabelle 2.1 : **Anthropometrische und internistische Daten der FPLD-Patienten**

(In eckigen Klammern sind die Normwerte des jeweiligen Parameters angegeben. Steatosis hepatis ist mit Sh abgekürzt.)

Patienten (n=19)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI (kg/cm ²) [19-25]	Alter	Insulinresistenz	Ges. Chol. (mg/dl)	HDL (mg/dl) [>60]	LDL (mg/dl) [<160]	TG (mg/dl) [<200]	Lp(a) (mg/dl) [<30]	Fettleber	ALT (U/l) [10-37]	AST (U/l) [11-36]	GGT (U/l) [w<39; m<66]
A-III-2	170	79,9	27,6	39,3	IDDM	208	33	96	742	4	Sh	64	67	65
D-II-1	159	54,0	21,4	38,6	-	148	48	93	103	3,7	Sh	20	24	22
F-I-2	163	60,0	22,6	62,4	PGT	221	62	113	227	83	Sh	18	25	21
F-II-2	162	73,0	27,8	40,0	PGT	233	36	147	480	3,9	Sh	50	47	39
I-III-9	179	79,4	24,8	24,1	keine	160	45	104	53	0,9	keine	41	28	33
A-III-18	167	72,9	26,1	36,5	NIDDM	174	37	74	314	9,3	Sh	46	35	46
F-II-1	168	73,0	25,9	44,7	PGT	253	39	176	432	79	Sh	18	21	28
A-III-5	173	67,0	22,4	28,7	PGT	243	42	171	205	17,7	Sh	72	38	102
B-III-1	172	74,5	25,2	18,6	NIDDM	220	46	85	445	34	Sh	30	31	29
B-II-2	165	71,8	26,4	43,3	PGT	212	43	127	246	28,4	Sh	24	27	30
G-II-2	164	75,0	27,9	35,8	NIDDM	165	27	92	228	4,5	Sh	26	20	18
G-II-1	166	76,0	27,6	25,5	NIDDM	193	40	93	300	1,6	Sh	27	25	18
G-I-1	167	82,0	29,4	59,8	IDDM	116	30	78	165	37,8	Sh	52	32	48
C-III-3	158	58,4	23,4	49,4	PGT	274	58	165	224	14,5	Sh	29	29	29
E-II-1	160	60,9	23,8	30,8	-	178	58	-	104	20,4	Sh	14	22	16
I-II-3	163	68,0	25,6	56,0	IDDM	240	36	134	349	81,4	Sh	24	27	27
H-II-1	165	75,7	27,8	34,4	NIDDM	229	36	116	387	3,5	Sh	57	41	235
H-I-1	174	74,0	24,4	64,1	IDDM	240	34	125	820	6,1	Sh	30	26	71
A-III-3	181	95,0	29,0	36,2	NIDDM	151	27	90	570	6,7	Sh	56	43	46

Tabelle 2.2 : **Anthropometrische Daten der Vergleichsprobanden**

Vergleichsprobanden (n=11 und n=6; gesamt n=17)	Alter	Größe	Gewicht	BMI
Proband 1	31,1	1,87	86,0	24,6
Proband 2	21,6	1,71	68,0	23,3
Proband 3	26,6	1,83	70,0	20,9
Proband 4	29,4	1,78	75,9	24,1
Proband 5	27,3	1,83	80,5	24,0
Proband 6	26,0	1,75	69,0	22,5
Proband 7	29,6	1,75	78,0	25,5
Proband 8	29,9	1,87	94,0	26,9
Proband 9	32,9	1,89	82,0	23,0
Proband 10	40,9	1,74	64,0	21,1
Proband 11	24,8	1,78	75,0	23,7
Sportler 1	26,5	1,90	90,0	24,9
Sportler 2	19,1	1,83	74,5	22,2
Sportler 3	32,5	1,88	96,0	27,2
Sportler 4	21,5	1,90	82,0	22,7
Sportler 5	23,8	1,77	69,0	22,0
Sportler 6	29,6	1,80	82,5	25,5

2.2 Untersuchungsdesign

1. Alle Patienten wurden genetisch bzgl. des Vorliegens einer FPLD untersucht.
2. Bei allen Patienten wurden kernspinspektroskopische Untersuchungen der ruhenden Muskulatur durchgeführt, um erstens die Konzentrationsverhältnisse der Metabolite des Energiestoffwechsels (^{31}P -MRS) und zweitens das extra- und intrazelluläre Fettverteilungsmuster (^1H -MRS) nichtinvasiv zu erfassen.

Zusätzlich wurden ^{31}P -Spektren bei zeitgleicher Belastung der Wadenmuskulatur innerhalb des Tomographen und in der Nachbelastungsphase akquiriert. Zur Erfassung des aerob-alktaziden Muskelstoffwechsels wurde eine fünfminütige moderate Belastung mit dynamischer Plantar-

flexion, für den anaerob-laktaziden Stoffwechsel die gleiche Belastungsform mit stufenweiser Belastungssteigerung bis zur muskulären Erschöpfung gewählt.

Zum Vergleich wurden die Ergebnisse aus kernspinspektroskopischen Messungen an gesunden Normalpersonen und Leistungssportlern mit vergleichbar großer Muskelmasse herangezogen, um mögliche Unterschiede der Ruheverteilungsmuster sowie des Muskelmetabolismus aufzuzeigen.

3. Zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit der Patienten wurde eine Spiroergometrie auf dem Fahrrad als Rampentest durchgeführt.
4. Die Ergebnisse der kernspinspektroskopischen Ruhe- und Belastungsuntersuchungen wurden mit den für das Krankheitsbild charakteristischen klinischen Befunden und Laborwerten sowie den Ergebnissen aus dem Leistungstest auf korrelative Zusammenhänge untersucht.

Der zeitliche Ablauf aller Versuche (siehe Tab. A.1) und dessen methodische Begründung sind in Anhang A dargestellt.

2.3 Testmethoden

Im Folgenden werden die verwendeten Testmethoden dargestellt. Sowohl für die Kernspinspektroskopie als auch für die genetischen Untersuchungen finden sich an dieser Stelle nur die grundlegenden methodisch-technischen Erklärungen.

2.3.1 Genetische Untersuchungen

Im Anschluß an die PCR-Amplifikation des *LMNA*-Gens erfolgte der Nachweis der Mutationen mittels Sequenzierung nach der Didesoxymethode nach Sanger (auch Kettenabbruch-Synthese genannt). Der Direktnachweis der Mutationen wurde zudem durch gelelektrophoretische Auftrennung nach Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen bestätigt.

2.3.1.1 Extraktion humaner DNA

Humane DNA wurde aus Lymphozyten isoliert. Hierzu wurde heparinisieretes Blut (10 ml) mit 90 ml 0,32 M Saccharose in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl und 1% Triton bei 4°C lysiert. Die Zellkerne wurden durch zehnmütige Zentrifugation bei 1000 x g abzentrifugiert und in 4,5 ml 0,075 M NaCl/0,024 M EDTA, pH 8,0 resuspendiert. Weiterhin wurden 0,5 ml 5%iger SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) und Proteinase K in einer Endkonzentration von 2 mg/ml zugegeben. Anschließend wurde diese Lösung 14 h bei 37°C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurde diese mit 20 mM Tris-HCl gesättigtem Phenol, pH 8,0 und Chloroform/Isoamylalkohol (24/1, vol/vol) zu jeweils gleichen Anteilen versetzt. Nach dem Mischen wurden die Phasen durch Zentrifugation (15 Minuten, 1000 x g) getrennt und so die in der wässrigen Phase befindliche DNA gereinigt. Anschließend wurde die DNA mit 3 M Natriumacetat und 100% Alkohol präzipitiert, abzentrifugiert und in 10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA, pH 7,5 resuspendiert.

2.3.1.2 Sequenzierung

Prinzipiell basierte die zur molekulargenetischen Diagnostik durchgeführte Sequenzierung auf der Didesoxymethode nach Sanger, die durch den Gebrauch des BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Perkin-Elmer abgewandelt wurde. Das Kit ist speziell auf die Verwendung von PCR-Produkten als Sequenzier-Template ausgerichtet und vereinfacht den Ablauf durch Kombination von Kettenabbruch und Markierung mittels Farbterminatoren in einem Arbeitsschritt. Das Prinzip der Farbterminatoren besteht darin, dass durch den Einbau eines Didesoxynukleotids (dd-NTP) anstelle eines Desoxynukleotids (dNTP) zum einen die Kettenverlängerung abgebrochen wird und dass zum anderen jedes der vier Didesoxynukleotide mit einem anderen Fluorochrom markiert ist. Die Terminationsreaktionsmischung enthält folgende Bestandteile:

- markierte A-/C-/G- und T-Farbterminatoren,
- Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dITP, dUTP),
- AmpliTaq[®] DNA-Polymerase mit thermisch stabiler Pyrophosphatase,
- MgCl₂,
- Tris-HCl Puffer, pH 9,0.

Für die Sequenzierung wurden die Proben nach folgendem Schema gemischt:

- 2 µl Terminationsreaktionsmischung,
- 2 µl Primer,
- 2 µl resuspendiertes PCR-Produkt,
- 4 ml HPLC-H₂O.

Die Primer für die Sequenzierung der zwölf Exone des *LMNA*-Gens sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Genannt sind die sense und antisense Primer für die jeweiligen Exone, ihre Abkürzung, Fragmentlänge und die entsprechende Annealing-Temperatur (AT).

Die Proben wurden im Thermocycler für 30 s auf 95°C erhitzt. Danach absolvierte der Thermocycler 25 Zyklen mit einem standardisierten Temperatur-Programm. Dieses bestand aus einer 30 s dauernden Denaturierung bei 95°C, einem Rückgang auf eine für den jeweils verwendeten Primer spezifische Temperatur für 30 s. Danach folgte eine 4 min dauernde Elongationsphase bei 60°C. Nach dem Durchlaufen der 25 Zyklen wurden die Proben vor der weiteren Verarbeitung auf 4°C abgekühlt.

Anschließend erfolgte eine Aufreinigung eines Teils der Proben, was bei großen Molekülen wie Nukleinsäuren und Proteinen sinnvoll ist, mittels Centri-Sep-Säulen. Das Prinzip basiert darauf, dass durch Zentrifugieren der Proben nach Auftragen auf ein hydratisiertes Gelmaterial alle niedermolekularen Komponenten herausgefiltert werden. Dazu wurde dem Gelmaterial 800 µl HPLC-Wasser hinzugefügt, gut gemischt und dieses für mindestens 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Säulen wurden auf Wasch-Tubes gestellt und darin für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Dann wurden 10 µl

Tabelle 2.3 : **Auflistung der in der PCR und bei der Sequenzierung verwendeten Primer (modifiziert nach [46])**

Exon	5'-Primer 5'-3'-Richtung	3'-Primer 5'-3'-Richtung	Bezeichnung	Fragment-Länge [Bp]	AT [°C]
1	CCCCAGATCCCGAGGTCCGAC	CCTCTCCACTCCCCGCCA	LMNA 1f/1r	575	67
2	CAGACTCCTTCTCTTAAATCTAC	CCTAGGTAGAAGAGTGAGTGTAC	LMNA 2f/2r	268	58
3	CCTTCAAGTTCTTGTGTTCTGTGAC	CCTAGCCCAGCCCAAGTCTGTC	LMNA 3f/3r	250	60
4	GGCCTCCCAGGAATAATTCTG	CTCCCTGCCACCATCTGC	LMNA 4f/4r	334	60
5	GCTGTAGCAGTGATGCCCAAC	CCAAAGCCCTGAGAAGTGAAG	LMNA 5f/5r	428	59
6	GCCAAGACTATGTTTAGAGCTTG	GGTCTAGTCAAGGCCAGTTG	LMNA 6f/6r	467	58
7	CCCCACTTGGTCTCCCTCTCC	CCCTGATGCAGCTGTATCCCC	LMNA 7f/7r	292	58
8	GAGGCCTCAATTGCAGGCAGGC	GAAAAGGACACTTACCCCAGC	LMNA 8f/8r	286	64
9	GGAGCGCTGGGGTAAGTGTC	CTCGTCCAGCAAGCAGCCAG	LMNA 9f/9r	192	65
10	GTAAGCAGCAGGCCGACAAAG	CACAGGAATATTCCATGGCATC	LMNA 10f/10r	458	64
11	GGAGCCTGCAGGAGCCTGGAGC	GCTGCGGAAGAGAAGGCAGGCTC	LMNA 11f/11r	445	65
12	GGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATC	AGGGAAAAGGAAGGGAGGAGAAAT	LMNA 12f/12r	686	58

Terminationsreaktions-Mischung auf die Mitte der Oberfläche der Säule pipettiert und anschließend 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert.

20 μ l der vorbereiteten Proben und 5 μ l der mittels der Centri-Sep-Säulen aufgereinigten Proben wurden zusammenpipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden mit Septen verschlossen und für 2 min in den Heizblock bei 95°C gestellt.

Anschließend erfolgte die Sequenzanalyse der amplifizierten DNA mit Hilfe des ABI Prism[®], 310 Genetic Analyzer. Dieses Gerät kann gleichzeitig über eine Kamera Fluoreszenz bei vier verschiedenen Wellenlängen erfassen, die den Emissionswellenlängen der verwendeten Farbterminatoren entsprechen. Die Reaktionsansätze laufen nur auf einer Spur. Das Gel wird mit einem Argonlaser beleuchtet. Passiert ein Fragment den Detektor, wird der spezifische Farbstoff durch den Laser angeregt und emittiert ein Licht einer für ihn spezifischen Wellenlänge. Aus der jeweiligen Farbe kann auf die betreffende Base geschlossen werden. Verarbeitet werden die entstehenden Signale durch eine Computer-Software zu einem sogenannten Elektropherogramm (vgl. Abb. 3.1).

2.3.1.3 Restriktionsverdau

Zum Direktnachweis der Mutationen mittels Restriktionsendonukleasen wurden 10 ml des PCR Produktes über Nacht bei 37°C mit 10 U des Restriktionsenzym *Hpa*II verdaut. Die Produkte wurden auf einem 4%igen Agarosegel analysiert. Das für die Gel-Elektrophorese benötigte Agarose-Gel wurde folgendermaßen hergestellt: 1 g SeaKem GTGTM Agarose und 3 g NuSieve GTGTM Agarose wurden mit 100 ml TAE-Puffer gemischt und erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch unter Rühren auf 60°C abgekühlt und dann in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Nachdem das 4 mm starke Gel erstarrt war, wurden jeweils 8 μ l PCR-Produkt und 4 μ l Auftragspuffer, welcher die Lauffront sichtbar macht,

in die Geltaschen pipettiert. Die mit TAE-Puffer überschichtete Gelplatte wurde dann im Rahmen der Elektrophorese einer Spannung von 0,8 V/cm Laufstrecke ausgesetzt. Nach Beendigung der Auftrennung wurde die Gelplatte für ca. 10 min mit Ethidiumbromid gefärbt. Im UV-Licht bei 320 nm wurde das Gel durchleuchtet und zu Dokumentationszwecken eine Photographie angefertigt (siehe Abb. 3.2).

2.3.2 Kernspinspektroskopische Untersuchungen

Die Probanden wurden mittels ^{31}P - und ^1H -Magnetresonanzspektroskopie untersucht.

Prinzipiell tritt bei der Magnet- oder Kernresonanz ein äußeres elektromagnetisches Feld (elektromagnetische Energie) selektiv in Wechselwirkung mit den magnetischen Momenten spezifischer Atomkerne [126]. Das magnetische Moment entsteht durch die Eigenrotation der Atomkerne, den so genannten Kernspin [47, 49, 59, 63]. Alle Nukleonen (Protonen und Neutronen) haben einen Spin von 1/2. Sowohl Protonen als auch Neutronen tendieren dazu, Paare mit entgegengesetztem Spin zu bilden, der sich gegenseitig aufhebt. Demzufolge besitzen Atomkerne mit gerader Massen- und Ordnungszahl keinen nach außen messbaren Kernspin. Deshalb können nur Verbindungen erfasst werden, die Atomkerne mit Kernspin enthalten, z.B. ^{31}P Phosphor oder ^1H Wasserstoff.

Bei der Magnetresonanzspektroskopie wird die zu untersuchende Probe (hier: Muskel) im Zentrum eines äußeren Magnetfeldes positioniert. Über eine dem Muskelbauch direkt angelegte Spule wird ein elektromagnetischer Impuls generiert, der die Atomkerne anregt. Die Anregungsfrequenz ist für das jeweils zu untersuchende Element spezifisch. Die Atomkerne befinden sich im angeregten Zustand auf einem höheren Energieniveau als im Ausgangszustand. Nach dem Impuls kehren die Atomkerne unter Abgabe dieser Energie in Form elektromagnetischer Wellen in den vorherigen Gleichgewichtszustand zurück. Der Betrag und die Frequenz dieser Energie können gemessen werden. Unter geeigneten Versuchsbedingungen ist die absorbierte und anschließend emittierte Energie proportional zur Anzahl der angeregten Atomkerne in der untersuchten Probe. Gleiche Atomkerne in unterschiedlicher chemischer Bindung unterscheiden sich in der Frequenz der emittierten elektromagnetischen Wellen. Durch mathematische Verfahren (siehe Anhang C) können die aufgezeichneten Summensignale aller Verbindungen des Elements in der Probe wieder getrennt werden: Das Rohsignal (FID) wird in das Spektrum überführt (siehe Abb. 2.1 und 2.8). Ein verwertbares Spektrum der menschlichen Muskulatur entsteht erst durch Integration einer ausreichenden Anzahl an Rohsignalen. Die einzelnen Peaks repräsentieren die verschiedenen Verbindungen. Die Fläche unter den Peaks ist proportional zu ihrer Konzentration im untersuchten Muskelbereich.

Die kernspinspektroskopischen Daten wurden mit einem Ganzkörpertomographen Siemens Magnetom Vision (Fa. Siemens, Erlangen) akquiriert. Das Gerät ist charakterisiert durch eine Feldstärke von 1,5 Tesla, entsprechend einer Protonenresonanzfrequenz von 63,9 MHz. Für die Phosphormessungen verringert sich die Resonanzfrequenz auf 25,9 MHz, entsprechend dem Quotienten der gyromagnetischen Verhältnisse der beiden Atomkerne.

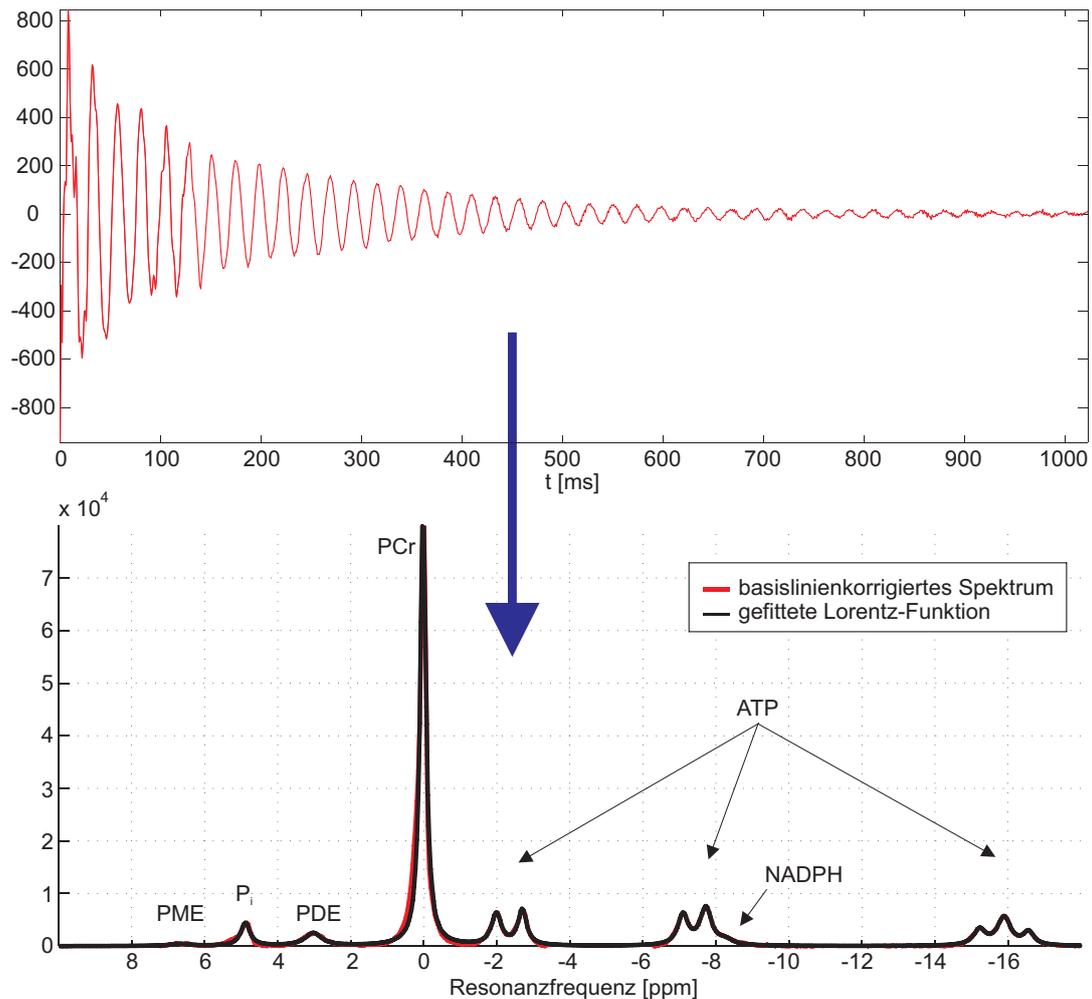


Abbildung 2.1 : **(Summen-)FID: kernspinspektroskopisches Rohsignal (oben), ^{31}P -Spektrum der Muskulatur (unten) nach softwaregestützter Umwandlung.**
 PME: Phosphomonoester; P_i : anorganisches Phosphat; PDE: Phosphodiester; PCr: Phosphokreatin; ATP: Adenosinriphosphat; NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

2.3.2.1 ^{31}P -NMR-Untersuchungen

Das Phosphorspektrum der Muskulatur zeigt 7 bzw. 8 Peaks: Phosphomonoester (PME), anorganisches Phosphat (P_i), Phosphodiester (PDE), Phosphokreatin (PCr) und 3 ATP-Peaks (α , β , γ) bzw. zusätzlich Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH). Aus den erhobenen Daten kann zudem der cytosolische pH-Wert berechnet werden. PCr, ATP und P_i sind die Hauptmetabolite des Energiestoffwechsels (siehe Abb. 2.2).

Die Phosphomonoester repräsentieren eine heterogene Gruppe von Stoffen, hauptsächlich Zuckerphosphate, z.B. als Zwischenprodukte des Citratzyclus oder intrazelluläre Carrier und phosphorylierte Lipide der Fettsynthese. Hauptkomponenten der Phosphodiester sind Zwischenprodukte des Fettstoffwechsels und phosphorylierte Membranbestandteile.

Aus den Ruhespektren sind Rückschlüsse auf die Fasertypverteilung des untersuchten Muskels möglich

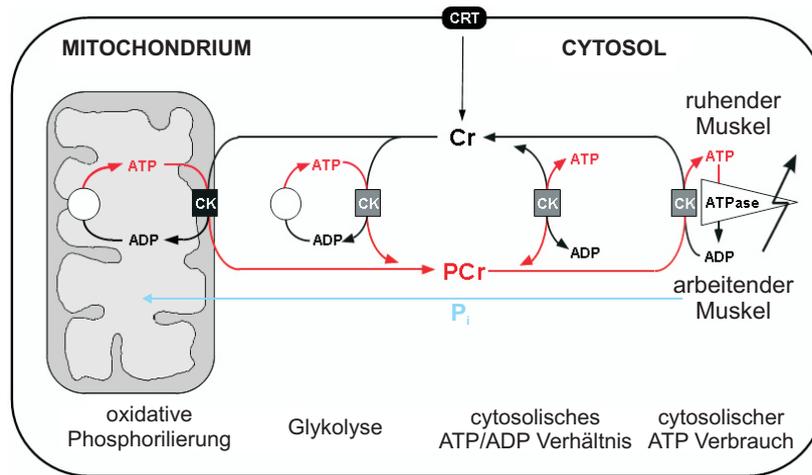


Abbildung 2.2 : **Schematische Darstellung des Energietransportes innerhalb der Muskelzelle**

Das Kreatin dient in Form des Phosphokreatins als schneller Energieträger von den Mitochondrien zu den Myofibrillen. Cr: Kreatin; PCr: Phosphokreatin; ATP: Adenosintriphosphat; P_i : anorganisches Phosphat

[100, 156, 148, 139]. Sowohl chemisch [40] als auch kernspinspektroskopisch gewonnene Ergebnisse [86, 98] zeigen signifikante Korrelationen zwischen dem Gehalt an Phosphormetaboliten und der Fasertypzusammensetzung. Typ-II-Fasern bzw. Muskelgruppen mit überwiegendem Typ-II-Faseranteil enthalten 60-100% höhere Konzentrationen an Phosphokreatin und weisen im Vergleich zu Muskeln, die hauptsächlich aus Typ-I-Fasern bestehen, einen größeren PCr/ P_i - und PCr/ β -ATP-Quotienten auf. Hohe Typ-II-Faseranteile sind z.B. bei Schnellkraftsportlern physiologisch, lassen sich allerdings auch bei Patienten mit familiärer Myopathie als möglicher Kompensationsmechanismus nachweisen [11]. Ein erniedrigter PCr/ β -ATP-Quotient gilt als Parameter für eine mitochondriale Dysfunktion [9]. Erniedrigte PCr/ P_i -Quotienten sind Zeichen eines erniedrigten oxidativen Potentials des Muskels als Ausdruck einer deutlichen Störung des Muskelenergiestoffwechsels, wie sie bei verschiedenen primären und sekundären mitochondrialen Dysfunktionen, aber auch bei Störungen der Glykolyse und Glykogenolyse gefunden wurde [31, 45, 99]. Erhöhte PDE-Konzentrationen weisen auf eine Störung der Ultrastruktur der Muskulatur insbesondere der Membranen (z.B. bei Patienten mit Typ Duchenne Muskeldystrophie) hin und treten im Rahmen akuter Rhabdomyolyse oder unter Elektrodauerstimulation im Rahmen der Fasertypumwandlung von Typ II nach Typ I auf [11].

In den Spektren der arbeitenden Muskulatur sind folgende Veränderungen zu erwarten: Unter Belastung sinkt die PCr-Konzentration, während die des anorganischen Phosphats ansteigt. In der Erholungsphase steigt die PCr-Konzentration wieder bis auf das Ausgangsniveau an, während der P_i -Peak unter den Ausgangslevel abfällt und danach erst langsam wieder bis auf die Ruhewerte ansteigt. Die ATP-Konzentration ist unter Belastungsbedingungen mit geringer und mittlerer Intensität konstant [62]. Patienten mit gestörter Glykogenolyse und/oder Glykolyse weisen eine schnellere Phosphokreatin-Depletion bei geringerer Laktatproduktion gegenüber Normalpersonen auf [6, 8, 9, 79]. Demgegenüber zeigen Patienten mit Mitochondrien-Fehlfunktionen eindeutige Veränderungen der Phosphorspektren in der Nachbelastungsphase mit deutlich verzögerter Regenerationsfähigkeit [9, 55, 61, 141].

Mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie erfolgte eine Untersuchung des rechten M. quadriceps femoris (vas-

tus medialis), des rechten M. biceps femoris und des rechten M. gastrocnemius (medialer Anteil) in Ruhe, sowie ein fünfminütiger Belastungsversuch mit 30% der isometrischen Maximalkraft und ein rampenförmig ansteigender Stufentest innerhalb des Tomographen bei zeitgleicher Aufzeichnung mehrerer Spektren des M. gastrocnemius. Dabei wurde auch die erbrachte Leistung der Probanden mit erfasst. Die Belastung erfolgte mittels eines dafür konzipierten und aus nicht ferromagnetischen Materialien mit Unterstützung des Instituts für Forschung und Entwicklung von Sportgeräten (FES) selbst entwickelten und gefertigten Ergometers. Die Abbildungen 2.3 - 2.5 zeigen den Versuchsaufbau.

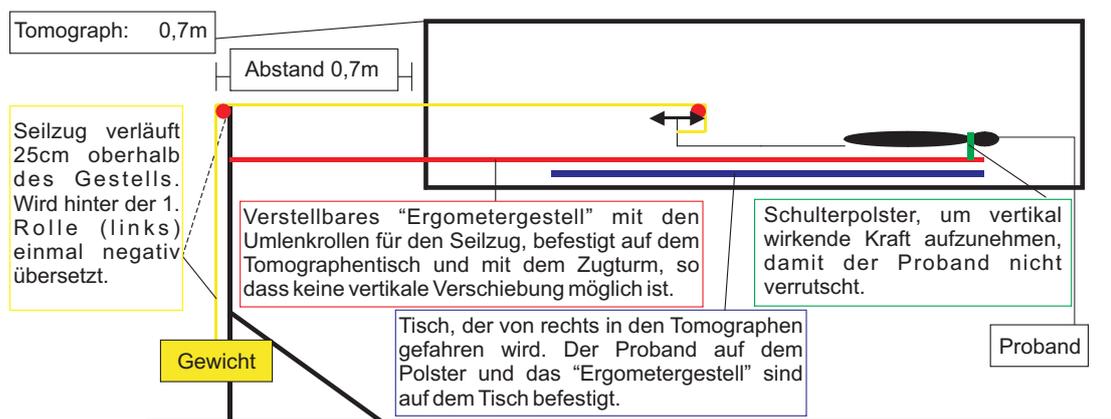


Abbildung 2.3 : **Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Belastungsmessungen innerhalb des Tomographen**

Die Probanden wurden aufgefordert, mit einer Frequenz von 1 Hz dynamisch gegen den vorgegebenen Widerstand plantar zu flektieren. Die Vorgabe des Tempos erfolgte akustisch durch ein Metronom; die Bewegungsausführung wurde gegebenenfalls verbal korrigiert. Die Belastungsmessungen des M. gastrocnemius wurden direkt im Anschluss an die Ruhemessung des gleichen Muskels durchgeführt, so dass der Sitz der Oberflächenspule konstant blieb. Lediglich die Anzahl der Akquisitionen wurde von 128 (entspricht einer Messdauer von 6:24 min) auf 10 (entspricht einer Messdauer von 30 s) reduziert, um eine der Belastung entsprechende andere zeitliche Auflösung zu erreichen. Während des aeroben Belastungstests mit konstantem Widerstand wurden 10 Spektren aufgenommen, in den ersten 10 Nachbelastungsminuten weitere 20 Spektren mit einer zeitlichen Auflösung von ebenfalls je 30 Sekunden. Im rampenförmig ansteigenden Stufentest wurde der Widerstand nach jeder Minute - beginnend mit 30% der isometrischen Maximalkraft um 10% bis zur muskulären Erschöpfung gesteigert. Auf jeder Belastungsstufe wurden 2 Spektren à 30 Sekunden und 20 weitere in den ersten 10 Nachbelastungsminuten akquiriert. Der Beginn der Belastungsversuche und der Start der Messungen erfolgten auf Kommando zeitgleich.

Die Probanden wurden, die Füße voran, liegend in den Magneten geschoben. Die Anregung der Phosphoratomkerne und die Akquisition der Spektren erfolgten unter Verwendung einer Oberflächenspule mit einem Durchmesser von 7 cm (Sende- und Empfangsspule). Der Muskelbauch wurde über dem Zentrum der Spule positioniert und befestigt. Vor den Phosphormessungen wurde das Magnetfeld homogenisiert. Dabei wurde in einem 1-Impuls-Experiment (FID-Sequenz) das Zeitsignal der Wasserresonanz durch Variation der Ströme (Shim-Experiment) maximiert. Für die Phosphormessungen wurde ebenfalls eine FID-Sequenz verwendet. Die untersuchungsrelevanten Messparameter der Ruhe-

und Belastungsuntersuchungen sowie des Shim-Experiments sind in Tabelle B.1 in Anhang B aufgeführt.

