

# Mechanisms of skeletal muscle dysfunction in lysosomal glycogen storage disease : observations in acid 1-4 [Alpha]-glucosidase deficient mice

## Citation for published version (APA):

Hesselink, R. P. (2004). *Mechanisms of skeletal muscle dysfunction in lysosomal glycogen storage disease : observations in acid 1-4 [Alpha]-glucosidase deficient mice*. Universiteit Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2004

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 26 Jan. 2021

## Summary

## Summary

Inherited enzyme deficiencies in muscle commonly lead to decreased contractile function, severely hampering patients locomotive capacities and/or leading to their death due to cardio-respiratory insufficiency. Glycogen storage disease type II (GSD II or Pompe's disease) is an inherited autosomal recessive disorder, in which the patient has insufficient activity of the lysosomal enzyme acid 1-4  $\alpha$ -glucosidase. As a consequence, glycogen accumulates in the lysosomes of all tissue, most severely depressing muscle contractile function. In the most severe cases of this muscular disorder, patients die before they reach the age of 2 years. In this thesis, studies are described which aimed to unravel the patho-physiological process that takes place in skeletal muscle tissue lacking acid 1-4  $\alpha$ -glucosidase. Using the acid 1-4  $\alpha$ -glucosidase deficient mouse (AGLU<sup>-/-</sup> mouse) as a model for human GSD II, we aimed to improve the insight in the processes underlying the disease, and to provide information that might facilitate the research regarding the therapeutic treatment of this disease.

After a general introduction on GSD II, the objectives of the studies described in the thesis are formulated in the first chapter. The main objective of this thesis was to gain insight in the time course of the decline in muscle mechanical performance in AGLU<sup>-/-</sup> mice in both isometric and isokinetic contractions. The second aim was to obtain information on possible mechanisms that lead to the decline in muscle performance. This includes alterations in muscle mass and quality of the remaining muscle tissue. As a number of factors can influence both muscle mass and quality of remaining muscle tissue, the third aim of this thesis was to identify mechanisms underlying muscle wasting that occurs in GSD II. To this end, changes in protein turnover, the activity of the ubiquitin proteasome complex and apoptotic activity were subject of study.

The thesis continues with an overview of the literature on lysosomal storage diseases in Chapter 2, paying special attention to the cellular pathology as it occurs in GSD II. In this chapter, a number of potential causes for the tissue damage that takes place in lysosomal storage diseases are identified. In the vast majority of lysosomal storage diseases accumulation of lipofuscin is prominent. Normally, lipofuscin only occurs in aged cells, and is connected to a diminished lysosomal activity. Moreover, lipofuscin accumulation in cells is connected to programmed cell death. As a result of this, two hypotheses are formulated about the possible ways of muscle wasting in GSD II. First, it is hypothesised that the gradual loss of muscle mass is caused by a combination of disuse atrophy and lipofuscin mediated apoptosis of myocytes. Second, we hypothesised that in the remaining skeletal muscle cells longitudinal transmission of force is hampered by swollen lysosomes, clustering of non-contractile material and focal regions with degraded contractile proteins, which results in muscle weakness.

Chapter 3 of this thesis describes a study on aged AGLU<sup>-/-</sup> mice. In this study a number of parameters, i.e. the force production capabilities, contractile mass, oxidative capacity, energy status, gross morphology, and desmin content of skeletal muscle were measured in the severely diseased state and compared to age matched control animals. Assessment of muscle contractile performance was performed in a specifically designed

