

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)

**mRNA-Expression der kardialen Isoformen
von Troponin T und Troponin I im Skelettmuskel
von Patienten mit Myopathie**

Barbara Sabine Meßner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. H.H.E. Baum
2. Univ.-Prof. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 22.09.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.12.2003 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS ----- II

1	<u>EINLEITUNG ----- 7</u>
2	<u>PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE ----- 10</u>
2.1	MUSKELPHYSIOLOGIE ----- 10
2.2	MOLEKULARGENETISCHE GRUNDLAGEN DER TROPONINEXPRESSION UND SEQUENZEN ----- 12
2.2.1	SEQUENZ DER CDNA DER KARDIALEN ISOFORM VON TROPONIN I (CTNI) ----- 14
2.2.2	SEQUENZ DER CDNA DER KARDIALEN ISOFORM VON TROPONIN T (CTNT) ----- 15
2.2.3	SEQUENZ DER CDNA DER SLOW-TWITCH SKELETTMUSKELISOFORM VON TROPONIN I (SMTNIS) ----- 19
2.2.4	SEQUENZ DER CDNA DER SLOW-TWITCH SKELETTMUSKELISOFORM VON TROPONIN T (SMTNTS) ----- 20
2.2.5	SEQUENZ DER CDNA DER FAST-TWITCH SKELETTMUSKELISOFORM VON TROPONIN I (SMTNIF) ----- 21
2.2.6	SEQUENZ DER CDNA DER FAST-TWITCH SKELETTMUSKELISOFORM VON TROPONIN T (SMTNTF) ----- 22
2.3	SKELETTMUSKELERKRANKUNGEN ----- 23
2.3.1	EINTEILUNG ----- 23
2.3.2	PATHOGENESE ----- 25
2.3.3	HISTOLOGISCHES BILD DER MYOPATHIEN ----- 26
2.3.4	MERKMALE EINZELNER SKELETTMUSKELERKRANKUNGEN ----- 27
2.3.4.1	X-chromosomale Muskeldystrophien ----- 27
2.3.4.1.1	Infantiler maligner Beckengürteltyp: Duchenne ----- 27
2.3.4.1.2	Juveniler benigner Beckengürteltyp: Becker-Kiener ----- 28
2.3.4.2	Rezessiv autosomale Muskeldystrophien ----- 28
2.3.4.2.1	Gliedergürtel-Muskeldystrophien: Leyden-Möbius (limb girdle dystrophy) ----- 28
2.3.4.2.2	Sarkoglykanopathien ----- 29
2.3.4.3	Dominant autosomale Muskeldystrophien ----- 30
2.3.4.3.1	Fazio-skapulo-humerale Muskeldystrophie: Erb-Landouzy- Dejerine ----- 30
2.3.4.3.2	Distale Muskeldystrophien: Welander ----- 30

2.3.4.4	Metabolische Myopathien – Glykogenosen-----	31
2.3.4.4.1	McArdlesche Erkrankung (Glykogenose Typ V)-----	31
2.3.4.4.2	Pompesche Erkrankung (Glykogenose Typ II)-----	31
2.3.4.5	Myotonia dystrophica / Dystrophia myotonica (Curschmann- Steinert)-----	32
2.3.4.6	Maligne Hyperthermie -----	33
2.3.4.7	Neurale Muskelatrophie-----	33
2.3.4.7.1	Neuronale Form vom Typ Charcot-Marie-Tooth -----	33
2.4	TROPONINE IN DER DIAGNOSTIK MYOKARDIALER SCHÄDIGUNGEN -----	34
3	<u>FRAGESTELLUNG-----</u>	39
4	<u>MATERIAL UND METHODEN-----</u>	40
4.1	MATERIAL -----	40
4.1.1	KONTROLLPROBEN -----	40
4.1.2	PATIENTENPROBEN-----	40
4.1.3	SERUMPROBEN-----	44
4.2	METHODEN-----	45
4.2.1	HOMOGENISIERUNG UND RNA-ISOLIERUNG -----	45
4.2.2	REVERSE TRANSKRIPTION -----	47
4.2.3	PCR-----	48
4.2.3.1	Ansatz-----	49
4.2.3.1.1	Kontrolle der reversen Transkription-----	49
4.2.3.1.2	Spezifische Nachweisreaktion-----	49
4.2.3.2	Durchführung -----	50
4.2.4	GELELEKTROPHORESE-----	53
4.2.4.1	Herstellung des Geles -----	53
4.2.4.2	Probenvorbereitung und Auftrag-----	54
4.2.4.3	Elektrophorese -----	54
4.2.5	RESTRIKTIONSVERDAU-----	55
4.2.5.1	Durchführung -----	55
4.2.5.2	Elektrophorese -----	56
4.2.6	AUSWERTUNG -----	56
4.2.7	VERGLEICH DER PCR-ERGEBNISSE MIT DEN HISTOLOGISCH-KLINISCHEN BEFUNDEN. -----	57
4.2.8	SERUM-----	57

<u>5</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>58</u>
5.1	ERGEBNISSE DER RNA-ISOLIERUNG	58
5.2	ERGEBNISSE FÜR SKELETTMUSKELISOFORMEN	60
5.2.1	SCHNELLE SKELETTMUSKELISOFORMEN	60
5.2.2	LANGSAME SKELETTMUSKELISOFORMEN	60
5.2.3	RESTRIKTIONSVERDAU DER SKELETTMUSKELISOFORMEN	65
5.3	ERGEBNISSE FÜR HERZMUSKELISOFORMEN	68
5.3.1	ERGEBNISSE FÜR cTNT	68
5.3.2	RESTRIKTIONSVERDAU cTNT	71
5.3.3	ERGEBNISSE FÜR cTNI	72
5.3.4	RESTRIKTIONSVERDAU cTNI	74
5.4	SERUMPROBEN	75
<u>6</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>77</u>
6.1	PRÄANALYTISCHE EINFLUSSFAKTOREN	77
6.2	SKELETTMUSKELISOFORMEN	81
6.3	KARDIALE ISOFORMEN	82
6.3.1	cTNT	83
6.3.2	cTNI	86
6.3.3	cTNT/cTNI-EXPRESSION BEI MUSKELDYSTROPHIE TYP DUCHENNE	88
6.4	NACHWEIS KARDIALER TROPONINE IM SERUM	91
<u>7</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>93</u>
<u>8</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>95</u>
<u>9</u>	<u>ANHANG</u>	<u>111</u>
9.1	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	111
9.2	DANKSAGUNG	113
9.3	LEBENS LAUF	114

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
as	antisense
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CA III	Carboanhydrase III
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Creatinkinase
CK-MB	Creatinkinase Isoenzym MB
cTnC	kardiale Isoform von Troponin C
cTnI	kardiale Isoform von Troponin I
cTnT	kardiale Isoform von Troponin T
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethyl-pyrocbonat
DGK	Dystrophinglykoproteinkomplex
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHZ	Deutsches Herzzentrum
DM	Dermatomyositis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
F.B.I.	Friedrich-Baur-Institut
FHC	familiäre hypertrophe Kardiomyopathie
FSH-Dystrophie	fazio-skapulo-humerale Muskeldystrophie
G	Guanin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBDH	= Isoenzym LDH1
LDH	Laktatdehydrogenase
LGMD	limb girdle muscular dystrophy
MD	Muskeldystrophie
MLC-1	kardiale Form der Myosin leichte Kette
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N.	Neurologische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar
nd	not done
nt	Nukleotide
o.B.	ohne Befund
OD	= Extinktion
PCR	Polymerasekettenreaktion
PM	Polymyositis
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase/reverse Transkription
rt-PCR	reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
s	sense
SCARMD	Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SM	Skelettmuskel
SMTnlf	fast-twitch Skelettmuskelisoform von Troponin I
SMTnls	slow-twitch Skelettmuskelisoform von Troponin I
SMTnTf	fast-twitch Skelettmuskelisoform von Troponin T
SMTnTs	slow-twitch Skelettmuskelisoform von Troponin T
T	Thymin
TBE	Puffer aus Tris, Boric Acid und EDTA
TnC	Troponin C
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Der Troponinkomplex ist Teil des dünnen Filamentes der kontraktiven Einheit der Skelett- und Herzmuskulatur (46, siehe **Abbildung 1**). Der Troponinkomplex besteht aus drei Proteinuntereinheiten, die mit den Buchstaben C, T und I bezeichnet werden (135).

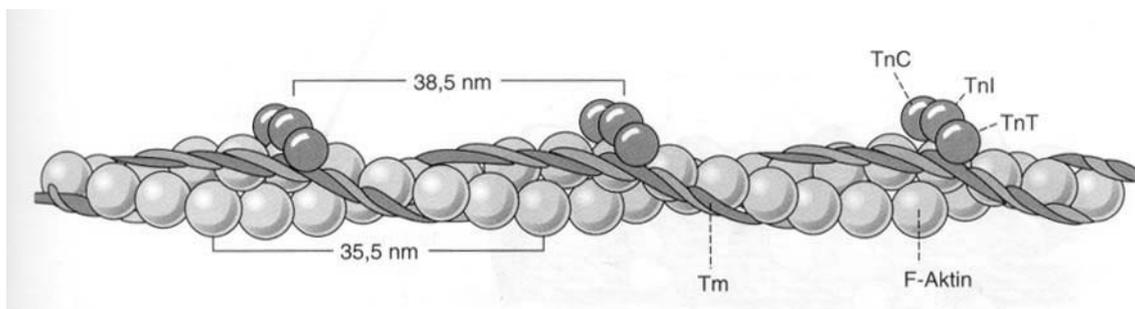


Abbildung 1: Struktur eines dünnen Filamentes. Anordnung von Tropomyosin (Tm), Troponin (TnC, TnI und TnT) und F-Aktin (42).