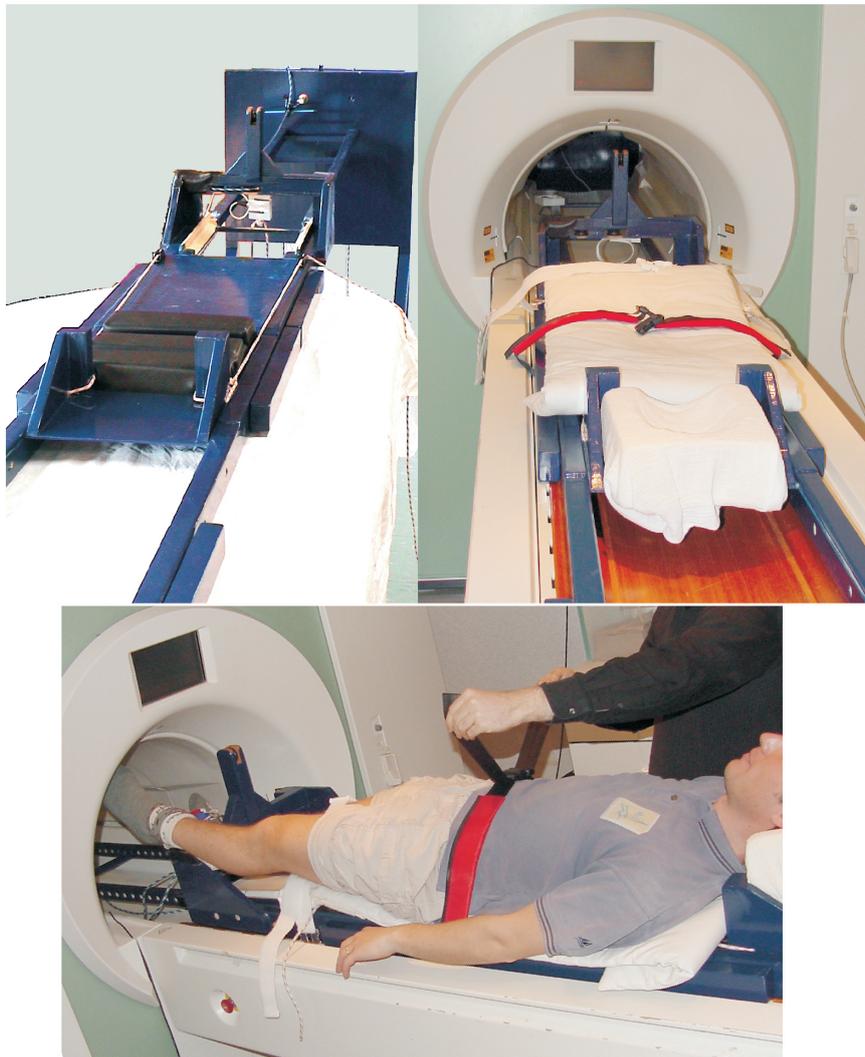


Abbildung 2.4 : **Selbstgefertigtes Ergometer aus nichtferromagnetischen Materialien zur Belastung innerhalb des MRT**

Gesamtdarstellung ohne Proband außerhalb (oben links) und innerhalb (oben rechts) des Tomographen; Ergometer mit Proband (unten)

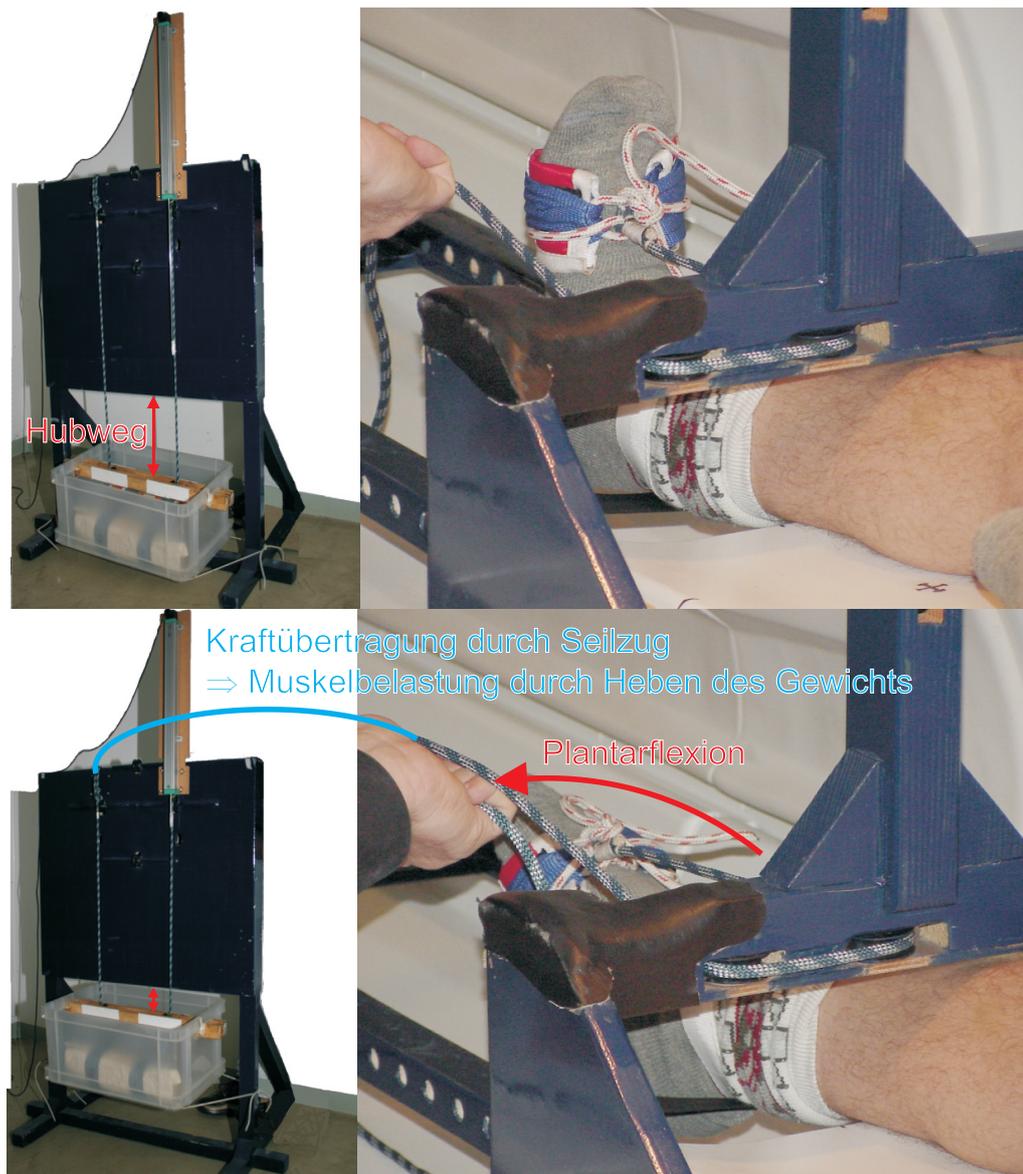


Abbildung 2.5 : **Detailliarstellung der Kraftübertragung unter Plantarflexion (rechts) und der Kraftaufzeichnung und Einrichtung zur Belastungssteuerung (links) im selbstgefertigten Ergometer aus nichtferromagnetischen Materialien zur Belastung innerhalb des MRT**

2.3.2.2 ^1H -NMR-Untersuchungen

Die protonenspektroskopischen Untersuchungen wurden am rechten M. gastrocnemius unter Ruhebedingungen mit einer zirkulären Spule (CP extremity, siehe Abb. 2.6) durchgeführt. Dazu wurden 256 Akquisitionen (einer Messdauer von 7:34 min entsprechend) aus einem im M. gastrocnemius platzierten 10 cm^3 großen Voxel ($4\text{ cm} \times 1,25\text{ cm} \times 2\text{ cm}$) summiert (siehe Abb. 2.7 und Abb. 2.8). Das Protonenspektrum der Muskulatur zeigt je 2 Resonanzen für extra- und intramyozelluläre Lipide (EMCL und IMCL) entsprechend der unterschiedlichen Alkylgruppen der Fettsäuren, einen Cholinpeak und eine Kreatindoublette. Kreatin dient in der Protonenspektroskopie als interner Standard und ermöglicht so den interindividuellen Vergleich der Lipidresonanzen [19].

Wie einleitend erwähnt, stehen insbesondere erhöhte intramuskuläre Lipidkonzentrationen im Zusammenhang mit Insulinresistenz und Hyperlipidämie [4, 24, 143]. Methodisch ist dabei zu beachten, dass die EMCL-Konzentration starken Schwankungen in Abhängigkeit von der Voxelplatzierung unterliegt (Einfluss durch subkutanes Fett / intermuskuläre Faszien) [127], was im Rahmen der eigenen Untersuchungen beachtet wurde (siehe Abb. 2.7). Vor der langen Ruhemessung wurde zum einen das Shim-Experiment analog zu den Phosphormessungen zur Homogenisierung des Magnetfeldes durchgeführt. Zum anderen erfolgte eine Optimierung der Parameter zur Unterdrückung des Wassersignals. Für alle ^1H -Messungen wurden STEAM-Sequenzen (*Stimulated Echo Acquisition Mode*) verwendet. Die untersuchungsrelevanten Messparameter sind in Tabelle B.2 in Anhang B aufgeführt.



Abbildung 2.6 : **Zur Versuchsdurchführung der protonenspektroskopischen Messungen verwendete zirkuläre Spule**

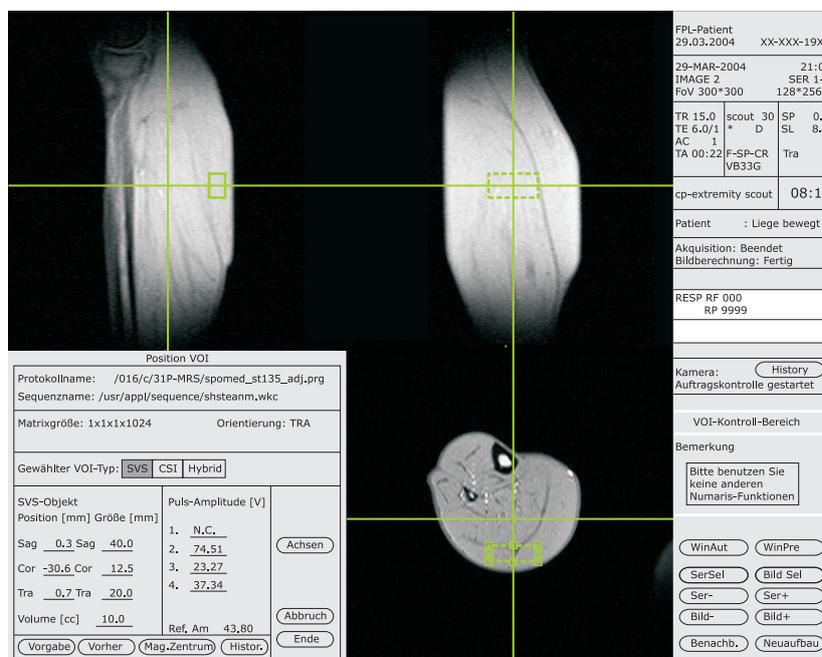


Abbildung 2.7 : **Bildschirmdarstellung mit drei MRT-Schnittbildern durch den Unterschenkel eines Probanden zur Ausrichtung und Platzierung des (Mess-)Voxels in der Wadenmuskulatur**

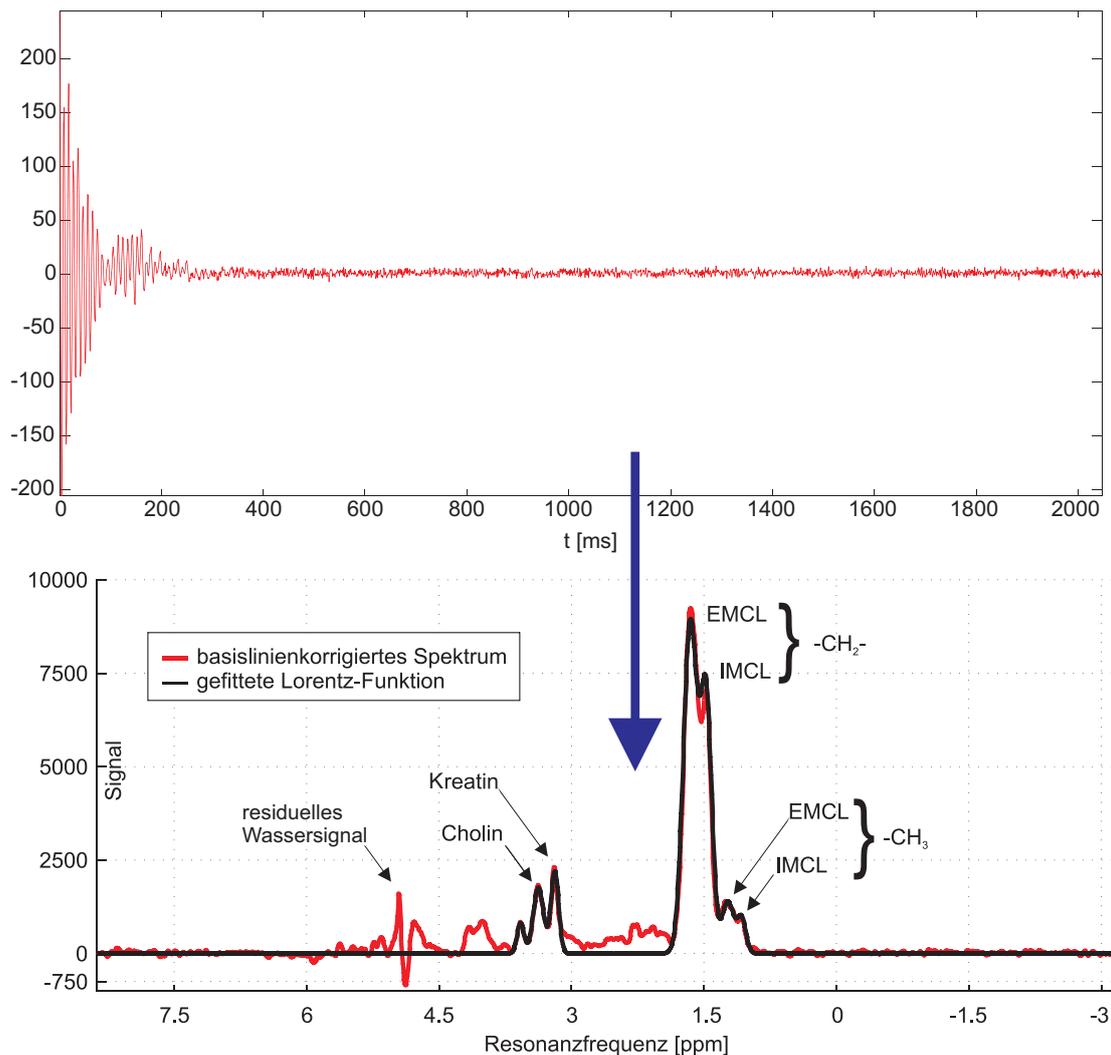


Abbildung 2.8 : **(Summen-)FID - kernspinspektroskopisches Rohsignal (oben) und Protonenspektrum der Muskulatur (unten) nach softwaregestützter Umwandlung**
 EMCL: extramyozelluläre Fette; IMCL: intramyozelluläre Fette; CH_2 -/ CH_3 -: Alkylgruppen der Fettsäuren

2.3.2.3 Auswertung der NMR-Spektren

Die computergestützte Umwandlung vom kernspinspektroskopischen Rohsignal zum Spektrum, die Auswertung der akquirierten Spektren und die Berechnung der Fitfunktion erfolgte mittels eigens erstellter Programme sowie der Software IGOR Pro Version 5.02 für Power Macintosh (Fa. Wave Metrics Inc., Lake Oswego, OR, USA). Die eigenen Programme und die unter IGOR verwendeten Makros zur Bearbeitung der Spektren stammen von Herrn P. Konstanczak [60, 81, 108]. Der genaue Auswertungsablauf ist in Anhang C jeweils für ^{31}P - und ^1H -Spektren beschrieben und graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse der Spektroskopie für die einzelnen Verbindungen werden im Folgenden als Konzentrationen bezeichnet, bleiben aber ohne physikalische Einheit.

Als Konzentrationsverhältnisse der Phosphorspektroskopie wurden PCr/P_i , $\text{PCr}/\beta\text{-ATP}$, PCr/PME , PCr/PDE , $\text{PCr}/\text{P}_{\text{total}}$, $\text{PME}/\beta\text{-ATP}$, $\text{PDE}/\beta\text{-ATP}$, $\beta\text{-ATP}/\text{P}_{\text{total}}$ und $\text{PDE}/\text{P}_{\text{total}}$ berechnet. $\beta\text{-ATP}$

wird dabei als interner Standard verwendet, da die Konzentration im menschlichen Muskel nahezu konstant ist [62]. Der Quotient aus den einzelnen Metaboliten und P_{total} gibt den jeweiligen relativen Anteil am Gesamtphosphatpool an.

Aus den Belastungs- und Nachbelastungsspektren wurden die maximale PCr-Depletion (*PCr-Breakdown*) und die maximale PCr-Konzentrationszunahme (*PCr-Recovery*) wie folgt berechnet: höchster Abfall bzw. Anstieg der PCr-Konzentration zwischen 2 Spektren in Prozent des Ausgangswertes. Als Ausgangswert wurden dafür die Konzentrationen aus dem Ruhespektrum, das direkt vor der jeweiligen Belastung gemessen wurde, auf 100% gesetzt. Die Werte wurden analog auch für P_i , β -ATP, PME, PDE und P_{total} berechnet.

Der pH-Wert wird nach der Formel $pH = 6,75 + \log \frac{\delta - 3,27}{5,69 - \delta}$

berechnet, wobei δ dem Frequenzabstand zwischen P_i und PCr entspricht [122].

Für die Protonenspektroskopie wurden die Konzentrationsverhältnisse von intra- und extramyozellulären Fetten (IMCL/EMCL) berechnet und auf die Kreatinkonzentration als internem Standard bezogen.

Zusammenfassend ist in Abbildung 2.9 schematisch die Anordnung der Geräte zur Erzeugung, Akquisition und Auswertung eines Kernresonanzspektrums der Oberschenkelmuskulatur dargestellt.

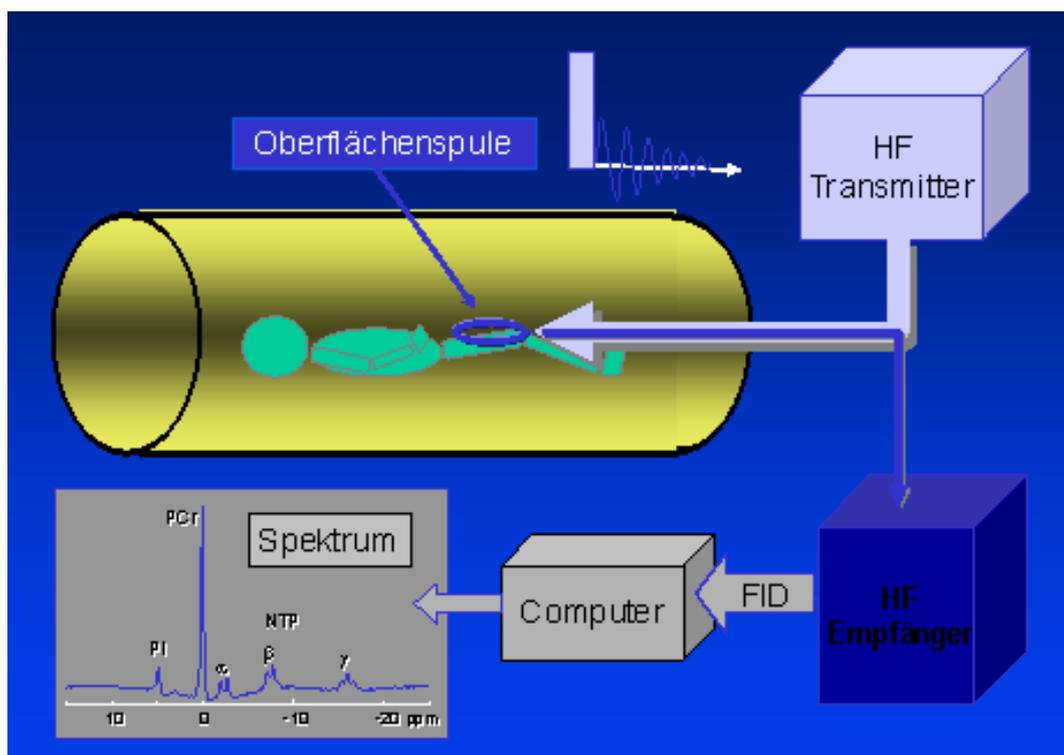


Abbildung 2.9 : **Zur Erzeugung und Auswertung des Kernresonanzspektrums erforderliche Geräte** (modifiziert nach Howe 2002 aus [122]) Die Oberflächenspule dient der Anregung der Moleküle im Muskel und der Ableitung des Resonanzsignals. Das Resonanzsignal wird als FID aufgezeichnet und softwaregestützt in das Resonanzspektrum überführt.

2.3.3 Fahrradergometer-Tests

Alle Ergometer-Tests wurden mit dem Newton Ergolab (Fa. Lode BV, Groningen, Niederlande) durchgeführt. Die stufenweise ansteigende Spiroergometrie dient der Erfassung der aeroben Kapazität. Wegen der verminderten Belastbarkeit der Patienten wurde der Test in Abänderung zum bundeseinheitlichen Schema für Normalpersonen [34, 102, 123] drehzahlunabhängig beginnend mit 0 Watt [153] und stufenweiser Steigerung um 25 Watt jede Minute bis zur subjektiven Erschöpfung als Rampentest durchgeführt. Die Trittfrequenz wurde mit 60 - 80 Umdrehungen pro Minute vorgegeben. Die spirometrischen Daten wurden mittels Oxycon Beta (Fa. Mijnhardt BV, Bunnik, Niederlande) kontinuierlich (*breath by breath*) nach vorheriger Gas- und Volumeneichung aufgezeichnet. Der Versuchsaufbau ist beispielhaft in Abbildung 2.10 gezeigt.



Abbildung 2.10 : **Fahrradspiroergometrie als Rampentest** (beginnend mit 0 Watt und Steigerung um 25 Watt pro Minute bis zur subjektiven Erschöpfung)

In den letzten 15 s jeder Belastungsstufe wurde das subjektive Belastungsempfinden nach der Borg-Skala (Skalierung 6 - 20) [22] und die Herzfrequenz (HF) über ein Herzfrequenzmessgerät (Fa. Polar Electro, Kempele, Finnland) erfasst. Des Weiteren erfolgte die Entnahme von 20 μl kapillarisierten Blutes aus dem hyperämisierten Ohrläppchen mit einer Glaskapillare (Fa. Prüfgerätewerk Medingen GmbH, Dresden) zur Bestimmung der Blutlaktatkonzentration (BLK). Das Belastungsempfinden wurde bis zum Abbruchzeitpunkt, die Spirometrie bis zur fünften Nachbelastungsminute durchgeführt. Alle weiteren Messungen erfolgten auf jeder Belastungsstufe, zum Abbruchzeitpunkt und in der ersten, dritten, fünften und zehnten Nachbelastungsminute. Die Bestimmung der BLK erfolgte enzymatisch-amprometrisch (Gerät: Enzym Chemische Analysator (ECA) PD10; VEB Prüfgerätewerk Medingen GmbH, Dresden).

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Software Statistica Version 6.0 (Fa. StatSoft, Tulsa, USA) unter Anleitung und nach Beratung durch das Institut für medizinische Statistik der Charité durchgeführt. Unterschiede bezüglich der erhobenen Parameter zwischen Einzelgruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf statistische Signifikanz geprüft, für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse verwendet. Zur Beurteilung statistischer Unterschiede im aeroben Belastungstest wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung und post-hoc Bonferroni Test herangezogen. Mittels linearer Regression haben wir die Korrelationskoeffizienten für die Beziehung zwischen den ermittelten kernspinspektroskopischen Quotienten und den klinischen sowie leistungsphysiologischen Parametern berechnet.

Dargestellt werden Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung oder Mediane und die jeweiligen Quartile, bzw. Minima und Maxima. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt, $p < 0,01$ für hochsignifikante Ergebnisse. Der lineare Zusammenhang zwischen zwei Parametern wurde ab 0,5 als moderat, ab 0,7 als hoch eingestuft.

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden zuerst die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen präsentiert. Im Anschluss sind die kernspinspektroskopischen Daten, sofern erhoben im Gruppenvergleich, sowie die leistungsdiagnostischen Kenngrößen dargestellt. Abschließend werden die einzelnen Ergebnisse auf korrelative Zusammenhänge geprüft.

3.1 Ergebnisse der genetischen Untersuchung

Bei allen bis auf zwei Probanden mit dem Phänotyp einer FPLD wurde eine der folgenden Mutationen nachgewiesen: R482W, R482Q oder R582H im *LMNA*-Gen oder *PPAR* γ -Rezeptor-Mutation C190S (siehe Tab. 3.1). Die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen exemplarisch das Ergebnis bei vorliegender Mutation R482W. Durch den Austausch des Nukleotids C durch T resultiert hier eine Änderung der Sequenz von CGG in TGG. Auf Ebene der Aminosäuren bedeutet dies, dass statt eines Arginins wie beim Wildtyp, bei den hier identifizierten Patienten ein Tryptophan zu finden ist.

In Abbildung 3.3 sind die Stammbäume der 9 Familien dargestellt. Alle Personen mit gesicherter Mutation im *LMNA*-Gen sind rot, die anderen weiß dargestellt. Untersuchte Patienten sind zusätzlich schwarz umrandet. Patientin C-IV-2 musste wegen eines Herzschrittmachers von der Untersuchung ausgeschlossen werden.

Tabelle 3.1 : **Aufstellung der FPLD-Patienten nach Stammbäumen und jeweils nachgewiesene Mutationen**

Patienten H-I-1 und H-II-1 ohne Direktnachweis einer Mutation.

Stammbaum	Mutation
A-III-2	<i>LMNA</i> R482W
A-III-3	<i>LMNA</i> R482W
A-III-5	<i>LMNA</i> R482W
A-III-19	<i>LMNA</i> R482W
B-III-1	<i>LMNA</i> R482Q
B-II-2	<i>LMNA</i> R482Q
C-III-3	<i>LMNA</i> R482Q
D-II-1	<i>LMNA</i> R482Q
E-II-1	<i>LMNA</i> R482Q
F-I-2	<i>LMNA</i> R582H
F-II-1	<i>LMNA</i> R582H
F-II-2	<i>LMNA</i> R582H
G-I-1	<i>PPARG</i> C190S
G-II-1	<i>PPARG</i> C190S
G-II-2	<i>PPARG</i> C190S
H-I-1	-
H-II-1	-
I-II-3	<i>LMNA</i> R482Q
I-III-9	<i>LMNA</i> R482Q

Abbildung 3.1 : **Analyse der Mutation im Codon 482 mittels ABI310 Sequenzierer.**

Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz der in verschiedenen Farben illustrierten Basen dargestellt. In der unteren Reihe ist die Sequenz mit der Mutation C → T dargestellt. Y steht für die nicht mögliche Basenzuordnung, da hier eine Heterozygotie vorliegt.

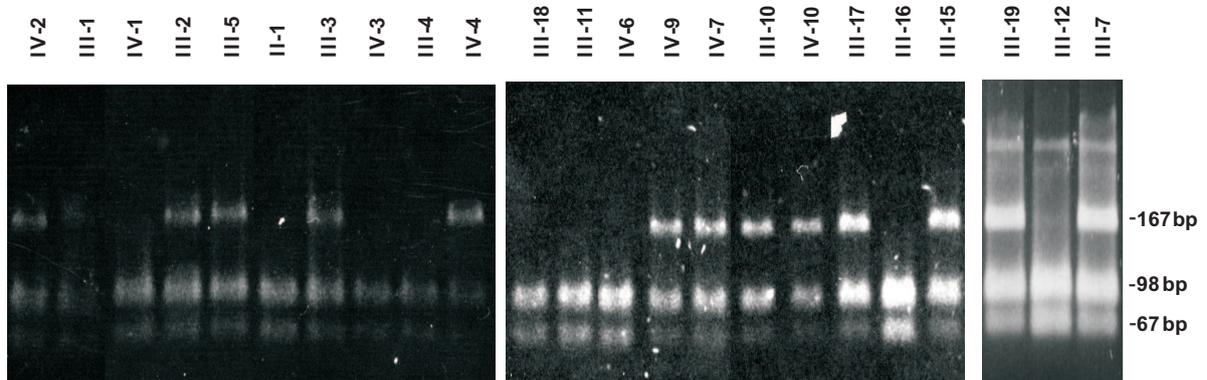
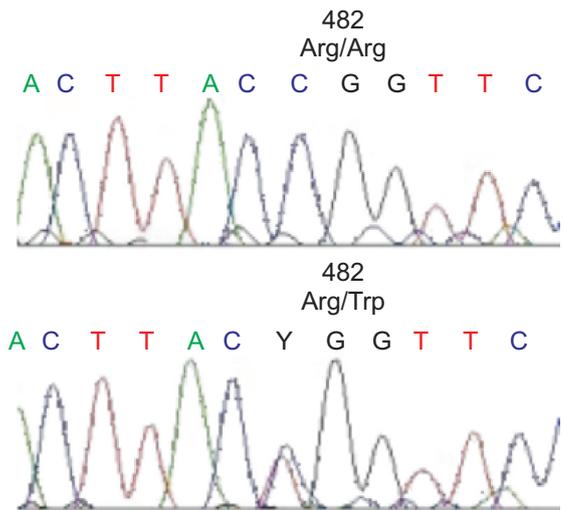


Abbildung 3.2 : **Gelelektrophoretischer Nachweis der R482W Mutation im Exon 8 der Familie A** (siehe Stammbaum in Abb. 3.3) durch Generierung einer hierfür etablierten PCR-Reaktion mit anschließendem Verdau mit dem Restriktionsenzym *HpaI* und Auftrennung im Agarosegel. Die 167 bp Bande entspricht dem heterozygoten Auftreten der R482W Mutation infolge einer fehlenden Spaltungsstelle für das Restriktionsenzym *HpaI* bei den Probanden IV-2, III-2, III-5, III-3, IV-4, IV-9, IV-7, III-10, IV-10, III-17, III-15, III-19 und III-7. Im Gegensatz hierzu weisen die anderen untersuchten Probanden keine Mutation auf. Normalerweise generiert diese Reaktion Banden von 98 und 67 Basenpaaren.

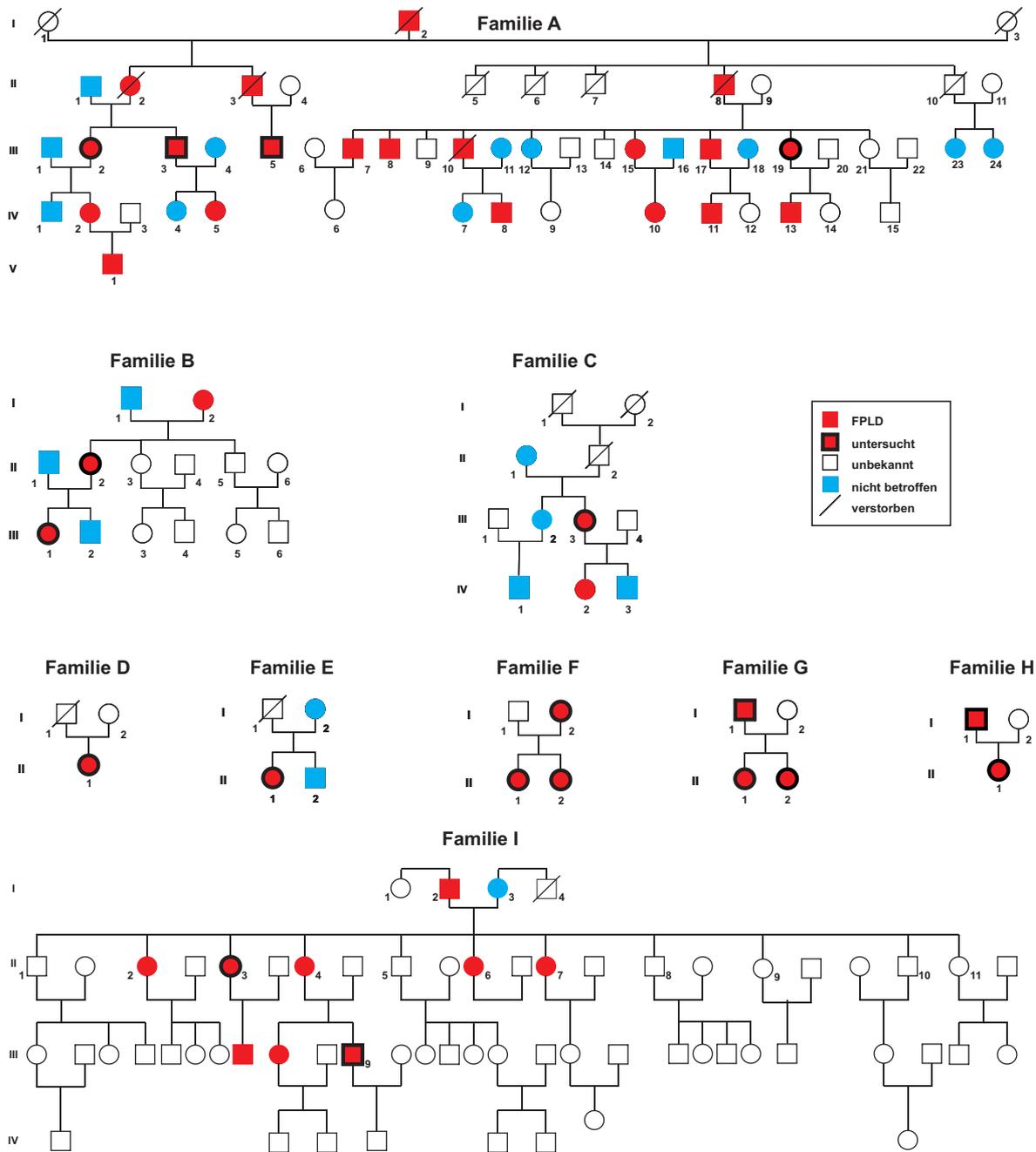


Abbildung 3.3 : **Stammbäume der 9 untersuchten Familien**

Die Patienten H-I-1 und H-II-1 sind phänotypisch FPLD, aber bei ihnen konnte bislang keine Mutation nachgewiesen werden.

3.2 Kernspinspektroskopische Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten werden zuerst die Ergebnisse der phosphorspektroskopischen Ruhemessungen, anschließend des fünfminütigen aeroben Belastungstests sowie des stufenweise ansteigenden Ausbelastungstests und abschließend der protonenspektroskopischen Messungen dargestellt.

3.2.1 Ergebnisse der ^{31}P -Ruhemessungen

In Abbildung 3.4 sind typische Resonanzspektren des M. biceps femoris einer FPLD-Patientin, eines Probanden aus der Kontrollgruppe und eines Sportlers gegenübergestellt. Im Unterschied zu den gesunden Vergleichsprobanden fallen in den Spektren der FPLD-Patienten erhöhte PDE-Konzentrationen auf.