*in situ* set-up. It was found that at 18 months of age, with obvious clinical symptoms, AGLU<sup>-/-</sup> mice produced a maximal torque during single tetanic contraction that was 50% reduced compared to unaffected animals. This decline in contractile performance was accompanied by a reduction of 20% in muscle mass, implying that loss of developed torque was disproportionate to the loss in muscle mass. During a series of supramaximal contractions, fatigue (when expressed as percentile decline of developed torque) did not differ between AGLU<sup>-/-</sup> mice and age-matched controls. Muscle oxidative capacity, energy status, and protein content (normalised to either dry or wet weight) were not changed in knockout mice compared to control. At 18 months of age, the gross morphology of muscle cells of AGLU<sup>-/-</sup> was clearly disturbed by the glycogen filled lysosomes and by large areas of cell debris that accumulated in the central region of the myocyte. Desmin content was found to be increased, whereas  $\alpha$ -actinin was not, suggesting a specific adaptation of the cytoskeleton in affected muscle cells. It was felt that the large clusters of non-contractile material present in the cytoplasm hamper longitudinal force transmission, and, hence, muscle contractile function. The increase in muscular desmin content is most likely reflecting adaptations to altered intracellular force transmission.

In Chapter 4, a study is described in which measurements were performed in three groups of mice (6-10, 12-16 and 18-24 months of age), representing different stages of progression of the pathology. Data on muscle mechanical performance were related to loss of muscle mass, muscle protein content, and muscle glycogen content, to analyse the contribution of each of these individual pathological features.

The progressive nature of the pathological process was underlined by the fact that in AGLU<sup>-/-</sup> mice, isometric maximal torque and peak power progressively declined when related to age matched controls. Moreover, the data presented indicate that power production during shortening contraction is affected earlier than isometric strength. Progressive loss of muscle mass was observed starting from age 12-16 months. The reduction of mass normalised power output was progressive with age, loss of mass normalised torque did not further increase after 12-16 months. Optimal shortening angular velocity was about 25% lower in AGLU<sup>-/-</sup> than in control mice, and did not change with age. As power-output is also determined by the shortening velocity of the muscle, reduced optimal shortening angular velocity of affected muscles was considered to be a substantial cause of the decline in peak power. Accumulation of glycogen was already prominent in muscles of 6-10 month old AGLU<sup>-/-</sup> mice but did not further increase thereafter. Therefore, it was concluded that in the 6-10 months old group, glycogen accumulation might be an important factor in loss of mechanical performance. In later stages of the disease, however, it is unlikely that accumulated glycogen is a crucial factor for the decrease in muscle mechanical function.

Chapter 5 elaborates on the effects of the lysosomal glycogen accumulation on the structure of the muscle cell. Morphological and structural features of muscle cells were analysed in AGLU<sup>-/-</sup> mice of the same ages as in the study described in the previous chapter, and compared to findings in non-affected littermates. Initially, the glycogen filled

lysosomes became visible as focal spots upon periodic acid Schiff (PAS) staining in AGLU<sup>-/-</sup> animals. In later stages, large intracellular inclusions of mixed cellular debris disturb the sarcoplasmic organisation. These large inclusions also contain lipofuscin, pointing to an overall dysfunction of the lysosomes to digest macromolecules. Concomitant with the appearance of the large inclusions, alterations in the cytoskeletal structure of the affected muscle cells were observed. Initially, increased deposition of titin bordering the large inclusions inside the affected muscle fibres occurs. It was hypothesised that these titin depositions might be a compensatory mechanism to facilitate transmission of forces around the inclusion, thus mitigating the decline in force. Total desmin content gradually increased with advancing age while desmin staining was not confined to areas in close vicinity of the intracellular inclusions. The functional significance of the alterations in desmin expression is incompletely understood. In later stages of the disease, when the structural disarrangement of the muscle cells becomes more severe, in some muscle cells the loss of titin and non-functional deposition of desmin were prominent.

Analysis of loss of contractile function in Chapter 4, and analysis of morphological features in Chapter 5 revealed that in the youngest AGLU<sup>-/-</sup> mice the disturbance of cellular organisation by the glycogen filled lysosomes might be the most prominent factor in the loss of muscle function. Therefore, in Chapter 6 the contribution of this phenomenon to the decrease in muscle contractile function in an isometrically contracting slice of a muscle was calculated with a finite element model. Force was calculated at several inclusion densities and distributions and compared to normal muscle. Results from the calculations were compared to *in situ* measures of dorsal flexor torque of  $\alpha$ -glucosidase null mice of 6 months of age and unaffected littermates and assessments of inclusion density in the dorsal flexor muscles. The calculated force loss was shown to be almost exclusively dependent on the inclusion density and less on the type of inclusion distribution. The force loss predicted by the model (6%) on the basis of measured inclusion density (3.3%) corresponded to the loss in mass-normalised strength *in situ* measurements (7%). It was concluded that the mechanical interaction between the non-contractile inclusions and the adjacent myofibrils is a key factor in the loss of force per unit muscle mass during early stages of GSD II in mice. As glycogen accumulation reaches higher levels in humans than in mice, it is highly probable that the impact of this mechanical interaction is even more severe in patients suffering from Pompe disease.