Troponin C bindet bis zu vier Calciumionen, die bei neuraler Stimulation aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden, und hebt dadurch die hemmende Funktion von Troponin I auf. Troponin I verhindert die Brückenbindung von Aktin und Myosin, wenn der Muskel nicht neural stimuliert wird (5, 46). Troponin T verbindet den Troponinkomplex mit Tropomyosin und transformiert die calciuminduzierte Konformationsänderung auf das dünne Filament. Außerdem ist es essentiell wichtig für die calciumregulierte ATPase Aktivität der Myofibrillen. Es können drei verschiedene Isoformen von Troponin T und I unterschieden werden, wobei zwei Isoformen im Skelettmuskel (slow-twitch und fast-twitch) und eine Isoform im Herzmuskel (kardial) exprimiert wird (139). Für Troponin C existieren nur zwei Isoformen. Die Herzisoform ist identisch mit der slow-twitch Skelettmuskelisoform (9, 136, 109, 50). Jede Isoform wird von einem eigenen Gen kodiert, wobei die Expression muskelfaserspezifisch stattfindet (49, 37, 99).

Im Gegensatz zu anderen Multigen-Familien gehen die Skelettmuskel- und Herzmuskelproteine des Troponins nicht durch alternatives Splicen verschiedener Exons aus einem einzigen Gen hervor (**110**).

Durch die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen die kardialen Isoformen von Troponin T (cTnT) und Troponin I (cTnI) ist es möglich, diese Isoformen mit kommerziell erhältlichen Immunoassays quantitativ im Serum zu messen. Sie sind zuverlässige klinisch-chemische Parameter in der Diagnose von Myokardschädigungen. Auch minimale Herzmuskelschädigungen, die mit anderen klinisch-chemischen und klinischen Parametern noch nicht nachgewiesen werden können, werden von diesen beiden Parametern erfasst, so dass z.B. bei Patienten mit instabiler Angina pectoris eine Risikostratifizierung möglich ist (**79, 91, 12, 81**). Dagegen ist cTnC kein möglicher herzspezifischer Marker für die laborchemische Diagnostik, weil es auch im erwachsenen slow-twitch Skelettmuskel exprimiert wird (**22**).

Diese Tatsache ist von großer Bedeutung, da ischämische Herzerkrankungen an erster Stelle in der Mortalitätsstatistik stehen. In 20 – 40% aller Herzinfarkte ist das EKG unauffällig, so dass die Diagnose mit Hilfe klinisch-chemischer Kenngrößen im Blut gestellt werden muss (**101**).

Obwohl cTnT ein sensitiver Marker für den Herzinfarkt ist, werden in mehreren Studien erhöhte Werte bei Patienten ohne Herzbeteiligung beschrieben, ähnlich wie für die unspezifischen Myokardmarker CK, CK-MB (**15**) und Myoglobin (**91**):

- bei polytraumatisierten Patienten mit Verletzungen der Skelettmuskulatur oder Rhabdomyolyse (**91, 79, 89**),
- bei Patienten mit verschiedenen Skelettmuskelerkrankungen wie z.B. Sklerodermie, Polymyositis, Dermatomyositis und Duchenne'scher Muskeldystrophie (**15, 78, 29, 84, 112**),
- bei Patienten mit chronischem Nierenversagen und Dialyse (**36, 77, 85, 61, 105, 18, 143**), besonders bei Diabetikern (**86**).

Der Grund für diese falsch positiven Werte könnte in unspezifischen Reaktionen oder in einer Kreuzreaktivität der Antikörper mit Skelettmuskel-TnT liegen (**144**). Die Kreuzreaktivität mit SMTnT wird mit weniger als 2% für den

Erstgenerationsassay beschrieben (9, 80), und spielt für den weiterentwickelten Zweitgenerationsassay keine Rolle (<0,1%) mehr (102). Folglich ist die Unspezifität nicht durch eine immunologische Kreuzreaktivität bedingt (79).

Es sind auch andere Gründe für die falsch positiven Ergebnisse denkbar.

Möglicherweise stammt das gemessene cTnT aus dem Herzmuskel infolge einer die Myopathie oder das Nierenversagen begleitenden stummen Kardiomyopathie (86). Eventuell wird auch cTnT nach dem gleichen Muster wie für die B-Untereinheit des Enzyms CK-MB beschrieben freigesetzt (83). Diese wird von verletzten Skelettmuskelzellen reexprimiert, nachdem sie bereits im embryonalen Skelettmuskel exprimiert wird (136), während der weiteren Entwicklung jedoch reprimiert und durch die M-Untereinheit ersetzt wird (73, 95).

Im Gegensatz zu den erhöhten Werten von cTnT bei Patienten mit Myopathie oder mit Niereninsuffizienz ist cTnI bei diesen Patienten nicht erhöht (2, 137, 25, 143, 97, 89, 68). Auch bei Verletzungen der Skelettmuskulatur sind die Werte von cTnI nicht erhöht, verglichen mit erhöhten CK-MB und Myoglobin-Werten, die aus dem Skelettmuskel freigesetzt werden (9, 112, 20, 131, 133). cTnI ist während der Ontogenese, der neonatalen Entwicklung oder beim Erwachsenen nicht im Skelettmuskel nachweisbar, auch nicht bei Regeneration nach akuter oder chronische Schädigung des Skelettmuskels (3, 100, 25, 40). Somit scheint dieser Parameter dem cTnT in seiner diagnostischen Aussagekraft überlegen, insbesondere bei Patienten mit möglicher „unspezifischer cTnT-Erhöhung“.

Allerdings sind die bisher verfügbaren Assays zur cTnI-Bestimmung im unteren Messbereich zu unspezifisch im Vergleich zum verfügbaren cTnT-Assay. Auf Grund dieser geringeren Empfindlichkeit der cTnI-Assays könnten diese negativen Ergebnisse auch „falsch negative“ Messwerte sein. Ein minimaler Herzmuskelschaden wird also deshalb vom eingesetzten cTnI-Assay nicht erkannt, weil der Assay in diesem tiefsten Messbereich nicht korrekt messen kann.

Myosin wird aufgehoben. Über Troponin T resultiert eine Seitwärtsbewegung des Tropomyosins. Diese deblockierende Bewegung des Tropomyosins in seine aktivierte Position (125) ermöglicht die Ausbildung von Querbrücken zwischen Myosin und den Aktinfilamenten, indem sich der Tropomyosin-Faden in die Rinne zwischen zwei Aktin-Ketten legt und dabei deren Bindungsstellen für das Myosin freigibt (124). Die Muskelkontraktion im quergestreiften Skelettmuskel erfolgt somit im Sinne der elektromechanischen Koppelung über einen allosterischen Mechanismus mit folgendem Informationsfluss: Ca^{2+} – Troponinkomplex – Tropomyosin – Aktin – Myosin.

Die aus allen o.g. molekularen Proteinen bestehenden Muskelzellen bilden größere Einheiten, die motorischen Einheiten. Eine motorische Einheit besteht aus einem sie versorgenden motorischen Neuron und allen von ihm versorgten Muskelfasern. Es können insgesamt drei verschiedene Muskelfasertypen der quergestreiften Skelettmuskulatur unterschieden werden (123) (Tabelle 1):

	Typ-1-Fasern (rot)	Typ-2A-Fasern (intermediär)	Typ-2B-Fasern (weiß)
	Slow-twitch	Fast-twitch	
Physiologie	langsam kontrahierend	schnell kontrahierend	schnell kontrahierend
	ausdauernd	ausdauernd	rasch ermüdend
Stoffwechsel	oxidativ	oxidativ/glykolytisch	glykolytisch

Tabelle 1 : Muskelfasertypen

Zu welchem Typ eine motorische Einheit gehört, entscheidet sich um den Zeitpunkt der Geburt. Slow-twitch Muskelfasern, die langsamer ermüdbar aber auch empfindlicher für Sauerstoffmangel sind, überwiegen in sog. „roten“ Muskeln wie dem M. soleus. In den „weißen“ Muskeln wie im M. gastrocnemius überwiegen fast-twitch Muskelfasern, die raschen Bewegungen dienen. Es gibt beim Menschen aber auch eine Zwischenform (127).

Neben der quergestreiften Skelettmuskulatur lassen sich beim Menschen zwei weitere Muskelgewebe unterscheiden: die quergestreifte Herzmuskulatur und die glatte Muskulatur.

Die Herzmuskulatur besteht aus quergestreiften, parallel verlaufenden und verzweigten Einzelzellen, deren Kontraktion unwillkürlich und rhythmisch verläuft. Das Prinzip dieser Kontraktion entspricht dem der quergestreiften Skelettmuskulatur, findet jedoch langsamer statt. Der Wirkort der Calciumionen am TnC ist identisch mit dem Skelettmuskel, aufgrund der geringeren Speichermöglichkeit ist lediglich ein zusätzlicher transmembranöser Ca^{2+} -Einstrom für den Kontraktionsablauf unabdingbar (**43, 124**).

Die glatte Muskulatur besteht dagegen aus nicht quergestreiften, spindelförmigen Zellen. Die Kontraktionsfähigkeit ist auch hier an Aktin- und Myosinfilamente gebunden, die im Gegensatz zur Herz- und Skelettmuskulatur jedoch gitterähnlich verlaufen. Dem glatten Muskel fehlt Troponin, die Calciumionen wirken direkt über eine Proteinkinase am Myosinkopf (**43, 124**).