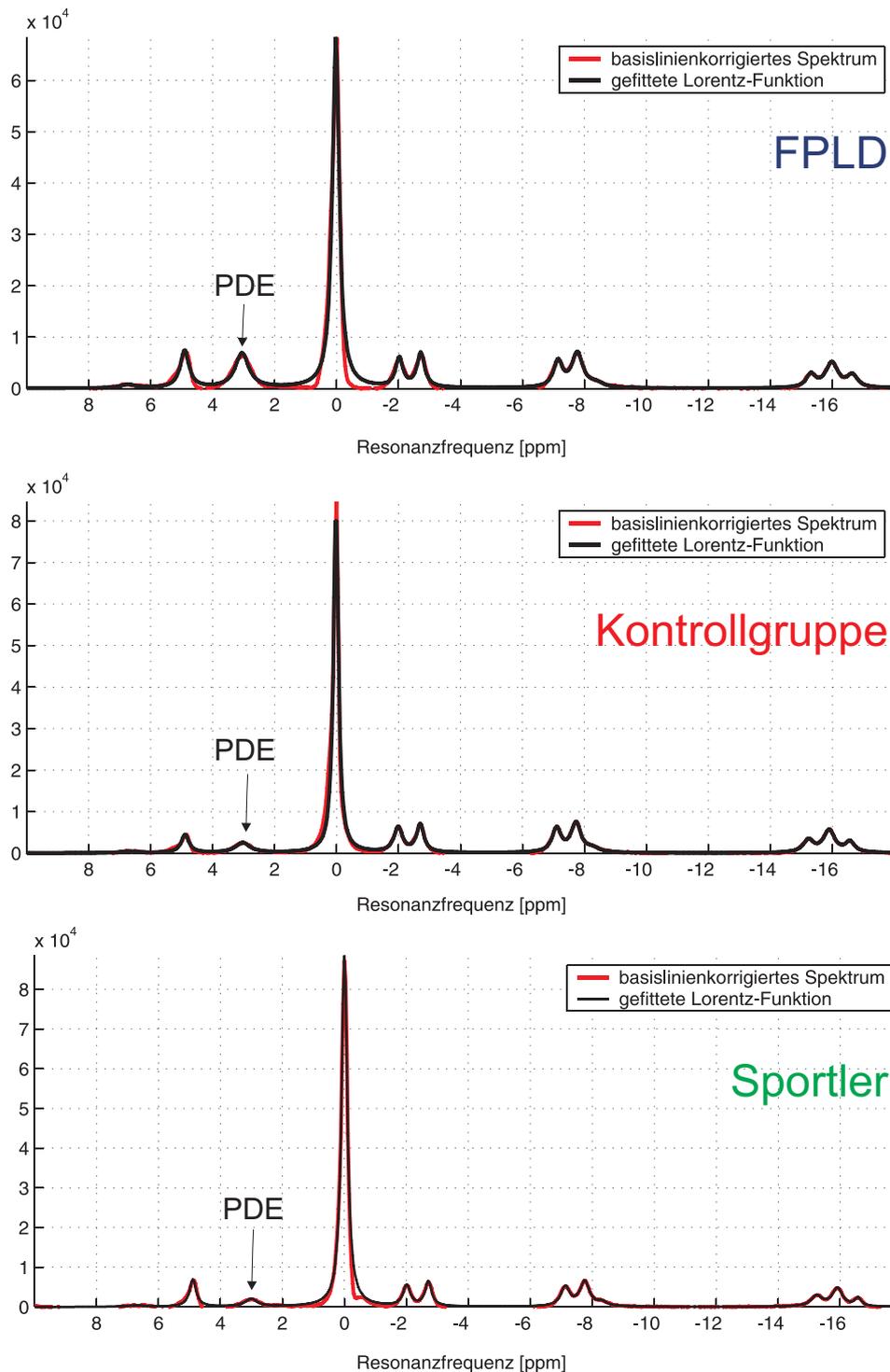


Abbildung 3.4 : **Ruhespektrum des M. biceps femoris einer FPLD-Patientin (oben), eines Kontrollprobanden (Mitte) und eines Sportlers (unten).**

Im Unterschied zu den gesunden Vergleichsprobanden fallen in den Spektren der FPLD-Patienten erhöhte Konzentrationen der Phosphodiester (PDE) auf.

Im Folgenden werden die Konzentrationsverhältnisse der energiereichen Phosphate sowie die pH-Werte der drei Muskeln unter Ruhebedingungen dargestellt. Die FPLD-Patienten wiesen gegenüber beiden anderen Gruppen für alle drei Muskeln hochsignifikant erhöhte PDE-Konzentrationen im Verhältnis zum Gesamtpool der energiereichen Phosphate auf (PDE/P_{total} für alle 3 Muskeln $p < 0,001$; siehe Abb. 3.5). Darüber hinaus fanden wir für das Verhältnis von PCr/PDE (Abb. 3.6) und von $PDE/\beta\text{-ATP}$ (Abb. 3.7) signifikante Gruppenunterschiede. Während Kontrollprobanden und Sportler keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen zeigten, lagen die der FPLD-Gruppe hochsignifikant niedriger (PCr/PDE für alle 3 Muskeln $p < 0,001$) bzw. höher ($PDE/\beta\text{-ATP}$ für alle 3 Muskeln $p < 0,001$).

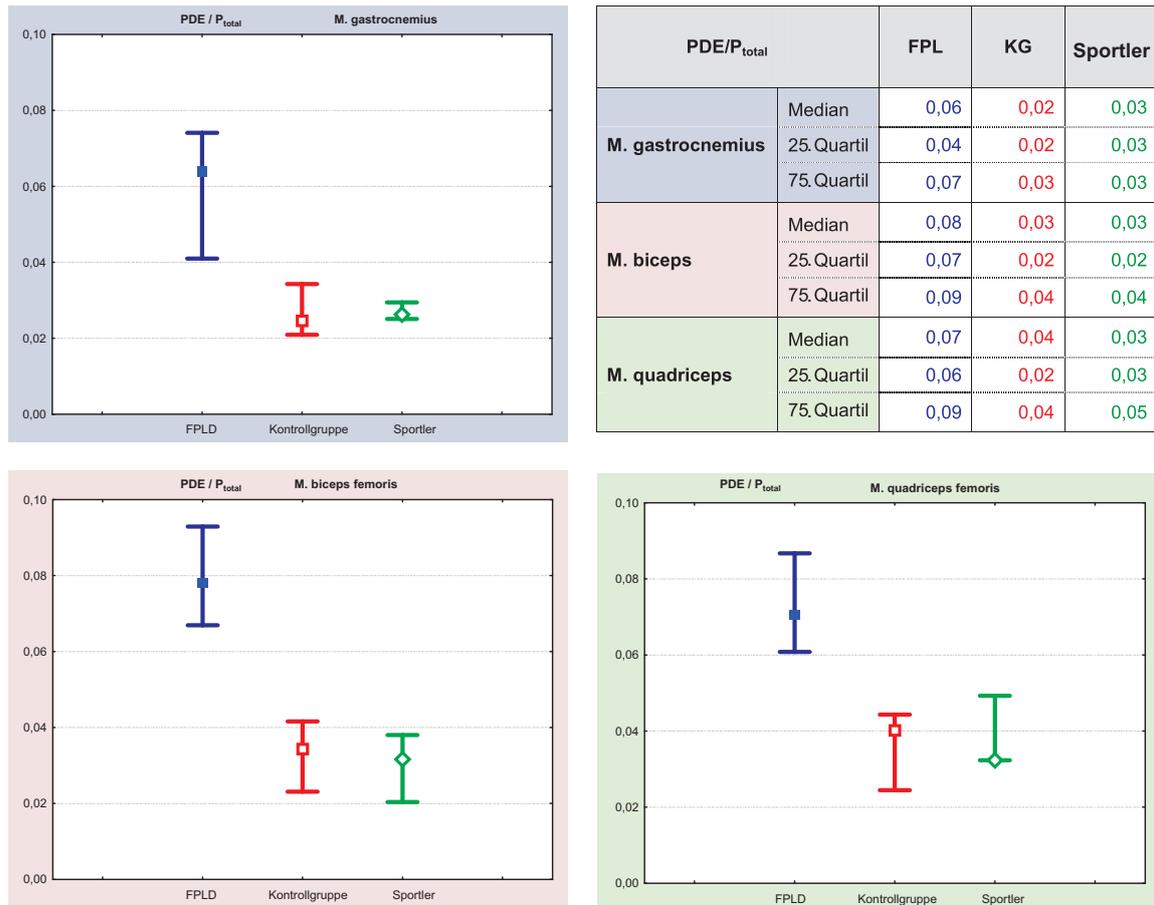


Abbildung 3.5 : **Ergebnisse der Ruhemessungen für den Quotienten PDE/P_{total}**

Die dargestellten Mediane und Quartile zeigen für die FPLD-Patienten signifikant erhöhte Phosphodiester-Konzentrationen (PDE) bezogen auf den Gesamtpool der energiereichen Phosphate gegenüber Kontrollprobanden (KG) und Sportlern in allen drei Muskeln (Kruskal-Wallis ANOVA für alle drei Muskeln $p < 0,001$ FPLD vs. Kontrollprobanden und Sportler).

Für die übrigen Konzentrationsverhältnisse fanden wir keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen FPLD-Patienten und Kontrollprobanden. Die Schnellkraftsportler zeigen signifikant höhere Verhältnisse von PCr/P_{total} im M. biceps femoris ($p < 0,01$) und $PCr/\beta\text{-ATP}$ im M. biceps femoris ($p < 0,01$) und M. quadriceps femoris ($p < 0,01$) gegenüber beiden anderen Gruppen (siehe Tab. 3.2). Die pH-Werte waren in allen drei Muskeln in Ruhe ohne signifikante Gruppenunterschiede. Insgesamt zeigten alle Quotienten große Streubreiten.

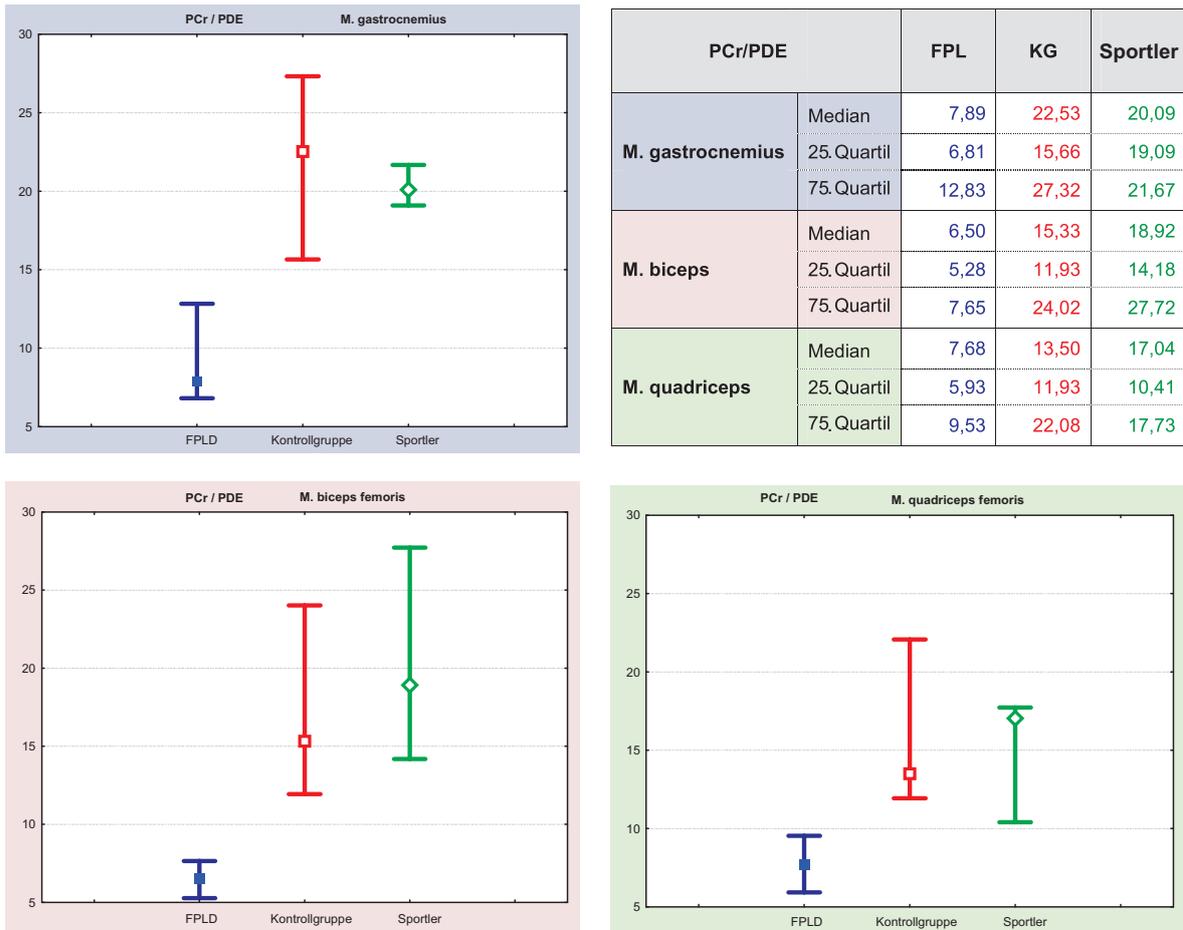


Abbildung 3.6 : **Ergebnisse der Ruhemessungen für den Quotienten PCr/PDE**

Dargestellt sind Mediane und die jeweiligen Quartile. Die FPLD-Patienten weisen signifikant erhöhte Phosphodiester-Konzentrationen (PDE) im Verhältnis zu den Phosphokreatin-Konzentrationen gegenüber Kontrollprobanden (KG) und Sportlern in allen drei Muskeln auf. Daraus resultieren signifikant niedrigere PCr/PDE-Quotienten für die FPLD-Gruppe (Kruskal-Wallis ANOVA für alle drei Muskeln $p < 0,001$ FPLD vs. Kontrollprobanden und Sportler).

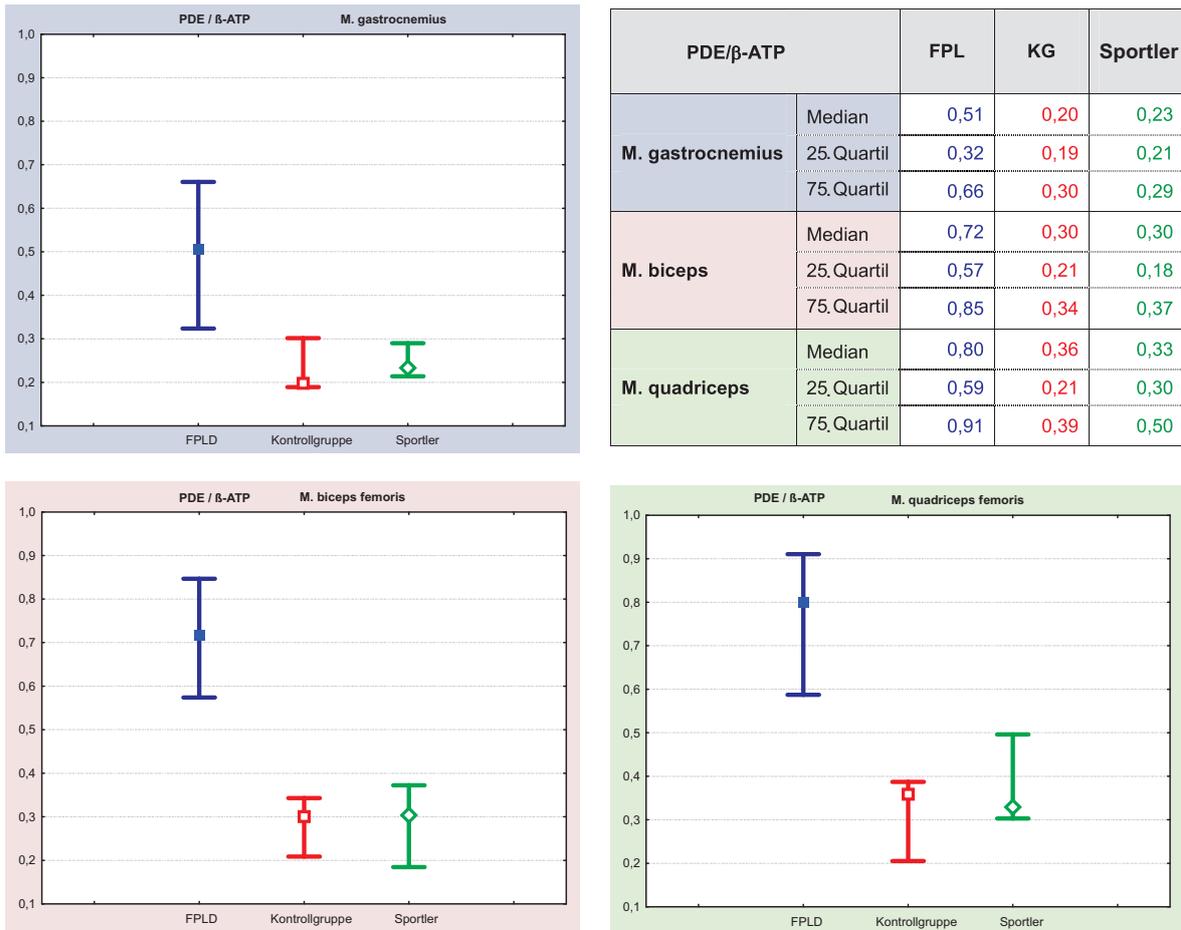


Abbildung 3.7 : **Ergebnisse der Ruhemessungen für den Quotienten PDE/β-ATP**

Die dargestellten Mediane und Quartile zeigen für die FPLD-Patienten signifikant erhöhte Phosphodiester-Konzentrationen (PDE) im Verhältnis zu den β-ATP-Konzentrationen gegenüber Kontrollprobanden (KG) und Sportlern in allen drei Muskeln (Kruskal-Wallis ANOVA für alle drei Muskeln p<0,001 FPLD vs. Kontrollprobanden und Sportler).

Tabelle 3.2 : **Ruhequotienten aus PCr/P_i, PCr/β-ATP, PCr/P_{total} und β-ATP/P_{total} als Kennziffern für die mitochondriale Funktion und das oxidative Potential der 3 Muskeln**
Sportler weisen im M. biceps und quadriceps femoris höhere PCr/β-ATP Quotienten und im M. biceps höhere PCr/P_{total} Quotienten gegenüber Kontrollprobanden und FPLD-Patienten auf. Darüber hinaus konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (Kruskal-Wallis ANOVA im M. biceps und M. quadriceps für PCr/β-ATP p<0,01 Sportler vs. Kontrollprobanden und FPLD sowie im M. biceps für PCr/P_{total} p<0,01 Sportler vs. Kontrollprobanden und FPLD).

Quotient	Gruppe	M. gastrocnemius			M. biceps femoris			M. quadriceps femoris		
		Median	25. Quartil	75. Quartil	Median	25. Quartil	75. Quartil	Median	25. Quartil	75. Quartil
PCr/P _i	FPLD	7.16	6.42	8.35	7.75	6.98	9.77	8.60	7.23	9.48
	Kontrollgruppe	8.13	7.29	9.16	8.69	8.03	9.78	8.44	8.04	9.48
	Sportler	8.56	8.21	9.21	9.48	8.95	10.88	9.15	8.55	10.13
PCr/β-ATP	FPLD	4.46	4.08	4.71	4.54	4.31	4.82	5.47	4.89	6.09
	Kontrollgruppe	4.58	4.26	4.79	4.29	4.16	4.73	4.65	4.15	4.89
	Sportler	4.92	4.21	5.20	5.37	5.12	5.58	5.16	5.16	5.44
PCr/P _{total}	FPLD	0.51	0.48	0.52	0.50	0.49	0.52	0.54	0.52	0.55
	Kontrollgruppe	0.52	0.50	0.54	0.52	0.50	0.54	0.54	0.52	0.54
	Sportler	0.54	0.53	0.55	0.57	0.55	0.58	0.54	0.54	0.55
β-ATP/P _{total}	FPLD	0.12	0.11	0.13	0.11	0.11	0.12	0.09	0.90	0.11
	Kontrollgruppe	0.11	0.11	0.12	0.12	0.11	0.12	0.11	0.11	0.12
	Sportler	0.11	0.10	0.12	0.11	0.10	0.11	0.10	0.10	0.11

3.2.2 Ergebnisse der ³¹P-Belastungsmessungen

Die kernspinspektroskopischen Belastungsmessungen der Wadenmuskulatur innerhalb des Tomographen konnten mit 15 der 19 Patienten durchgeführt werden. Zwei Patienten mit bekannter stabiler Angina pectoris wurden von den Messungen ausgeschlossen; bei zwei weiteren Patientinnen konnten die Spektren wegen eines technischen Defektes im Tomographen nicht aufgezeichnet werden.

Die Ergebnisse des aeroben dynamischen Belastungstests, der mit 30% der zuvor ermittelten isometrischen Maximalkraft der Plantarflexion durchgeführt wurde, werden im Folgenden analog zu den Ruhemessungen im Gruppenvergleich mit den Kontrollprobanden und Sportlern dargestellt.

Für den stufenförmig ansteigenden Ausbelastungstest fehlen Vergleichsdaten der Kontrollprobanden und Sportler, so dass hier eine rein deskriptive Darstellung für die Gruppe der FPLD-Patienten gewählt wurde. Mit den Kontrollprobanden und Schnellkraftsportlern wurde ein anaerob-laktazider Ausbelastungstest unter Verwendung einer Blutsperre am Oberschenkel durchgeführt. Diese Belastungsform hat sich in Vorversuchen für die Patienten als ungeeignet herausgestellt, weil die Blutsperre schmerzbedingt nicht toleriert wurde. Diese Beobachtung ist in dem Kontext interessant, dass die Patienten Myalgien unklarer Genese angeben, was dem Beschwerdebild der FPLD als typisch zugerechnet werden kann.

3.2.2.1 Aerober 5-Minuten-Belastungstest

Abbildung 3.8 zeigt eine Gesamtdarstellung der Belastungsspektren einer FPLD-Patientin nach einer (B1), drei (B3) und der letzten Minute (B5) des fünfminütigen Ausdauerests mit 30% der Maximalkraft, sowie fünf Spektren aus der zehnmütigen Nachbelastungsphase (p30: 30s nach Belastungsende; P1, P3, P5 und P10: 1., 3., 5. und 10. Nachbelastungsminute). Als Referenz ist im Vordergrund das 30-Sekunden-Ruhespektrum derselben Probandin, das direkt vor der Belastung akquiriert wurde, mit dargestellt.

Analog dazu zeigen die Abbildungen 3.9 und 3.10 die Gesamtdarstellungen der Spektren aus dem aeroben Belastungstest für einen Kontrollprobanden und einen Sportler. Die Ergebnisse des aeroben Belastungstests sind im Gruppenvergleich in Tabelle 3.3 zusammengefasst dargestellt.

Für alle drei Gruppen waren unter Belastung ein deutlicher Abfall der Phosphokreatinkonzentrationen und ein korrespondierender Anstieg der Konzentrationen des anorganischen Phosphates festzustellen. In der Erholungsphase kehrten die PCr-Konzentrationen in allen drei Gruppen wieder nahezu vollständig auf das Ausgangsniveau zurück. Die Konzentrationen des anorganischen Phosphates sanken bei allen Probanden deutlich unter das Ausgangsniveau. Das durchschnittliche Minimum wurde in der dritten Nachbelastungsminute erreicht. Binnen der ersten zehn Nachbelastungsminuten kehrte die P_i -Konzentration bei keinem Probanden auf das Ausgangsniveau zurück; durchschnittlich lagen die Werte bei 65% bis 71%. Insgesamt waren die Belastungsreaktion und die Belastungskinetik in allen drei Gruppen vergleichbar und sowohl für den PCr- als auch den P_i -Verlauf ohne signifikante Gruppenunterschiede, mit Ausnahme der Schnellkraftsportler mit signifikant höheren Konzentrationen anorganischen Phosphates zwischen der dritten und fünften Belastungsminute ($p=0,04$). In den Abbildungen 3.11 bis 3.13 sind die prozentualen Verläufe von PCr und P_i für alle drei Gruppen und die jeweils resultierenden Quotienten dargestellt. Für die Konzentrationsverläufe der übrigen Metabolite ließen sich keine signifikant unterschiedlichen Verläufe nachweisen.

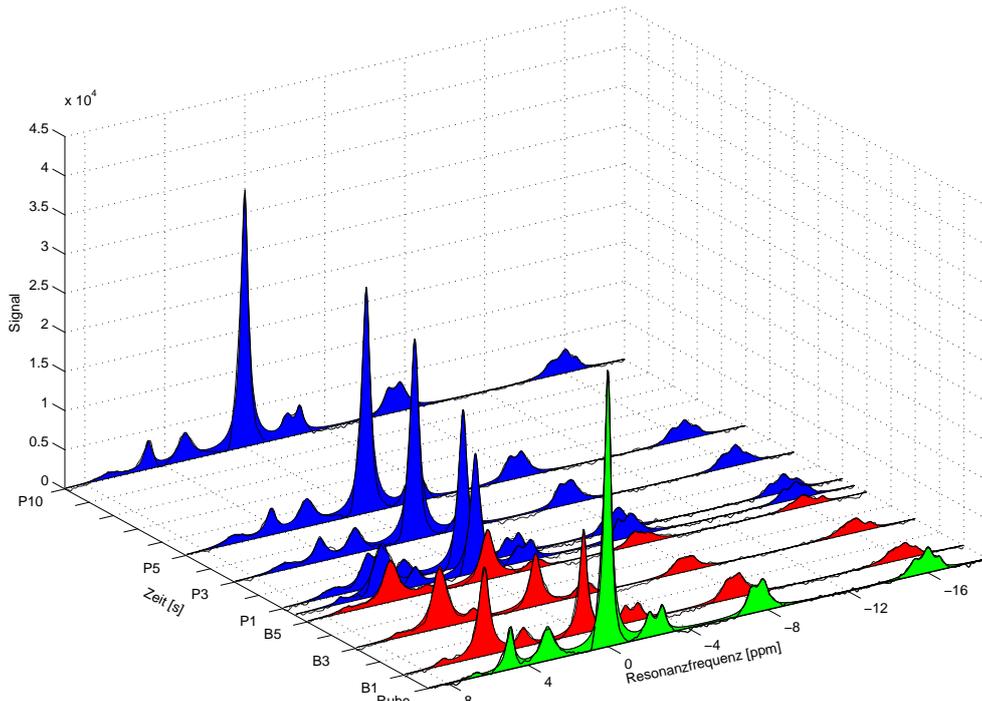


Abbildung 3.8 : **Summendarstellung der Ruhe- (grün), Belastungs- (rot) und Nachbelastungs-**spektren (blau) einer FPLD-Patientin aus dem aeroben Belastungstest

Unter Belastung zeigt sich ein Absinken der PCr- und PDE-Konzentrationen sowie ein Anstieg beider Metabolite in der Nachbelastungsphase, während für die P_i -Konzentration ein gegensätzlicher Verlauf zu verzeichnen ist.

Eckelmann, 1.02.2004

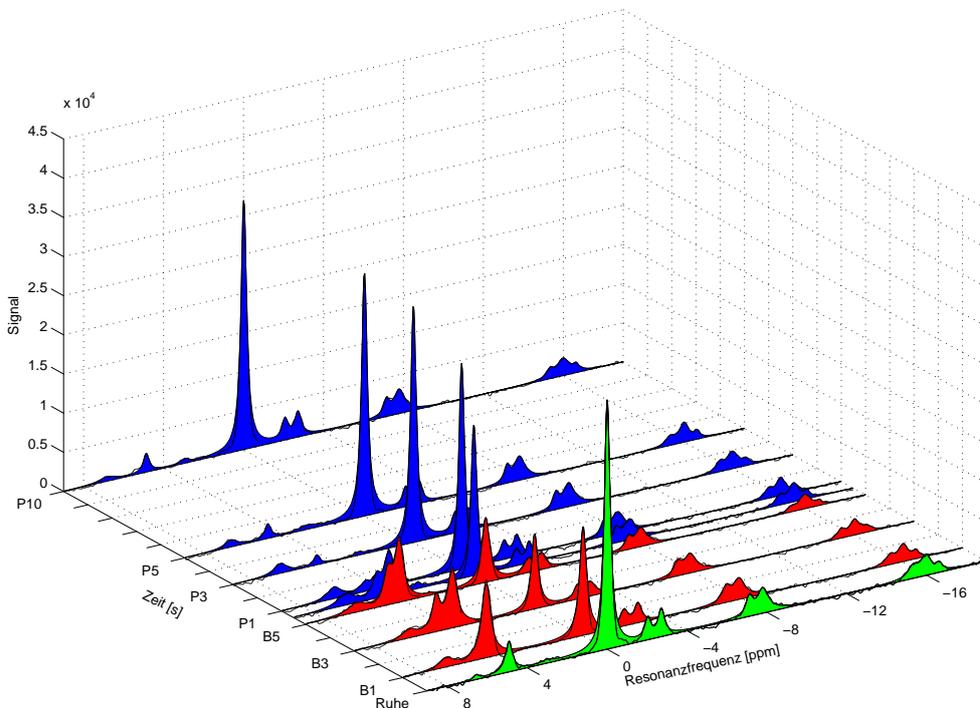


Abbildung 3.9 : **Summendarstellung der Ruhe- (grün), Belastungs- (rot) und Nachbelastungs-**spektren (blau) eines Kontrollprobanden aus dem aeroben Belastungstest

Unter Belastung zeigt sich ein Absinken der PCr- und PDE-Konzentrationen sowie ein Anstieg beider Metabolite in der Nachbelastungsphase, während für die P_i -Konzentration ein gegensätzlicher Verlauf zu verzeichnen ist.

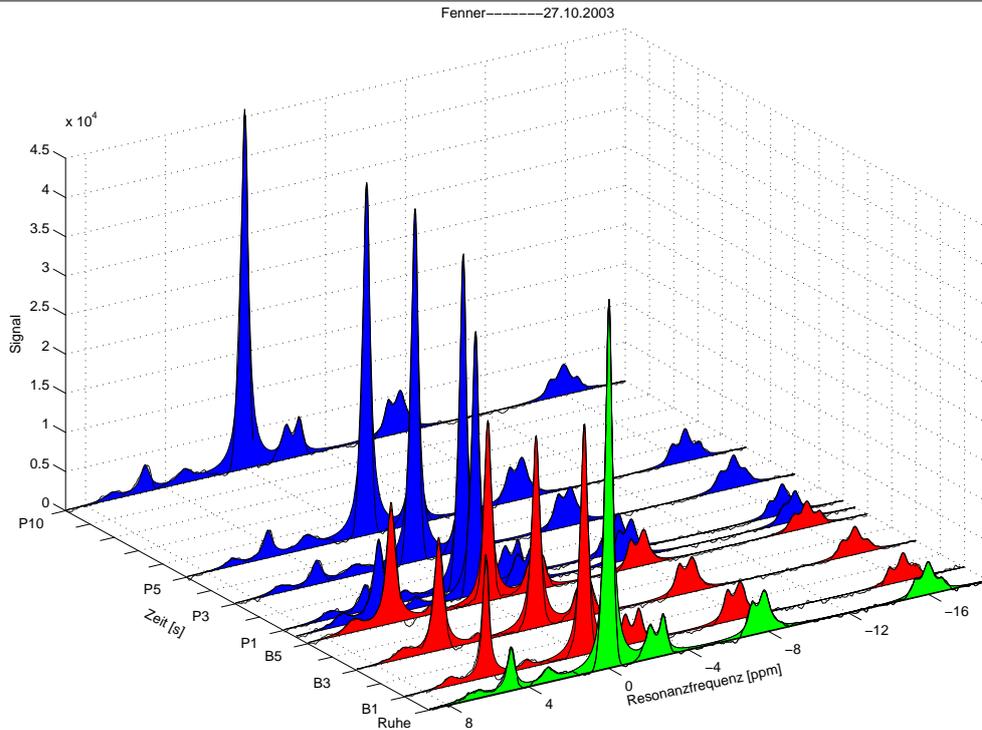


Abbildung 3.10 : **Summendarstellung der Ruhe- (grün), Belastungs- (rot) und Nachbelastungspektren (blau) eines Sportlers aus dem aeroben Test**

Unter Belastung zeigt sich ein Absinken der PCr- und PDE-Konzentrationen sowie ein Anstieg beider Metabolite in der Nachbelastungsphase, während für die P_i -Konzentration ein gegensätzlicher Verlauf zu verzeichnen ist.)

Tabelle 3.3 : **Ergebnisse des aeroben Belastungstests im Gruppenvergleich**

Bezüglich der dargestellten Parameter PCr und P_i , bzw. der daraus resultierenden Quotienten sowie des pH-Wertes ist die Belastungskinetik ohne signifikante Gruppenunterschiede (Ausnahme: maximale P_i -Konzentration signifikant höher in der Gruppe der Sportler). Für die Kennziffern und Quotienten, die den Verlauf der PDE-Konzentration charakterisieren zeigen die FPLD-Patienten signifikant unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. (Q25: 25. Quartil; Q75: 75. Quartil)

	FPLD Patienten			Kontrollgruppe			Sportler		
	Median	Q25	Q75	Median	Q25	Q75	Median	Q25	Q75
min PCr-Konz. [%]	49,9	39,5	60,3	39,9	28,2	51,6	46,2	26,8	65,6
max PCr-Konz. [%]	98,9	96,1	101,8	94,4	91,2	97,6	95,8	90,4	101,1
max P_i -Konz. [%]	332,9	241,2	424,7	354,4	292,6	416,2	450,1	272,5	627,8
min P_i -Konz. [%]	57,1	46,0	68,1	47,4	34,5	60,3	56,1	34,8	77,5
max PCr Breakdown [%]	42,0	33,8	50,3	49,8	40,5	59,1	43,8	28,4	59,3
max PCr Recovery [%]	20,2	19,6	20,8	20,9	20,2	21,6	21,1	19,9	22,2
max P_i Anstieg [%]	200,6	147,7	253,5	254,4	192,6	316,2	204,1	101,6	306,5
max PCr/ P_i	13,91	11,16	16,65	15,96	13,47	18,45	14,93	9,61	20,25
min PCr/ P_i	1,46	0,88	2,03	0,96	0,29	1,63	1,48	0,37	2,60
min pH	6,98	6,92	7,04	6,99	6,91	7,06	6,95	6,73	7,16
max PDE [%]	90,4	75,4	105,5	109,4	82,4	136,3	111,7	65,0	158,5
min PDE [%]	51,3	35,9	66,7	30,2	11,6	48,7	22,8	8,0	53,7
max PCr/PDE	15,2	-12,3	42,7	71,9	38,9	104,9	72,8	54,0	91,6
min PCr/PDE	8,6	-7,1	24,2	21,9	18,4	25,5	26,4	17,8	35,0

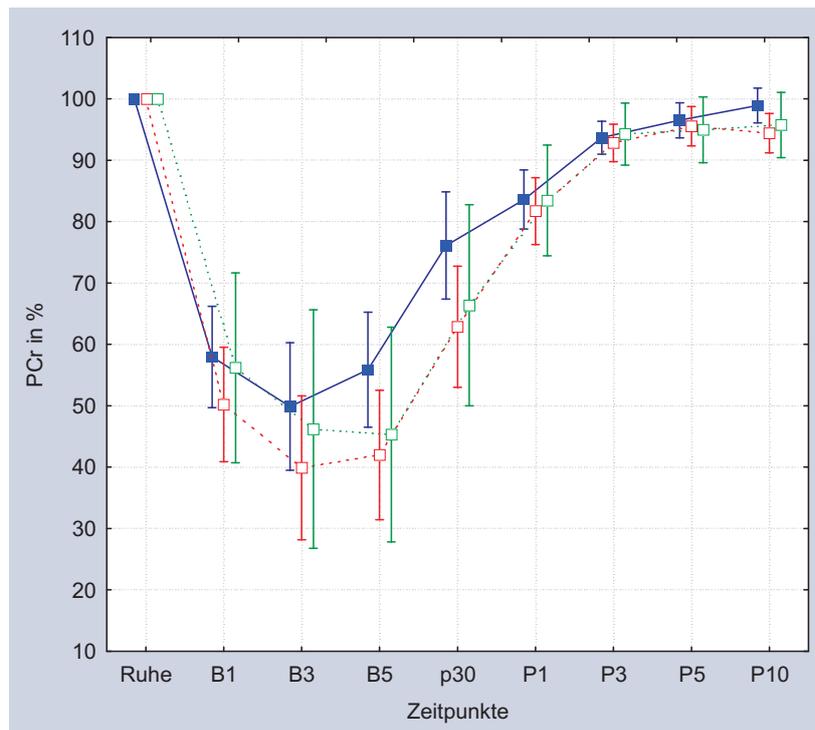


Abbildung 3.11 : **Prozentualer PCr-Verlauf des aeroben Belastungstests im Gruppenvergleich**

Dargestellt sind Mediane und die jeweiligen Quartile; FPLD-Patienten sind blau, Kontrollprobanden rot und Sportler grün dargestellt. In der Belastungs- (B1-B5) und Erholungsphase (p30-P10) zeigen sich in allen 3 Gruppen vergleichbare Veränderungen der PCr-Konzentrationen ohne signifikanten Gruppenunterschiede.