In Chapter 7, the mechanisms of muscle wasting in AGLU<sup>-/-</sup> mice are studied in more detail, using a series of techniques to study both the synthesis and the degradation of muscle protein. Muscle mass of both AGLU<sup>-/-</sup> and unaffected littermates was determined at the same ages as in Chapters 4 and 5, and was found to be decreased in AGLU<sup>-/-</sup> mice of the eldest 2 age groups. Protein synthesis rates were measured as the rate of incorporation of L-[ring-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-phenylalanine into mixed muscle protein in AGLU<sup>-/-</sup> mice and unaffected littermates at 12-16 months of age. Proteolytic activity of the ubiquitin proteasome complex was determined in pooled muscles of mice of the various age

groups all 3 age groups. Furthermore, localisation of the 19S regulatory subunit of the proteasome complex was performed on muscle tissue slides of control and affected mice of all age groups, as well as assessment of apoptotic activity by determination of the contents of TUNEL positive nuclei.

The results show that at 12 months, protein synthesis rates were at least 3-fold higher in AGLU<sup>-/-</sup> mice compared to unaffected animals, while the activity of the proteasome and antibody staining of the 19S regulatory subunit were increased too. In AGLU<sup>-/-</sup> mice 6-10 months of age, the indicated markers of proteolysis are increased as well, while muscle mass remains constant. In AGLU<sup>-/-</sup> animals 18-24 months of age, activity of the proteasome complex is reduced, while wasting of muscle is prominent. Only in these old affected animals a small number of nuclei (1.5%) was TUNEL positive.

The data collectively suggest that disruption of the myofibrillar structure in early stages of the disease leads to high activities of the proteasome system and clearance of the disrupted or damaged myofibrils. High rates of regeneration, most likely via activation of satellite cells in the damaged areas, appear to lead to high rates of protein synthesis. This then results in a rapid replacement (turnover) of the damaged myofibrils with newly synthesised myofibrils and minimal visible loss of structure. The chapter ends with the hypothesis that in older animals, the regenerative capacity may be lost due to satellite cell depletion and the rates of protein synthesis must fall. In order to prevent a very rapid loss of myofibrils the activity of the proteasome system seems to show an adaptive downregulation.

Finally in Chapter 8, the results of the previous chapters are discussed and directions for future areas of research are indicated. In that chapter it is concluded that the pathology in muscle lacking acid 1-4  $\alpha$ -glucosidase is multifactorial. Analysing the data from the studies carried out in this thesis and comparing them with results obtained by other groups aiming to develop therapeutic interventions for GSD II it is felt that a point of no return might be present in the patho-physiological process of acid 1-4  $\alpha$ -glucosidase deficiency. This would imply that to be most successful, therapeutic interventions should take place early in the disease process. Close monitoring of new-borns is thus essential. In the future, more experimental studies should be performed, delineating the mechanisms of muscle wasting and the regenerative capacity of the affected muscle in order to reduce the detrimental effects of muscle atrophy. Finally, it is suggested that apart from the enzyme replacement therapy that is presently developed, additional therapeutic measures such as mild exercise programmes or addition of muscle growth stimulating agents should be explored.