2.2 Molekulargenetische Grundlagen der Troponinexpression und Sequenzen

Bei Troponin T und I können drei Isoformen unterschieden werden: die kardiale, die fast-twitch und die slow-twitch Isoform (**139**). In Untersuchungen zur Aminosäuresequenz der Troponine T und I bei Ochse, Ratte und Huhn konnte gezeigt werden, dass diese drei Isoformen von verschiedenen Genen codiert werden (**139**). Dabei kann jede dieser drei Isoformen in verschiedenen Subformen auftreten, d.h. durch alternatives Splicen können aus einem einzigen Gen verschiedene Varianten entstehen (siehe **Abbildung 3**). Dies ist bei mehreren Tierspezies der Fall. Interessanterweise gibt es für jede Isoform ein einzigartiges splicing-Muster, was bei keiner anderen Multigen-Familie bekannt ist und somit als Besonderheit der Troponin-Familie anzusehen ist (**49**).

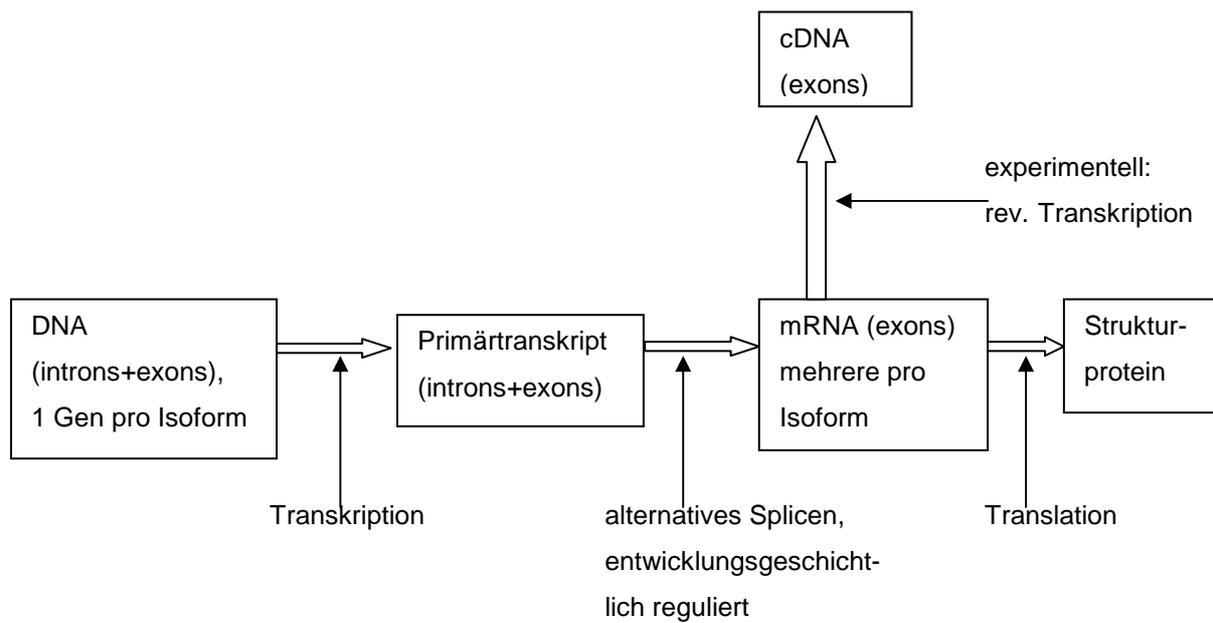


Abbildung 3: Genexpression

Zwischen den zwei verschiedenen Troponinuntereinheiten T und I gibt es trotz ihrer gemeinsamen Zugehörigkeit zu einer Multigenfamilie einige deutliche Unterschiede:

- Es existieren von allen drei Troponin T-Isoformen mehr durch alternatives Splicing zustandegekommene Isoformen als von Troponin I.
- Troponin T weist größere Homologien zwischen seinen Isoformen auf als Troponin I.
- Troponin I ist interspeziesspezifisch stärker konserviert.
- Die kardiale Isoform von Troponin T wird im embryonalen fast-twitch Skelettmuskel exprimiert (**109**).

Das Troponin C unterscheidet sich deutlich von den beiden anderen Troponinuntereinheiten:

- Es existieren nur zwei Isoformen: die fast-twitch Isoform und die slow-twitch Isoform, die mit der kardialen Isoform identisch ist. Diese kardiale bzw. slow-twitch Isoform wird, wie das kardiale Troponin T, auch im embryonalen fast-twitch Skelettmuskel exprimiert (**109**). Auch konnte beim erwachsenen Kaninchen gezeigt werden, dass nach chronischer elektrischer Stimulation cTnC im fast-twitch Skelettmuskel reexprimiert wird. Somit wäre eine Reexpression der kardialen Isoform im myopathischen Skelettmuskel möglich.

- Es ist nicht muskelspezifisch, sondern die Isoform SMTnCs kann auch in Nichtmuskelzellen wie Fibroblasten nachgewiesen werden (50).

Wegen seiner mangelnden Herzspezifität findet das Troponin C keine Verwendung als kardialer Marker und hat somit keine klinische Relevanz.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen (139, 5, 141, 49, 146, 145) konnte auf Proteinebene die Sequenz der humanen Troponine durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen der Troponinisoformen untereinander und mit denen anderer Spezies identifiziert werden. Somit war es möglich, spezifische Primer zur Amplifizierung der mRNA zu identifizieren. Im folgenden werden die cDNA-Sequenzen der einzelnen nachgewiesenen Troponin T- und I-Isoformen kurz vorgestellt.

2.2.1 Sequenz der cDNA der kardialen Isoform von Troponin I (cTnI)

Die bei Vallins (139) beschriebene Gensequenz der cDNA der kardialen Isoform des Troponin I diente als Grundlage für die Auswahl der Primer. Seine Bezeichnung lautet HSTROPIA (706 bp, 176 A, 190 C, 232 G, 108 T). Der Genlocus wird als TNNI3 bezeichnet. Das Protein hat eine Länge von 209 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 23876 Da.

Sequenz 1: cTnI

GTCTCAGCATGGCGGATGGGAGCAGCGATGCGGGCTAGGGAACTCGCCCTGCACCAGCCCCAATCAGACGCCG
 CTCCTCCAACTACCGCGCTTA TGCCACGGAGCCGCACGCCAAGAAAAATCTAAGATCTCCGCCTCGAGAAAA
 TTGCAGCTGAAG | ACTCTGCTGCTGCAGATTGCAAAGCAAGAGCTGGAGCGAGAGGCGGAGGAGCGGCGCGGA
 GAGAAGGGGCGCGCTCTGAGCACCCGCTGCCAGCCGCTGGAGTTGGC || CGGGCTGGGCTTCGCGGAGCTGCAG
 GACTTGTGCCGACAGCTCCACGCCCGTGTGGACAAGGTGGATGAAGAGAGATACGACATAGAGGCAAAAGTCA
 CCAAGAACATCACGGAGATTGCAGATCTG | ACTCAGAAGATCTTTGACCTTCGAGGCAAGTTTAAGCGGCCCA
 CCCTGCGGAGAGTGAGGATCTCTGCAGATGCCATGATGCAGGCGCTGCTGGGGGCC || CGGGCTAAGG | AGTCC
 CTGGACCTGCGGGCCCACCTCAAGCAGGTGAAGAAGGAGGACACCGAGAAGGAAAAC || CGGGAGGTGGGAGAC
 TGGCGCAAGAACATCGATGCACTGAGTGAATGGAGGGCCGCAAGAAAAAGTTTGAGAGCTGAGCCTTCCTGC
CTACTGCCCCTGCCCTGAGGAGGGCCCTGAGGAATAAAGCTTCTCTCTGAGCTGA

<u>Primer 1s: 40 – 57</u>	<u>Primer 1as: 691 – 673</u>	Hinf I	
<u>Primer 2s: 76 – 94</u>	<u>Primer 2as: 656 – 638</u>	Msp I	

Während der Embryonalentwicklung exprimiert der Herzmuskel des Hühnchens eine spezifische embryonale Form des cTnI und zusätzlich die langsame Skelettmuskelisoform (**136**). Dabei ist diese slow-twitch Isoform die prädominante Form des Troponin I im Herzen zu dieser Zeit. Auch im fetalen menschlichen Herzen entspricht die kardiale Isoform der ontogenetisch älteren slow-twitch Skelettmuskelisoform des Troponin I (**60, 72**). Antikörperstudien bei Ratte, Huhn und Rind ergaben, dass sich in diesen Spezies während der Herzentwicklung um die Geburt bis zum ersten postnatalen Monat ein Switch in der Isoform-Expression von slow-twitch TnI zu kardialem TnI abspielt (ähnliches gilt auch für die Myosin-Schwerkette) (**121**). Beim Menschen existiert das cTnI neben SMTnIs bereits bei 20 Wochen Gestationsalter im fetalen Herzen. Ein Switch zur alleinigen Expression des adulten cTnI findet mit stetigen Konzentrationsänderungen zwischen der zwanzigsten fetalen Woche und dem neunten postnatalen Monat statt (**21**). Dadurch erhöht sich die Reaktionsfähigkeit des Myokards auf adrenerge Stimulation mit erhöhter Relaxationsfähigkeit.

cTnI ist dabei sehr spezifisch für das Myokard. Während der Entwicklung wird es nur im Myokard produziert. Diese Spezifität beruht vor allem auf den großen Unterschieden im N-terminalen Ende, welches im Vergleich zur Skelettmuskelform verlängert ist. In der restlichen Sequenz besteht große Ähnlichkeit zu anderen Spezies und zu den anderen Isoformen (**139**).