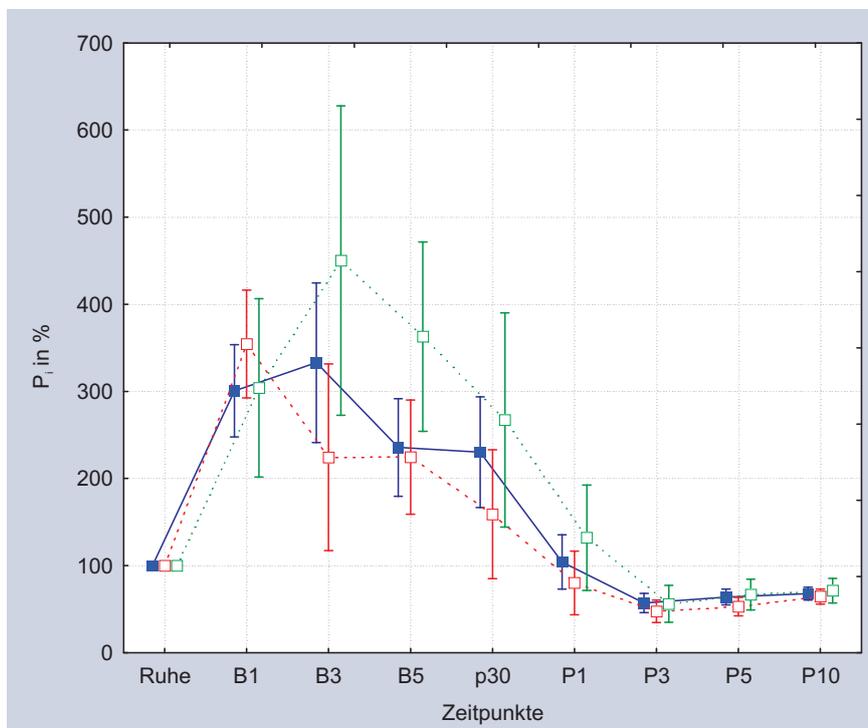


Abbildung 3.12 : **Prozentualer Pi-Verlauf des aeroben Belastungstests im Gruppenvergleich**

Dargestellt sind Mediane und die jeweiligen Quartile; FPLD-Patienten sind blau, Kontrollprobanden rot und Sportler grün dargestellt. In der Belastungs- (B1-B5) und Erholungsphase (p30-P10) zeigen sich in allen 3 Gruppen vergleichbare Veränderungen der P_i -Konzentrationen; zu den Messzeitpunkten nach der dritten und fünften Belastungsminute (B3 und B5) weisen die Sportler signifikant höhere Konzentrationen auf (ANOVA $p=0,04$ Sportler vs. FPLD und Kontrollprobanden B3 und B5, sonst keine signifikanten Gruppenunterschiede).

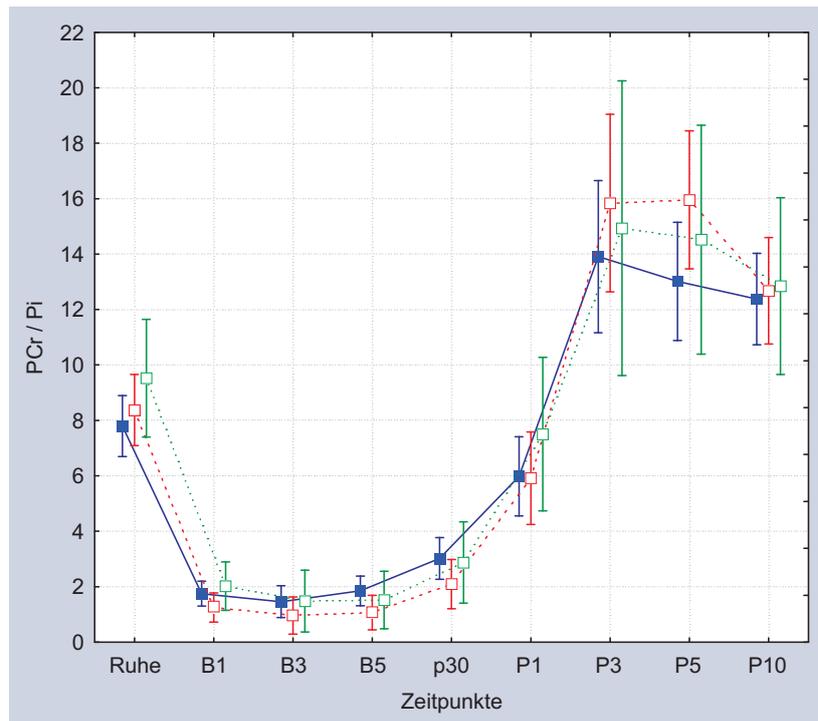


Abbildung 3.13 : **PCr/P_i-Verlauf des aeroben Belastungstests im Gruppenvergleich**

Dargestellt sind Mediane und jeweilige Quartile; FPLD-Patienten sind blau, Kontrollprobanden rot und Sportler grün dargestellt. In der Belastungs- (B1-B5) und Erholungsphase (p30-P10) zeigen sich in allen 3 Gruppen vergleichbare Veränderungen dieses Quotienten ohne signifikanten Gruppenunterschiede.

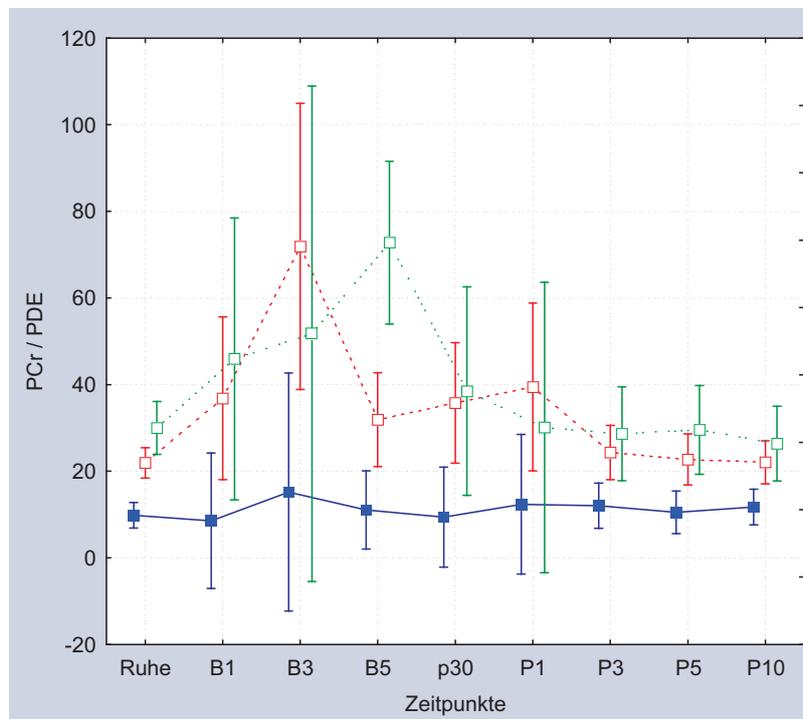


Abbildung 3.14 : **PCr/PDE-Verlauf des aeroben Belastungstests im Gruppenvergleich**

Die Mediane und jeweiligen Quartile der FPLD-Patienten sind blau, der Kontrollprobanden rot und der Sportler grün dargestellt. Die FPLD-Patienten zeigen einen konstanten Verlauf des Quotienten aus PCr und PDE, während es in den beiden anderen Gruppen unter Belastung (B1-B5) zu einem Anstieg dieses Quotienten mit Rückkehr auf das Ausgangsniveau in der Erholungsphase (p30-P10) kommt. Zudem weisen die FPLD-Patienten zu jedem Zeitpunkt signifikant niedrigere Ergebnisse im Vergleich zu den beiden anderen Gruppe auf. (ANOVA $p=0,007$ FPLD vs. Kontrollprobanden und Sportler).

Für den Verlauf des PCr/PDE-Quotienten ergaben sich hochsignifikant unterschiedliche Gruppenverläufe ($p < 0,01$; Abb. 3.14). Während die Konzentrationsverhältnisse in der Gruppe der Kontrollprobanden und der Sportler unter Belastung deutlich anstiegen (von 22 bzw. 30 auf 72) und in der Erholungsphase wieder auf das Ausgangsniveau abfielen, blieb der Quotient bei den FPLD-Patienten über den gesamten Verlauf nahezu unverändert (zwischen 9 und 15). Der Verlauf der Konzentrationsverhältnisse von PDE zu P_{total} und zu β -ATP zeigte für keinen der beiden Parameter signifikante Gruppenunterschiede; im Vergleich der Gruppen zu jedem einzelnen Zeitpunkt waren beide Quotienten der FPLD-Patienten zu denen der Kontrollprobanden bzw. Sportler hochsignifikant größer, vergleichbar zu den Ruhequotienten. Die PDE-Konzentration war auch unter aeroben Belastungsbedingungen und in der Erholungsphase im Verhältnis zum Gesamtpool der energiereichen Phosphate bei den Patienten erhöht. Insgesamt zeigten sich große individuelle Unterschiede in der Belastungsreaktion bei identischer Belastungsgestaltung.

3.2.2.2 Stufenförmig ansteigender Ausbelastungstest

Abbildung 3.15 zeigt eine Gesamtdarstellung der Belastungsspektren einer FPLD-Patientin jeweils am Ende jeder Belastungsminute des stufenförmig ansteigenden Ausbelastungstests beginnend mit 30% der anfänglich ermittelten Maximalkraft und Steigerung um 10% bis zur subjektiven muskulären Erschöpfung, sowie fünf Spektren aus der zehnminütigen Nachbelastungsphase (p30: 30s nach Belastungsende; P1, P3, P5 und P10: 1., 3., 5. und 10. Nachbelastungsminute). Als Referenz ist im Vordergrund das 30s-Ruhespektrum derselben Probandin, das direkt vor der Belastung akquiriert wurde, dargestellt.

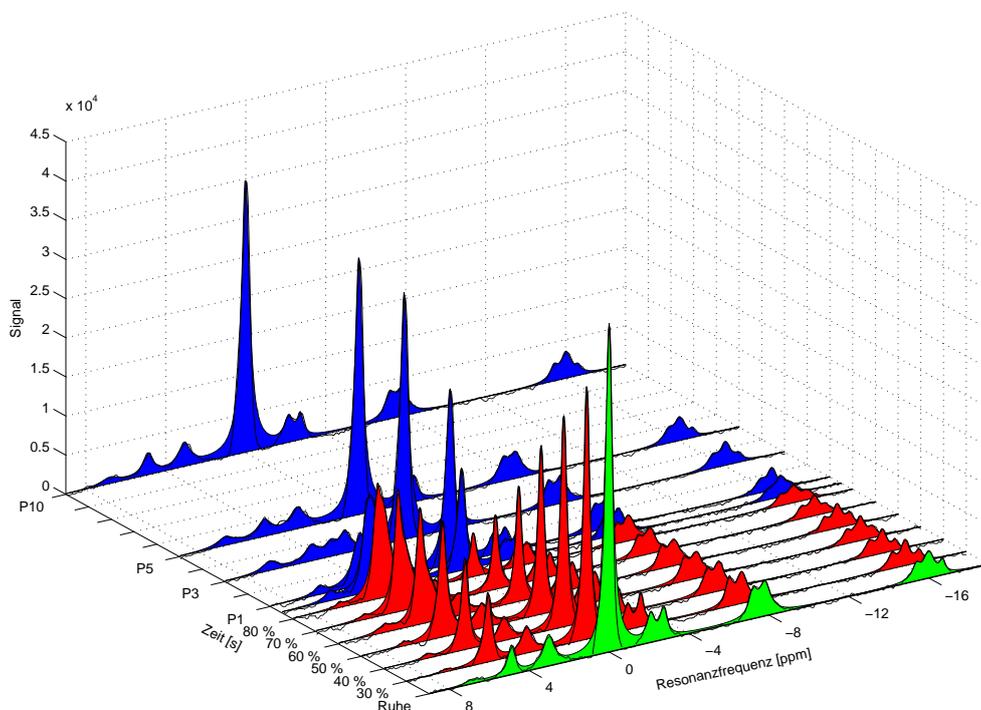


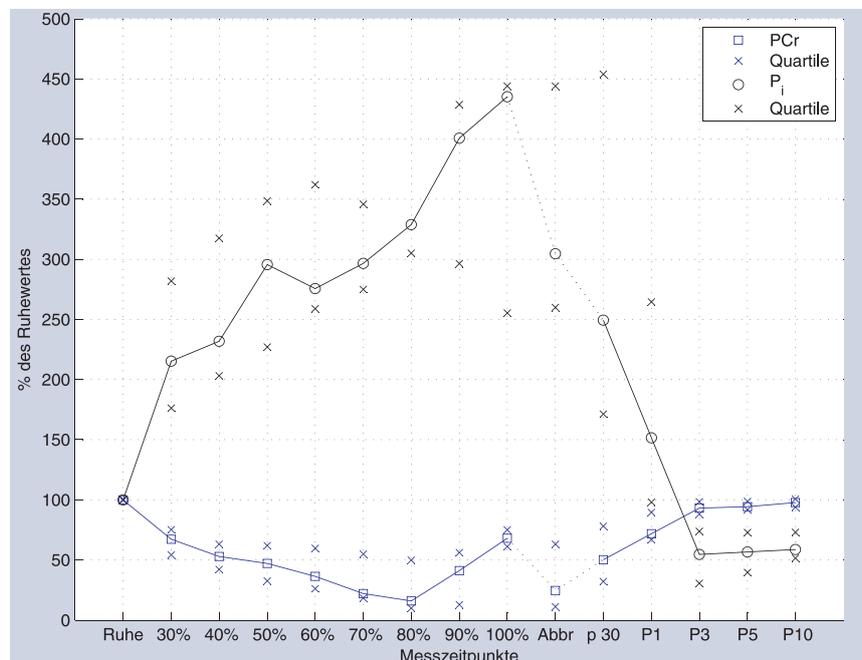
Abbildung 3.15 : **Summendarstellung der Ruhe- (grün), Belastungs- (rot) und Nachbelastungsspektren (blau) einer FPLD-Patientin aus dem stufenförmigen Test**

Unter Belastung zeigt sich ein Absinken der PCr- und PDE-Konzentrationen sowie ein Anstieg beider Metabolite in der Nachbelastungsphase, während für die P_i -Konzentration ein gegensätzlicher Verlauf zu verzeichnen ist.

Tabelle 3.4 : **Ergebnisse des stufenweise ansteigenden Ausbelastungstests der FPLD-Patienten**

	Median	25. Quartil	75. Quartil
min PCr-Konzentration in %	16,0	10,0	49,9
max PCr-Konzentration in %	97,7	93,8	100,6
max P_i -Konzentration in %	435,2	255,3	444,0
min P_i -Konzentration in %	54,6	30,6	73,9
max PCr Recovery in %	21,0	10,5	25,5
max PCr/ P_i	16,8	8,2	26,9
PCr/ P_i bei Abbruch	0,4	0,1	1,4
max PCr/ β -ATP	4,9	4,5	5,5
PCr/ β -ATP bei Abbruch	1,5	0,7	3,0
pH 1 bei Abbruch	7,0	6,8	7,0
pH 2 bei Abbruch	6,7	6,5	6,7
min pH 1	6,8	6,5	7,0
min pH 2	6,5	6,3	6,6
max PDE in %	86,4	76,1	97,4
min PDE in %	26,5	8,7	43,4
max PCr/PDE	12,7	5,1	15,4
min PCr/PDE	6,7	4,0	12,1
PCr/PDE bei Abbruch	10,4	6,5	15,4

In Tabelle 3.4 sind analog zu den Ergebnissen aus dem aeroben Belastungstest die Konzentrationsverhältnisse und Kenngrößen des Stufentests zusammengestellt. Die Abbildungen 3.16 bis 3.18 zeigen den durchschnittlichen prozentualen Konzentrationsverlauf der einzelnen Metabolite bezogen auf die direkt vor der Belastung ermittelten Ruhekonzentrationen, die auf 100% gesetzt wurden.

Abbildung 3.16 : **Prozentualer Verlauf von PCr und P_i während des Stufentests**

Die dargestellten Mediane und jeweiligen Quartile zeigen erwartungsgemäß ein Absinken der PCr-Konzentration unter stufenweise ansteigender Belastung bis zur subjektiven Erschöpfung (30% bis Abbr) und den korrespondierenden Anstieg der P_i -Konzentration sowie den genau gegensätzlichen Verlauf dieser beiden Konzentrationen in der Nachbelastungsphase (p30-P10). Die PCr-Konzentrationen sind blau, die P_i -Konzentrationen schwarz dargestellt.

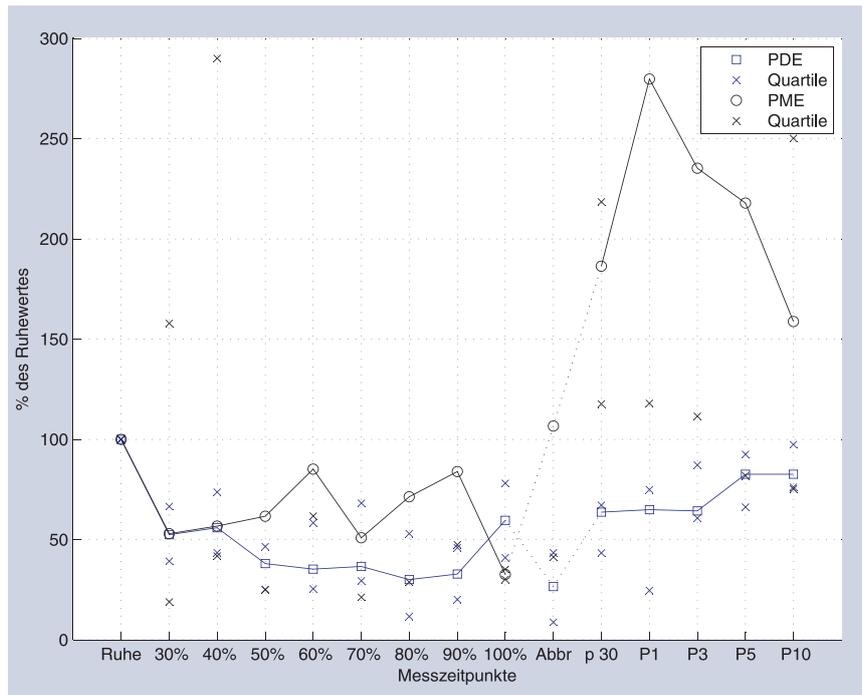


Abbildung 3.17 : **Prozentualer Verlauf von PME und PDE während des Stufentests**
 Dargestellt sind Mediane und die jeweiligen Quartile; die PDE-Konzentrationen sind blau, die PME-Konzentrationen schwarz dargestellt.

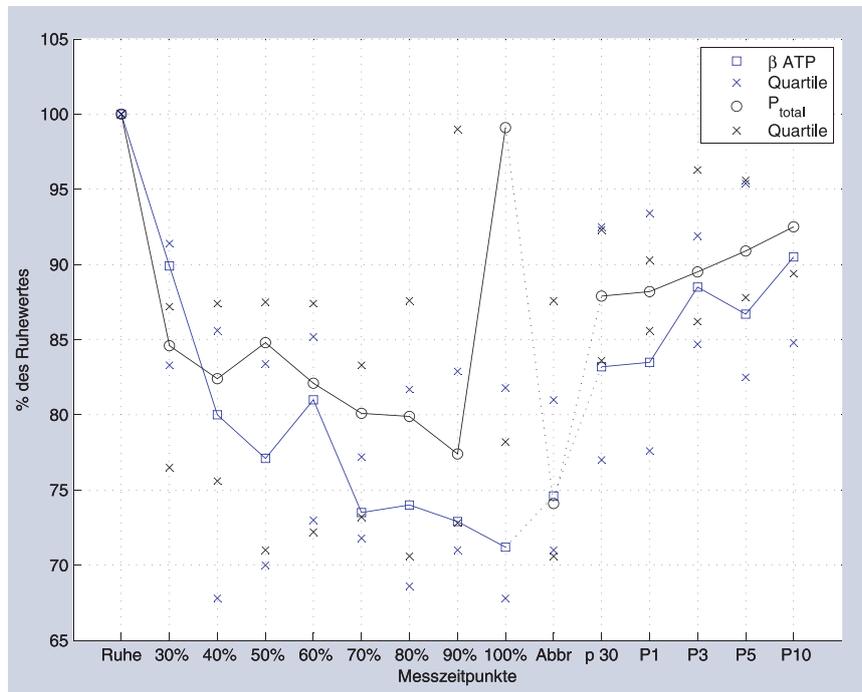


Abbildung 3.18 : **Prozentualer Verlauf von β -ATP und P_{total} während des Stufentests**
 Dargestellt sind Mediane und die jeweiligen Quartile; die β -ATP-Konzentrationen sind blau, die P_{total} -Konzentrationen schwarz dargestellt.

Während der Belastungsphase kam es zu einem sukzessiven Abfall der Phosphokreatinkonzentration und zu einem korrespondierenden Anstieg der Konzentration des anorganischen Phosphats. Bis zur subjektiven muskulären Erschöpfung durchliefen 3 Patienten 4 Belastungsstufen (Abbruch nach der 60%-Belastungsstufe), ein Patient schaffte die 70%-Belastungsstufe, je 4 Patienten durchliefen 6 bzw. 7 Stufen (80% bzw. 90% bei Abbruch), 2 Patienten waren bis 100% belastbar und ein Patientin erreichte sogar 110% der anfänglich ermittelten maximalen isometrischen Kontraktionskraft. Bei den Patienten, die im Stufentest mehr als 90% der ermittelten isometrischen Maximalkraft bewältigen konnten, muss angenommen werden, dass die Maximalkraftmessung ein zu niedriges Ergebnis erbracht hatte. In der Erholungsphase füllten sich die Phosphokreatinpools fast vollständig wieder auf. Die maximale PCr-Recovery-Rate fand sich analog zum aeroben Belastungstest in den ersten 30 Sekunden direkt nach Abbruch und war mit ca. 20% vom Wert identisch zur Reaktion nach aerober Belastung. Die Konzentration des anorganischen Phosphats sank bis auf ein Minimum in der dritten Nachbelastungsminute und stieg während der verbleibenden 7 Erholungsminuten nur unwesentlich an.

Unter anaerober Belastung sank die Konzentration der Phosphodiester stärker als bei der aeroben Belastung auf Minimalwerte von 26,5% der Ausgangskonzentration. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei den Kontrollprobanden und Sportlern unter aeroben Bedingungen. In den ersten 10 Erholungsminuten stieg die Konzentration wieder auf durchschnittlich 86,4% an, was mit den Ergebnissen aus dem aeroben Belastungstest vergleichbar ist. Die resultierenden Quotienten aus PCr und PDE waren in Analogie zu den Ergebnissen aus dem aeroben Dauertest nahezu konstant. Die intramuskulär bestimmten pH-Werte lagen in Ruhe im Mittel bei 7,09 und sanken nach lokaler muskulärer Ausbelastung auf durchschnittlich 6,8 (6,5 bis 7,0). Auch hier fanden sich nur unwesentliche Unterschiede zu den Messergebnissen aus dem Ausdauerstest.

Insgesamt zeigte sich auch bei diesem Test eine große interindividuelle Varianz der Belastungsreaktion trotz identischer Bewegungs- und Testanweisung mit klar definiertem Abbruchkriterium.

3.2.3 Ergebnisse der ^1H -Ruhemessungen

Von 12 FPLD-Patienten und den 11 Kontrollprobanden wurden Protonenspektren der Wadenmuskulatur in Ruhe unter Verwendung einer zirkulären Spule erzeugt. Für die Schnellkraftsportler war diese Messung aus zeitlichen und logistischen Gründen nicht geplant. 4 FPLD-Patienten konnten wegen eines technischen Defektes in der Protonenspule nicht gemessen werden. Bei 3 weiteren FPLD-Patienten musste auf diese Messung verzichtet werden, weil die lange Liegedauer im Tomographen von ihnen nicht toleriert wurde.

In Abbildung 3.19 sind typische ^1H -Resonanzspektren der Wadenmuskulatur einer FPLD-Patientin und eines Kontrollprobanden gegenübergestellt.

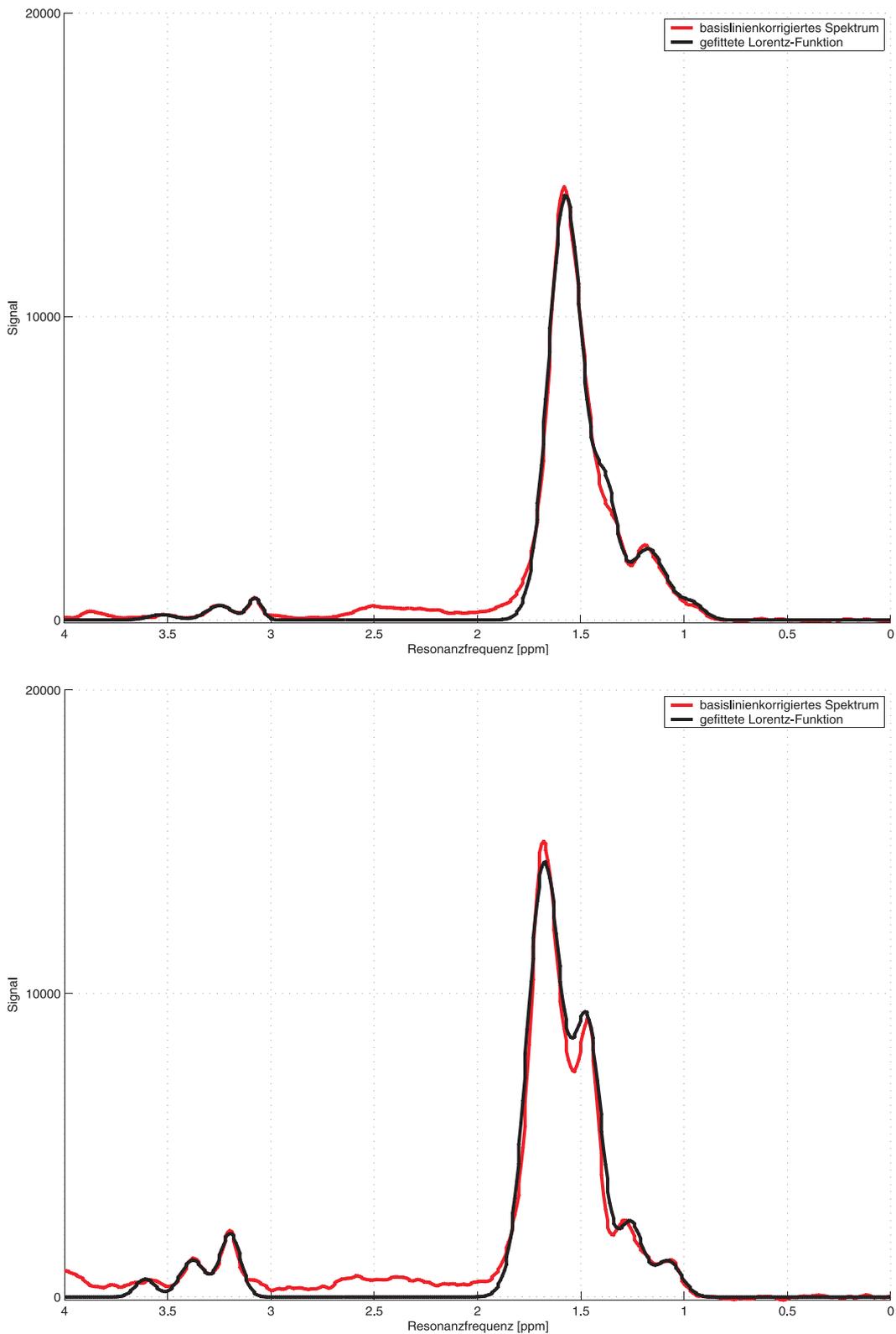


Abbildung 3.19 : **Protonenspektrum der Wadenmuskulatur einer FPLD-Patientin (oben) und eines Kontrollprobanden (unten)**

Im Verhältnis zu Cholin und Kreatin fallen im Spektrum der FPLD-Patientin sowohl erhöhte EMCL- als auch IMCL-Konzentrationen intramyozellulär im Vergleich zum Spektrum des Kontrollprobanden auf.

Für die Konzentrationsverhältnisse aus IMCL sowie EMCL zu Kreatin - als internem Standard unter Ruhebedingungen [119, 120, 19] - bestanden im Gesamtgruppenvergleich signifikante Gruppenunterschiede ($p=0,02$ IMCL/Cr bzw. $p<0,001$ EMCL/Cr), jeweils mit im Verhältnis höheren Lipidkonzentrationen für die Patientengruppe (siehe Abb. 3.20 und 3.21).

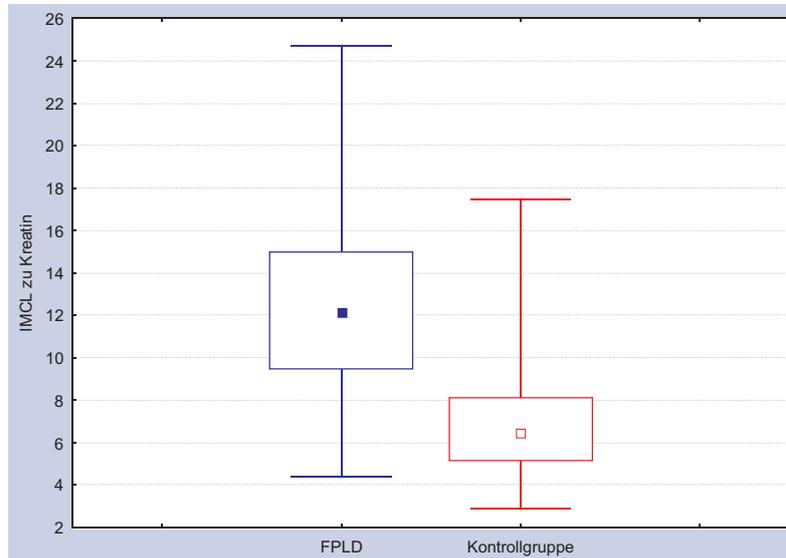


Abbildung 3.20 : **IMCL/Kreatin-Quotient im M. gastrocnemius im Gruppenvergleich**

Die dargestellten Mediane, jeweiligen Quartile sowie Minima und Maxima zeigen im Verhältnis zur Kreatin-Konzentration als internem Standard erhöhte IMCL-Konzentrationen für die FPLD-Gruppe (M-W-U-Test mit signifikant größeren Quotienten für die FPLD-Gruppe ($p=0,02$)).

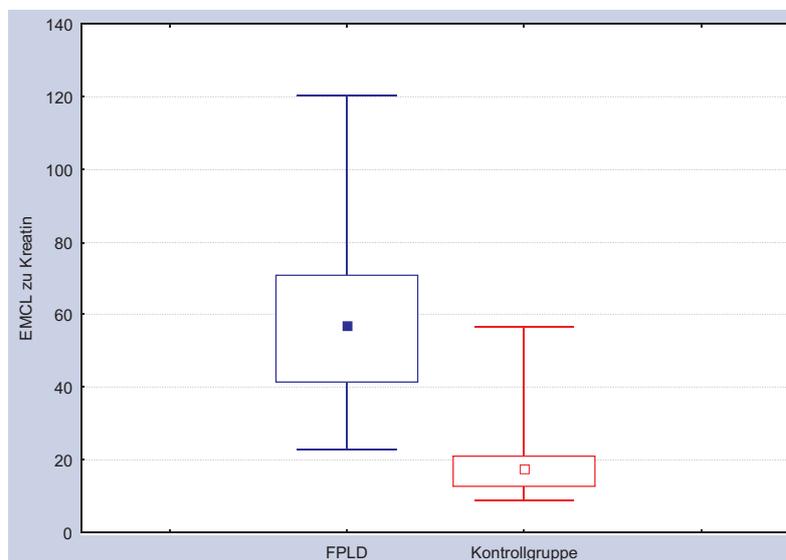


Abbildung 3.21 : **EMCL/Kreatin-Quotient im M. gastrocnemius im Gruppenvergleich**

Die dargestellten Mediane, jeweiligen Quartile sowie Minima und Maxima zeigen im Verhältnis zur Kreatin-Konzentration als internem Standard erhöhte EMCL-Konzentrationen für die FPLD-Gruppe (M-W-U-Test mit hochsignifikant größeren Quotienten für die FPLD-Gruppe ($p<0,001$)).

Für das Verteilungsmuster aus extra- und intramyozellulären Fetten zeigten die FPLD-Patienten hochsignifikant höhere Quotienten als die Kontrollprobanden. In der Patientengruppe lagen die Konzentrationen an extramyozellulärem Fett im Mittel um das fünffache über denen der intramyozellulären Fette, während bei den Kontrollprobanden das Verhältnis etwa drei zu eins betrug (siehe Abb. 3.22).