## Samenvatting



## Samenvatting

Erfelijke enzym deficiënties in spierweefsel hebben vaak een verminderd functioneren van het spierweefsel tot gevolg. Als gevolg hiervan is de capaciteit van deze patiënten om te bewegen afgenomen, en in veel gevallen sterven patiënten aan een verminderde cardio-respiratoire functie. Glycogeen stapeling ziekte type II, ook wel ziekte van Pompe genoemd, is een aandoening die autosomaal recessief overerft, en waarin de patiënten een te lage activiteit van het lysosomale enzym zure 1-4  $\alpha$ -glucosidase hebben. Als gevolg hiervan ontstaat stapeling van glycogeen in de lysosomen van deze patiënten. Deze stapeling komt in alle weefsels voor, maar heeft de meeste gevolgen voor het spierweefsel, waarvan de functie ernstig verminderd is. Bij de meest ernstige vorm van deze spierziekte overlijden de patiënten door functie verlies van hartspeer en ademhalingspijnen voor ze 2 jaar oud zijn. De onderzoeken die in dit proefschrift beschreven staan, waren er op gericht inzicht te verwerven in het pathologische proces dat plaatsvindt in spierweefsel zonder werkzaam zure 1-4  $\alpha$ -glucosidase. In deze onderzoeken werd een genetisch gemodificeerde muizenstam gebruikt als model voor het humane ziektebeeld. Metingen uitgevoerd aan muizen zonder werkzaam zure 1-4  $\alpha$ -glucosidase (AGLU<sup>-/-</sup> muizen) hadden tot doel meer inzicht te verschaffen in het mechanisme dat het klinische ziektebeeld veroorzaakt, en informatie te verzamelen die de ontwikkeling van therapieën voor de ziekte van Pompe kunnen vergemakkelijken.

Het proefschrift begint met een inleidend hoofdstuk waarin enige algemene informatie over het ziektebeeld gegeven wordt en de onderzoeksdoelen beschreven staan. Het belangrijkste doel van dit proefschrift was een beeld te krijgen van het tijdsfad waarin de afname van spierfunctie in zowel isometrische als isokinettische contracties plaatsvindt. Een tweede doel was inzicht te krijgen in een aantal mogelijke mechanismen die een rol spelen bij de verminderde spierfunctie. Hieronder vallen zowel veranderingen in spiermassa als vermindering van de kwaliteit van het spierweefsel. Omdat een aantal factoren een rol kan spelen bij zowel veranderingen in spiermassa als veranderingen in kwaliteit van het nog aanwezige spierweefsel was een derde doel van dit proefschrift de factoren die een rol spelen bij de afname van spiermassa bij ziekte van Pompe te belichten. Hiervoor werden de eiwit turnover, de activiteit van het ubiquitine proteasoom systeem en de apoptotische activiteit in het spierweefsel van AGLU<sup>-/-</sup> muizen onderzocht.

Vervolgens wordt in hoofdstuk 2 een literatuuroverzicht gegeven over lysosomale stapelingsziekten. Hierbij is de nadruk gelegd op de ziekte van Pompe. Aan de hand van de literatuur wordt in dit hoofdstuk een aantal mechanismen genoemd die een rol kunnen spelen bij de schade aan weefsels die optreedt bij lysosomale stapelingsziekten. In veruit de meeste van deze aandoeningen is stapeling van lipofuscine een duidelijk herkenbaar fenomeen. Lipofuscine stapeling komt in normale omstandigheden alleen voor in oudere cellen en wordt in verband gebracht met een verminderde functie van de lysosomen. Verder wordt stapeling van lipofuscine in verband gebracht met geprogrammeerde celdood. Hierop werden 2 hypothesen geformuleerd over mogelijke

mechanismen die de afname van spiermassa bij ziekte van Pompe kunnen veroorzaken. Een eerste oorzaak van de progressieve afname van spiermassa is een combinatie van atrofie door het verminderde gebruik van de spieren en door lipofuscine stapeling veroorzaakte geprogrammeerde celdood. Een tweede hypothese was dat de door glycogeen stapeling gezwollen lysosomen, stapeling van niet contractiel materiaal, en plekken in de spiercel waar de contractiele elementen worden afgebroken de structuur van overgebleven spierweefsel dusdanig verstoord hebben dat doorleiding van krachten in de lengterichting, dat wil zeggen naar de pezen, niet meer goed mogelijk is. Dit heeft een verminderde spierfunctie tot gevolg.