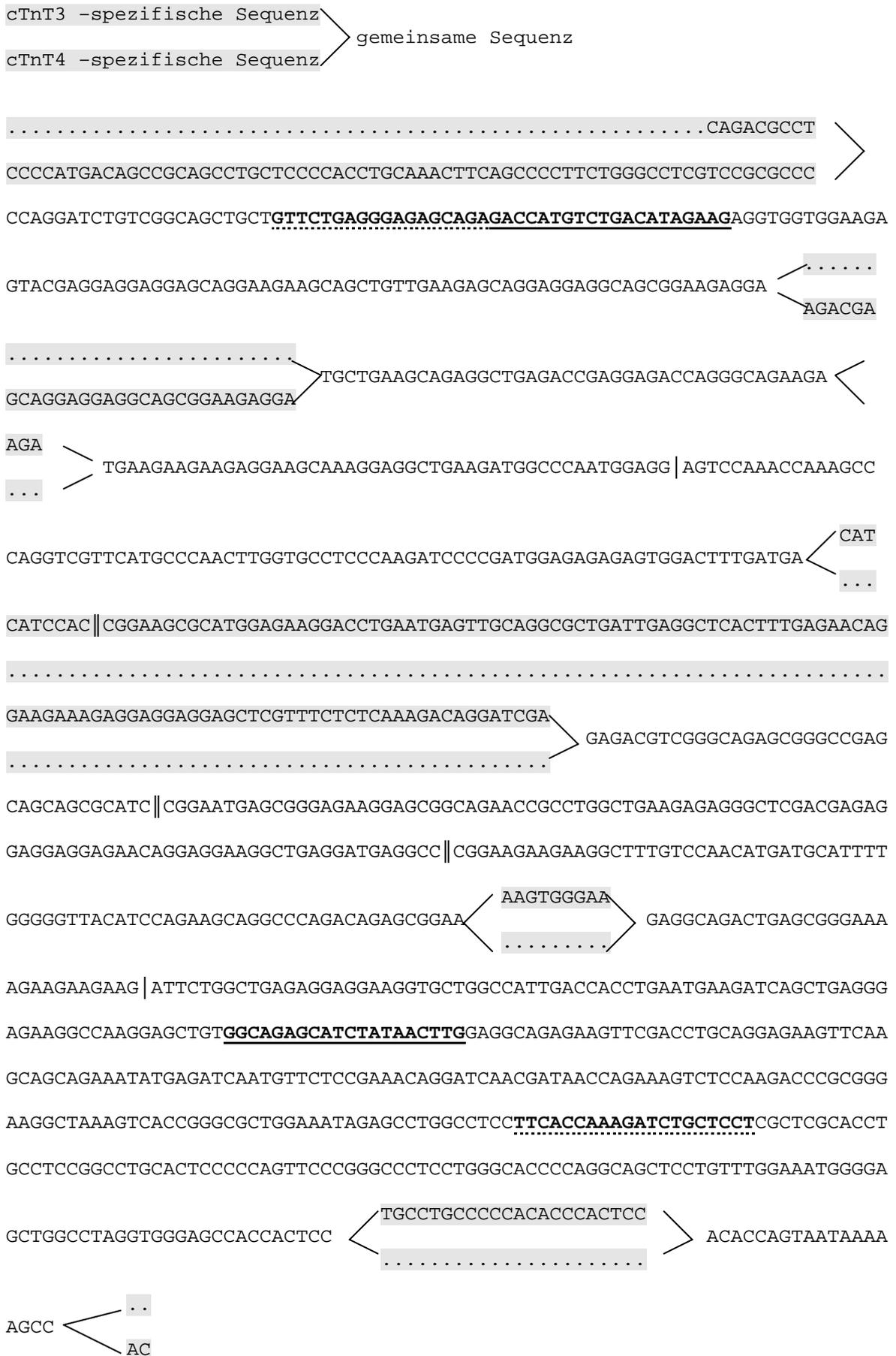
2.2.2 Sequenz der cDNA der kardialen Isoform von Troponin T (cTnT)

Von Troponin T entstehen aufgrund des Mechanismus des kombinatorischen alternativen Splicens aus einem Gen vier verschiedene Isoformen (**6, 7**). Im fetalen Herzen kommen alle diese vier Isoformen von Troponin T vor, während im erwachsenen Herzen nur zwei Isoformen exprimiert werden. In der Literatur werden diese Isoformen unterschiedlich benannt. Hier wurde die Bezeichnung von Anderson übernommen (**5**). Anderson gliedert die vier Isoformen in absteigender Molekülgröße und benennt sie cTnT1 bis 4. cTnT2 hat 15bp, cTnT3 hat 30bp und cTnT4 hat 45bp weniger als cTnT1. cTnT1 und 2 werden im fetalen Herzen exprimiert, wobei cTnT2 nur in sehr geringer Konzentration vorkommt. Im adulten

Herzen sind beide Isoformen nicht nachweisbar. Beim Switch der fetalen Isoformen in die erwachsenen Isoformen wird die Expression von cTnT1 herunterreguliert und gleichzeitig die Expression von cTnT3 hochreguliert. cTnT3 ist im erwachsenen Herzen die dominante Isoform. Die Isoform cTnT4, die zu einer erhöhten Calciumsensitivität der ATPase-Aktivität führt, kann sowohl im fetalen als auch im geschädigten erwachsenen Herzen im Sinne einer Anpassungsreaktion gefunden werden.

Die Sequenzen stammen von Anderson (5). Das Gen für cTnT3 wird als HSTROP bezeichnet (1104 bp, 324 A; 254 C; 370 G, 156 T), das Gen für cTnT4 als HSTNT4 (1043bp, 301 A; 247 C; 351 G, 144 T). Das Gen der adulten und der fetalen Isoformen liegt auf Chromosom 1q32 (98), der Genlocus hat den Namen TNNT2. Das Molekulargewicht des Proteins liegt bei 34459 Da.

Sequenz 2: cTnT



cTnT3:

<u>Primer 1s: 32 – 49</u>	<u>Primer 1as: 952 – 933</u>	Hinf I	
<u>Primer 2s: 50 – 69</u>	<u>Primer 2as: 782 – 763</u>	Msp I	

cTnT4:

<u>Primer 1s: 89 – 107</u>	<u>Primer 1as: 911 - 892</u>	Hinf I	
<u>Primer 2s: 108 – 127</u>	<u>Primer 2as: 741 – 722</u>	Msp I	

Zwischen den zwei hier interessierenden Isoformen cTnT3 und cTnT4 besteht ein Längenunterschied von 99 bp, der mit einem Verlust einer MspI Schnittstelle einhergeht. Dies kommt durch kombiniertes Splicen am 5'-Ende zustande, wobei zwei Exons (15nt und 30nt) (bzw. drei Exons mit 15nt, 3nt und 27nt (**135**)) unterschiedlich gesplitt werden (**5**).

2.2.3 Sequenz der cDNA der slow-twitch Skelettmuskelisoform von Troponin I (SMTnIs)

Die Sequenz dieser Isoform (21561 Da) wurde von Wade entnommen (141). Sie hat den Namen HSTROPI (816 bp, 180 A; 247 C; 244 G, 145 T) und liegt auf dem Genlocus TNNI1. Dieses Gen ist auf Chromosom 1, q12 lokalisiert (141).

Sequenz 3: SMTnIs

TAGTCTGCAGTCTACGGCGAGGCACAGGCCAGCCCAGCTCCACGAGGACTGAACAAGGTGCTGTCTCACTGCC
 ACCCATGCCGGAAGTCGAGAGAAAAACCCAAGATCACTGCCTCCCGCAAACCTCTTGCTGAAGAGCCTGATGCTGG
 CCAAGGCCAAGGAATGCTGGGAGCAGGAGCACGAGGAGCGCGAGGCTGAGAAGGTGCGCTACCTGGCAGAGCG
 CATCCCCACGCTGCAGACCCGTGGCCTGTCCCTCAGTGCCCTGCAGGACCTGTGCCGGGAGCTGCACGCCAAG
 GTGGAGGTGGTGATGAGGAGCGATACGACATTGAGGCCAAATGCCCTCCACAACACCAGGGAGATTAAGGACC
 TGAAGCTGAAGGTGATGGACCTCCGTGGGAAGTTCAAGCGCCCCGCCCTGCGTCGAGTCCGTGTCTCGGCTGA
 CGCCATGCTCCGGGCCCTGCTGGGCTCCAAGCACAAGGTGTCCATGGATCTGCGGGCCAACCTCAAGTCTGTG
 AAGAAGGAAGACACAGAGAAGGAGCGGCCTGTGGAGGTGGGTGACTGGA|GGAAGAACGTGGAGGCCATGTCT
 GGCATGGAAGGCCGGAAGAAGATGTTTGATGCCCAATGCTCCGACCTCACAATAGAGGCCAGCTTGCTGTG
 CTGCGCTCTGAGCTCCTGCTTCATGCTTCTTCTCCAACCC||AGCTCACTCACCTCTCTGCCTGTGTCTGGAGC
ATCCCTTCCCACCTCTCCCCCACTTCTTCCCTCCAGCCTGCAATGCCCCTCCTCTGGAAC TGGGATTAAACAGA
 TACCCAAGAGGCAGG

<u>Primer 1s: 35 – 52</u>	<u>Primer 1as: 792 – 775</u>	Bsr I	
<u>Primer 2s: 76 – 93</u>	<u>Primer 2as: 745 – 728</u>	Hph I	

Das SMTnIs besteht aus 9 Exons und einem skelettmuskelspezifischen upstream enhancer (39). Zwischen den SMTnIs Isoformen unterschiedlicher Spezies besteht eine sehr große Ähnlichkeit, z.B. 89% Identität zwischen Mensch und Kaninchen (141).

Während der Entwicklung wird diese Isoform im Skelettmuskel und im Herzen exprimiert, bei Erwachsenen allerdings nur noch muskelfasertypenspezifisch in der langsamen Skelettmuskulatur (121). Diese Änderung in der Expression erfolgt durch eine mit Hilfe der Muskelinnervation regulierten Entwicklung (141). Während der Skelettmuskelentwicklung entziehen sich einige Myoblasten dem Zellzyklus, fusionieren zu multinukleären Myotubes und produzieren muskelspezifische kontraktile Proteine. Die Myofibrillen spezialisieren sich zusammen mit muskelfasertypenspezifischen kontraktile Proteinen weiter (39).