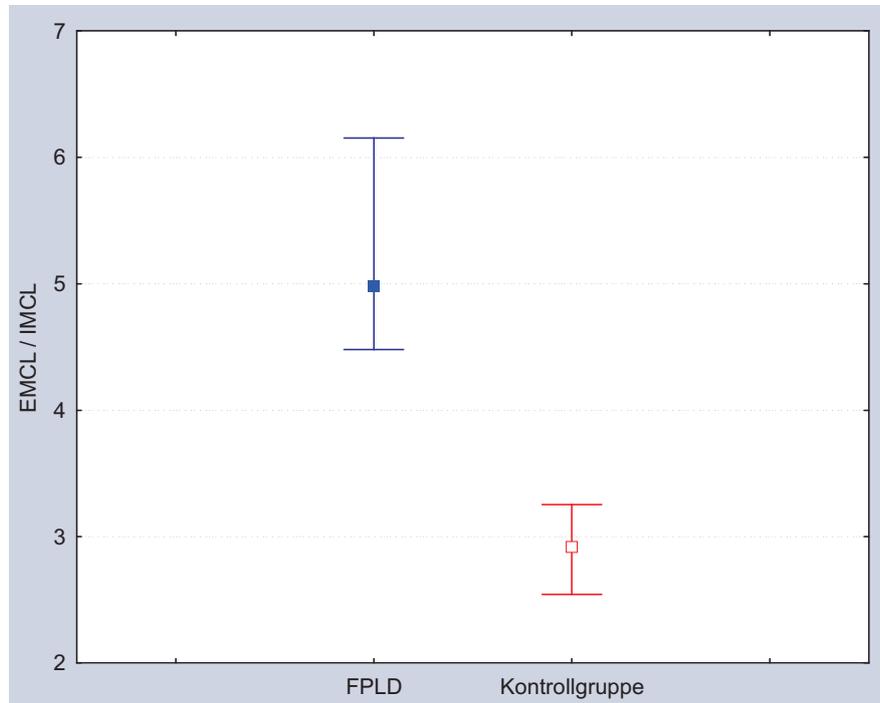


Abbildung 3.22 : **Ergebnisse des Quotienten aus extra- und intrazellulären Fetten im Gruppenvergleich**

Die dargestellten Mediane und jeweiligen Quartile zeigen für die FPLD-Gruppe signifikant größere Quotienten (Kruskal-Wallis Einzelgruppenvergleich $p=0,003$).

Die Kreatin- und CholinKonzentrationen zeigten keine signifikanten Gruppenunterschiede.

3.3 Leistungsdiagnostische Ergebnisse

Analog zu den Belastungsmessungen im Kernspintomographen wurde der fahrradergometrische Rampentest mit 15 Patienten durchgeführt. In Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse des 1-Minuten-Rampentests zusammengefasst.

Tabelle 3.5 : **Ergebnisse des fahrradergometrischen Rampentests der FPLD-Patienten**

	Einheit	Mittelw.	Stdabw.
P max	Watt	185,0	52,4
rel. P max	Watt/kg KG	2,6	0,6
P IAS	Watt	75,1	31,5
rel. P IAS	Watt/kg KG	1,0	0,4
V'E max	l/min	85,6	29,3
V'E vslope	l/min	34,5	9,7
VO ₂ peak	ml	2051,3	510,4
rel. VO ₂ peak	ml/kg min	28,9	6,6
HF max	1/s	164,5	21,0
Laktat Abbruch	mmol/l	9,9	3,1
Laktat max	mmol/l	12,1	3,6
Laktat IAS	mmol/l	2,4	0,6
RQ max		1,7	0,2

Die fahrradergometrische Leistungsfähigkeit lag im 1-Minuten-Rampentest im alters- und geschlechtsspezifischen Normbereich. Durchschnittlich 2,60 Watt pro kg Körpergewicht entsprechen 106,6% der Norm. Die aerobe Kapazität wies mit einer VO₂ peak von 28,9 ml pro kg Körpergewicht pro Minute eine Einschränkung um -22,9% gegenüber der alters- und geschlechtsspezifischen Norm auf. Bezogen auf die geleistete *Workrate* lag die aerobe Kapazität mit 8,61 ml/min*Watt ebenfalls ca. 20% unter der alters- und körperdimensionsunabhängigen Norm von 10,29 ml/min*Watt.

Die anaerobe Kapazität lag mit maximalen Laktatkonzentrationen von 12,1 mmol/l und einem respiratorischen Quotienten bei Belastungsabbruch von 1,37 (RQ max im Durchschnitt 1,66) im hochnormalen Bereich (Ruhelaktatkonzentration grenzwertig hoch-normal bis erhöht: 1,7 mmol/l). Der individuelle anaerobe Übergangsbereich (individuelle anaerobe Schwelle = so genannte individuelle Laktatschwelle nach Stegmann / Kindermann [136, 135]) lag bei 40% der maximalen Leistungsfähigkeit (entsprechend 55,9% der VO₂ peak) und trat gegenüber der alters- und geschlechtsspezifischen Norm verfrüht ein.

3.4 Korrelation kernspinspektroskopischer Ergebnisse mit klinischen und leistungsdiagnostischen Daten

Die signifikanten Korrelationen zwischen den kernspinspektroskopisch gewonnenen Ergebnissen und den klinischen sowie leistungsdiagnostischen Daten sind in den Tabellen 3.6 bis 3.10 zusammengefasst.

Tabelle 3.6 : **Korrelationsmatrix für die Quotienten PCr/PDE, PDE/ β -ATP und PDE/ P_{total} zur Triglycerid-Konzentration im Serum**

	/TG	PCr/PDE	PDE/β-ATP	PDE/P_{total}
Ruhe M. biceps femoris		-0.64	0.76	0.80
Ruhe M. quadriceps femoris		-0.68	0.76	0.78
Ruhe M. gastrocnemius		-0.63	0.74	0.76

Tabelle 3.7 : **Korrelationen EMCL/IMCL zu den Konzentrationen der Triglyceride (TG) und der LDL im Serum und zum BMI**

	TG	LDL	BMI
EMCL/IMCL	0.91	0.90	0.97

Für die klinischen Parameter konnten wir einen hohen Zusammenhang zwischen relativer PDE- und der Triglyceridkonzentration im Blutplasma nachweisen (Tab. 3.6). Das Fettverteilungsmuster aus EMCL und IMCL korreliert zudem mit der Triglycerid- und LDL-Konzentration im Blutplasma und dem BMI (Tab. 3.7).

Für den fahrradergometrischen Stufentest fanden wir einen moderaten bis hohen negativen Zusammenhang zwischen relativer PDE-Konzentration in Ruhe und unter Belastung zu den Parametern für die absolute und relative Leistungsfähigkeit, zur absoluten und relativen Sauerstoffaufnahme (Maximalwerte und Werte an der individuell ermittelten anaeroben Schwelle), zur maximalen Herzfrequenz und zur Laktatkonzentration an der individuellen anaeroben Schwelle (Tab. 3.8 - 3.10).

Weitere signifikante Korrelationen zwischen den kernspinspektroskopischen und den klinischen sowie leistungsdiagnostischen Ergebnissen bestanden nicht.

Tabelle 3.8 : **Korrelationsmatrix für die PCr/PDE-Quotienten der Ruhemessungen und beider Belastungstests zu Parametern aus den fahrradergometrischen Stufentests**

(Ruhe grün, Belastung rot, Nachbelastung blau, entsprechend den Darstellungen der Spektren, signifikante Korrelationen mit $p < 0,05$; n.s.= nicht signifikant)

	Pmax	rel. Pmax	VO2 peak	rel. VO2 peak	HF max	Laktat Abbruch	Laktat max
Ruhe M. biceps femoris	0,67	0,70	0,63	0,63	0,62	0,73	0,67
Ruhe M. quadriceps femoris	0,60	0,64	0,59	0,61	0,57	0,70	0,64
Ruhe M. gastrocnemius lang	n.s.	0,55	n.s.	0,52	0,59	0,67	0,63
Ruhe M.gastrocnemius (30 s)	0,56	0,59	0,55	0,56	0,55	0,62	0,56
aerobe Belastung 1 min	n.s.	0,52	0,57	0,61	n.s.	0,55	n.s.
aerobe Belastung 3 min	0,61	0,58	0,67	0,63	n.s.	0,58	n.s.
aerobe Belastung 5 min	n.s.	0,51	n.s.	n.s.	n.s.	0,56	n.s.
Nachbelastung p30	n.s.	0,48	0,55	0,57	n.s.	0,55	n.s.
Nachbelastung P1	0,59	0,58	0,61	0,57	n.s.	0,63	n.s.
Nachbelastung P3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Nachbelastung P5	n.s.	n.s.	n.s.	0,51	n.s.	0,57	n.s.
Nachbelastung P10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,50	n.s.
Stufentest 30%	0,69	0,61	0,68	0,55	n.s.	0,53	n.s.
Stufentest 40%	0,74	0,64	0,77	0,63	n.s.	0,55	n.s.
Stufentest 50%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Stufentest 60%	0,69	0,60	0,70	0,56	n.s.	0,50	n.s.
Stufentest 70%	0,73	0,67	0,74	0,61	n.s.	n.s.	n.s.
Stufentest Abbruch	0,61	0,60	0,70	0,69	n.s.	0,50	n.s.
Nachbelastung p30	0,51	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Nachbelastung P1	0,59	0,57	0,57	0,51	n.s.	0,75	n.s.
Nachbelastung P3	0,60	0,54	0,59	n.s.	n.s.	0,64	n.s.
Nachbelastung P5	0,56	0,52	0,54	n.s.	n.s.	0,55	n.s.
Nachbelastung P10	n.s.	n.s.	0,54	0,52	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 3.9 : **Korrelationsmatrix für die PDE/ β -ATP-Quotienten aus den Ruhemessungen und den aeroben Belastungstests zu Parametern des fahrradergometrischen Stufentests** (Ruhe grün, Belastung rot, Nachbelastung blau, entsprechend den Darstellungen der Spektren, signifikante Korrelationen mit $p < 0,05$; n.s.= nicht signifikant)

	VO2 peak	rel. VO2 peak	rel. Vslope	HF max	HF IAS
Ruhe M. biceps femoris	-0,54	-0,64	-0,65	-0,71	-0,61
Ruhe M. quadriceps femoris	n.s.	-0,57	-0,65	-0,58	-0,57
Ruhe M. gastrocnemius lang	-0,55	-0,60	-0,70	-0,61	-0,53
Ruhe M.gastrocnemius (30 s)	n.s.	n.s.	-0,57	n.s.	n.s.
aerobe Belastung 1 min	n.s.	-0,56	-0,61	n.s.	-0,52
aerobe Belastung 3 min	n.s.	-0,54	-0,54	n.s.	n.s.
aerobe Belastung 5 min	-0,54	-0,63	-0,67	n.s.	-0,51
Nachbelastung p30	-0,50	-0,56	-0,63	n.s.	-0,54
Nachbelastung P1	n.s.	n.s.	-0,65	n.s.	n.s.
Nachbelastung P3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Nachbelastung P5	n.s.	-0,51	-0,57	n.s.	-0,56
Nachbelastung P10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 3.10 : **Korrelationsmatrix für PDE/ P_{total} -Quotienten aus den Ruhemessungen und den aeroben Belastungstests zu Parametern des fahrradergometrischen Stufentests** (Ruhe grün, Belastung rot, Nachbelastung blau, entsprechend den Darstellungen der Spektren, signifikante Korrelationen mit $p < 0,05$; n.s.= nicht signifikant)

	VO2 peak	rel. VO2 peak	rel. Vslope	HF max	HF IAS	Laktat Abbruch	Laktat max
Ruhe M. biceps femoris	-0,58	-0,69	-0,65	-0,79	-0,65	-0,71	-0,64
Ruhe M. quadriceps femoris	-0,50	-0,59	-0,62	-0,64	-0,52	-0,60	-0,54
Ruhe M. gastrocnemius lang	-0,57	-0,66	-0,69	-0,73	-0,64	-0,59	-0,51
Ruhe M.gastrocnemius (30 s)	-0,59	-0,66	-0,71	-0,71	-0,61	-0,55	n.s.
aerobe Belastung 1 min	n.s.	n.s.	-0,57	-0,50	n.s.	n.s.	n.s.
aerobe Belastung 3 min	n.s.	-0,56	-0,60	n.s.	-0,55	n.s.	n.s.
aerobe Belastung 5 min	n.s.	-0,54	-0,53	-0,52	-0,52	n.s.	n.s.
Nachbelastung p30	-0,60	-0,68	-0,66	n.s.	-0,57	n.s.	n.s.
Nachbelastung P1	-0,53	-0,61	-0,65	-0,53	-0,56	n.s.	n.s.
Nachbelastung P3	n.s.	-0,53	-0,64	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Nachbelastung P5	n.s.	-0,50	-0,52	-0,51	n.s.	n.s.	n.s.
Nachbelastung P10	n.s.	-0,56	-0,57	-0,60	-0,59	n.s.	n.s.

4 Diskussion

Anhand kernspinspektroskopischer Ruhe- und Belastungsmessungen haben wir weltweit erstmalig den Metabolismus der Beinmuskulatur von 19 Patienten mit dem klinischen Bild einer familiären partiellen Lipodystrophie Typ Dunnigan-Köbberling (FPLD) untersucht und Veränderungen gegenüber Spektren von gesunden Vergleichsprobanden herausgearbeitet. Im Kontext bereits erhobener laborchemischer Parameter und der Ergebnisse leistungsphysiologischer Tests konnten wir den klinischen Phänotyp dieses seltenen, genetisch bedingten Krankheitsbildes weiter charakterisieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen genetischem Defekt und klinischem Erscheinungsbild durch Untersuchungen zu Veränderungen des Energie- und Fettstoffwechsels der Skelettmuskulatur auf molekularer Ebene zu erklären. Im Rahmen der Arbeit konnten wir die drei einleitend aufgestellten Hypothesen verifizieren:

1. Patienten mit FPLD weisen charakteristische Veränderungen der ^{31}P -Ruhe- und ^{31}P -Belastungsspektren der Beinmuskulatur gegenüber gesunden Probanden auf:
 - In den Ruhespektren konnten wir erhöhte PDE-Konzentrationen im Verhältnis zu allen anderen Metaboliten nachweisen.
 - Unter aeroben Belastungsbedingungen zeigten die Patienten einen konstanten Verlauf des PCr/PDE-Quotienten, während es bei den gesunden Kontrollprobanden zu einem Anstieg dieses Parameters unter Belastung mit Rückkehr auf das Ausgangsniveau in der Nachbelastungsphase kam.
 - Im rampenförmigen Ausbelastungstest wiesen die FPLD-Patienten eine niedrige PCr-Recovery bei geringem Absinken des pH-Werts auf.
2. Patienten mit FPLD haben ein differentes Verteilungsmuster intra- und extramyozellulärer Fette der Wadenmuskulatur gegenüber gesunden Probanden:
 - In der Patientengruppe konnten wir signifikant höhere Konzentrationen sowohl der intra- als auch extramyozellulären Lipide nachweisen.
 - Gegenüber den Kontrollprobanden wiesen die FPLD-Patienten signifikant höhere Konzentrationsverhältnisse EMCL/IMCL auf.
3. Die magnetresonanzspektroskopischen Ergebnisse korrelieren mit für das Krankheitsbild charakteristischen klinischen und leistungsphysiologischen Parametern:
 - Die (relative) PDE-Konzentration korreliert mit der Lipidkonzentration im Plasma.
 - Die (relative) PDE-Konzentration korreliert negativ mit Parametern der aeroben und anaeroben Leistungsfähigkeit.
 - Der EMCL/IMCL-Quotient korreliert mit der Plasmalipid- und -LDL-Konzentration.
 - Die (relative) PDE-Konzentration korreliert mit dem EMCL/IMCL-Quotienten.

4.1 Einschränkungen der Studie und Methodenkritik

Die Ergebnisse sind aufgrund der geringen Patienten- und Kontrollprobandenzahlen im Hinblick auf die statistische Auswertbarkeit mit Einschränkungen verbunden. Die gefundenen, deutlich ausgeprägten signifikanten Korrelationen und Unterschiede zu den gesunden Vergleichsprobanden trotz dieser Fallzahlen unterstreichen die Eindeutigkeit dieser Ergebnisse. Weitere Zusammenhänge werden aber möglicherweise maskiert. Auf eine Poweranalyse zur Fallzahloptimierung haben wir trotzdem verzichtet, weil mehr Patienten mit dieser seltenen Erkrankung nicht zu gewinnen gewesen wären; unseres Wissens ist das die bisher weltweit größte Patientengruppe mit diesem Krankheitsbild, die in einer Studie untersucht wurde. Aufgrund der zeitlich, logistisch und finanziell sehr aufwändigen Untersuchungen war die maximal mögliche Anzahl an Probanden zudem begrenzt.

Als weitere Einschränkung der vorliegenden Studie ist die Wahl der Kontrollgruppe zu nennen. Als Kontrollprobanden wurden ausschließlich junge, gesunde Männer gewählt, um mögliche Einflüsse durch Alter oder Geschlecht auszuschließen. Damit ist für die Patientengruppe nicht auszuschließen, dass die gefundenen signifikanten Unterschiede nicht allein auf die Erkrankung zurückzuführen sind. Um den Einfluss der Muskelhypertrophie zu berücksichtigen, wurden gezielt auch Sportler mit vergleichbar großer Muskelmasse als Vergleichsprobanden herangezogen. Eine weitere alters- und geschlechtsadaptierte Kontrollgruppe im Sinne eines Pair-matched-Verfahrens konnte aus oben erwähnten logistischen und finanziellen Gründen nicht zusätzlich untersucht werden.

Die Untersuchungsmethoden weisen zwei Schwachpunkte auf: Zum einen wurden der stufenförmige Belastungstest im Tomographen nur mit der Patientengruppe durchgeführt. Prinzipiell war auch für die Patienten ein anaerober Belastungstest mit Blutsperre geplant, wie er bei den Kontrollprobanden durchgeführt wurde. Diese Art der Belastungsmessung wurde aber schmerzbedingt von den Patienten nicht toleriert. Zum anderen war die Methode zur Bestimmung der isometrischen Maximalkraft außerhalb des Tomographen anscheinend nicht ausreichend präzise. Durch den höheren Freiheitsgrad ohne Fixierung von Ober- und Unterschenkel wurden sowohl zu hohe als auch zu niedrige Maximalkraft-Ergebnisse ermittelt. Das führte dann in der Folge in den Belastungsmessungen im Tomographen zu etwas erhöhten oder zu niedrigen Belastungen. Die Belastungsreaktion wies aber bei allen Probanden auf steady-state Bedingungen im aeroben Belastungstest hin [79, 78] und erfüllte die Kriterien der muskulären Ausbelastung im Rampentest [7].

Letzter Punkt der Methodenkritik ist ein Schwachpunkt kernspinspektroskopischer Untersuchungen an sich. Die gewonnenen Ergebnisse sind als absolute Zahlen schwierig mit anderen veröffentlichten Daten zu vergleichen, weil gerätespezifische Eigenschaften (insbesondere des Tomographen und der verwendeten Spulen) erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Systemintern ist eine sehr hohe Genauigkeit und Messkonstanz gewährleistet [91].

Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse der genetischen, klinisch-laborchemischen und leistungsphysiologischen Untersuchungen diskutiert, um den klinischen Phänotyp weiter zu charakterisieren. Anschließend erfolgt die Bewertung der kernspinspektroskopisch erhobenen Daten unter Berücksichtigung des Ausprägungsgrades der Erkrankung und im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen und Schnellkraftsportlern, sowie eine Einordnung und Bewertung der eigenen Ergebnisse unter Berücksichtigung anderer Veröffentlichungen. Abschließend werden die praktische Relevanz der Untersuchungen diskutiert und Schlussfolgerungen gezogen.

4.2 Genetische, klinisch-laborchemische und leistungsphysiologische Ergebnisse

Unsere Patientengruppe wies die typischen für die FPLD beschriebenen klinischen Symptome [65, 74, 149, 157] mit Abhängigkeit des Ausprägungsgrades der Erkrankung vom Geschlecht [66, 151], Alter [30, 66, 67] und der vorliegenden Mutation [54, 68, 151, 159] auf. Bei allen bis auf 4 Probanden mit dem Phänotyp einer FPLD haben wir eine Mutation im *LMNA*-Gen nachgewiesen. Dabei zeigten die Patienten mit den Mutationen *R482Q* und *R482W*, bei denen Lamin A und C betroffen sind, ausgeprägte Symptome, während die beiden Patienten mit der Mutation *R582H*, einer Sequenz, die ausschließlich für Lamin A codiert, in Übereinstimmung mit der Literatur atypische, weniger stark ausgeprägte Symptome aufwiesen [74, 131, 149]. Bei zwei Probanden wurde eine Mutation im PPAR γ -Rezeptor (*PPAR γ 190S*) gefunden. Diese genetischen Varianten gehen als sekundäre Laminopathie klinisch in der Regel ebenfalls mit dem Vollbild einer FPLD einher [65, 74, 149, 92, 93]. Mittlerweile wurden Mutationen im *ZMPSTE24*-, *AKT2*- und *CIDEC*-Gen als weitere Ursachen für eine FPLD gefunden [121], was möglicherweise den fehlenden Nachweis einer Mutation bei den Probanden H-I-1 und H-II-1 im eigenen Patientenkollektiv trotz des charakteristischen klinischen Bildes einer FPLD erklärt.

Klinisch stehen bei der FPLD der Diabetes mellitus und die medikamentös schwierig einzustellende Hypertriglyceridämie im Vordergrund. Als markantestes äußeres Merkmal erscheint die Hypertrophie der Extremitätenmuskulatur, was den Patienten in Kombination mit dem regionalen Verlust des Subkutanfettgewebes ein athletisches Aussehen verleiht. Viele Patienten, insbesondere jene mit deutlich ausgeprägtem Phänotyp der Erkrankung berichten aber über verminderte Belastbarkeit, schnelles Ermüden und massive Schmerzen in der hypertrophierten Muskulatur. Die Arbeitsgruppe um Spuler [134] konnte in Biopsien aus dem M. vastus lateralis bei 4 Patienten mit ausgeprägtem Phänotyp einer FPLD im Vergleich zu asymptomatischen Kontrollprobanden die Hypertrophie beider Muskelfasertypen bei sonst unspezifischen moderaten myopathischen Veränderungen nachweisen. Über histochemische, enzymhistochemische und genetische Untersuchungen deckten sie Veränderungen in der SMAD-Myostatin-Interaktion bei erhöhten intrazellulären SMAD-Konzentrationen und reduzierten Myostatinkonzentrationen als mögliche Ursache für die Hypertrophie auf. SMAD, der intrazelluläre Mediator von Myostatin, ist bei den Patienten an die Kernmembran angeheftet und nicht wie bei Normalpersonen innerhalb des Zellkerns lokalisiert. Das erklärt die bei der FPLD auftretende Muskelhypertrophie vergleichbar zum Phänotyp einer Myostatindefizienz im Gegensatz zu anderen Laminopathien und Lipodystrophien über eine Störung der SMAD-Signalkaskade. Die Muskelhypertrophie tritt aufgrund dieser direkten genetischen Ursache als eines der ersten Symptome bereits im Pubertätsalter in Erscheinung. Die damit verbundenen Myalgien sind vermutlich auf eine Erhöhung des Kompartimentdruckes in den Muskellogen unter Belastung zurückzuführen, welche mit einer lokalen Minderperfusion verbunden sind. Diese Theorie wird durch die von uns beobachtete Intoleranz gegenüber der Belastungstestung unter Blutsperrung im Tomographen weiter untermauert. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen zudem, dass SMAD neben dem enormen Einfluss auf die Differenzierung von Myozyten auch in der Differenzierung von Adipozyten eine entscheidende Rolle spielt [64].

Die subjektiv eingeschränkte Belastbarkeit mit schnellem Ermüden konnten wir im Rahmen unserer Untersuchungen objektivieren. Bei insgesamt normaler körperrgewichtsadaptierter maximaler Leistung ist die aerobe Leistungsfähigkeit im Mittel um 23% erniedrigt. Die veränderte Belastungsreaktion führt bei den Patienten zu einem verfrühten Übergang der aeroben zur anaeroben Energiebereitstellung. In den kernspinspektroskopischen Belastungsmessungen zeigten die Patienten nach lokaler Ausbelastung zudem verminderte Regenerationsraten für den PCr-Pool. Widersprüchlich sind unsere Ergebnisse zur anaeroben Belastungsreaktion und Laktatproduktion im Vergleich der Rampentests auf dem Fahrradergometer und im Tomographen. Maximale Laktatkonzentration und respiratorischer Quotient im Fahrradtest fielen hochnormal aus, was noch stärker zu gewichten ist, da ein Teil der Patienten eine Medikation mit β -blockierenden Substanzen erhielt, welche per se niedrigere maximale Laktatkonzentrationen bedingen können. Im NMR zeigte sich dem gegenüber ein geringer pH-Wert-Abfall. In vergleichbaren Ausbelastungstests wurden kernspinspektroskopisch pH-Werte zwischen 6,2 und 6,4 gemessen [150, 158]. Möglicherweise sind diese Unterschiede durch die im MRT im Vergleich zur Gesamtmuskelmasse eingesetzte kleine Muskelgruppe mit geringer Muskelmasse zu erklären. Zudem sind die für das Krankheitsbild typischen Veränderungen in der untersuchten Wadenmuskulatur am stärksten ausgeprägt, was eine vom Gesamtorganismus abweichende Belastungsreaktion ebenfalls begründen könnte. Die Minderung der Leistungsfähigkeit korreliert mit Parametern, die den Ausprägungsgrad der FPLD widerspiegeln, wobei wir die größten Zusammenhänge für die Leistungsparameter an der individuellen anaeroben Schwelle fanden. Wahrscheinlich sind die erheblichen und im Verlauf der Erkrankung zunehmenden Veränderungen des intrazellulären Energiestoffwechsels der Grund dafür, was sich durch unsere kernspinspektroskopischen Ergebnisse untermauern lässt, welche im folgenden diskutiert werden.

4.3 Kernspinspektroskopische Ergebnisse

Erwartungsgemäß haben wir aufgrund der ausgeprägten morphologischen Veränderungen und Stoffwechsellanomalien der FPLD-Patienten in den kernspinspektroskopischen Untersuchungen der Skelettmuskulatur sowohl unter Ruhe- als auch Belastungsbedingungen Auffälligkeiten gegenüber gesunden Vergleichspersonen gefunden. Die Kernspinspektroskopie gilt dabei als sehr sensitives Verfahren, mit dem bereits Veränderungen des Energiestoffwechsels erfasst werden können, noch bevor pathologische Veränderungen systemisch (z.B. laborchemisch) auftreten oder phänotypische Auffälligkeiten sichtbar werden [8, 61, 72, 79, 138]. Diese Beobachtung können wir für das Krankheitsbild der FPLD bestätigen.

4.3.1 Kernspinspektroskopische Messungen der ruhenden Muskulatur

Die Patienten wiesen erhöhte Konzentrationen der Phosphodiester bei sonst insgesamt unauffälligem Ruheverteilungsmuster der energiereichen Phosphometabolite auf. Erhöhte PDE- und PME-, ADP- und P_i - bei erniedrigten Phosphokreatinkonzentrationen sowie erhöhte pH-Werte in Ruhe wurden für Patienten mit Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie berichtet [8, 9, 79, 11]. Die beschriebenen Veränderungen korrelieren mit dem Ausprägungsgrad der Erkrankung und wurden als Zeichen einer

Störung der Ultrastruktur der Muskulatur insbesondere der Membranen mit dadurch freigesetzten Membranphospholipiden gedeutet. Bis auf die erhöhten PDE-Konzentrationen konnten wir derartige Veränderungen in unserer Patientengruppe nicht nachweisen. Die Erhöhung der Phosphodiester-Konzentration ist bei den FPLD-Patienten zudem deutlicher ausgeprägt, als in den genannten Veröffentlichungen über die beiden anderen Krankheitsbilder beschrieben oder gezeigt. Limitierend für einen Vergleich mit diesen Studienergebnissen ist die geringe Patientenanzahl ($n < 10$); außerdem handelt es sich um Muskeldystrophien, während bei der FPLD die Lipodystrophie im Vordergrund steht und zusätzlich eine Muskelhypertrophie zu verzeichnen ist.

Es liegen lediglich drei ^{31}P -MRS-Studien aus dem Krankheitskomplex der Laminopathien zum Vergleich mit den eigenen Untersuchungen vor [45, 53, 97]. Bei äußerst geringen Probandenzahlen sind die Ergebnisse zudem uneinheitlich. Die Arbeitsgruppe um Barbiroli [45] konnte bei 3 Patienten mit autosomal dominanter Limb-Girdle-Myopathie und histologisch nachgewiesenen *ragged-red fibers* sowie vorliegender Kardiomyopathie histologische und phosphorspektroskopische Veränderungen im Sinne einer mitochondrialen Myopathie mit erniedrigten PCr-Konzentrationen (erniedrigte PCr/ P_i - und PCr/ β -ATP-Quotienten), erhöhten ADP-Konzentrationen und erniedrigtem Potential der oxidativen Phosphorylierung nachweisen, während Lodi und Mitarbeiter [97] bei ihren Patienten ($n=7$) im Frühstadium einer autosomal rezessiv vererbten Limb-Girdle-Muskeldystrophie bis auf eine pH-Wert-Erhöhung in Ruhe keine weiteren Veränderungen der Phosphorspektren feststellen konnten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Patienten, die von der Arbeitsgruppe um Lodi untersucht wurden, keine klinischen Zeichen der Muskeldystrophie aufwiesen. Garg und Stray-Gundersen [53] fanden in Muskelbiopsien des M. quadriceps von Patienten mit generalisierter Muskeldystrophie ($n=3$) eine Erhöhung des Typ-II-Faseranteils bei deutlicher Reduktion des Faserquerschnitts, sowohl für Typ-I- als auch für Typ-II-Fasern. Bei reduzierter Maximalkraft und maximaler Sauerstoffaufnahme zeigten die ^{31}P -MRS-Untersuchungen in Ruhe keine Auffälligkeiten gegenüber Normalpersonen. Hierbei ist zu beachten, dass die kernspinspektroskopischen Messungen an der Unterarm- und nicht an der Beinmuskulatur durchgeführt wurden.

In weiteren Veröffentlichungen über phosphorspektroskopische Ergebnisse bei verschiedenen Muskelkrankungen werden erniedrigte Konzentrationsverhältnisse von Phosphokreatin zu β -ATP und vor allem von Phosphokreatin und anorganischem Phosphat als Hinweis auf eine Störung des oxidativen Stoffwechsels entweder in Folge eines mitochondrialen Defektes [9] oder aufgrund einer Störung der Glukose-, bzw. Glykogenbereitstellung genannt [8, 12, 11, 31, 45, 79, 80, 141, 140]. Bei allen genannten Krankheitsbildern handelt es sich allerdings um Muskeldystrophien. ^{31}P -MRS-Untersuchungen an Patienten mit genetisch oder pharmakologisch bedingter Lipodystrophie liegen nicht vor.

Überraschender Weise haben wir bei den FPLD-Patienten keine dieser Veränderungen gefunden, obwohl sie aufgrund der bei dem Krankheitsbild klinisch im Vordergrund stehenden peripheren Insulinresistenz und Hyperlipidämie mit pathologischem Energiestoffwechsel und der leistungsphysiologisch nachgewiesenen verminderten aeroben Leistungsfähigkeit wahrscheinlich waren. Möglicherweise sind die Stoffwechselveränderungen hauptsächlich durch die selektive, für die FPLD charakteristische Erhöhung der Phosphodiesterkonzentration zu erklären. Strukturelle Veränderungen, insbesondere im Bereich der Membranen können alle Bereiche des Zellstoffwechsels beeinflussen, ohne dass die Enzymaktivitäten in den Mitochondrien oder im Cytosol pathologisch sein müssen. Die erhöhte Beweg-

lichkeit von Lamin A/C und daraus resultierend des Cytoskeletts durch die gestörte Interaktion der Intermediärfilamente führt möglicher Weise dazu, dass die semiliquiden membrangebundenen Bestandteile in der MRS sichtbar werden [83, 82]. Die Phosphodiester könnten aber auch Abbauprodukte im Lipidstoffwechsel darstellen. Diese Theorie ist aufgrund der starken Erhöhung der PDE-Konzentration und der Entität der FPLD im Sinne einer Fettverteilungsstörung mit resultierend gestörtem Fettstoffwechsel und Hyperlipidämie sogar wahrscheinlicher. Die hohe Korrelation zwischen relativer PDE- und Plasmalipidkonzentration unterstreicht diese These. In aktuellen Studien zum Krankheitsbild der Lipodystrophien unterschiedlicher Genese wird die toxische Wirkung der Akkumulation von Abbauprodukten im Lipidstoffwechsel als sogenannte Lipotoxizität beschrieben [43, 71, 115, 118, 121, 124, 152].

4.3.2 Kernspinspektroskopische Belastungsmessungen

Die größten Auffälligkeiten im Vergleich der Patientengruppe mit den anderen Probanden stellen analog zu den Ruhemessungen die durchgehend zu allen Belastungs- und Erholungszeitpunkten erhöhten PDE-Konzentrationen und deren Veränderung unter Belastung dar. Dabei war die relative Konzentrationsänderung dieser Metabolitgruppe unter aerober Belastung gegenüber den Kontrollprobanden vermindert. Daraus resultiert für die FPLD-Gruppe über den gesamten Belastungs- und Erholungsverlauf ein annähernd konstanter PCr/PDE-Quotient, was sich auch im rampenförmigen Ausbelastungstest zeigte. Bei den gesunden Probanden kam es zu einem deutlichen Anstieg dieses Quotienten unter Belastung und einer Rückkehr auf das Ausgangsniveau in der Nachbelastungsphase. Bei Gesunden werden unter Belastungsbedingungen Zwischenprodukte des Lipidstoffwechsels im Rahmen der raschen Energiegewinnung weiterverarbeitet, was die PDE-Resonanz nahezu verschwinden lässt, während bei den FPLD-Patienten wahrscheinlich ein großer Anteil der PDE-Fraktion Stoffwechselzwischenprodukte darstellt, die offenbar nicht weiter metabolisiert werden können und demzufolge akkumulieren. Die Belastungsreaktion war bezüglich der übrigen Phosphometabolite unter aeroben Belastungsbedingungen normal [1, 12, 11, 48, 62, 89, 110, 160] und ohne signifikanten Gruppenunterschied zu den Kontrollprobanden. Im Ausbelastungstest fanden wir eine niedrige Rate für die Wiederauffüllung des PCr-Pools, die fast identisch mit der aus dem aeroben Belastungstest ermittelten PCr-Recovery war und mit dem Ausprägungsgrad der Erkrankung korrelierte. Eine verminderte PCr-Recovery-Rate ist ein direkter und sehr sensibler Marker für eine Störung der oxidativen Phosphorylierung und gilt damit als indirekter Nachweis eines mitochondrialen Defektes [3, 8, 7, 9, 79, 78, 80, 97, 96, 141, 115]. Barnes et al. [9] und Taylor et al. [141, 140] konnten diese Veränderungen bei Patienten mit myotoner Dystrophie nachweisen, Lodi et al. [97] und Fabrizi et al. [45] bei Limb-Girdle-Muskeldystrophie. In den übrigen Arbeiten wurden Patienten mit histologisch gesicherten Mitochondriopathien oder Patienten mit Belastungsintoleranz unklarer Genese untersucht. Aus den eigenen Untersuchungen ist nicht zu klären, ob die verminderte Resyntheserate Folge des pathologischen Stoffwechsels ist, z.B. in Folge veränderter intrazellulärer Signalkaskaden, oder ob der Gendefekt direkt zur Störung der Mitochondrienfunktion führt. Wahrscheinlich ist eine Kombination aus beidem, da ähnliche Veränderungen auch bei anderen Laminopathien nachgewiesen wurden, die nicht mit derartigen Stoffwechseleränderungen einhergehen [45, 97], die Ausprägung der Störung jedoch mit dem Ausprägungsgrad der Erkrankung korreliert und im Verlauf der Erkrankung zunimmt.