In hoofdstuk 3 wordt een onderzoek beschreven bij oudere AGLU<sup>-/-</sup> muizen, waarbij de klinische klachten zich al duidelijk hadden ontwikkeld. In dit onderzoek werden de hoeveelheid spiermassa, de spier contractiliteit, de oxidatieve capaciteit, de energie status, de morfologie van de spieren en de hoeveelheid desmine in de spier bepaald. De resultaten van de aangedane muizen werden vergeleken met die van niet aangedane nestgenoten. Spiercontractiliteit werd *in situ* gemeten in speciaal hiervoor ontworpen meetapparatuur. Het bleek dat aangedane muizen van 18 maand oud 50% minder koppel kunnen leveren tijdens een eenmalige tetanische spiercontractie dan hun niet aangedane nestgenoten. Deze verminderde spierfunctie ging gepaard met een 20% verminderde spiermassa. De afname in spierfunctie is dus disproportioneel ten opzichte van de afname in spiermassa. De vermoeibaarheid van de spieren, uitgedrukt als de procentuele afname in geproduceerd koppel tijdens een serie contracties, verschilde niet tussen de AGLU<sup>-/-</sup> muizen en de controle dieren. Ook de op spiermassa genormaliseerde waarden van de oxidatieve capaciteit, energie status en het eiwit gehalte vertoonden geen verschillen. De morfologie van de spieren van AGLU<sup>-/-</sup> muizen verschilde wel wezenlijk van die van niet aangedane controle dieren. De celstructuur was duidelijk verstoord door aanwezigheid van met glycogeen gevulde lysosomen en door grote gebieden centraal in de spiercellen waar celmateriaal zich had afgezet. Analyse van de hoeveelheid desmine en  $\alpha$ -actinine in het spierweefsel toonde aan dat in de spieren van AGLU<sup>-/-</sup> muizen duidelijk meer desmine aanwezig was dan in de controle dieren, terwijl de hoeveelheden  $\alpha$ -actinine gelijk waren. Omdat het waarschijnlijk is dat de grote hoeveelheden niet-contractiel materiaal in de spiercellen van de AGLU<sup>-/-</sup> muizen de longitudinale kracht doorleiding beïnvloedt, is het aannemelijk dat de verhoogde hoeveelheid desmine in aangedane muizen een aanpassing is aan de veranderde intracellulaire krachten.

Hoofdstuk 4 beschrijft een onderzoek dat werd uitgevoerd op muizen in 3 verschillende leeftijdsgroepen (6-10 maand, 12-16 maand en 18-24 maand). Deze verschillende leeftijden komen overeen met verschillende stadia van het ziekteproces bij de muizen. Gegevens over de mechanische prestaties van de spier werden gerelateerd aan de mate van spiermassa verlies, eiwit gehalte van de spier en glycogeen gehalte van de spier. Op deze manier werd inzicht verkregen in de mate waarin deze pathologische factoren afzonderlijk bijdragen aan het verlies van spierfunctie.

Het progressieve karakter van de ziekte kwam tot uiting in een voortschrijdende afname van het geleverd maximaal koppel en maximaal vermogen ten opzichte controle dieren van gelijke leeftijd. Ook blijkt uit de gegevens dat de spierfunctie tijdens isokinetische contracties eerder is aangedaan dan tijdens isometrische contracties. Progressief spiermassa verlies trad op vanaf de leeftijd 12-16 maand. De op spiermassa genormaliseerde afname van het geproduceerd vermogen werd progressief minder in alle leeftijdsgroepen, terwijl het geleverd koppel niet meer afnam na 12-16 maand. De optimale contractie snelheid lag ongeveer 25% lager in de AGLU<sup>-/-</sup> dieren. Dit was niet afhankelijk van de leeftijd. Omdat het geleverd vermogen mede afhankelijk is van de contractie snelheid kan deze vermindering een substantiële bijdrage geleverd hebben aan het verminderd maximaal vermogen in de AGLU<sup>-/-</sup> muizen. De stapeling van glycogeen was in AGLU<sup>-/-</sup> dieren van 6-10 maand al zeer duidelijk, en nam na die leeftijd niet significant toe. Hieruit werd geconcludeerd dat in de jongste muizen (6-12 maand) de glycogeen stapeling een belangrijke factor kan zijn in het verlies van spierfunctie. Het is echter niet waarschijnlijk dat in het verdere verloop van de pathologie de glycogeen stapeling per sé een cruciale factor is in de progressieve afname van spier massa en spierfunctie.