2.2.4 Sequenz der cDNA der slow-twitch Skelettmuskelisoform von Troponin T (SMTnTs)

Die Sequenz für die slow-twitch Isoform des Troponin T beruht auf der Angabe von Gahlmann (49). Sie wird als HSTNTS bezeichnet (980 bp, 261 A; 253 C; 335 G, 131 T). Das Gen liegt auf Chromosom 19q13.4, auf dem Genlocus TNNT1. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 32817 Da.

Sequenz 4: SMTnTs

```

AGCAAGGCTCAGCCTCAAGATTCACAGCATCTCAGACGCAGCCTAGGCCGCACCAGGATGTCGGACAACCGAGG
AGCAGGAATATGAGGAGGAGCAGCCGGAAGAGGAGGCTGCGGACGAGGAGGAGGAAGCCCCGAAGAGCCGGA
GCCGGTGGCAGAGCCAGAAGAGGAACGCCCAAACCAAGCCGCCCGTGGTGCCTCCTTTGATCCCGCAAAG
ATCCCAGAAGGGGAGCGCGTTGACTTCGATGACATCCACCGCAAGCGCATGGAGAAAGACCTGCTGGAGCTGC
AGACACTCATCGATGTACATTTTCGAGCAGCGGAAGAAGGAGGAAGAGGAGCTGGTTGCCTTGAAGGAGCGCAT
TGAGCGGCGCCGGTCAGAGAGAGCCGAGCAACAGCGCTTCAGAACTGAGAAGGAACCGGAACGTCAGGCTAAG
CTGGCGGAGGAGAAGATGAGGAAGGAAGAGGAAGAGGCCAAGAAGCGGGCAGAGGATGATGCCAAGAAAAAGA
AGGTGCTGTCCAACATGGGGGCCATTTTGGCGGCTACCTGGTCAAGGCAGAACAGAAGCGTGGTAAGCGGCA
GACGGGGCGGGAGATGAAGGTGCGCATCCTCTCCGAGCGTAAGAAGCCTCTGGACATTGACTACATGGGGGAG
GAACAGCTCCGGGCCCGGTCTGCCTGGCTGCCTCCATCACAGCCCTCCTGCCCTGCCAGGGAGAAAGCCCAGG
AGCTGTGCGACTGGA|TCCACCAGCTGG|AGTCTGAGAAGTTCGACCTGATGGCGAAGCTGAAACAGCAGAAA
TATGAGATCAACGTGCTGTACAACCGCATCAGCCACGCCAGAAGTTCGGGAAGGGGGCAGGGAAGGGCCGCG
TTGGAGGCCGCTGGAAGTGAGGATGCCGCCCGGACAGTGGCACCTGGGAAGCCTGGGAGTGTTTGTCCATC
GGTAGCTTTGAAATAAACGCTCCCCCTCAGACACC
  
```

Primer 1s: 16 – 35	Primer 1as: 962 – 943	Hinf I	
Primer 2s: 50 – 67	Primer 2as: 855 – 837	Bsr I	█

Durch alternatives Splicen können insgesamt vier Isoformen gebildet werden (122). Zwischen der fast-twitch und der kardialen Isoform von Troponin T besteht 65% Übereinstimmung der Aminosäuren, vor allem am carboxyl-terminalen Ende. In der hypervariablen aminoterminalen Region bestehen dagegen große Unterschiede, sowohl zwischen den Isoformen als auch zu SMTnTs anderer Spezies.

2.2.5 Sequenz der cDNA der fast-twitch Skelettmuskelisoform von Troponin I (SMTnlf)

Die Sequenz für das smTnlf-Gen wurde von Zhu (146) übernommen. In der Genbank wird die cDNA-Sequenz unter dem Namen HSTROPNIN geführt. Es besteht aus 701 bp (179 A, 186 C, 242 G, 94 T). Der Genlocus ist TNNI2, das Molekulargewicht des Proteins 21207 Da.

Sequenz 5: SMTnlf

CTAGGCTCCAAGCTCAGGACCTCAGGATGGGAGATGAGGAGAAGCGGAACAGGGCCATCACGGCCCGCAGGCA
 GCACCTGAAGAGCGTGATGCTGCAGATAGCGGCCACGGAGCTGGAGAAGGAGGAGAGCCGCCGTGAGGCAGAG
 AAGCAGAACTACCTGGCGGAGCACTGCCCGCCGCTGCATATCCCGGGCTCCATGTCTGAAGTGCAGGAGCTCT
 GCAAAACAGCTGCACGCCAAGATCGATGCGGCTGAAGAGGAGAAGTACGACATGGAGGTGAGGGTGCAGAAGAC
 CAGCAAGGAGCTGGAGGACATGAACCAGAAGCTATTTGATCTGCGGGCAAGTTCAAGCGGCCCCACTGCGG
 AGGGTGCGCATGTGCGCCGATGCCATGCTCAAGGCCCTGCTGGGCTCGAAGCACAAGGTGTGCATGGACCTGA
 GGGCCAACCTGAAGCAGGTCAAGAAGGAGGACACAGAGAAGGAGCGGGACCCTGCGAGACGTGGGTGACTGGAG
 GAAGAACATCGAGGAGAAGTCTGGCATGGAGGGCCGGAAGAAGATGTTTG | AGTCCG | AGTCCTAGGCCACTC
 GCTGCCCTACGCTGCCCGGTGCCCGGCTCCAGCAGAACATACTAGGGAGATGCACCCAGAGCCTGCCAG
 GGAGGGCTGGCCTCACCACCACCGTCAAATAAAGGATTTGAATCCCC

Primer 1s: 12 - 29	Primer 1as: 683 - 666	Hinf I	
Primer 2s: 28 - 46	Primer 2as: 645 - 627		

Besonders auffällig ist hier eine sehr hohe Sequenzkonservierung zwischen verschiedenen Spezies, so besteht z.B. 97% Ähnlichkeit zwischen Mensch und Maus bzw. 82% zwischen Mensch und Vogel (146). Im Gegensatz hierzu gibt es große Unterschiede zu den anderen beiden Isoformen beim Menschen. Die Homologie zwischen Tnlf und Tnls bzw. cTnI besteht nur zu 59 bzw. 57%. Die Unterschiede liegen hierbei vor allem im aminoterminalen Ende, also dem Bereich, der mit TnT und TnC interagiert.

2.2.6 Sequenz der cDNA der fast-twitch Skelettmuskelisoform von Troponin T (SMTnTf)

Diese Sequenz entnehmen wir bei Wu (145). Das Gen heißt TNNT3. In der Genbank ist die Sequenz unter dem Namen HSTRT gespeichert. Die Isoform besteht aus 1000 bp (295 A, 260 C, 323 G, 122 T). Das Molekulargewicht des entsprechenden Proteins ist 30465 Da.

Sequenz 6: SMTnTf

CCCACCTTCACCATGTCTGACGAGGAAGTTGAACAGGTGGAGGAGCAGTACGAAGAAGAAGAGGAAGCCCAGG
 AGGAAGAGGAAGTTCAAGAAGACACCGCAGAGGAGGACGCGGAAGAGGAGAAACCGAGACCCAAACTCACTGC
 TCCTAAGATCCAGAAAGGGGAGAAAGTGGACTTCGATGACATCCAGAAGAAGCGTCAGAACAAAGACCTAATG
 GAGCTCCAGGCCCTCATCGACAGCCACTTTGAAGCC||CGGAAGAAGGAGGAGGAGCTGGTCGCTCTCAA
 AGAGAG|AATCGAGAAGCGCCGTGCAGAGAGAGCGGAGCAGCAGAG|GATTCGTGCAGAGAAGGAGAGGGAGC
 GCCAGAACAGACTGGC|GGAGGAAAAGGCCAGAAGGGAGGAGGATGCCAAGAGGAGGGCAGAGGACGACC
 TGAAGAAGAAGAAAGCGCTGTCTCCATGGGCGCAACTACAGCAGCTACC+TGGCCAAGGCTGACCAGAAGA
 GAGGCAAGAAGCAGACAGCCGAGAGATGAAGAAGAAG|ATTCTGGCTGAGAGACGCAAGCCGCTCAACATCG
 ATCACCTTGGTGAAGACAAAAGTGAAGGACAAGGCCAAGGAGCTCTGGGAGACCTGCACCAGCTGGAGATTGA
 CAAGTTCGAGTTTGGGGAGAAGCTGAAACGCCAGAAATATGACATCACCACGCTCAGGAGCCGCATTGACCAG
 GCCAGAAGCACAGCAAGAAGGCTGGGACCCAGCCAAGGGCAAAGTCGGCGGGCGCTGGAAGTAGAGAGGCC
 AGAAAGGCCCTCGAGGCAGAGACCCTCCGCCCTCTTGACACACCAGGGCCGCTCGTGGGACTCCACATCCTCCA
 GCCCCACAATCCTGTGAGGGTCTCCCTGACGTCTGGGGTGGAGAGGCCATCCCGGGGCGTCCCCCGCGT
 CTGTGTCTTGTGCTGCCTTCATCCCCTGGGGCCTGTGAATAAAGCTGCAGAACCCCTT

Primer 1s: 26 – 44	Primer 1as: 703 – 684	Hinf I	
Primer 2s: 138 – 156	Primer 2as: 660 – 641	Msp I	
		BstNI	+
		Bsr I	█

Das menschliche TnTf ist im fetalen und erwachsenen schnellen Skelettmuskel gewebespezifisch.