Im Ausbelastungstest zeigten die FPLD-Patienten bei rascher PCr-Depletion nur ein geringes Absinken des pH-Wertes. Bei maximaler dynamischer Arbeit fanden Vandenborne et al. [148] in der Wadenmuskulatur einen 84%igen Abfall des PCr-Pools und einen achtfachen Anstieg des P_i -Peaks. Karatzaferi et al. [76] fanden eine vergleichbar hohe PCr-Depletion im Anschluss an eine maximale dynamische Belastung. Während die PCr-Depletion in unserer Untersuchung identisch mit denen aus den anderen Veröffentlichungen ist, fällt der korrespondierende P_i -Anstieg bei den FPLD-Patienten geringer aus. Eine verminderte oder sogar fehlende Ansäuerung unter Belastung bei gleicher oder gesteigerter PCr-Depletion ist auf eine Störung der Glykolyse oder der Glukose-Verfügbarkeit zurückzuführen [96]. Bei FPLD-Patienten wurde eine gestörte Glukoseoxidation nachgewiesen [23]. Zusätzlich kommt es durch eine Down-Regulation des GLUT-4-Transporters als Folge der peripheren Insulinresistenz auch zur verminderten Glukoseaufnahme in die Muskelzellen [23]. Im Gegensatz zu strukturellen Ursachen bei den Patienten mit Muskeldystrophie mit veränderter intrazellulärer Matrix bei fehlendem bzw. in seiner Struktur verändertem Dystrophin [80, 87, 96] wurde als Ursache bei der FPLD ein genetisch bedingter transkriptionaler Defekt mit Reduktion der PPAR γ -Aktivität beschrieben, der direkten Einfluss auf die Insulinresistenz und die GLUT-4-Aktivität hat [121, 124]. Deshalb tritt diese Beobachtung auch bei allen FPLD-Patienten unabhängig vom Ausprägungsgrad der Erkrankung als Folge des genetischen Defektes und in der Regel vor den übrigen Stoffwechselveränderungen auf.

Im folgenden Subkapitel werden die protonenspektroskopischen Ergebnisse diskutiert.

4.3.3 Protonenspektroskopische Messungen

Die ^1H -Magnetresonanzspektroskopie ist als Methode zur Erfassung des relativen Fettgehaltes in der Muskulatur gut evaluiert und im Vergleich mit anderen Methoden (z.B. Computertomographie, selektive Fettquantifizierung mittels MRT, Elektronenmikroskopie) und dem Goldstandard der Biopsie validiert [16, 17, 58, 90, 137, 144]. Der Vergleich von Studienergebnissen auf unterschiedlichen Geräten oder mit verschiedenen Untersuchungsdesigns sollte allerdings kritisch erfolgen, da die Muskelfaserorientierung im Verhältnis zur Ausrichtung der Extrazellulärmatrix, die Voxelgröße, -platzierung und -ausrichtung, sowie Kopplungseffekte entscheidenden Einfluss auf die Spektren haben, insbesondere auf die Resonanz extrazellulärer Lipide [16, 17, 18, 50]. Relative Unterschiede oder Veränderungen zwischen gesunden Probanden und Patienten innerhalb einer Studie lassen sich gut vergleichen.

Die Quantifizierung intra- (IMCL) und extramyozellulärer Fette (EMCL) im M. gastrocnemius mittels ^1H -Magnetresonanzspektroskopie erbrachte für die Patientengruppe neben signifikant erhöhten IMCL- überraschender Weise auch signifikant höhere EMCL-Konzentrationen gegenüber den gesunden Kontrollprobanden. Zudem war der Quotient aus EMCL und IMCL mit einem Verhältnis von ca. 5:1 gegenüber 3:1 für die Kontrollgruppe ebenfalls bei den FPLD-Patienten signifikant erhöht und korrelierte hoch mit der Plasmalipid- und -LDL-Konzentration. Aus zahlreichen ^1H -MRS-Untersuchungen [15, 26, 27, 75, 84, 104, 143] sind spezifische Zusammenhänge zwischen Fettstoffwechselstörungen und peripherer Insulinresistenz bekannt. Die Konzentration intramyozellulärer Lipide korreliert mit dem Körpergewicht und dem Fettverteilungsmuster positiv, mit der Insulinresistenz negativ [75, 85, 133, 143]. Die Konzentrationen an zirkulierenden freien Fettsäuren und Insulin scheinen den entscheidenden Einfluss auf die IMCL-Konzentration zu haben, nicht ein erhöhtes Körpergewicht

oder das Fettverteilungsmuster per se [4, 24]. Bei nicht insulinabhängigen, normalgewichtigen Typ-II-Diabetikern wurde eine auf das Doppelte erhöhte IMCL-Konzentrationen in verschiedenen Unterschenkelmuskeln gegenüber Nichtdiabetikern mittels ^1H -MRS ermittelt [4, 24, 75, 104], also identische Ergebnisse zu denen in unserer Patientengruppe mit ausgeprägter peripherer Insulinresistenz. Als histologisches Korrelat konnten Vantyghem et al. [149] intrazelluläre Fettansammlung (*“lipid droplets”*) bei FPLD-Patienten nachweisen. Allerdings stimmten nur 3 ihrer 14 Patienten einer Muskelbiopsie zu. In aktuellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation intramyozellulärer Lipide in den Myozyten mit einer gestörten Triglyceridsyntheseleistung vergesellschaftet ist [71, 115]. Die intrazellulären Lipidablagerungen sind Zwischenprodukte des Fettstoffwechsels, vor allem das 1,2-Diacylglycerol-Phosphat (DAG) [51, 43]. Erhöhte Konzentrationen an DAG führen über die Aktivierung neuer Proteinkinasen C zur direkten Hemmung der insulinvermittelten Glukoseaufnahme über Blockierung der GLUT-4-Rezeptoren [43, 124]. Die daraus resultierende Reduktion der insulinmedierten Glukoseaufnahme in die Zelle spiegelt das Ausmaß der peripheren Insulinresistenz wider. Boschmann et al. [23] fanden zudem bei FPLD-Patienten unter Belastung eine gesteigerte Rate der β -Oxidation der Fettsäuren. Die β -Oxidation war allerdings unvollständig und führte zur Akkumulation von Zwischenprodukten des Lipidabbaus mit gesteigerter Ketogenese. Die intrazellulären Fettablagerungen können neben der oben beschriebenen Störung intrazellulärer Signalkaskaden über die Produktion von Radikalen direkt eine chronische Entzündungsreaktion auslösen, die die Mitochondrienfunktion einschränkt [118]. Da es sich bei diesen lipotoxischen Verbindungen hauptsächlich um zweifach phosphorylierte Ester handelt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um die Moleküle handelt, die sich in der Phosphorspektroskopie als PDE-Resonanz und in der Protonenspektroskopie als IMCL abbilden.

Bei Patienten mit peripherer Insulinresistenz geht die gesteigerte IMCL-Konzentration mit verringerten EMCL/IMCL-Quotienten (<1) gegenüber Normalpersonen einher [75, 104, 120]. In unserer Patientengruppe fanden wir überraschender Weise das genau gegensätzliche Ergebnis. Anscheinend ist die intramuskuläre extrazelluläre Akkumulation von Lipiden noch deutlich stärker ausgeprägt, als die intrazelluläre. Diese Beobachtung konnte in der einzigen protonenspektroskopischen Studie mit Patienten mit Lipodystrophie nicht bestätigt werden. Brechtel und Mitarbeiter [25] fanden bei Patienten mit Lawrence Syndrom, einem sehr seltenen Krankheitsbild generalisierter Lipodystrophie, um 14% erniedrigte IMCL-Konzentrationen in der Wadenmuskulatur gegenüber Gesunden. Die Resonanz für extramyozelluläre Fette war nicht nachweisbar. Beim Lawrence Syndrom kommt es aber zu einer starken Reduktion des Körperfettanteils, während bei der FPLD eine Fettverteilungsstörung bei annähernd normalem Körperfettanteil vorliegt. Im Verlauf der FPLD kommt es genetisch bedingt zu einer Veränderung des peripheren Depotfettgewebes mit Unfähigkeit der Adipozyten intrazellulär Fett zu speichern sowie reduzierter Triglyceridsynthese [20]. Im Tiermodell wurde als Ursache eine Störung der Zelldifferenzierung vom Präadipozyten zum Adipozyten nachgewiesen [155]. Der intrazelluläre Transkriptionsfaktor PPAR γ , der wichtigste Faktor der Adipogenese mit Regulation der Fettaufnahme und des Fettmetabolismus, wird bei FPLD-Patienten als Folge der Dysfunktion des Lamin A/C oder eines direkten Gendefektes supprimiert [95, 92, 93]. Die unterschiedliche Konzentration von PPAR γ im viszeralen und subkutanen Fettgewebe ist wahrscheinlich auch die Ursache für den regionalen Befall der Adipozyten an den Extremitäten bei den FPLD-Patienten [121]. Klinisch wird diese Störung genau zu dem Zeitpunkt manifest, wenn die Fettdepots regulär anwachsen sollten [71]. Als Resultat kommt es zu einer Fettumverteilung und zu einer vermehrten Fettablagerung im Muskelgewebe mit intrazellulärer

Akkumulation von Langketten-Acyl-CoA, DAG und Ceramiden, sowie einer Erhöhung der Konzentration zirkulierender freier Fettsäuren [2, 52, 115]. Das erklärt möglicher Weise die pathologisch hohen EMCL-, Plasmalipid- und -LDL-Konzentrationen, sowie das typische Fettverteilungsmuster und die Steatosis hepatis. Konsekutiv steigt auch die Konzentration der intramyozellulären Lipide mit oben beschriebenen pathologischen Stoffwechseleränderungen.

4.3.4 Schlussfolgerungen und klinische Relevanz der gefundenen Ergebnisse

Die dargestellten Untersuchungen haben dazu beigetragen, das Krankheitsbild der familiären partiellen Lipodystrophie Typ Dunnigan-Köbberling, welche als Modellerkrankung für Insulinresistenzsyndrome, Hyperlipidämien und Verteilungsstörungen von Adipozyten (Adipositas) dient, weiter zu charakterisieren. Die magnetresonanzspektroskopischen Ergebnisse und Korrelationsanalysen liefern entscheidende Hinweise, die Theorien zur Pathophysiologie der Insulinresistenz und Mechanismen der Lipotoxizität stützen. Damit tragen unsere Forschungsarbeiten auch zum weiteren Verständnis anderer Krankheiten mit insulinresistentem Diabetes mellitus und Hyperlipidämie, z.B. dem Diabetes mellitus Typ II, der Adipositas oder in Kombination dem metabolischen Syndrom bei, was aufgrund der großen Inzidenz, Morbidität und Mortalität dieser Erkrankungen von großer Wichtigkeit ist. Bestimmte Formen von *LMNA*-Mutationen werden sogar direkt als prädisponierender Faktor für die Entwicklung eines Diabetes oder metabolischen Syndroms diskutiert [38, 157].

In Abbildung 4.1 sind schematisch die pathophysiologisch entscheidenden intrazellulären Signalkaskaden und Stoffwechselinteraktionen für die FPLD und die Verbindungen zu den Hauptergebnissen der vorliegenden Arbeit dargestellt. Lamin A und C haben die Funktion, Chromatin und verschiedene Transkriptionsfaktoren zu binden und sind an der Organisation der Kernmembran und des Zytoskeletts beteiligt [121, 157]. Die genetisch bedingte Störung dieser Schlüsselstelle der Zelldifferenzierung und des Zellmetabolismus erklärt die Symptomvielfalt bei der FPLD. Einige der pathophysiologischen Zusammenhänge scheinen aber auch bei den metabolischen "Wohlstandskrankheiten" [121], den Mechanismen der Zellverfettung im Alter mit konsekutiver Störung der Mitochondrienfunktion [124] und den medikamentös induzierten Lipoatrophien, z.B. bei HIV [146] von zentraler Bedeutung.

Beim metabolischen Syndrom kommt der Organismus an die Grenze der Speicherkapazität bzw. der Umsatzraten für Lipide, während bei der Lipodystrophie durch die allmähliche Reduktion des subkutanen Fettgewebes dessen Speichervermögen sowie endokrine und antiinflammatorische Funktionen verloren gehen [43, 71, 124]. Die Auswirkungen auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel sind identisch [32, 132] (vgl. Tab. 4.1). Bei den medikamentös induzierten Lipoatrophien werden direkte Störungen der Transkriptionsfaktoren und intrazellulärer Signalkaskaden vermutet [146]. Eine daraus resultierende oder eigenständig genetisch determinierte reduzierte mitochondriale Aktivität fördert wiederum die Erhöhung der intrazellulären Fettablagerungen [105, 113, 114], was das Fortschreiten der metabolischen Störungen wiederum aggraviert.

Aufgrund der ähnlichen pathophysiologischen Mechanismen bei der FPLD und dem metabolischen Syndrom mit genetisch bzw. hyperalimentär bedingter Lipotoxizität ergeben sich verschiedene therapeutische Ansätze. Zum einen muss die Fettaufnahme in die Muskelzellen bei gleichzeitiger Reduktion der frei zirkulierenden Lipide und Fettsäuren erreicht werden [124]. Zum anderen könnte z.B. über Sub-

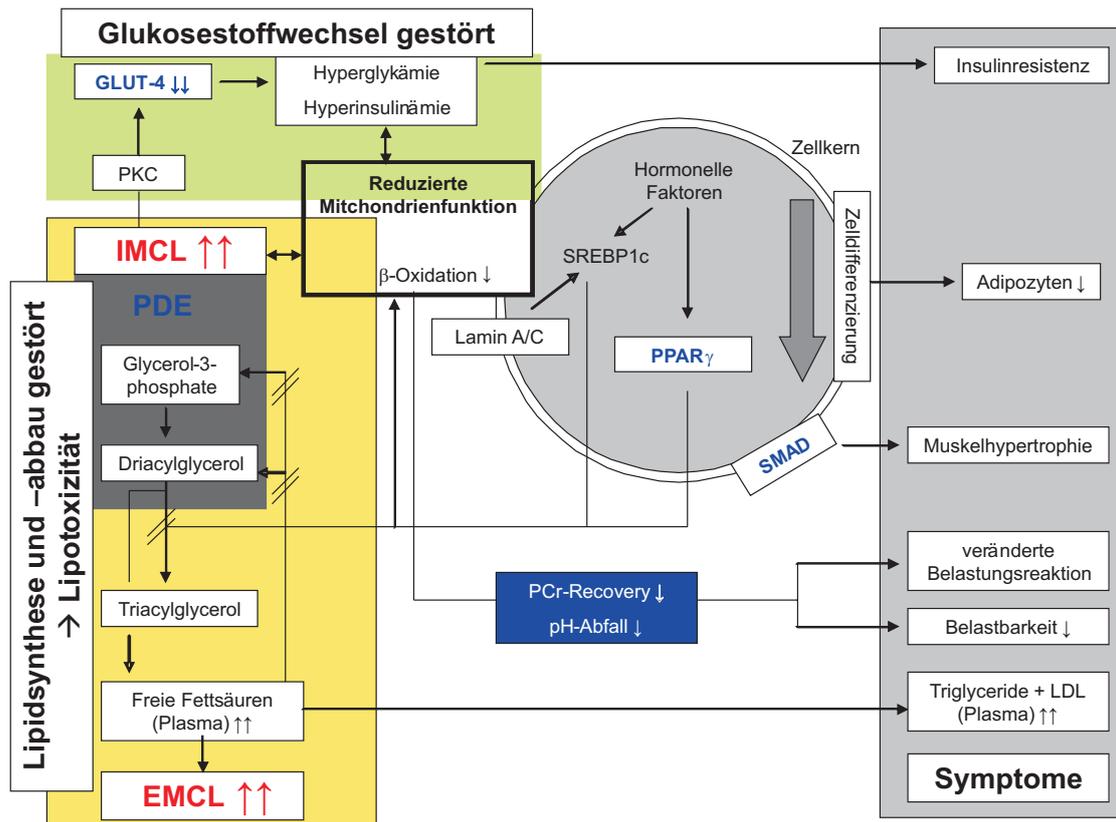


Abbildung 4.1.: **Zusammenfassende schematische Darstellung der Hypothesen zu den pathophysiologisch entscheidenden intrazellulären Signalkaskaden und Stoffwechselinteraktionen bei der FPLD**

Blau bzw. blau unterlegt sind die Hauptergebnisse der ^{31}P -MRS, rot die der ^1H -MRS dargestellt. GLUT-4: Glukosetransporter, PKC: Proteinkinase C, IMCL: intrazelluläre Lipide, EMCL: extrazelluläre Lipide, PDE: Phosphodiester, LDL: low density lipoproteins; Doppelstrich: Stoffwechselvorgang blockiert.

stitution oder Aktivierung bestimmter Kinasen der intrazelluläre Lipidstoffwechsel beeinflusst werden. Dabei gilt es, die Weiterverarbeitung der Zwischenprodukte der Triglyceridsynthese (z.B. DAG) und der β -Oxidation der Fettsäuren zu fördern [23, 124]. Als weiterer Ansatz bietet sich eine Verbesserung der Fettspeicherung in den Adipozyten an. Dies kann z.B. medikamentös über PPAR γ -Agonisten oder Adipokine [95, 115, 121, 124] oder - vor allem bei vorliegender Lipodystrophie - durch Transplantation von funktionsfähigem subkutanen Fettgewebe [121, 145] erreicht werden. Auf diese Weise ist es möglich, den oben beschriebenen circulus vitiosus zu durchbrechen, was in ersten Anwendungsstudien bestätigt wurde [95, 145].

Die Kernspinspektroskopie bietet herausragende Möglichkeiten, um diese neuen Therapieansätze zu evaluieren. Zum einen sind durch die hohe systeminterne Genauigkeit und die Nichtinvasivität des Verfahrens gute Voraussetzungen für Längsschnittuntersuchungen gegeben. Zum anderen können mit dieser Methode - wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt - die Schlüsselstellen des intra- und extrazellulären Metabolismus auf molekularer Ebene abgebildet werden. Mittels weiterführender kernspinspektroskopischer Untersuchungen an Patienten mit anderen Krankheitsbildern (Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom, HIV mit Lipodystrophie, Zellverfettung im Alter) können Parallelen in den

Tabelle 4.1 : **Gegensätze und Parallelen der Lipidakkumulation und Lipotoxizität bei der FPLD und beim metabolischen Syndrom** (nach Rochford [121])

FPLD	Metabolisches Syndrom
Rückgang des subkutanen Fettgewebes gestörte Adipozytendifferenzierung Hormonresistenz veränderte Ausschüttung von Adipokinen stark eingeschränkte Fettspeicherkapazität	Hypertrophie der Adipozyten Fehlfunktion der Adipozyten proinflammatorische Reaktion veränderte Ausschüttung von Adipokinen Fettspeicherkapazität ausgeschöpft
<p>ektoper Lipidakkumulation Lipotoxizität Insulinresistenz Dyslipidämie kardiovaskuläre Erkrankungen</p>	

Stoffwechselanomalien aufgedeckt werden, um somit den jeweils zugrunde liegenden Pathomechanismus besser verstehen und kausale Therapien entwickeln zu können. Durch genauere Analyse der IMCL- und EMCL-Fraktion in der Protonenspektroskopie und insbesondere der Phosphodiester in der Phosphorspektroskopie können möglicherweise die Schlüsselstellen der Stoffwechselfregulation noch weiter eingegrenzt und zudem die enzymatischen Reaktionen des Glukose- und Fettstoffwechsels mit Schrittmacherfunktion identifiziert werden. Dafür sind weitere Forschungsprojekte mit zielgerichteter Optimierung der spektroskopischen Messmethodik gegebenenfalls in Kombination mit weiteren modernen Messmethoden notwendig.

5 Zusammenfassung

Die familiäre partielle Lipodystrophie Typ Dunnigan-Köbberling (FPLD) ist eine seltene genetische Erkrankung und stellt aufgrund der Ähnlichkeit der Symptome mit denen des metabolischen Syndroms (Syndrom X) eine Modellerkrankung für das Verständnis der Pathogenese der Hyperlipidämien, insulinresistentem Diabetes und Adipositas dar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, durch Untersuchungen zum Muskelstoffwechsel und Fettverteilungsmuster sowie leistungsphysiologische Tests das Krankheitsbild der FPLD weiter zu charakterisieren und mögliche pathophysiologische Zusammenhänge auf molekularer Ebene abzuleiten.

Untersucht wurden 19 Patienten mit dem klinischen Bild einer FPLD und 17 gesunde, männliche Vergleichsprobanden. Bei allen Patienten wurde ein genetisches Screening bzgl. typischer Mutationen für eine FPLD durchgeführt. Die Untersuchungen zum Muskelstoffwechsel und Fettverteilungsmuster der Beinmuskulatur erfolgten für alle Probanden mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS), einem modernen Verfahren zur kontinuierlichen, nichtinvasiven Erfassung metabolischer Zustände und Veränderungen in der (arbeitenden) Muskulatur. Die Konzentrationsverhältnisse der Metabolite des Energiestoffwechsels (Phosphokreatin, β -ATP, anorganisches Phosphat sowie Phospho- und Phosphodiester) wurden phosphorspektroskopisch (^{31}P -MRS), das intra- und extrazelluläre Fettverteilungsmuster protonenspektroskopisch (^1H -MRS) ermittelt. Zusätzlich wurden ^{31}P -Spektren bei zeitgleicher Belastung der Wadenmuskulatur im Tomographen und in der Nachbelastungsphase akquiriert. Der aerob-alkalotische Stoffwechsel wurde im 5-min-Test mit moderater Belastung, der anaerob-alkalotische mittels rampenförmigem Ausbelastungstest erfasst. Die Leistungsfähigkeit wurde im Rahmen einer Fahrradspiroergometrie ermittelt. Die kernspinspektroskopischen Ergebnisse wurden auf korrelative Zusammenhänge mit den leistungsphysiologischen und bereits erhobenen klinischen Parametern geprüft.

Bei 17 Patienten wurde eine Mutation im *LMNA*- oder *PPAR γ* -Gen als Ursache für die FPLD gefunden. In der Phosphorspektroskopie zeigten sich in Ruhe und in allen Belastungs- und Nachbelastungsspektren signifikant höhere Konzentrationen der Phosphodiester (PDE) bei den FPLD-Patienten im Vergleich zu den gesunden Vergleichsprobanden. Zudem wiesen die Patienten über den Belastungs- und Erholungsverlauf konstante Quotienten zwischen Phosphokreatin und PDE auf, während es bei den Vergleichsprobanden zu einem Absinken dieses Parameters unter Belastung mit Wiederanstieg auf den Ausgangswert in der Nachbelastungsphase kam. Im Ausbelastungstest kam es in der Patientengruppe zu geringem Absinken des intrazellulären pH-Wertes und verzögerter Regeneration des Phosphokreatinpools in der Erholungsphase. Protonenspektroskopisch fanden wir für die FPLD-Patienten signifikant höhere Konzentrationen sowohl intra- (IMCL) als auch extramyozellulärer (EMCL) Lipide im Vergleich zu den Kontrollprobanden. Das Verhältnis EMCL/IMCL war ebenfalls signifikant erhöht. In der Fahrradspiroergometrie wiesen die FPLD-Patienten bei normaler absoluter und relativer Leistungsfähigkeit eine um 23% gegenüber der Norm verminderte aerobe Kapazität auf. Die anaerobe

Kapazität lag im hochnormalen Bereich. Der individuelle anaerobe Übergangsbereich (aerob-anaerobe Schwelle) trat bei den Patienten bei 40% der maximalen Leistungsfähigkeit und somit verfrüht ein. Wir fanden hohe korrelative Zusammenhänge zwischen relativer PDE-Konzentration und der Plasmalipidkonzentration sowie dem EMCL/IMCL-Quotienten und der Plasmalipid- sowie -LDL-Konzentration und dem BMI. Für den fahrradergometrischen Leistungstest fanden wir moderate bis hohe negative korrelative Zusammenhänge zwischen relativer PDE-Konzentration in Ruhe und unter Belastung und den Parametern der absoluten und relativen Leistungsfähigkeit, der relativen Sauerstoffaufnahme sowie der Herzfrequenz und Laktatkonzentration an der individuellen anaeroben Schwelle.

Durch die dargestellten Untersuchungen konnten wir den klinischen Phänotyp von Patienten mit familiärer partieller Lipodystrophie Typ Dunnigan-Köbberling weiter charakterisieren. Die kernspinspektroskopischen Untersuchungen und Korrelationsanalysen haben entscheidende Hinweise zu möglichen pathophysiologischen Mechanismen geliefert:

1. Der genetische Defekt führt vermutlich direkt über Reduktion der PPAR γ -Aktivität und Down-Regulation des GLUT-4-Transporters zur Störung der insulinvermittelten Glukoseaufnahme, was die gestörte Belastungs- und Regenerationskinetik im Tomographen unabhängig von der Ausprägung des Krankheitsbildes und das Auftreten der Insulinresistenz vor den übrigen Stoffwechseleränderungen erklärt.
2. Die erhöhten PDE- und IMCL-Konzentrationen spiegeln vermutlich Zwischenprodukte des Fettstoffwechsels bei gestörter Triglyceridsynthese bzw. β -Oxidation wider. Diese intrazellulären Lipidablagerungen führen über eine Störung intrazellulärer Signalkaskaden, chronische Entzündungsreaktionen durch Radikalbildung sowie Störung der Mitochondrien- und Membranfunktionen zu den klinisch apparenten Stoffwechselpathologien, was als Lipotoxizität bezeichnet wird. Extrazellulär kommt es ebenfalls zur Akkumulation von Zwischenprodukten des Fettstoffwechsels, was die hohen EMCL-, Plasmalipid- und -LDL-Konzentrationen erklärt. Die Lipidakkumulation nimmt im Verlauf der Erkrankung zu und korreliert mit den klinischen Parametern. Genetisch bedingt kommt es bei der FPLD zu einer Störung der Adipozytendifferenzierung mit allmählicher Reduktion des subkutanen Fettgewebes. Die Stoffwechseleränderungen treten sekundär aufgrund des Verlustes der Speicherkapazität sowie der endokrinen und antiinflammatorischen Funktionen des Fettgewebes auf. Beim metabolischen Syndrom kommt der Organismus hyperalimentär bedingt an die Grenze der Speicherkapazität bzw. der Umsatzraten für Lipide.

Die Auswirkungen auf den Fett- und Glukosestoffwechsel sind die gleichen wie bei der FPLD. Die Zellverfettung im Alter oder die medikamentös induzierte Lipoatrophie, z.B. bei HIV, unterliegen vermutlich den gleichen intrazellulär gestörten Signalkaskaden wie bei der FPLD. Die ähnlichen pathophysiologischen Mechanismen bei Erkrankungen unterschiedlicher Entitäten eröffnen neue therapeutische Strategien, die insbesondere an Schlüsselstellen des intrazellulären Lipidmetabolismus und der Lipidspeicherung ansetzen. Die Magnetresonanzspektroskopie stellt ein einzigartiges diagnostisches Verfahren dar, den Erfolg dieser Strategien zu verifizieren.

Literaturverzeichnis

- [1] Achten, E., Van Cauteren, M., Willem, R., Luypaert, R., Malaisse, W., Van Bosch, G., Delanghe, G., De Meirleir, K., and Osteaux, M. ^{31}P -NMR Spectroscopy and the Metabolic Properties of Different Muscle Fibers. *J Appl Physiol* 68(2) (1990), 644–649.
- [2] Araújo-Vilar, D., Loidi, L., Domínguez, F., and Cabezas-Cerrato, J. Phenotypic gender differences in subjects with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) due to a nuclear lamin A/C R482W mutation. *Horm Metab Res* 35, 1 (Jan 2003), 29–35.
- [3] Argov, Z., Stefano, N. D., Taivassalo, T., Chen, J., Karpati, G., and Arnold, D. L. Abnormal oxidative metabolism in exercise intolerance of undetermined origin. *Neuromuscul Disord* 7, 2 (Mar 1997), 99–104.
- [4] Bachmann, O. P., Dahl, D. B., Brechtel, K., Machann, J., Haap, M., Maier, T., Loviscach, M., Stumvoll, M., Claussen, C. D., Schick, F., Häring, H. U., and Jacob, S. Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 50, 11 (Nov 2001), 2579–2584.
- [5] Baier, P. *Laminopathien*. PhD thesis, Charité, Berlin, 2003.
- [6] Barbiroli, B., Funicello, R., Ferlini, A., Montagna, P., and Zaniol, P. Muscle energy metabolism in female DMD/BMD carriers: a ^{31}P -MR spectroscopy study. *Muscle Nerve* 15, 3 (Mar 1992), 344–348.
- [7] Barbiroli, B., Iotti, S., and Lodi, R. In vivo assessment of human skeletal muscle mitochondria respiration in health and disease. *Mol Cell Biochem* 174, 1-2 (Sep 1997), 11–15.
- [8] Barbiroli, B., McCully, K. K., Iotti, S., Lodi, R., Zaniol, P., and Chance, B. Further impairment of muscle phosphate kinetics by lengthening exercise in DMD/BMD carriers. An in vivo ^{31}P -NMR spectroscopy study. *J Neurol Sci* 119, 1 (Oct 1993), 65–73.
- [9] Barnes, P. R., Kemp, G. J., Taylor, D. J., and Radda, G. K. Skeletal muscle metabolism in myotonic dystrophy A ^{31}P magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 120 (Pt 10) (Oct 1997), 1699–1711.
- [10] Behrens, G. M., Lloyd, D., Schmidt, H. H., Schmidt, R. E., and Trembath, R. C. Lessons from lipodystrophy: LMNA, encoding lamin A/C, in HIV therapy-associated lipodystrophy. *AIDS* 14, 12 (Aug 2000), 1854–1855.
- [11] Bendahan, D., Mattei, J. P., Guis, S., Kozak-Ribbens, G., and Cozzone, P. J. [Non-invasive investigation of muscle function using ^{31}P magnetic resonance spectroscopy and ^1H MR imaging]. *Rev Neurol (Paris)* 162, 4 (Apr 2006), 467–484.

- [12] Bendahan, D., Mattéi, J. P., Kozak-Ribbens, G., and Cozzone, P. J. [Non invasive investigation of muscle diseases using ^{31}P magnetic resonance spectroscopy: potential in clinical applications]. *Rev Neurol (Paris)* 158, 5 Pt 1 (May 2002), 527–540.
- [13] Benedetti, S., Menditto, I., Degano, M., Rodolico, C., Merlini, L., D'Amico, A., Palmucci, L., Berardinelli, A., Pegoraro, E., Trevisan, C. P., Morandi, L., Moroni, I., Galluzzi, G., Bertini, E., Toscano, A., Olivè, M., Bonne, G., Mari, F., Caldara, R., Fazio, R., Mammì, I., Carrera, P., Toniolo, D., Comi, G., Quattrini, A., Ferrari, M., and Previtali, S. C. Phenotypic clustering of lamin A/C mutations in neuromuscular patients. *Neurology* 69, 12 (Sep 2007), 1285–1292.
- [14] Benedetti, S., and Merlini, L. Laminopathies: from the heart of the cell to the clinics. *Curr Opin Neurol* 17, 5 (Oct 2004), 553–560.
- [15] Bernroider, E., Brehm, A., Krssak, M., Anderwald, C., Trajanoski, Z., Cline, G., Shulman, G. I., and Roden, M. The role of intramyocellular lipids during hypoglycemia in patients with intensively treated type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 10 (Oct 2005), 5559–5565.
- [16] Boesch, C., Décombaz, J., Slotboom, J., and Kreis, R. Observation of intramyocellular lipids by means of ^1H magnetic resonance spectroscopy. *Proc Nutr Soc* 58, 4 (Nov 1999), 841–850.
- [17] Boesch, C., and Kreis, R. Observation of intramyocellular lipids by ^1H -magnetic resonance spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci* 904 (May 2000), 25–31.
- [18] Boesch, C., and Kreis, R. Dipolar coupling and ordering effects observed in magnetic resonance spectra of skeletal muscle. *NMR Biomed* 14, 2 (Apr 2001), 140–148.
- [19] Boesch, C., Machann, J., Vermathen, P., and Schick, F. Role of proton MR for the study of muscle lipid metabolism. *NMR Biomed* 19, 7 (Nov 2006), 968–988.
- [20] Boguslavsky, R. L., Stewart, C. L., and Worman, H. J. Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 15, 4 (Feb 2006), 653–663.
- [21] Bonne, G., Barletta, M. R. D., Varnous, S., Bécane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C. R., Gary, F., Urtizbera, J. A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D., and Schwartz, K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21, 3 (Mar 1999), 285–288.
- [22] Borg, G. Psychological Bases of Perceived Exertion. *Med Sci Sports exerc* 14 (1982), 377–381.
- [23] Boschmann, M., Engeli, S., Moro, C., Luedtke, A., Adams, F., Gorzelniak, K., Rahn, G., Mähler, A., Dobberstein, K., Krüger, A., Schmidt, S., Spuler, S., Luft, F. C., Smith, S. R., Schmidt, H. H.-J., and Jordan, J. LMNA mutations, skeletal muscle lipid metabolism, and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 4 (Apr 2010), 1634–1643.
- [24] Brechtel, K., Dahl, D. B., Machann, J., Bachmann, O. P., Wenzel, I., Maier, T., Claussen, C. D., Häring, H. U., Jacob, S., and Schick, F. Fast elevation of the intramyocellular lipid content in the presence of circulating free fatty acids and hyperinsulinemia: a dynamic ^1H -MRS study. *Magn Reson Med* 45, 2 (Feb 2001), 179–183.