In hoofdstuk 5 wordt verder ingegaan op de effecten die de lysosomale glycogeen stapeling kan hebben op de structuur van de spiercel. In de spieren van aangedane en controle muizen van dezelfde leeftijdsgroepen als in hoofdstuk 4 werden de morfologische en structurele eigenschappen geanalyseerd. In de jongste AGLU<sup>-/-</sup> dieren toonde een PAS kleuring de met glycogeen gevulde lysosomen als duidelijk afgebakende plekken in de spiercel. In de oudere dieren wordt de sterk georganiseerde indeling van de spiercel ook nog verstoord door grote velden met afzettingen van celmateriaal. In deze afzettingen komt regelmatig lipofuscine voor, wat erop duidt dat het lysosomaal systeem niet meer in staat is om macromoleculen af te breken. Parallel aan het verschijnen van de afzettingen van cel-materiaal zijn veranderingen in de structuur van het cytoskelet waar te nemen. Deze beginnen met een toename van titine aan de randen van de intracellulaire afzettingen. Deze observatie heeft tot de hypothese geleid dat de lokaal verhoogde titine afzetting tot doel heeft de doorleiding van krachten langs de grote insluitsels te bevorderen, en op die manier de functie van de spiercel te behouden. In de AGLU<sup>-/-</sup> muizen werd een progressieve toename in de hoeveelheid desmine gevonden en kleuringen toonden aan dat deze verhoogde desmine expressie niet beperkt was tot de gebieden in de buurt van de inclusies. De functionele betekenis van de toename in desmine is nog niet duidelijk. In de latere fases van het ziekteproces zijn de verstoringen in de celstructuur steeds groter en is in individuele cellen een verminderde hoeveelheid titine en niet-functionele desmine te zien.

Uit de gegevens van hoofdstuk 4 en 5 bleek dat in de jonge AGLU<sup>-/-</sup> dieren de lysosomale stapeling van glycogeen de meest bepalende factor voor spierfunctie verlies zou kunnen zijn. Daarom is in hoofdstuk 6 de bijdrage van intracellulaire inclusies van gezwollen lysosomen aan de verminderde spierfunctie gekwantificeerd met behulp van een eindige elementen model. De berekeningen werden uitgevoerd op een isometrisch

contraherende plak spier, bij verschillende inclusie dichtheden en verdelingen. De resultaten van de berekeningen werden vergeleken met resultaten van *in situ* koppel metingen aan de dorsaalflexoren van 6 maand oude AGLU<sup>+</sup> muizen en inclusie dichtheid bij deze dieren. Het berekend koppel verlies was bijna geheel afhankelijk van de inclusie dichtheid, en niet van de verdeling van de inclusies. De uitkomsten van het model (6% krachtsverlies bij een inclusie dichtheid van 3.3%) kwamen goed overeen met de waarden gevonden bij *in situ* metingen (7% koppelverlies). Uit de analyses bleek dat de interactie tussen de niet-contractiele insluitsels en de direct aangrenzende myofibrillen een belangrijke factor is in het verlies in spierfunctie in de eerste fase van het pathologisch proces bij AGLU<sup>-/-</sup> muizen. Omdat de stapeling bij patiënten met ziekte van Pompe veel sterker is dan de stapeling bij de AGLU<sup>-/-</sup> muizen is het waarschijnlijk dat dit fenomeen in patiënten een nog prominentere rol speelt.