Es existieren durch alternatives Splicen eines einzigen Gens 40 bis 64 verschiedene Varianten, aber 90% entsprechen den 3 Hauptformen TnT1f, TnT3f und TnT3f* (145). Diese Varianten führen zu einer unterschiedlichen Ca²⁺-Sensitivität der dünnen Filamente (31). Es stehen mehr Exons für das alternative Splicen zur Verfügung als bei der slow-twitch und der kardialen Isoform, mit

zusätzlicher unterschiedlicher Kombination der Exons (145). Die zwei Exons des 3'-Endes werden alpha und beta-mRNA genannt, wobei die beta-mRNA in der Embryonalentwicklung und die alpha-mRNA beim Erwachsenen vorkommt (145). Die fünf Exons im N-terminalen Ende entsprechen einer hypervariablen Region des Moleküls (31). Hier existiert im menschlichen Gen im fetalen, aber nicht im erwachsenen Muskel ein Exon, das sogenannte fetal exon. Es entspricht aziden Bestandteilen, die wegen der reduzierten Ca^{2+} -Sensitivität im fetalen Muskel eingefügt sind. Es bildet die fetalen Isoformen TnT1 und TnT3 (31).

Im Gegensatz zu den variablen Regionen an beiden Enden ist zentral ein Segment sowohl inter- als auch intraspeziesspezifisch konserviert. Sein Proteinprodukt bindet mit Tropomyosin und mit Troponin I.

Insgesamt existiert etwa 57-60% Übereinstimmung in der codierenden Region mit TnTs und cTnT. Die Ähnlichkeit zu SMTnTf anderer Wirbeltiere dagegen ist größer, wie z.B. mit 73% zum Huhn, 86% zur Ratte und sogar 93% zu der beta-Form, d.h. embryonalen Form der Ratte. Auch die Struktur ist speziesspezifisch übergreifend gleich, nämlich hydrophil und alpha-helikal.

2.3 Skelettmuskelerkrankungen

2.3.1 Einteilung

Den Myopathie-Syndromen liegen systematische, primär die Muskulatur betreffende Störungen mit fortschreitendem Faseruntergang zugrunde. Es sind rein motorische Syndrome, deren Leitsymptom die Muskelschwäche ist. Nach Bodechtel (23) lassen sich die Muskelerkrankungen – ohne neurogen bedingte Störungen – folgendermaßen einteilen (siehe **Tabelle 2**):

Primäre (hereditäre) Myopathien:

- 1) Progressive Muskeldystrophien
- 2) Kongenitale Myopathien mit strukturellen Besonderheiten
- 3) Kongenitale Stoffwechselmyopathien
- 4) Dystrophia myotonica
- 5) Periodische Lähmungen
- 6) Sonderformen

Sekundäre (erworbene) Myopathien:

- 1. Polymyositis – Dermatomyositis
- 2. Herdmyositis bei anderen Kollagenosen
- 3. Erregerbedingte Myositis
- 4. Endokrine Myopathien
- 5. Nutritive Myopathien
- 6. Medikamentös-toxische Myopathien
- 7. Vaskuläre Myopathien
- 8. Muskelaaffektionen bei sonstigen internen Erkrankungen
- 9. Traumen – Tumoren

Myotone Syndrome

Störungen der neuromuskulären Übertragung

Tabelle 2: Einteilung Myopathien

A. X-chromosomale Muskeldystrophien

- 1. infantiler maligner Beckengürteltyp: Duchenne*
- 2. juveniler benigner Beckengürteltyp: Becker-Kiener
- 3. skapulo-humero-distaler Typ

B. rezessiv autosomale Muskeldystrophien

- 1. Gliedergürtel-Muskeldystrophien (limb girdle): Leyden-Möbius
 - a) früher Beckengürteltyp
 - b) später Beckengürteltyp
 - c) Schultergürteltyp
 - d) Sarkoglykanopathien
- 2. kongenitale Muskeldystrophien
 - a) maligner Typ: de Lange
 - b) benigner Typ: Batten-Turner

C. dominant autosomale Muskeldystrophien

- 1. fazio-skapulo-humerale Muskeldystrophie: Erb-Landouzy-Dejerine
- 2. distale Muskeldystrophien: Welander
- 3. okuläre Muskeldystrophien: Kiloh-Nevin; chronische progressive Ophthalmoplegie

*bösartigste und häufigste Form, nach G.-B.-A. Duchenne benannt

Tabelle 3: Einteilung Muskeldystrophien

Die wichtigste Untergruppe dieser Muskelerkrankungen sind die genetisch bedingten progressiven Muskeldystrophien, auch Dystrophia musculorum progressiva genannt, die einen Großteil der hier untersuchten Skelettmuskel-erkrankungen umfassen.

Muskeldystrophische Prozesse sind durch eine primäre Degeneration der Muskelfasern gekennzeichnet (**123**). Sie lassen sich nach unterschiedlichem Verteilungsmuster der Muskelschwächen, ihrer Kombination mit anderen Symptomen, dem Manifestationsalter, der voneinander abweichenden Progre-dienz und dem spezifischen Erbgang, also nach klinischen und genetischen Gesichtspunkten in eine Reihe von selbständigen Muskeldystrophien unterteilen (siehe **Tabelle 3**).

2.3.2 Pathogenese

In der formalen Pathogenese existieren drei Theorien: die vaskuläre, die neurogene und die Membran-Theorie (**123**).

In der vaskulären Theorie wird das Auftreten kleiner Gruppen nekrotischer Muskelfasern auf Mikroinfarkte zurückgeführt, was sich bisher allerdings von Tierversuchen nicht auf den Menschen übertragen ließ.

Die neurogene Theorie unterstellt eine Funktionsstörung der Motoneurone, was wiederum bisher nicht gänzlich bestätigt werden konnte.

Die Membrantheorie stützt die seit langem bekannte Aktivitätssteigerung vieler löslicher Muskelenzyme im Serum der Dystrophiekranken auf einen Membrandefekt. Vor allem die exzessive Vermehrung der Creatinkinase (CK) ließ die Frage aufkommen, ob bei der Pathogenese Anomalien in der biochemischen Struktur der Muskelproteine und der Enzyme oder Veränderungen an den Membranen der Muskelzellen eine Rolle spielen.

Während die Aktivitäten der CK, der Aldolasen, der LDH und der Transaminasen (GOT stärker als GPT) im Serum erhöht sind, ist die Aktivität der CK im Muskel vermindert. Dabei ist die CK der empfindlichste Indikator für eine Läsion der Skelettmuskulatur, wobei der Serumspiegel dem Schweregrad des Gewebsunterganges entspricht (**23**). Bei Verminderung der Muskelmasse resultieren eine Kreatinurie sowie eine Verminderung des Serumkreatinins. Der Muskel erscheint makroskopisch blassgelb (**87**).

2.3.3 Histologisches Bild der Myopathien

Das histologische Bild wird durch Kalibervariationen der oft abgerundeten Muskelfasern bestimmt. Es entsteht ein buntes Bild aus durcheinanderliegenden hypertrophierten und atrophierten Fasern. Kompensatorisch hypertrophierte Fasern bei myogenen Erkrankungen gehören meist dem Typ 2 an. Atrophische, also abgerundete und degenerativ veränderte Fasern betreffen alle drei Fasertypen.

Weiterhin bieten zahlreiche Muskelfasern als typisches Bild bei Myopathien degenerative Veränderungen bis hin zur vollständigen Nekrose mit konsekutiver Parenchymrarefizierung. Es entwickeln sich sekundäre entzündliche Veränderungen mit lymphohistiozytären Abräumreaktionen. Beispielsweise ist für Dystrophien die Vermehrung des endomysialen und des perimysialen Bindegewebes typisch. Besonders bei der Duchenne'schen Form zeigt sich eine ausgeprägte endomysiale Fibrose. Auch existiert eine tropfenförmige Fetteinlagerung. Bei der myotonen Dystrophie und der Gliedergürteldystrophie gehören vermehrt binnenständig gelegene Muskelzellkerne zum typischen Befund.

2.3.4 Merkmale einzelner Skelettmuskelerkrankungen

Im folgenden werden die den in dieser Untersuchung analysierten Biopsien zu Grunde liegenden Skelettmuskelerkrankungen dargestellt. Dabei wird in der Reihenfolge Erbgang, betroffenes Geschlecht, Erkrankungsalter, evtl. Todesfolge, Klinik, Histologie und Laborbefunde näher auf die jeweilige Erkrankung eingegangen (**23, 87, 123**).

2.3.4.1 X-chromosomale Muskeldystrophien

2.3.4.1.1 Infantiler maligner Beckengürteltyp: Duchenne

Auf diese höchst maligne Form, die erstmals im Jahre 1868 beschrieben wurde, entfallen zwei Drittel aller Muskeldystrophien. Da die Vererbung X-chromosomal erfolgt (Defekt auf Chromosom Xp21 (**71**)), manifestiert sich die Krankheit beim männlichen Geschlecht. Das Leiden beginnt im frühen Kleinkindesalter (im Durchschnitt 4. Lebensjahr) und schreitet schnell bis zum Tod zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr fort, der meist durch eine Kardiomyopathie oder eine Lungenfunktionsstörung verursacht wird. Diese Dystrophie beginnt mit einer Schwäche der Beckengürtelmuskeln. Die Muskelschwäche ist bereits in Ruhe dauerhaft ausgeprägt. An den Extremitäten schreiten dann die Paresen von proximal nach distal fort bis zur Gehunfähigkeit. Kennzeichnend ist eine Pseudohypertrophie insbesondere der Wadenmuskulatur. In 84% weisen EKG-Veränderungen auf eine spezifische Form der Kardiomyopathie hin. In der sehr ausgeprägten Histologie sieht man einen massiven Zerfall der Fasern, wobei Typ-2B-Fasern zuerst abgebaut werden, und eine exzessive Vermehrung des Bindegewebes. Intrazellulär kommt es zu einem Proteinverlust und zu einer Zunahme der Lipide und des Calciums. Alle Veränderungen zusammen führen zu Ähnlichkeiten mit fetaler Muskulatur (**71**). Entsprechend der pathogenetischen Membrantheorie ist das Sarkolemm der Muskelfasern unterbrochen und die

Adenylatzyklase weist ein abnormes biochemisches Verhalten auf. Im Immunoblot ist die Detektion von Dystrophin negativ. Dieses normalerweise im Dystrophinglykoproteinkomplex (DGK) vorhandene Dystrophin ist ein Strukturprotein, welches das Sarkolemm in seiner Struktur stabilisiert. Im Serum sind die Aktivitäten der Creatinkinase und anderer aus der Muskulatur stammender Enzyme wie der Transaminasen, der Laktatdehydrogenase und der Aldolase stark erhöht. Für die klinische Diagnostik sind vor allem die im Frühstadium stark erhöhten CK-Werte (50-faches der Norm) von Bedeutung, die im Laufe der Erkrankung durch den Ersatz der Muskulatur durch Fett- und Bindegewebe fast wieder Normalwerte erreichen. Außerdem sind die Isoenzymfraktionen der CK und der LDH zu Gunsten der phylogenetisch älteren Isoformen (CK-MB, HBDH) verschoben.