- [25] Brechtel, K., Jacob, S., Machann, J., Hauer, B., Nielsen, M., Meissner, H. P., Matthaei, S., Haering, H. U., Claussen, C. D., and Schick, F. Acquired generalized lipodystrophy (AGL): highly selective MR lipid imaging and localized ^1H -MRS. *J Magn Reson Imaging* 12, 2 (Aug 2000), 306–310.
- [26] Brechtel, K., Machann, J., Jacob, S., Strempler, A., Schick, F., Häring, H. U., and Claussen, C. D. [In-vivo ^1H -MR spectroscopy: the determination of the intra- and extramyocellular lipid content depending on the insulin effect in the direct offspring of type-2 diabetics]. *Rofo* 171, 2 (Aug 1999), 113–120.
- [27] Brehm, A., Krssak, M., Schmid, A. I., Nowotny, P., Waldhäusl, W., and Roden, M. Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. *Diabetes* 55, 1 (Jan 2006), 136–140.
- [28] Brodsky, G. L., Muntoni, F., Miodini, S., Sinagra, G., Sewry, C., and Mestroni, L. Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. *Circulation* 101, 5 (Feb 2000), 473–476.
- [29] Brown, M. S., and Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 4746 (Apr 1986), 34–47.
- [30] Cao, H., and Hegele, R. A. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 9, 1 (Jan 2000), 109–112.
- [31] Chance, B., Leigh, J. S., Kent, J., McCully, K., Nioka, S., Clark, B. J., Maris, J. M., and Graham, T. Multiple controls of oxidative metabolism in living tissues as studied by phosphorus magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 24 (Dec 1986), 9458–9462.
- [32] Chen, D., and Garg, A. Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. *J Lipid Res* 40, 10 (Oct 1999), 1735–1746.
- [33] Chen, L., Lee, L., Kudlow, B. A., Santos, H. G. D., Sletvold, O., Shafeghati, Y., Botha, E. G., Garg, A., Hanson, N. B., Martin, G. M., Mian, I. S., Kennedy, B. K., and Oshima, J. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 362, 9382 (Aug 2003), 440–445.
- [34] Clasing, D., and Siegfried, I., Eds. *Sportärztliche Untersuchung und Beratung*. Perimed, Erlangen, 1986.
- [35] De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J., Tazir, M., Kassouri, N., Szepletowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C., Grid, D., and Levy, N. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 70(4) (January 2002), 1075.
- [36] Decaudoain, A., Vantyghem, M.-C., Guerci, B., Hécart, A.-C., Auclair, M., Reznik, Y., Narbonne, H., Ducluzeau, P.-H., Donadille, B., Lebbé, C., Béréziat, V., Capeau, J., Lascols, O., and Vigouroux, C. New Metabolic Phenotypes in Laminopathies: LMNA Mutations in Patients With Severe Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* (Aug 2007), 4835–4844.

- [37] Dobbins, R. L., and Malloy, C. R. Measuring in-vivo metabolism using nuclear magnetic resonance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6, 5 (Sep 2003), 501–509.
- [38] Duesing, K., Charpentier, G., Marre, M., Tichet, J., Hercberg, S., Froguel, P., and Gibson, F. Evaluating the association of common LMNA variants with type 2 diabetes and quantitative metabolic phenotypes in French Europids. *Diabetologia* 51, 1 (Jan 2008), 76–81.
- [39] Dunnigan, M. G., Cochrane, M. A., Kelly, A., and Scott, J. W. Familial lipotrophic diabetes with dominant transmission. A new syndrome. *Q J Med* 43, 169 (Jan 1974), 33–48.
- [40] Edström, L., Hultman, E., Sahlin, K., and Sjöholm, H. The Content of High-Energy Phosphates in Different Fibre Types in Skeletal Muscles from Rat, Guinea-Pig and Man. *J Physiol* 332 (1982), 47–58.
- [41] Emery, A. E. Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromuscul Disord* 10, 4-5 (Jun 2000), 228–232.
- [42] Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A. B., Boehnke, M., Glover, T. W., and Collins, F. S. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 6937 (May 2003), 293–298.
- [43] Erion, D. M., and Shulman, G. I. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med* 16, 4 (Apr 2010), 400–402.
- [44] Esch, H. V., Agarwal, A. K., Debeer, P., Fryns, J.-P., and Garg, A. A homozygous mutation in the lamin A/C gene associated with a novel syndrome of arthropathy, tendinous calcinosis, and progeroid features. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2 (Feb 2006), 517–521.
- [45] Fabrizi, G. M., Lodi, R., D’Ettore, M., Malandrini, A., Cavallaro, T., Rimoldi, M., Zaniol, P., Barbiroli, B., and Guazzi, G. Autosomal dominant limb girdle myopathy with ragged-red fibers and cardiomyopathy. A pedigree study by in vivo ^{31}P -MR spectroscopy indicating a multisystem mitochondrial defect. *J Neurol Sci* 137, 1 (Apr 1996), 20–27.
- [46] Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H. J., Spudich, S., De Girolami, U., Seidman, J., Seidman, C., Muntoni, F., Muehle, G., Johnson, W., and McDonough, B. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* 341(23) (December 1999), 1715–1724.
- [47] Foster, M. *Magnetic Resonance in Medicine and Biology*. Pergamon Press, Oxford, 1984.
- [48] Francescato, M., and Cettolo, V. Two-Pedal Ergometer for in Vivo MRS Studies of Human Calf Muscle. *Magn Reson Med* 46 (2001), 1000–1005.
- [49] Gadian, D. *Nuclear Magnetic Resonance and its Application to Living Systems*. Clarendon Press, Oxford, 1984.

- [50] Gao, F., Bottomley, P. A., Arnold, C., and Weiss, R. G. The effect of orientation on quantification of muscle creatine by ^1H MR spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 21, 5 (Jun 2003), 561–566.
- [51] Garg, A. Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clin Cornerstone* 8 Suppl 4 (2006), S7–S13.
- [52] Garg, A., Peshock, R. M., and Fleckenstein, J. L. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1 (Jan 1999), 170–174.
- [53] Garg, A., Stray-Gundersen, J., Parsons, D., and Bertocci, L. A. Skeletal muscle morphology and exercise response in congenital generalized lipodystrophy. *Diabetes Care* 23, 10 (Oct 2000), 1545–1550.
- [54] Garg, A., Vinaitheerthan, M., Weatherall, P. T., and Bowcock, A. M. Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin a/c gene. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1 (Jan 2001), 59–65.
- [55] Genge, A., Karpati, G., Arnold, D., Shoubridge, E. A., and Carpenter, S. Familial myopathy with conspicuous depletion of mitochondria in muscle fibers: a morphologically distinct disease. *Neuromuscul Disord* 5, 2 (Mar 1995), 139–144.
- [56] Genschel, J., Baier, P., Kuepferling, S., Proepsting, M., Buettner, C., Ewert, R., Hetzer, R., Lochs, H., and Schmidt, H. A new frameshift mutation at codon 466 (1397delA) within the LMNA gene. *Hum Mutat* 16, 3 (Sep 2000), 278.
- [57] Genschel, J., and Schmidt, H. H. Mutations in the LMNA gene encoding lamin A/C. *Hum Mutat* 16, 6 (Dec 2000), 451–459.
- [58] Geurts, J. J. G., Barkhof, F., Castelijns, J. A., Uitdehaag, B. M. J., Polman, C. H., and Pouwels, P. J. W. Quantitative ^1H -MRS of healthy human cortex, hippocampus, and thalamus: metabolite concentrations, quantification precision, and reproducibility. *J Magn Reson Imaging* 20, 3 (Sep 2004), 366–371.
- [59] Gillies, R., Ed. *N M R in Physiology and Biomedicine*. Academic Press, 1994.
- [60] Günther, T., Vormann, J., Konstanczak, P., and Schäfer, A. Interactions of polyamines in the measurement of free magnesium concentration by mag-fura-2 and ^{31}P -NMR. *Biochim Biophys Acta* 1192, 2 (Jun 1994), 281–285.
- [61] Gold, R., Seibel, P., Reinelt, G., Schindler, R., Landwehr, P., Beck, A., and Reichmann, H. Phosphorus magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of mitochondrial myopathies: results of a 6-month therapy study with coenzyme Q. *Eur Neurol* 36, 4 (1996), 191–196.
- [62] Goudemant, J., Francaux, M., Mottet, I., Demeure, R., Sibomana, M., and Sturbois, X. ^{31}P NMR Saturation Transfer Study of the Creatine Kinase Reaction in Human Skeletal Muscle at Rest and During Exercise. *MRM* 37 (1997), 744–753.

- [63] Grünert, J. *MR-Spektroskopie*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 1989.
- [64] Harp, J. B. New insights into inhibitors of adipogenesis. *Curr Opin Lipidol* 15, 3 (Jun 2004), 303–307.
- [65] Hegele, R. LMNA mutation position predicts organ system involvement in laminopathies. *Clin Genet* 68, 1 (Jul 2005), 31–34.
- [66] Hegele, R. A. Familial partial lipodystrophy: a monogenic form of the insulin resistance syndrome. *Mol Genet Metab* 71, 4 (Dec 2000), 539–544.
- [67] Hegele, R. A., Anderson, C. M., and Cao, H. Lamin A/C mutation in a woman and her two daughters with Dunnigan-type partial lipodystrophy and insulin resistance. *Diabetes Care* 23, 2 (Feb 2000), 258–259.
- [68] Hegele, R. A., Cao, H., Anderson, C. M., and Hramiak, I. M. Heterogeneity of nuclear lamin A mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 9 (Sep 2000), 3431–3435.
- [69] Hegele, R. A., and Pollex, R. L. Genetic and physiological insights into the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, 3 (Sep 2005), R663–R669.
- [70] Howald, H., Boesch, C., Kreis, R., Matter, S., Billeter, R., Essen-Gustavsson, B., and Hoppeler, H. Content of intramyocellular lipids derived by electron microscopy, biochemical assays, and ¹H-MR spectroscopy. *J Appl Physiol* 92, 6 (Jun 2002), 2264–2272.
- [71] Huang-Doran, I., Sleigh, A., Rochford, J. J., O’Rahilly, S., and Savage, D. B. Lipodystrophy: metabolic insights from a rare disorder. *J Endocrinol* 207, 3 (Dec 2010), 245–255.
- [72] Ikehira, H., Nishikawa, S., Matsumura, K., Hasegawa, T., Arimizu, N., and Tateno, Y. The functional staging of Duchenne muscular dystrophy using in vivo ³¹P MR spectroscopy. *Radiat Med* 13, 2 (1995), 63–65.
- [73] Jackson, S. N., Pinkney, J., Bargiotta, A., Veal, C. D., Howlett, T. A., McNally, P. G., Corral, R., Johnson, A., and Trembath, R. C. A defect in the regional deposition of adipose tissue (partial lipodystrophy) is encoded by a gene at chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 63, 2 (Aug 1998), 534–540.
- [74] Jacob, K. N., and Garg, A. Laminopathies: multisystem dystrophy syndromes. *Mol Genet Metab* 87, 4 (Apr 2006), 289–302.
- [75] Jacob, S., Machann, J., Rett, K., Brechtel, K., Volk, A., Renn, W., Maerker, E., Matthaei, S., Schick, F., Claussen, C. D., and Häring, H. U. Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 48, 5 (May 1999), 1113–1119.
- [76] Karatzaferi, C., Haan, A. d., Ferguson, R., Mechelen, W. v., and Sargeant, A. Phosphocreatine and ATP Content in Human Single Fibres Before and After Maximum Dynamic Exercise. *Pflügers Archiv – Europ J Physiol*, published online 03/2001 (2001).

- [77] Köbberling, J., and Dunnigan, M. G. Familial partial lipodystrophy: two types of an X linked dominant syndrome, lethal in the hemizygous state. *J Med Genet* 23, 2 (Apr 1986), 120–127.
- [78] Kemp, G. J., and Radda, G. K. Quantitative interpretation of bioenergetic data from ^{31}P and ^1H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: an analytical review. *Magn Reson Q* 10, 1 (Mar 1994), 43–63.
- [79] Kemp, G. J., Taylor, D. J., Dunn, J. F., Frostick, S. P., and Radda, G. K. Cellular energetics of dystrophic muscle. *J Neurol Sci* 116, 2 (Jun 1993), 201–206.
- [80] Kent-Braun, J. A., Miller, R. G., and Weiner, M. W. Magnetic resonance spectroscopy studies of human muscle. *Radiol Clin North Am* 32, 2 (Mar 1994), 313–335.
- [81] Konstanczak, P., Wust, P., Sander, B., Schründer, S., Frenzel, T., Wlodarczyk, W., Vogl, T., Müller, G., and Felix, R. [Thermometry by measuring the chemical shift of lanthanide complex]. *Strahlenther Onkol* 173, 2 (Feb 1997), 106–116.
- [82] Kraegen, E. W., and Cooney, G. J. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 19, 3 (Jun 2008), 235–241.
- [83] Kraegen, E. W., Cooney, G. J., Ye, J., and Thompson, A. L. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance—hyperinsulinemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109, 4 (2001), S516–S526.
- [84] Krebs, M., Krssak, M., Nowotny, P., Weghuber, D., Gruber, S., Mlynarik, V., Bischof, M., Stingl, H., Fürnsinn, C., Waldhäusl, W., and Roden, M. Free fatty acids inhibit the glucose-stimulated increase of intramuscular glucose-6-phosphate concentration in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5 (May 2001), 2153–2160.
- [85] Krssak, M., Petersen, K. F., Dresner, A., DiPietro, L., Vogel, S. M., Rothman, D. L., Roden, M., and Shulman, G. I. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ^1H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42, 1 (Jan 1999), 113–116.
- [86] Kushmerick, M., Moerland, T., and Wiseman, R. Mammalian Skeletal Muscle Fibers Distinguished by Contents of Phosphocreatine, ATP, and P_i . *Proc Natl Acad Sci* 89 (1992), 7521–7525.
- [87] Laforêt, P., Richard, P., Said, M. A., Romero, N. B., Lacene, E., Leroy, J.-P., Baussan, C., Hogrel, J.-Y., Lavergne, T., Wahbi, K., Hainque, B., and Duboc, D. A new mutation in PRKAG2 gene causing hypertrophic cardiomyopathy with conduction system disease and muscular glycolysis. *Neuromuscul Disord* 16, 3 (Mar 2006), 178–182.
- [88] Laforêt, P., Wary, C., Duteil, S., de Kerviler, E., Carlier, P. G., Lombès, A., Romero, N. B., Fardeau, M., Eymard, B., and Leroy-Willig, A. [Exploration of exercise intolerance by ^{31}P NMR spectroscopy of calf muscles coupled with MRI and ergometry]. *Rev Neurol (Paris)* 159, 1 (Jan 2003), 56–67.
- [89] Larson, D., Hesslink, R., Hrovat, M., Fishman, R., and Systrom, D. Dietary Effects on Exercising Muscle Metabolism and Performance by ^{31}P -MRS. *J Appl Physiol* 77(3) (1994), 1108–1115.

- [90] Larson-Meyer, D. E., Smith, S. R., Heilbronn, L. K., Kelley, D. E., Ravussin, E., Newcomer, B. R., and Group, L. A. A. R. Muscle-associated triglyceride measured by computed tomography and magnetic resonance spectroscopy. *Obesity (Silver Spring)* 14, 1 (Jan 2006), 73–87.
- [91] Layec, G., Bringard, A., Fur, Y. L., Vilmen, C., Micallef, J.-P., Perrey, S., Cozzone, P. J., and Bendahan, D. Reproducibility assessment of metabolic variables characterizing muscle energetics in vivo: A ^{31}P -MRS study. *Magn Reson Med* 62, 4 (Oct 2009), 840–854.
- [92] Lüdtke, A., Buettner, J., Schmidt, H. H.-J., and Worman, H. J. New PPAR γ mutation leads to lipodystrophy and loss of protein function that is partially restored by a synthetic ligand. *J Med Genet* 44, 9 (Sep 2007), e88.
- [93] Lüdtke, A., Buettner, J., Wu, W., Muchir, A., Schroeter, A., Zinn-Justin, S., Spuler, S., Schmidt, H. H.-J., and Worman, H. J. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ C190S mutation causes partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 6 (Jun 2007), 2248–2255.
- [94] Lüdtke, A., Genschel, J., Brabant, G., Bauditz, J., Taupitz, M., Koch, M., Wermke, W., Worman, H. J., and Schmidt, H. H.-J. Hepatic steatosis in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Am J Gastroenterol* 100, 10 (Oct 2005), 2218–2224.
- [95] Lüdtke, A., Heck, K., Genschel, J., Mehnert, H., Spuler, S., Worman, H. J., and Schmidt, H. H.-J. Long-term treatment experience in a subject with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy: efficacy of rosiglitazone. *Diabet Med* 22, 11 (Nov 2005), 1611–1613.
- [96] Lodi, R., Kemp, G. J., Muntoni, F., Thompson, C. H., Rae, C., Taylor, J., Styles, P., and Taylor, D. J. Reduced cytosolic acidification during exercise suggests defective glycolytic activity in skeletal muscle of patients with Becker muscular dystrophy. An in vivo ^{31}P magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 122 (Pt 1) (Jan 1999), 121–130.
- [97] Lodi, R., Muntoni, F., Taylor, J., Kumar, S., Sewry, C. A., Blamire, A., Styles, P., and Taylor, D. J. Correlative MR imaging and ^{31}P -MR spectroscopy study in sarcoglycan deficient limb girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7, 8 (Dec 1997), 505–511.
- [98] Madhu, B., Lagerwall, K., and Soussi, B. Phosphorus Metabolites in Different Muscles of the Rat Leg by ^{31}P Image-Selected In Vivo Spectroscopy. *NMR in Biomedicine* 9 (1996), 327–332.
- [99] Matthews, P. M., Allaire, C., Shoubridge, E. A., Karpati, G., Carpenter, S., and Arnold, D. L. In vivo muscle magnetic resonance spectroscopy in the clinical investigation of mitochondrial disease. *Neurology* 41, 1 (Jan 1991), 114–120.
- [100] Mäurer, J., Konstanczak, P., Söllner, O., Ehrenstein, T., Knollmann, F., Wolff, R., Vogl, T., and Felix, R. Muscle Metabolism of Professional Athletes Using ^{31}P -Spectroscopy. *Acta Radiologica* 40 (1999), 73–77.
- [101] McCully, K., and Posner, J. Measuring Exercise-Induced Adaptations and Injury with Magnetic Resonance Spectroscopy. *Int J Sports Med* 13 (Suppl 1) (1992), S147–S149.
- [102] Mellerowicz, H. Revidierte Standardisierungsvorschläge für die Ergometrie 1981. *Dtsch Z Sportmed* 33 (2) (1982), 52.

- [103] Meyerspeer, M., Krssák, M., Kemp, G. J., Roden, M., and Moser, E. Dynamic interleaved $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ STEAM MRS at 3 Tesla using a pneumatic force-controlled plantar flexion exercise rig. *MAGMA* 18, 5 (Nov 2005), 257–262.
- [104] Misra, A., Sinha, S., Kumar, M., Jagannathan, N. R., and Pandey, R. M. Proton magnetic resonance spectroscopy study of soleus muscle in non-obese healthy and Type 2 diabetic Asian Northern Indian males: high intramyocellular lipid content correlates with excess body fat and abdominal obesity. *Diabet Med* 20, 5 (May 2003), 361–367.
- [105] Morino, K., Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Frattini, J., Shatzkes, N., Neschen, S., White, M. F., Bilz, S., Sono, S., Pypaert, M., and Shulman, G. I. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115, 12 (Dec 2005), 3587–3593.
- [106] Mounkes, L., Kozlov, S., Burke, B., and Stewart, C. L. The laminopathies: nuclear structure meets disease. *Curr Opin Genet Dev* 13, 3 (Jun 2003), 223–230.
- [107] Muchir, A., Bonne, G., van der Kooij, A. J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P. A., de Visser, M., and Schwartz, K. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 9, 9 (May 2000), 1453–1459.
- [108] Mäurer, J., Konstanczak, P., Söllner, O., Ehrenstein, T., Knollmann, F., Wolff, R., Vogl, T. J., and Felix, R. Muscle metabolism of professional athletes using ^{31}P -spectroscopy. *Acta Radiol* 40, 1 (Jan 1999), 73–77.
- [109] Nagano, A., and Arahata, K. Nuclear envelope proteins and associated diseases. *Curr Opin Neurol* 13, 5 (Oct 2000), 533–539.
- [110] Park, J., Brown, R., Park, C., McCully, K., Cohn, M., Haselgrove, J., and Chance, B. Functional Pools of Oxidative and Glycolytic Fibers in Human Muscle Observed by ^{31}P Magnetic Resonance Spectroscopy During Exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1997), 8976–8980.
- [111] Perseghin, G., Scifo, P., Cobelli, F. D., Pagliato, E., Battezzati, A., Arcelloni, C., Vanzulli, A., Testolin, G., Pozza, G., Maschio, A. D., and Luzi, L. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ^1H - ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48, 8 (Aug 1999), 1600–1606.
- [112] Peters, J. M., Barnes, R., Bennett, L., Gitomer, W. M., Bowcock, A. M., and Garg, A. Localization of the gene for familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) to chromosome 1q21-22. *Nat Genet* 18, 3 (Mar 1998), 292–295.
- [113] Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R., and Shulman, G. I. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350, 7 (Feb 2004), 664–671.

- [114] Petersen, K. F., Dufour, S., Savage, D. B., Bilz, S., Solomon, G., Yonemitsu, S., Cline, G. W., Befroy, D., Zeman, L., Kahn, B. B., Papademetris, X., Rothman, D. L., and Shulman, G. I. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 31 (Jul 2007), 12587–12594.
- [115] Phielix, E., and Mensink, M. Type 2 diabetes mellitus and skeletal muscle metabolic function. *Physiol Behav* 94, 2 (May 2008), 252–258.
- [116] Press, W., Teukolsky, S., Vetterling, W., and Flannery, B. *Numerical Recipes in Fortran*, 2nd edn. ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- [117] Reaven, G. M. Insulin resistance may or may not play a role in blood pressure regulation. *J Intern Med* 244, 4 (Oct 1998), 359–360.
- [118] Rial, E., Rodríguez-Sánchez, L., Gallardo-Vara, E., Zaragoza, P., Moyano, E., and González-Barroso, M. M. Lipotoxicity, fatty acid uncoupling and mitochondrial carrier function. *Biochim Biophys Acta* 1797, 6-7 (2010), 800–806.
- [119] Rico-Sanz, J., Hajnal, J. V., Thomas, E. L., Mierisová, S., Ala-Korpela, M., and Bell, J. D. Intracellular and extracellular skeletal muscle triglyceride metabolism during alternating intensity exercise in humans. *J Physiol* 510 (Pt 2) (Jul 1998), 615–622.
- [120] Rico-Sanz, J., Moosavi, M., Thomas, E. L., McCarthy, J., Coutts, G. A., Saeed, N., and Bell, J. D. In vivo evaluation of the effects of continuous exercise on skeletal muscle triglycerides in trained humans. *Lipids* 35, 12 (Dec 2000), 1313–1318.
- [121] Rochford, J. J. Molecular mechanisms controlling human adipose tissue development: insights from monogenic lipodystrophies. *Expert Rev Mol Med* 12 (2010), e24.
- [122] Rossiter, H. Application of Magnetic Resonance Spectroscopy in Sports Medicine. Tutorial Lecture. ACSM 2002 Baltimore.
- [123] Rost, R., and Hollmann, W. *Belastungsuntersuchungen in der Praxis*. Thieme, Stuttgart, 1992.
- [124] Samuel, V. T., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375, 9733 (Jun 2010), 2267–2277.
- [125] Sandre-Giovannoli, A. D., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Munnich, A., Merrer, M. L., and Lévy, N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 5628 (Jun 2003), 2055.
- [126] Sapega, A., Sokolow, D., Graham, T., and Chance, B. Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance: A Non-invasive Technique for the Study of Muscle Bioenergetics During Exercise. *Med Sci Sports Exerc* 19 (4) (1987), 410–420.
- [127] Scheurer, E., Ith, M., Dietrich, D., Kreis, R., Hüsler, J., Dirnhofer, R., and Boesch, C. Statistical evaluation of time-dependent metabolite concentrations: estimation of post-mortem intervals based on in situ ¹H-MRS of the brain. *NMR Biomed* 18, 3 (May 2005), 163–172.

- [128] Schmidt, H., Gensche, I. J., Baier, P., Schmidt, M., Ockenga, J., Tietge, U., Propsting, M., Buttner, C., Manns, M., Lochs, H., and Brabant, G. Dyslipemia in familial partial lipodystrophy caused by an R482W mutation in the LMNA gene. *J Clin Endocrinol Metab* 86(5) (May 2001), 2289–2295.
- [129] Schmidt, H., and Lochs, H. Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. *Circulation* 103, 4 (Jan 2001), E20.
- [130] Schmidt, H. H., Genschel, J., Baier, P., Schmidt, M., Ockenga, J., Tietge, U. J., Pröpsting, M., Büttner, C., Manns, M. P., Lochs, H., and Brabant, G. Dyslipemia in familial partial lipodystrophy caused by an R482W mutation in the LMNA gene. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5 (May 2001), 2289–2295.
- [131] Shackleton, S., Lloyd, D. J., Jackson, S. N., Evans, R., Niermeijer, M. F., Singh, B. M., Schmidt, H., Brabant, G., Kumar, S., Durrington, P. N., Gregory, S., O’Rahilly, S., and Trembath, R. C. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 24, 2 (Feb 2000), 153–156.
- [132] Simha, V., and Garg, A. Lipodystrophy: lessons in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 17, 2 (Apr 2006), 162–169.
- [133] Sinha, R., Dufour, S., Petersen, K. F., LeBon, V., Enoksson, S., Ma, Y.-Z., Savoye, M., Rothman, D. L., Shulman, G. I., and Caprio, S. Assessment of skeletal muscle triglyceride content by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes* 51, 4 (Apr 2002), 1022–1027.
- [134] Spuler, S., Kalbhenn, T., Zabojszcza, J., van Landeghem, F. K. H., Ludtke, A., Wenzel, K., Koehnlein, M., Schuelke, M., Lüdemann, L., and Schmidt, H. H. Muscle and nerve pathology in Dunnigan familial partial lipodystrophy. *Neurology* 68, 9 (Feb 2007), 677–683.
- [135] Stegmann, H., and Kindermann, W. Comparison of prolonged exercise tests at the individual anaerobic threshold and the fixed anaerobic threshold of 4 mmol/l lactate. *Int J Sports Med* 3, 2 (May 1982), 105–110.
- [136] Stegmann, H., Kindermann, W., and Schnabel, A. Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. *Int J Sports Med* 2, 3 (Aug 1981), 160–165.
- [137] Szczepaniak, L. S., Babcock, E. E., Schick, F., Dobbins, R. L., Garg, A., Burns, D. K., McGarry, J. D., and Stein, D. T. Measurement of intracellular triglyceride stores by ¹H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol* 276, 5 Pt 1 (May 1999), E977–E989.
- [138] Taivassalo, T., Shoubbridge, E. A., Chen, J., Kennaway, N. G., DiMauro, S., Arnold, D. L., and Haller, R. G. Aerobic conditioning in patients with mitochondrial myopathies: physiological, biochemical, and genetic effects. *Ann Neurol* 50, 2 (Aug 2001), 133–141.
- [139] Takahashi, H., Kuno, S., Katsuta, S., Shimojo, H., Masuda, K., Yoshioka, H., Anno, I., and Itai, Y. Relationship Between Fibre Composition and NMR Measurements in Human Skeletal Muscle. *NMR Biomed* 9 (1) (1996), 8–12.

- [140] Taylor, D. J. Clinical utility of muscle MR spectroscopy. *Semin Musculoskelet Radiol* 4, 4 (2000), 481–502.
- [141] Taylor, D. J., Kemp, G. J., Woods, C. G., Edwards, J. H., and Radda, G. K. Skeletal muscle bioenergetics in myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* 116, 2 (Jun 1993), 193–200.
- [142] Tazir, M., Azzedine, H., Assami, S., Sindou, P., Nouioua, S., Zemmouri, R., Hamadouche, T., Chaouch, M., Feingold, J., Vallat, J. M., Leguern, E., and Grid, D. Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain* 127, Pt 1 (Jan 2004), 154–163.
- [143] Thamer, C., Machann, J., Bachmann, O., Haap, M., Dahl, D., Wietek, B., Tschritter, O., Niess, A., Brechtel, K., Fritsche, A., Claussen, C., Jacob, S., Schick, F., Häring, H.-U., and Stumvoll, M. Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4 (Apr 2003), 1785–1791.
- [144] Torriani, M., Thomas, B. J., Halpern, E. F., Jensen, M. E., Rosenthal, D. I., and Palmer, W. E. Intramyocellular lipid quantification: repeatability with ¹H MR spectroscopy. *Radiology* 236, 2 (Aug 2005), 609–614.
- [145] Tran, T. T., Yamamoto, Y., Gesta, S., and Kahn, C. R. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7, 5 (May 2008), 410–420.
- [146] Tsiodras, S., Perelas, A., Wanke, C., and Mantzoros, C. S. The HIV-1/HAART associated metabolic syndrome - novel adipokines, molecular associations and therapeutic implications. *J Infect* 61, 2 (Jul 2010), 101–113.
- [147] Vandenborne, K., McCully, K., Kakihira, H., Prammer, M., Bolinger, L., Detre, J., Meirlier, K. D., Walter, G., Chance, B., and Leigh, J. Metabolic Heterogeneity in Human Calf Muscle During Maximal Exercise. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991), vol. 88, pp. 5714–5718.
- [148] Vandenborne, K., Walter, G., Ploutz-Snyder, L., Staron, R., Fry, A., Meirleir, K. D., Dudley, G., and Leigh, J. Energy-Rich Phosphates in Slow and Fast Human Skeletal Muscle. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 268 (37) (1995), C869–C876.
- [149] Vantyghem, M. C., Pigny, P., Maurage, C. A., Rouaix-Emery, N., Stojkovic, T., Cuisset, J. M., Millaire, A., Lascols, O., Vermersch, P., Wemeau, J. L., Capeau, J., and Vigouroux, C. Patients with familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type due to a LMNA R482W mutation show muscular and cardiac abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 11 (Nov 2004), 5337–5346.
- [150] Vestergaard-Poulsen, P., Thomsen, C., Sinkjr, T., and Henriksen, O. Simultaneous ³¹P-NMR Spectroscopy and EMG in Exercising and Recovering Human Skeletal Muscle: A Correlation Study. *J Appl Physiol* 79 (5) (1995), 1469–1478.
- [151] Vigouroux, C., Magré, J., Vantyghem, M. C., Bourut, C., Lascols, O., Shackleton, S., Lloyd, D. J., Guerci, B., Padova, G., Valensi, P., Grimaldi, A., Piquemal, R., Touraine, P., Trembath,

- R. C., and Capeau, J. Lamin A/C gene: sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipodystrophy. *Diabetes* 49, 11 (Nov 2000), 1958–1962.
- [152] Waki, H., and Tontonoz, P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2 (2007), 31–56.
- [153] Wassermann, K., Hansen, J., Sue, D., Whipp, B., and Casaburi, R. *Principles of Exercise Testing and Interpretation*, 2nd ed. (1994) ed. Williams & Wilkins, Philadelphia, 1994.
- [154] Wildermuth, S., Spranger, S., Spranger, M., Raue, F., and Meinck, H. M. Köbberling-Dunnigan syndrome: a rare cause of generalized muscular hypertrophy. *Muscle Nerve* 19, 7 (Jul 1996), 843–847.
- [155] Wojtanik, K. M., Edgemon, K., Viswanadha, S., Lindsey, B., Haluzik, M., Chen, W., Poy, G., Reitman, M., and Londos, C. The role of LMNA in adipose: a novel mouse model of lipodystrophy based on the Dunnigan-type familial partial lipodystrophy mutation. *J Lipid Res* 50, 6 (Jun 2009), 1068–1079.
- [156] Wolff, R., Konstanczak, P., and Mäurer, J. Die Bestimmung der Muskelfaserverteilung (Typ I, II) mit Hilfe der Kernspinspektroskopie – Erste Ergebnisse. In *Beiträge des 3. Symposiums der Sektion Trainingswissenschaft der Deutschen Vereinigung für Sportwissenschaft vom 4. bis 6.10.1995 in Dortmund* (1996), K. J. H. Starischka S, Carl K, Ed., SFT-Verlag Margit Starischka, Erlensee, pp. 293–300.
- [157] Worman, H. J., Ostlund, C., and Wang, Y. Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, 2 (Feb 2010), a000760.
- [158] Yoshida, T. The Rate of Phosphocreatine Hydrolysis and Resynthesis in Exercising Muscle in Humans Using ³¹P-MRS. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 21 (5) (2002), 247–255.
- [159] Young, J., Morbois-Trabut, L., Couzinet, B., Lascols, O., Dion, E., Béréziat, V., Fève, B., Richard, I., Capeau, J., Chanson, P., and Vigouroux, C. Type A insulin resistance syndrome revealing a novel lamin A mutation. *Diabetes* 54, 6 (Jun 2005), 1873–1878.
- [160] Zanconato, S., Buchthal, S., Barstow, T., and Cooper, D. ³¹P-MRS of Leg Muscle Metabolism During Exercise in Children and Adults. *J Appl Physiol* 74 (5) (1993), 2214–2218.
- [161] Zehnder, M., Mülli, M., Buchli, R., and Boutellier, U. The Influence of Delayed Onset Muscle Soreness on Muscle Metabolism Measured by Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS). *Medicine & Science in Sports & Exercise* 31(5) (1999), S76.

Anhang

A Zeitlicher Ablauf der Versuche

Tabelle A.1 : Zeitlicher Ablauf der kernspinspektroskopischen Untersuchungen

Kernspinspektroskopische Untersuchungen		
Untersuchung	Untersuchungsdauer (inkl. Nach- belastungsphase)	zeitliche Differenz zur vorhergehenden Untersuchung
¹ H-Ruhespektrum des M. gastrocnemius	6:24 min	-
Messung der isometrischen Maximalkraft bei Plantarflexion	3x7 s	im Anschluss
³¹ P-Ruhespektrum des M. biceps femoris	6:24 min	30:00 min
³¹ P-Ruhespektrum des M. quadriceps femoris	6:24 min	im Anschluss
³¹ P-Ruhespektrum des M. gastrocnemius	6:24 min	im Anschluss
³¹ P-Ruhespektrum des M. gastrocnemius (Referenzspektrum für den aeroben Belastungstest)	0:30 min	im Anschluss
Aerober Belastungstest	15:00 min	im Anschluss
³¹ P-Ruhespektrum des M. gastrocnemius (Referenzspektrum für den anaeroben Belastungstest)	0:30 min	im Anschluss
Anaerober Belastungstest	18:00 min	im Anschluss

Der fahrradergometrische Stufentest wurde nach den kernspinspektroskopischen und kernspintomographischen Untersuchungen durchgeführt, um Artefakte in den Spektren, die durch muskuläre Mikro- oder Makroverletzungen, wie z.B. Muskelkater, und metabolische Veränderungen hervorgerufen werden können [101, 161], zu vermeiden. Die zeitliche Differenz zwischen den einzelnen Untersuchungen betrug mindestens 2 Tage, um eine vollständige muskuläre Regeneration zu gewährleisten. Dies wurde vor den nachfolgenden Untersuchungen jeweils erfragt und dokumentiert. Der fahrradergometrische Rampentest erfolgte zum Abschluss der Gesamtuntersuchung, weil eine kurzfristige Erholung (binnen 2 Tagen) nicht zu erwarten war.