In hoofdstuk 7 wordt in meer detail ingegaan op mogelijke mechanismen van spiermassa verlies bij AGLU<sup>-/-</sup> muizen. Hierbij is een aantal technieken gebruikt om zowel afbraak als opbouw van spiereiwit te kunnen meten. Muizen uit dezelfde leeftijdsgroepen als in hoofdstukken 4 en 5 werden onderzocht. In de oudste 2 groepen was de spiermassa in AGLU<sup>-/-</sup> muizen lager dan die van controle dieren. In de leeftijdsgroep 12-16 maand werd de eiwit synthese snelheid bepaald door de inbouwsnelheid van L-[ring-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-phenylalanine in de spier. De proteolytische activiteit van het ubiquitine proteasoom systeem werd in alle leeftijdscategorieën gemeten in spier homogenaten. Ten slotte werd op coupes van spierweefsel van dieren uit alle leeftijdsgroepen zowel de lokalisatie van het 19S deel van het proteasoom complex als de apoptotische activiteit in de spiercellen bepaald. De uitkomsten van de verschillende metingen toonden aan dat in AGLU<sup>-/-</sup> muizen van 12-16 maand de eiwitsynthese activiteit ten minste 3 keer hoger is dan in controle dieren, terwijl ook de activiteit van het ubiquitine proteasoom systeem verhoogd is en er meer 19S subunit in de cel aanwezig is. Ook in de 6-10 maand oude AGLU<sup>-/-</sup> dieren zijn de markers voor proteolyse verhoogd, hoewel de spiermassa niet verschilt met controle dieren. In de oudste dieren tenslotte is de activiteit van het proteasoom systeem verminderd, terwijl er wel duidelijk afname van spiermassa in AGLU<sup>-/-</sup> dieren is. Dit is ook de enige groep dieren waarin een klein percentage (1.5%) van de celkernen apoptose lijkt te ondergaan. Uit deze gegevens wordt geconcludeerd dat de verstoring van de myofibrillaire structuur in de eerste fase van het ziekteproces een verhoogde activiteit van het proteasoom systeem tot gevolg heeft, waardoor de beschadigde celdelen worden opgeruimd. Activatie van satellietcellen kan voor een snelle regeneratie van het verloren gegane spierweefsel zorgen en de oorzaak zijn van de hoge eiwit synthese activiteit. Door deze hoge turnover worden beschadigde cel delen snel vervangen en is het zichtbaar verlies van spierstructuur minimaal. Aan het eind van dit hoofdstuk wordt de hypothese geformuleerd dat in de oudere dieren de regeneratieve capaciteit verminderd kan zijn vanwege een tekort aan satelliet cellen. De eiwit synthese snelheid zal dan afnemen. Om een te snel verlies van spierweefsel tegen te gaan daalt de proteolytische activiteit in deze oude dieren.

Hoofdstuk 8 is een algemene discussie waarin alle gegevens uit de voorgaande hoofdstukken worden besproken en mogelijke toekomstige onderzoeksvelden aangegeven. Er wordt geconcludeerd dat het ziekteproces in spieren met een verlaagde activiteit van zure 1-4  $\alpha$ -glucosidase een multifactorieel proces is. Verder wordt, na analyse van de resultaten uit de studies in dit proefschrift en die verkregen uit onderzoek door anderen, gesuggereerd dat er in het ziekteproces een 'point of no return' zou kunnen zijn. Dit impliceert dat een therapeutische interventie zo vroeg mogelijk in het ziekteproces plaats moet vinden om het grootste effect te hebben. Hiervoor is een goede screening van pasgeborenen essentieel. Toekomstige studies zouden zich moeten richten op de mechanismen van spiermassa verlies en de regeneratieve capaciteit bij ziekte van Pompe. Dit dient te gebeuren om de zeer nadelige effecten van spiermassa verlies tegen te kunnen gaan. Het hoofdstuk sluit af met de suggestie dat naast de enzym vervangende therapie die momenteel ontwikkeld wordt ook onderzoek gedaan dient te worden naar ondersteunende therapieën. Voorbeelden hiervan zijn aangepaste trainingsprogramma's of het toedienen van stoffen die de spiergroei stimuleren.