2.3.4.1.2 Juveniler benigner Beckengürteltyp: Becker-Kiener

Dieser gutartigen Form entsprechen 10% der X-chromosomalen Muskeldystrophien. Sie gleicht in Genetik, Verteilung der Muskelschwäche und Aktivitätssteigerung der CK im Serum der Duchenne'schen Dystrophie. Der Beginn ist jedoch später (10. Lebensjahr). Sie schreitet langsamer fort mit länger erhaltener Gehfähigkeit, endet jedoch ebenfalls tödlich (jenseits des 45. Lebensjahres).

2.3.4.2 Rezessiv autosomale Muskeldystrophien

2.3.4.2.1 Gliedergürtel-Muskeldystrophien: Leyden-Möbius (limb girdle dystrophy)

Durch den rezessiv autosomalen Erbgang sind beide Geschlechter gleich häufig betroffen. Diese Dystrophie ist vermutlich genetisch uneinheitlich, was sich in dem variablen Erkrankungsbeginn zwischen dem 2. und dem 40. Lebensjahr zeigt. Die Lebenserwartung ist eingeschränkt. Die Muskelschwächen treten meist

zuerst im Beckengürtel auf, seltener beginnen sie im Schultergürtel. Die CK ist leicht- bis mittelgradig erhöht, erreicht aber niemals so hohe Werte wie bei der Duchenne'schen Dystrophie.

2.3.4.2.2 Sarkoglykanopathien

Es werden die Sarkoglykanopathien LGMD 2C, 2D, 2E und 2F unterschieden, bei denen die Mutationen im Gen des γ -, α -, β - bzw. δ -Sarkoglykans lokalisiert sind (71). Die primären Sarkoglykanopathien sind durch einen primären Mangel des entsprechenden Sarkoglykans aufgrund unterschiedlicher Mutationen definiert. Im Immunoblot werden sie durch eine fehlende Detektion des Sarkoglykans oder des Adhalins diagnostiziert. Den Sarkoglykanopathien sind die Dystrophinopathien in Klinik und Pathogenese ähnlich: sie sind primär durch einen Mangel an Strukturproteinen im Dystrophinglykoproteinkomplex (DGK) bedingt. Dieser Komplex garantiert normalerweise die Strukturstabilität des Sarkolemmes, und wird von Dystrophin, Dystroglykanen, Sarkoglykanen und Syntrophinen gebildet. Das Dystrophin ist dabei mit der Aktinkomponente des Zytoskeletts verbunden. Die genetisch bedingte Schwäche des DGK führt sekundär zu einer Schädigung der äußeren Muskelfasermembran und zu Störungen der normalen Signalübertragung. Auch das Zellinnere wird beeinträchtigt: es kommt zu einer erhöhten Rate freier Radikale, zu mechanischen Strukturschäden und zum Verlust zellulärer Substanzen (71).

Die Manifestation der Sarkoglykanopathien liegt in der ersten Lebensdekade. Im Krankheitsverlauf ist sowohl eine langsame als auch eine schnelle Progression möglich. Bei langsamem Verlauf tritt eine Gehunfähigkeit ab dem 3. Lebensjahrzehnt und der Tod nach dem 40. Lebensjahr ein. Rasche Verläufe dagegen sind Duchenne-ähnlich. Sie weisen eine Gehunfähigkeit spätestens mit 16 Jahren auf und oftmals ein letales Ende vor dem 20. Lebensjahr.

Einen Phänotyp ähnlich der Duchenne-Form weist v.a. die γ -Sarkoglykanopathie auf. Sie wird als „Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy“ (=SCARMD) beschrieben. Hier kommt es auch häufig zu kardialen

Funktionsstörungen, die mit dem EKG nachweisbar sind. Die Muskelschwächen beginnen proximal. Die CK-Werte sind im Frühstadium 10-100 fach erhöht und fallen im Verlauf der Erkrankung ab.

2.3.4.3 Dominant autosomale Muskeldystrophien

2.3.4.3.1 Fazio-skapulo-humerale Muskeldystrophie: Erb-Landouzy-Dejerine

Diese dominant autosomale Dystrophie, die bei beiden Geschlechtern gleich häufig vorkommt, setzt meist zwischen dem 10. und dem 25. Lebensjahr ein. Die Lebenserwartung ist nicht oder nur geringgradig verkürzt. Die ersten Muskelschwächen zeigen sich im Bereich der Gesichtsmuskulatur oder des Schultergürtels und greifen erst im Spätstadium auf die untere Extremität über. Die Gehfähigkeit bleibt häufig erhalten. Im histologischen Bild lässt sich diese Form nicht von einer Gliedergürteldystrophie unterscheiden. Die Aktivität der CK ist nur leicht oder gar nicht erhöht.

2.3.4.3.2 Distale Muskeldystrophien: Welander

Dieses sehr seltene Leiden beginnt erst zwischen dem 40. und dem 60. Lebensjahr. Im allgemeinen werden die distalen Extensoren an Unterarm und Unterschenkel betroffen. Aufgrund dieser distalen Manifestation ist die Abgrenzung zu neurogenen Prozessen sehr schwierig zu treffen. Histologisch zeigt sich zusätzlich zu den myopathischen Veränderungen eine Typ-1-Faseratrophie.

Noch nicht zweifelsfrei lassen sich zwei weitere distal beginnende Krankheiten unter diesen Punkt einordnen: die Myopathia distalis juvenilis Biemond und die kongenitale dominant autosomal erbliche Myopathie (23).

2.3.4.4 Metabolische Myopathien – Glykogenosen

Genetisch verankerte Störungen im Abbau des Glykogens, der wichtigsten Energiequelle der Muskelfaser, können zu Myopathien führen, deren besonderes morphologisches Kennzeichen in einer Glykogenspeicherung besteht. Von den zehn bekannten Glykogenosen verursachen fünf muskuläre Symptome. Dabei handelt es sich um zweierlei klinische Syndrome, nämlich das Bild belastungsabhängiger schmerzhafter Muskelkontrakturen (bei Typ V, VII) bzw. das Bild einer Myopathie (bei Typ II, III, IV). In diesem Zusammenhang wird der jeweils häufigste Vertreter jeder Gruppe dargestellt.

2.3.4.4.1 McArdlesche Erkrankung (Glykogenose Typ V)

Dieses Leiden beruht auf einem Mangel an Muskelphosphorylase. Der Erbgang ist meist autosomal rezessiv, vereinzelt auch dominant. Männer sind dreimal häufiger betroffen als Frauen. Ab der frühen Kindheit wird eine rasche Ermüdbarkeit der beanspruchten Muskulatur bemerkt, später gefolgt von Schmerzen, Paresen und Kontrakturen. Nach körperlicher Anstrengung kommt es zu paroxysmaler Myoglobinurie und zu einem vorübergehenden Anstieg der CK- und LDH-Werte im Serum. Die CK ist im beschwerdefreien Intervall normal. Sichere Hinweise auf eine Beteiligung der glatten Muskulatur und des Herzmuskels haben sich bisher nicht ermitteln lassen, obwohl wenigstens eine geringe Mitbeteiligung des Herzmuskels vermutet wird.

2.3.4.4.2 Pompesche Erkrankung (Glykogenose Typ II)

Auch „Cardiomegalia glycogenica“ genannt, was zeigt, dass bei dieser Erkrankung die Myopathie nur selten im Vordergrund steht. Sie beruht auf einem Mangel an Alpha-1,4-Glukosidase, der sauren Maltase. In schweren Fällen setzt die Symptomatik bald nach der Geburt ein und führt noch im ersten Lebensjahr zum Tod. Milder verlaufende Formen zeigen Überlebenszeiten bis in die zweite

Lebensdekade. Die Spätformen entwickeln sich als isolierte Muskelglykogenosen schleichend zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr. Die Symptomatik besteht in einer massiven Glykogenablagerung im Herzmuskel, dem ZNS, in Leber, Zungen- und Skelettmuskulatur. Es entwickeln sich proximal betonte schlaffe Extremitätenparesen, die an eine Gliedergürteldystrophie erinnern. In der Biopsie findet sich eine vakuolige Myopathie der Typ-1-Muskelfasern – auch in klinisch nicht betroffenen Muskeln. Die CK-Aktivität ist mehrfach erhöht.