Um Veränderungen in der Zeitspanne zwischen den einzelnen Untersuchungstagen auszuschließen (z.B. Diät-, Therapie- oder Trainingseffekte), erfolgten alle Messungen innerhalb einer Woche.

Die Messung der isometrischen Maximalkraft bei Plantarflexion musste aus organisatorischen Gründen am selben Tag wie die kernspinspektroskopischen Untersuchungen erfolgen, weil sie als Grundlage für die Belastungssteuerung im aeroben und anaeroben Belastungstest diente. Durch die anschließend

ingelegte Pause und die beiden Ruhemessungen der Oberschenkelmuskulatur (insgesamt ca. 60 min mit Umlagern und Shimmen) sind Veränderungen der PCr/P_i -Quotienten unwahrscheinlich, die im Anschluss an maximale Kontraktionen beobachtet wurden [101]. Die Protonenspektroskopie erfolgte aus diesem Grund als erste Untersuchung.

Durch die direkte Abfolge von Ruhe- und Belastungsmessung des M. gastrocnemius wurden identische Untersuchungsbedingungen und Messungen desselben Muskelareals garantiert.

B Messparameter für die kernspinspektroskopischen Untersuchungen

Tabelle B.1 : Messparameter der ³¹P-NMR-Untersuchungen und des Shim-Experimentes

³¹ P-Spektroskopie	Abkürzung	Einheit	Ruhe- untersuchung	Belastungs- untersuchung	Shim- Experiment
Repetitionszeit	TR	ms	3000	2000	750
Spektrale Bandbreite	SW	Hz	±1000	±1000	±5000
Datenvektorenlänge	Vec	Datenpunkte	1024	1024	1024
Transmitterspannung	TRA	V	25	25	10
Verstärkungsfaktor des Empfängers	Gain	dB	105	105	62
Akquisitionen	AC		256	16	1
Gesamtzeit	TA	min	12:50	0:32	0:01
Anzahl der Messungen			1	8	1

Tabelle B.2 : Messparameter ¹H-NMR-Untersuchungen und Wasserunterdrückung

¹ H-Spektroskopie	Abkürzung	Einheit	Ruhe- untersuchung	Wasserunter- drückung	Shim- Experiment
Sequenz			STEAM	STEAM	STEAM
Repetitionszeit	TR	s	2	2	1
Spektrale Bandbreite	SW	Hz	± 1000	± 1000	± 5000
Datenvektorenlänge	Vec	Daten- punkte	2048	2048	2048
Echozeit	TE	ms	135	135	135
Verstärkungsfaktor des Empfängers	Gain	dB	116	116	110
Akquisitionen	AC		256	10	1
Gesamtzeit	TA	min	7:34	0:26	0:01
Anzahl der Messungen			1	3	1

Tabelle B.3 gibt eine Übersicht der in der Kernspinspektroskopie derzeit verwendeten Elemente, der untersuchten Metabolite und der Anwendungsgebiete.

Tabelle B.3 : **In der Kernspinspektroskopie verwendete Isotope** (aus [122])

Isotop	Metabolite	Anwendungsbereiche / anatomische Region
^1H	Desoxy-Myoglobin, Laktat, Cholin, Creatin, Alanin, intra-/extrazelluläre Lipide, usw.	Durchblutung, Fettstoffwechsel, usw. / Gehirn, Muskel
^{31}P	PCr, P_i , ATP, ADP, PME, PDE	Energiestoffwechsel, pH / Muskel, Herz, Leber, Tumore
^{13}C	Glukose, Glykogen, Aminosäuren	Gehirn, Muskel, Herz, Leber, Tumore
^{19}F	markierte Medikamente	Medikamentenaufnahme und -stoffwechsel in der Leber
^3He & ^{129}Xe	hyperpolarisierte Gase	Lungenperfusion
^{23}Na	intra-/extrazelluläres Natrium	

Tabelle B.4 : **Für die Kernspinspektroskopie charakteristische Daten verschiedener Elemente nach Grünert [63]**

Element	Gehalt im menschl. Körper [%]	MRS-sensitives Isotop	Spinquantenzahl	rel. Empfindlichkeit (B_0 konst.)	Resonanzfrequenz im Feld von 1 T [MHz]
Wasserstoff	10	^1H	1/2	100.0	42.57
Phosphor	1,2	^{31}P	1/2	6.7	17.23
Kohlenstoff	0.001	^{13}C	1/2	0.018	10.70
Fluor	0.00066	^{19}F	1/2	83.3	40.05
Natrium	0.18	^{23}Na	5/2	9.2	11.26

C Auswertungsablauf für die kernspinspektroskopischen Untersuchungen

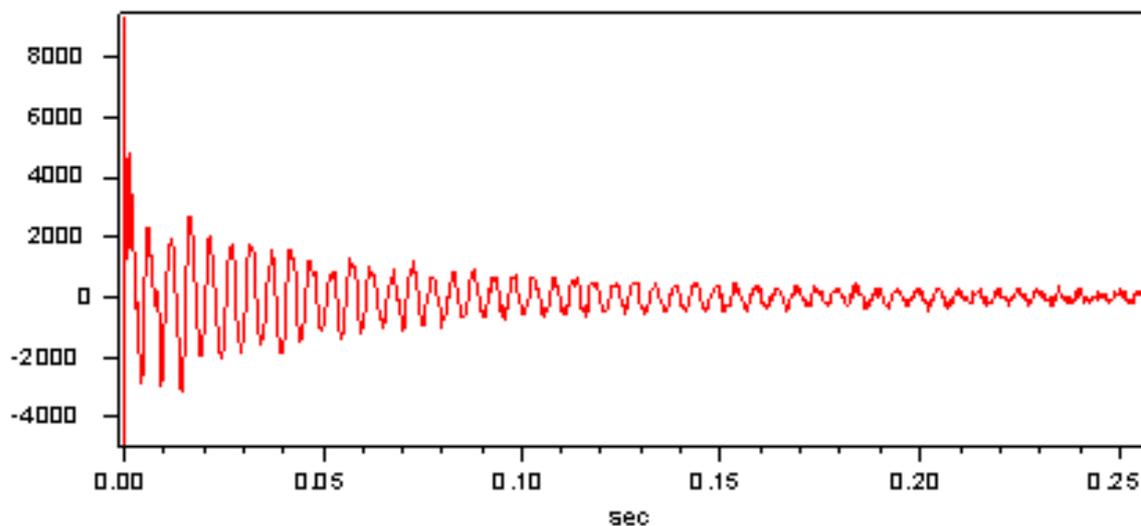


Abbildung C.1 : **Kernspinspektroskopisches Rohsignal (FID)**

Ausgangspunkt der Auswertung von ^{31}P -NMR-Spektren sind die Rohdaten in Form des FID (MR-Signal als Funktion der Zeit, Abb. C.1).

Der aufgenommene Datenvektor wird durch Anhängen von Nullen von 1024 auf 2048 Datenpunkte verdoppelt, so dass sich eine spektrale Auflösung von 0,98 Hz je Datenpunkt ergibt. Des Weiteren erfolgt eine artifizielle Bandweitenveränderung der Zeitdomäne-Daten mittels eines Lorentzian Line-broadening. Der Faktor (lb) betrug für die Ruhespektren 2 Hz und für die Belastungsspektren 5 Hz. Danach erfolgt die Reduktion des Datenvektors auf den Bereich der zu erwartenden Resonanzen: +80 bis -760 Hz.

Durch die anschließende Fourier-Transformation wird das Zeitsignal in ein Signal der Frequenzdomäne umgewandelt (siehe Abb. C.2). Die einzelnen Verbindungen werden als "Kurvenabschnitt" in einem bestimmten Frequenzbereich (Abszisse) sichtbar.

Das Absorptionsspektrum ist das Resultat der anschließenden Phasenkorrektur nullter (konstante Phase) und erster (lineare Phase) Ordnung (siehe Abb. C.3).

Diese "Phase" hat nichts mit der Verschiebung des Präzessionswinkels in der (T_2)-Relaxation zu tun, sondern entsteht durch die Datenaufnahme, die Signalverstärkung, die Verbindung von Sende- und Empfangsgerät in einer Oberflächenspule und gerätespezifische Besonderheiten. Die Phasenkorrektur dient dazu, die Verschiebung zwischen realer und imaginärer Aufzeichnung zu beheben.

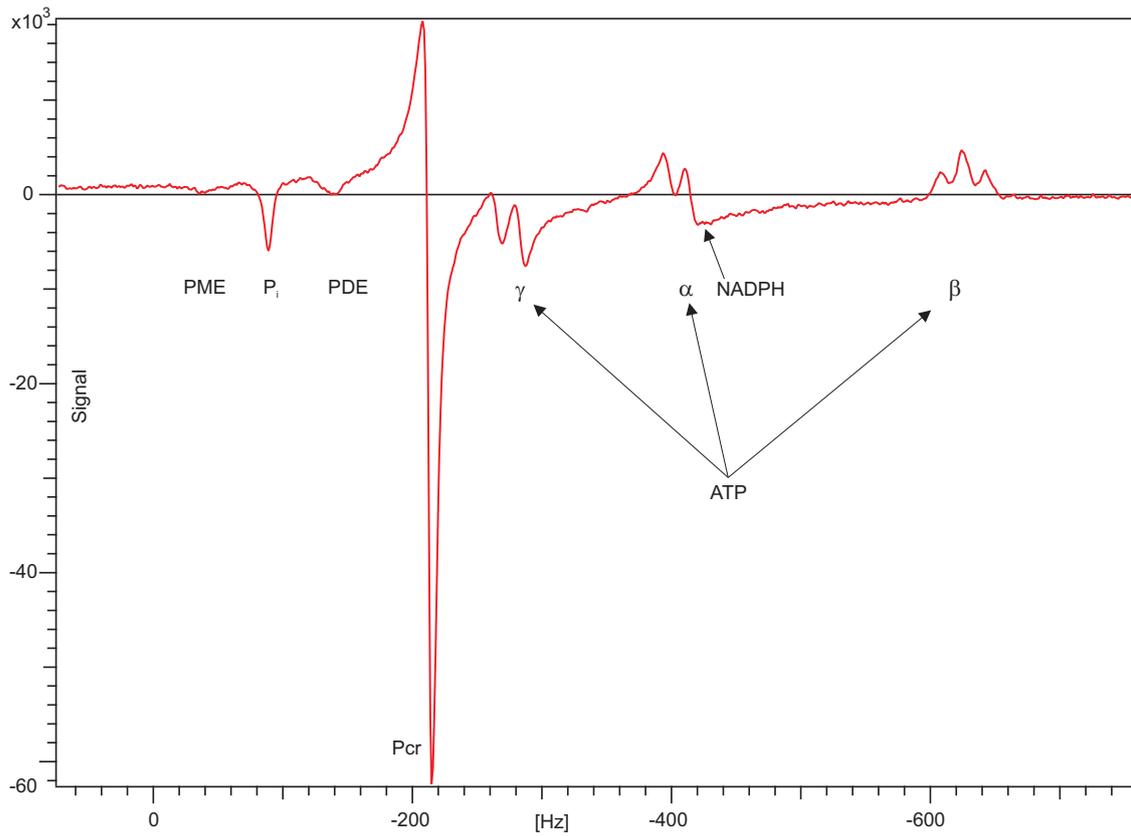


Abbildung C.2 : **Spektrum nach Fourier-Transformation**

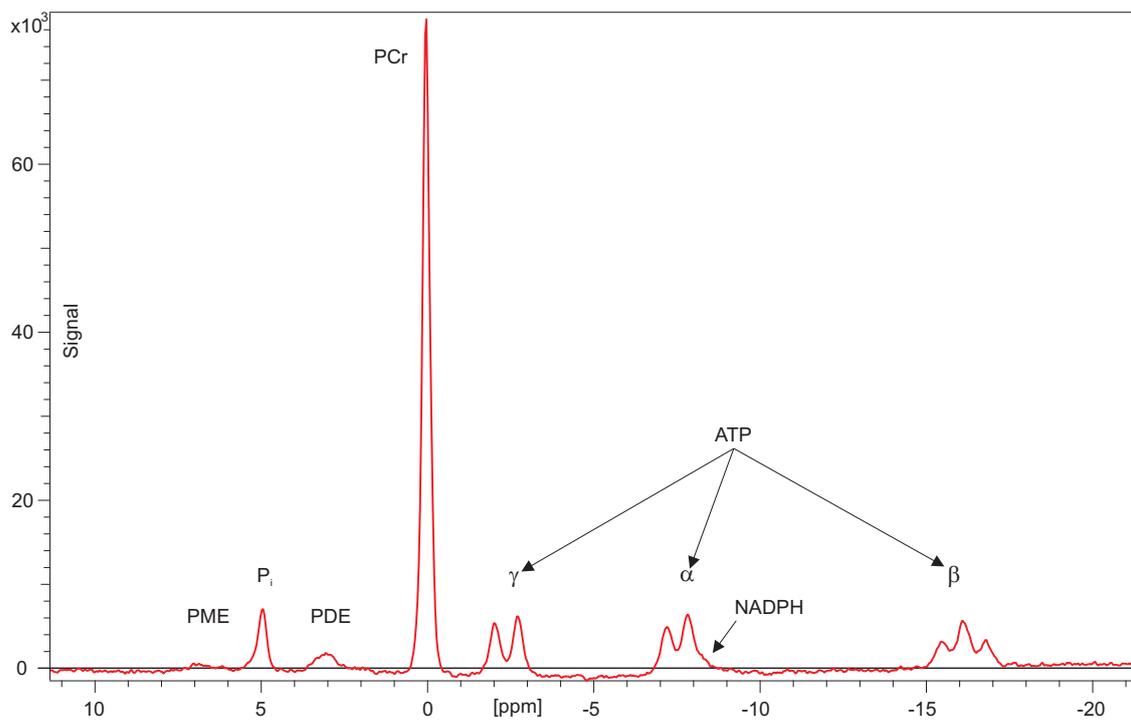


Abbildung C.3 : **Phasenkorrigiertes Spektrum**

Anschließend wird der Datenvektor von Hz in ppm ($1 \text{ ppm} = 121,44 \text{ Hz}$) umgewandelt und die Basislinie korrigiert (Baseline Fit). Die Bereiche, in denen keine Resonanzen zu erwarten sind, werden hierzu auf 0 gesetzt. Die Resonanzen werden auf die daraus errechnete Basislinie bezogen (siehe Abb. C.4 und C.5).

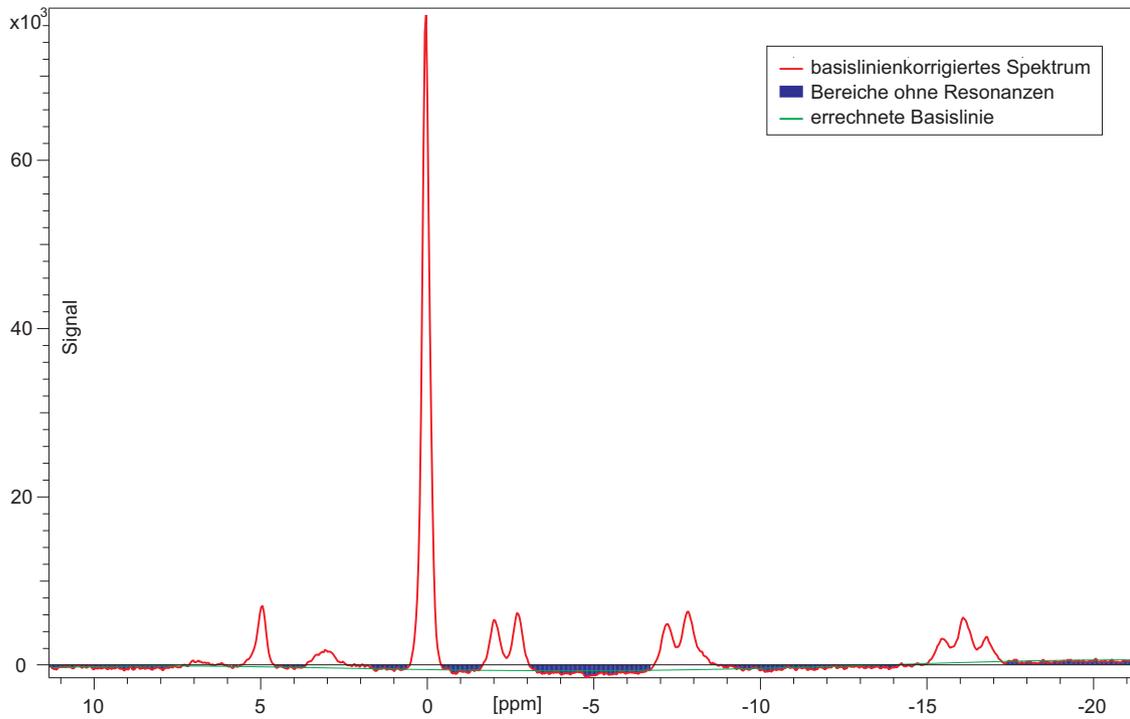


Abbildung C.4 : **Spektrum mit Basislinienbereichen und errechneter Basislinie**

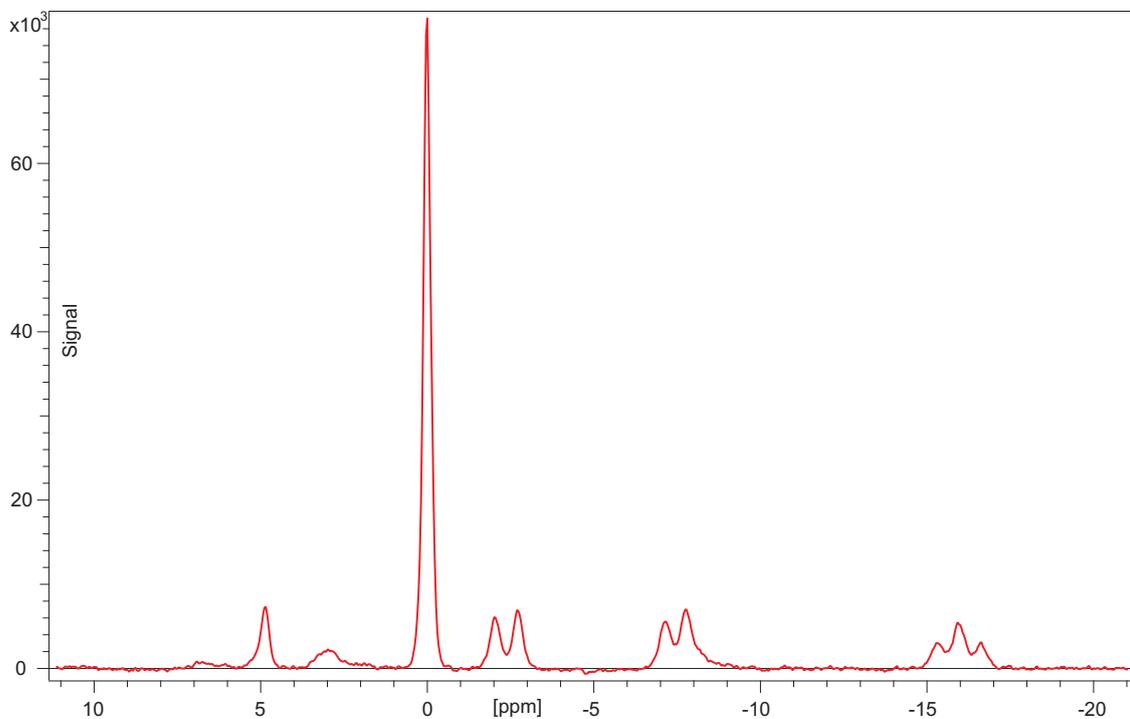


Abbildung C.5 : **Basislinienkorrigiertes, geschnittenes Spektrum in ppm**

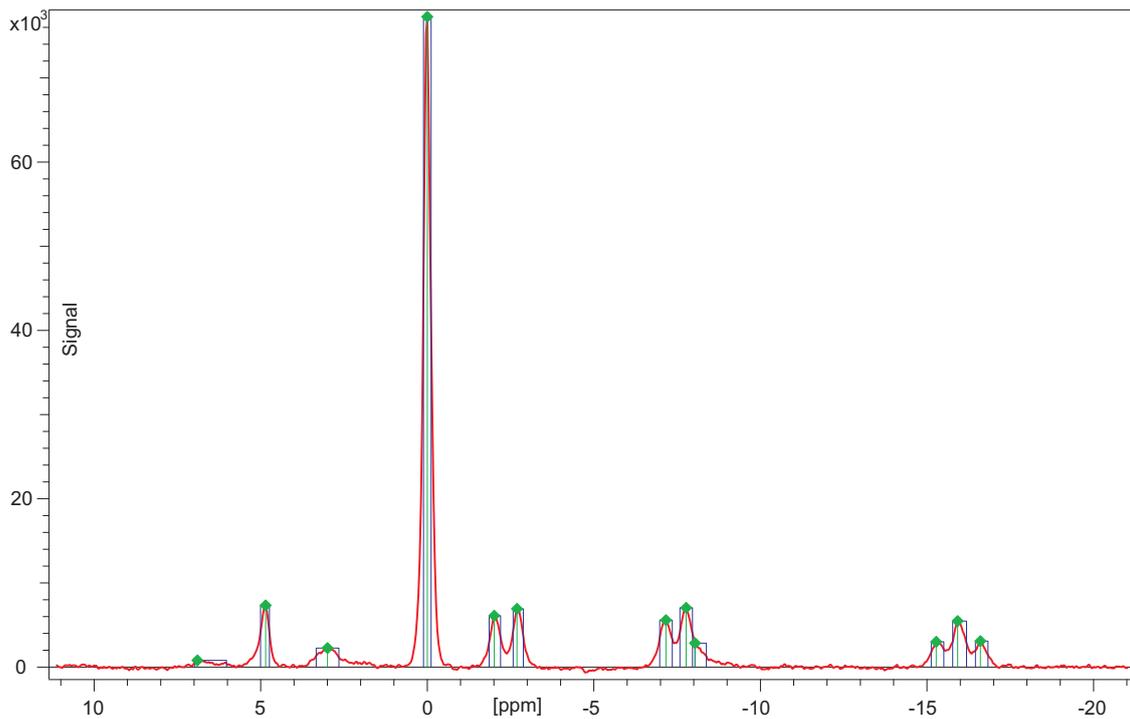


Abbildung C.6 : **Spektrum mit markierten Peaks und Halbwertsbreiten**

Im Spektrum werden die einzelnen Resonanzen (12 Peaks in Ruhespektren, 11 Peaks in Belastungsspektren) durch Höhe und Halbwertsbreite markiert: PME, P_i , PDE, PCr, γ - und α -ATP (je 2 Peaks), β -ATP (3 Peaks) und NADPH. Die vom Computer automatisch ermittelten Startwerte zur Berechnung des Peak-Fits (Lorentz-Funktion, die der Resonanz am nächsten kommt) wurden bezüglich Amplitude und Lage (chemical shift) manuell korrigiert (siehe Abb. C.6 und C.7).

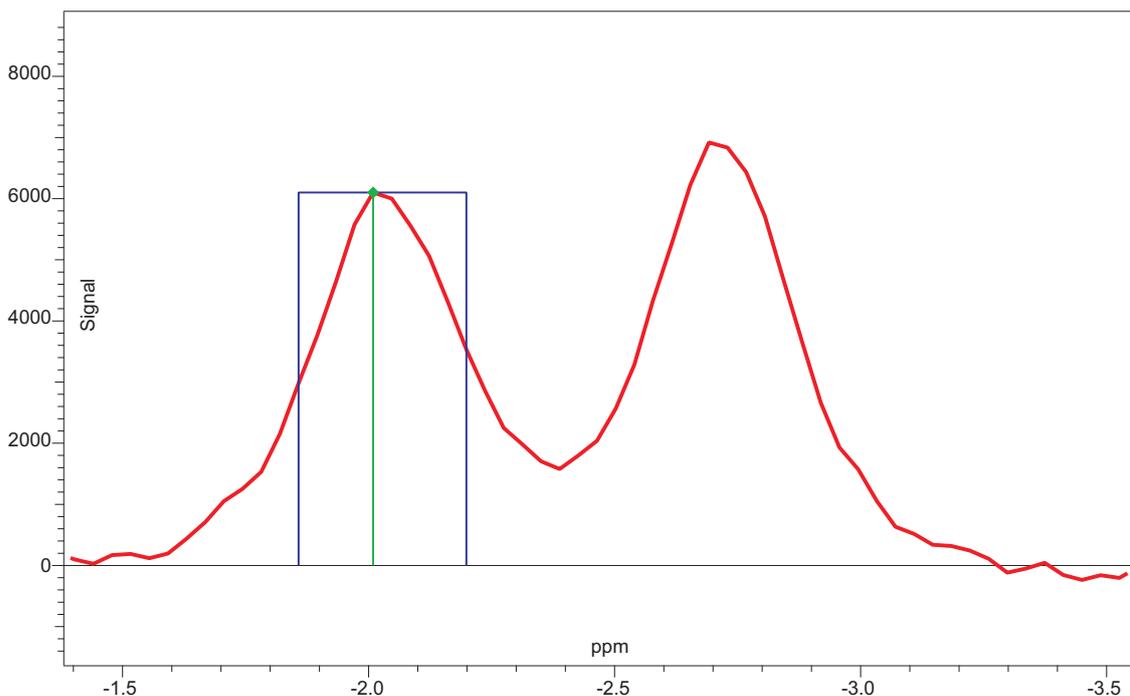


Abbildung C.7 : **Ausschnitt eines Spektrums mit markiertem Peak und Halbwertsbreite**

Die Flächen unter den Resonanzen, die ein Maß für die Konzentration der einzelnen Phosphor-Metabolite darstellen, werden mit Hilfe des nichtlinearen Approximationsprogrammes nach dem modifizierten Algorithmus von Marquardt und Lewenberg berechnet [116]. Das theoretische Modell wird über die Variation der Parameter und eine Minimierung der Summe der Fehlerquadrate an die experimentellen Daten angepasst. Für die Linienform der Signale wird hierbei eine Lorentz-Funktion vorausgesetzt (siehe Abb. C.8).

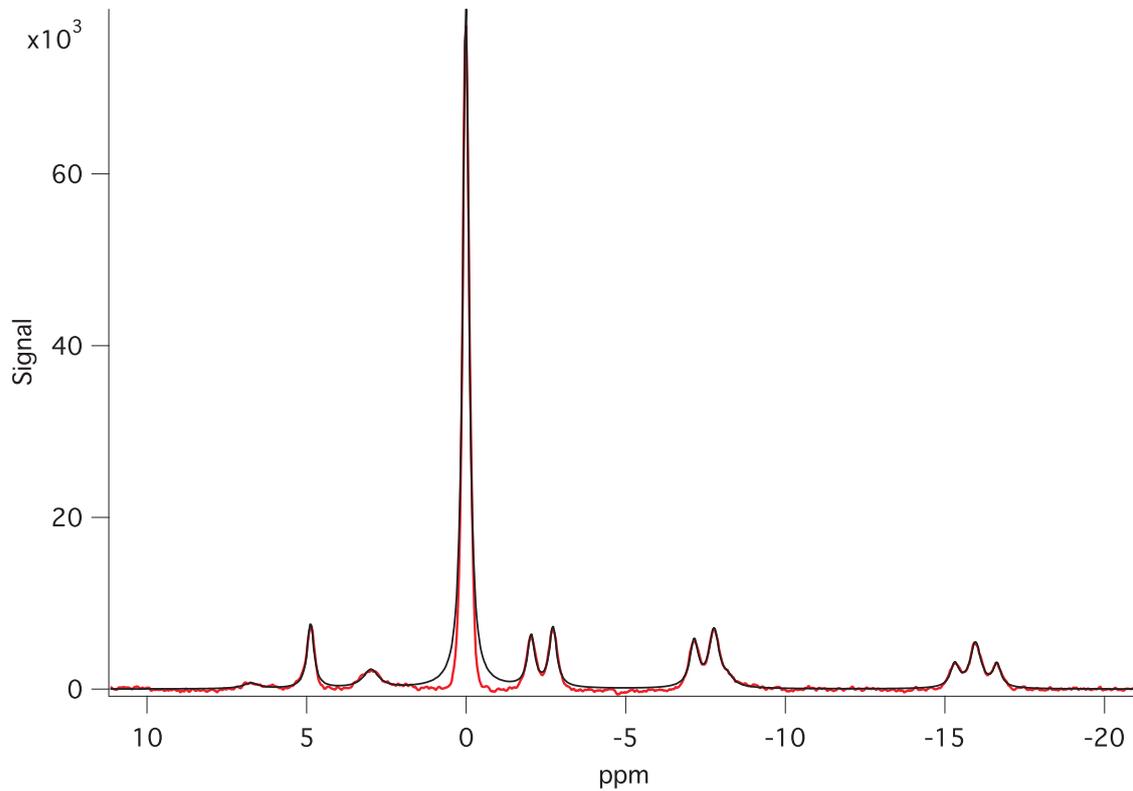


Abbildung C.8 : **Spektrum mit daraus berechneter Fitfunktion als Grundlage für die Flächenberechnung**

Danksagung

Für die Vergabe des Themas, die Betreuung der Arbeit und die konstruktive Kritik bei der Datenauswertung und -interpretation danke ich Herrn Prof. Dr. Hartmut Schmidt ganz herzlich.

Mein besonderer Dank gilt den Herren Paul Konstanczak und Dr. med. Lars Brechtel. Paul Konstanczak hat seine Auswertungssoftware zur Verfügung gestellt und geholfen, die Sequenzen für die spektroskopischen Untersuchungen am Tomographen zu implementieren. Er hat mir zudem über die Literatur hinaus das Verständnis für die Spektroskopie vermittelt, was die kritische Bewertung der eigenen und fremder Ergebnisse erst ermöglicht. Dr. Lars Brechtel danke ich für die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche im MRT und der Leistungsdiagnostik.

Herrn Dipl.-Math. Olivier Pfeiffer gilt mein Dank für den entsprechenden Support. Meiner Frau danke ich für ihre Geduld. Zu guter Letzt bedanke ich mich bei allen Probanden für ihren zeitlichen Aufwand und den engagierten Einsatz bei allen Untersuchungen, sowie bei den zahlreichen Personen, die durch kleine Hilfen zum Teil große Schwierigkeiten beseitigten.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Hoff E, Strube P, Gross C, Hartwig T, Putzier M. (2010) Monosegmental anterior lumbar interbody fusion with the SynFix-LR™ device. A prospective 2-year follow-up study. Orthopade. 2010 Nov;39(11):1044-50

Strube P, **Hoff E**, Hartwig T, Perka CF, Gross C, Putzier M. (2011) Stand-alone Anterior Versus Anteroposterior Lumbar Interbody Single-Level Fusion After a Mean Follow-up of 41 Month. J Spinal Disord Tech. Jun 28 (Epub ahead of print)

Back DA, Haberstroh N, **Hoff E**, Plener J, Haas N, Perka C, Schmidmaier G. (2011) Implementation of the eLearning project NESTOR: A network for students in traumatology and orthopedics. Chirurg. May 12 (Epub ahead of print)

Strube P, Tohtz S, **Hoff E**, Gross C, Perka C, Putzier M. (2010) Dynamic stabilization adjacent to single-level fusion: part I. Biomechanical effects on lumbar spinal motion. Eur Spine J. 2010 Dec;19(12):2171-80

Putzier M, **Hoff E**, Tohtz S, Gross C, Perka C, Strube P. (2010) Dynamic stabilization adjacent to single-level fusion: part II. No clinical benefit for asymptomatic, initially degenerated adjacent segments after 6 years follow-up. Eur Spine J. 2010 Dec;19(12):2181-9

Hoff E, Strube P, Gross C, Perka C, Putzier M. (2009) Anterior versus anterior-posterior single level lumbar fusion – a prospective randomized study. Eur Spine J. Suppl. 2009

Brechtel L, Worms L, Velic S, Scharp C, **Hoff E**, Patotschka I. (2003) Validität des Shuttle-Runs zur Bestimmung der maximalen Sauerstoffaufnahme bei geistig behinderten und nicht-behinderten Probanden. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin (54) 7-8/2003: S101

Brechtel L, Wolff R, Brachmann S, Lock J, Heepe W, **Hoff E**. (2003) Neue Indikatoren des Eisenstoffwechsels bei Marathon-Läuferinnen. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin (54) 7-8/2003: S33

Brechtel L, Patotschka I, Hermsdorf M, **Hoff E**, Schwarz V, Wolff R. (2001) Zentralvenöses Aktivierungsniveau und motorische Fertigkeiten von Kindern nach erschöpfender Fahrradergometrie. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin (52) 7-8/2001: S24

Brechtel L, Patotschka I, Hermsdorf M, **Hoff E**, Schwarz V, Wolff R. (2001) Zentralvenöses Aktivierungsniveau und motorische Fertigkeiten von Kindern nach erschöpfender Fahrradergometrie. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin (52) 7-8/2001: S24

Brechtel L, **Hoff E**, Patotschka I, Wickede M, Felix R, Wolff R. (2001) 31P-Magnetresonanzspektroskopische Verlaufsstudie über 6 Jahre bei jugendlichen Eisschnellläufern. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin (52) 7-8/2001: S22

Brechtel L, **Hoff E**, Patotschka I, Wolff R, Hosten N, Felix R, Wickede M. (2001) A 6-Year Follow Up Study of 31P-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) in Junior Ice Speed Skaters. Medicine and Science in Sports and Exercise (33) 5: S147

Preise

Strube P, Hartwig T, Müller B, Groß C, **Hoff E**, Putzier M. (2010) Akute Bandscheibenschäden nach Diskographie / Diskanalgesie? – eine prospektive kontrollierte histologische Studie

1. Vortragspreis auf dem Jahreskongress der Deutschen Wirbelsäulengesellschaft 2010

Streitparth F, Putzier M, Hartwig T, de Bucourt M, **Hoff E**, Gross C, Teichgräber U, Strube P (2011) Kombinierte Diskographie-Diskanalgesie im offenen 1.0 Tesla MRT: Kann eine Diskanalgesie eine Diskographie ersetzen?

1. Posterpreis auf dem Deutschen Röntgenkongress 2011

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit zum Thema *“Charakterisierung des muskulären Metabolismus von Patienten mit familiärer partieller Lipodystrophie mittels ^{31}P - und ^1H -Magnetresonanzspektroskopie”* in der gesetzten Frist von mir selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet wurden.

Alle Zitate sowie sinngemäße wörtliche Wiedergaben, die anderen Werken entnommen wurden, sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Die Abbildungen, Diagramme und Tabellen sind von mir erstellt, soweit diese nicht als Entlehnung gekennzeichnet sind.

Berlin, 16. August 2011 Eike Hoff