2.3.4.5 Myotonia dystrophica / Dystrophia myotonica (Curschmann-Steinert)

Diese Krankheit ist die zweithäufigste hereditäre degenerative Myopathie. Sie folgt einem autosomal dominanten Erbgang. Die Mutation ist auf dem langen Arm des Chromosoms 19 lokalisiert. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Meistens liegt das klinische Manifestationsalter zwischen 30 und 50 Jahren, manchmal ist die Erkrankung schon bei der Geburt vorhanden. Die Lebenserwartung ist auf durchschnittlich 51 Jahre herabgesetzt. Charakterisiert ist die Krankheit durch das gemeinsame Auftreten von myodystrophischen und myotonen Komponenten. Der myodystrophische Prozess äußert sich in distalen und fazialen atrophischen Lähmungen. Die myotone Bewegungsbehinderung setzt erst Jahre später ein oder existiert jahrelang unbemerkt. Im späteren Verlauf kommt es häufig zu einer Herzbeteiligung und einer Einbeziehung der glatten Muskulatur. Typische zusätzliche Symptome sind Stirnglatze, Katarakt und Hodenatrophie. Muskelbioptisch zeigen sich eine Typ-2-Faserhypertrophie, eine Typ-1-Faseratrophie und allgemeine myopathische Veränderungen wie Bindegewebsvermehrung. Die CK ist nur bei schwerer Form um das 2- bis 3-fache der Norm erhöht.

2.3.4.6 Maligne Hyperthermie

Diese Erkrankung kann man sowohl zu den periodischen Lähmungen unter den hereditären Myopathien (**Tabelle 2, 5**) als auch zu den medikamentös-toxischen Myopathien der erworbenen Formen (**Tabelle 2, 6.**) zählen. Sie kommt familiär gehäuft vor, vornehmlich bei Kindern und jungen Erwachsenen, mit einer Letalität von 73%. Die Bereitschaft zur Entwicklung der malignen Hyperthermie folgt offenbar einem autosomal dominanten Erbgang. Die meisten Fälle wurden in Zusammenhang mit einer Halothannarkose und nach Gabe von Muskelrelaxantien wie Succinylcholin beobachtet. Es ist eine akute Rhabdomyolyse mit Myoglobinurie. Klinisch auffällig ist eine Hyperthermie bis zu 44°C und eine Starre der Muskulatur. Als Voraussetzung werden subklinische primäre Myopathien erwogen. Der glykolytische Stoffwechsel des Muskels ist erhöht mit Vermehrung des Glucose-6-phosphats. Bemerkenswert ist die erheblich gesteigerte Aktivität vor allem der Creatinkinase bei klinisch gesunden Blutsverwandten der Betroffenen.

2.3.4.7 Neurale Muskelatrophie

Nach den zugrundeliegenden morphologischen Veränderungen am peripheren Neuron lassen sich die hypertrophe von der neuronalen Form unterscheiden.

2.3.4.7.1 Neuronale Form vom Typ Charcot-Marie-Tooth

Dieses dominant erbliche Leiden manifestiert sich erst im Erwachsenenalter. Durch die primäre Degeneration der distalen Anteile des Axons setzt eine atrophische Parese vorwiegend der distalen Muskelgruppen der unteren Extremitäten ein, wobei die Gehfähigkeit bis ins hohe Alter erhalten bleibt. In der Muskelbiopsie sieht man eine großfeldrig angeordnete neurogene Atrophie. Diese Erkrankung stellt keine Myopathie dar und wurde somit in dieser Arbeit als „ohne pathologischen Befund“ klassifiziert.

2.4 Troponine in der Diagnostik myokardialer Schädigungen

Bei dem Überbegriff der myokardialen Schädigung steht die Form der ischämischen Herzmuskelschädigung im Vordergrund. Dies ist die häufigste ernsthafte kardiale Schädigung und der Hauptgrund für kardiovaskuläre Erkrankung und Tod. Daneben können auch andere Umstände, wie z. B. Herzmuskelentzündung oder Trauma zu Schädigungen des Herzens führen.

Eine ischämische Herzmuskelschädigung wird hauptsächlich durch die sogenannten „akuten koronaren Syndrome“ verursacht. Der Begriff des „akuten Koronarsyndroms“ umfasst die lebensbedrohlichen Phasen im Spektrum der koronaren Herzerkrankung (KHK, **56**). Dieses reicht von Patienten mit stabiler Angina pectoris (AP) über Patienten mit instabiler Angina pectoris (UAP) oder mit nicht transmuraalem Herzinfarkt (non-Q-wave Infarkt) bis zu Patienten mit klassischem akuten Myokardinfarkt (AMI).

Für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes stehen drei anerkannte differentialdiagnostische Hilfen zur Verfügung: die klinische Anamnese inklusive EKG, biochemische Myokardmarker und bildgebende Verfahren (**60**).

Im Anfangsstadium eines Infarktes ist es für den Arzt dennoch oft schwierig, die richtige Diagnose zu stellen, wobei jedoch eine frühzeitige Diagnose und eine erfolgreiche Reperfusion während eines sich entwickelnden Infarktes die Risiken des Herzinfarktes reduzieren, da mehr als 50% der Todesfälle während der ersten zwei Stunden nach Auftreten der Symptome stattfinden.

In 20 – 40% aller Herzinfarkte ist das EKG unauffällig, so dass die Diagnose mit Hilfe biochemischer Marker im Blut gestellt werden muss (**101**).

Auch in den früheren Stadien des „akuten Koronarsyndroms“, vor allem bei der KHK, der stabilen und der instabilen Angina pectoris, zeigen sich oft keine Veränderungen im EKG, sondern nur subjektive Symptome. Hier muss wenn

invasive Methoden nicht akut verfügbar sind die Diagnostik auf Grund fehlender objektivierbarer Alternativen häufig durch laborchemische Parameter erfolgen.

Laborchemisch können viele intrazelluläre Substanzen wie Enzyme oder myofibrilläre kontraktile Proteine, die von nekrotisierenden Myokardzellen in die Blutbahn freigesetzt werden, als klinische Marker für den Herzinfarkt zur Diagnostik eingesetzt werden **(60)**:

- katalytische Aktivität der Creatinkinase (Gesamt-CK), ein Enzym, das in Form von verschiedenen Isoenzymen im Herzmuskel, im Skelettmuskel und im Gehirn vorhanden ist. Diesem Enzym mangelt es also an Herzspezifität, daraus folgt ein hoher Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse **(73)**. Es existiert keine absolute diagnostische Sensitivität (wegen eventueller Verletzung des Skelettmuskels **(3)**), so dass oft die Quelle des betroffenen Gewebes nicht eruiert werden kann **(24)**.
- Aktivitätsbestimmung des Herz-Isoenzym CK-MB, das allerdings auch mit bis zu 3% der Gesamtaktivität in der Skelettmuskulatur nachweisbar ist. Die eingesetzte Immuninhibitionsmethode zur Messung der CK-MB-Aktivität hat bei geringer Erhöhung der Gesamt-CK eine niedrige Sensitivität und ergibt beim Vorhandensein atypischer Isoformen leicht falsch hohe Ergebnisse **(19, 79)**.
- Verhältnis von CK-MB Aktivität zur Gesamt-CK Aktivität. Es besitzt eine verbesserte Spezifität, aber eine niedrige Sensitivität **(79)**. Diese Ratio basiert auf der Voraussetzung, dass der Prozentsatz der CK-MB im Herzmuskel höher ist als im Skelettmuskel **(3)**. Dennoch ist eine genaue Differenzierung zwischen einer Verletzung des Skelettmuskels und der des Herzmuskels nicht möglich **(2)**.

Bis 2001 galt die Aktivitätsbestimmung der Gesamt-CK und der CK-MB als der Goldstandard in der Diagnostik des akuten Myokardinfarkts.

- Massenkonzentration des Isoenzym CK-MB mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 49%. Die Messung wird von Makro-CK-Varianten oder dem Isoenzym CK-BB nicht verfälscht **(19)**. Trotzdem existieren gewisse

Einschränkungen: interindividuell unterschiedliche Normalwerte (im Skelettmuskel und im Blut gesunder Probanden gemessen (**8**)), das Vorkommen auch im Nicht-Herzmuskel und seine nur kurze Erhöhung im Serum nach Freisetzung (**79**). Insgesamt ist es trotzdem spezifischer als die Gesamt-CK.

- Konzentration von Myoglobin, ein Hämprotein, das nicht herzmuskelspezifisch ist, aber sehr sensitiv. Es wird sehr schnell freigesetzt und ist daher bei negativem Wert zum Ausschluss in der Frühphase geeignet.
- Neben den genannten Parametern gibt es noch andere Marker wie z.B. Myosin Schwereketten, Glykogenphosphorylase-BB, Fatty Acid Binding Protein oder BNP (**119**), die (noch) keinen Eingang in die klinische Routine gefunden haben, bzw. auf Grund neuerer Marker nicht mehr verwendet werden, wie z.B. Laktatdehydrogenase (Isoenzym LDH1=HBDH), GOT (ASAT) oder Aldolase.

Alle diese Parameter sind nicht absolut herzspezifisch. Daher sind die Ergebnisse dieser kardialen Marker unter Umständen schwierig zu interpretieren, zum Beispiel bei Patienten mit verletzter Skelettmuskulatur, nach i.m. Injektionen, mit Myopathie oder bei Patienten mit chronischem Nierenversagen (**2**). Bei diesen letzteren Patienten können auch ohne offensichtliche Herzprobleme höhere Serumwerte für CK (**73**), CK-MB Aktivität (**82**) und Myoglobin (**143**) gemessen werden (**59**).

Auf Grund dieser Unspezifität gilt jetzt die Konzentrationsbestimmung der kardialen Isoformen von Troponin T (cTnT) und Troponin I (cTnI) als der Goldstandard in der laborchemischen Diagnose von ischämischen Myokardschäden (**134**). Sie sind verlässliche Marker wegen ihrer Spezifität und Sensitivität. Auch unter Routinebedingungen zeigen sie keine nennenswerten Unspezifitäten.

cTnT und cTnI besitzen eine hohe Herzspezifität (84% - 93% bzw. 93% - 100% (**79, 12, 147**)), eine hohe Sensitivität (87% - 100% bzw. 96% - 98% (**79, 91, 12, 81, 147**)) und eine gute diagnostische Effizienz (88% (**79**)). Zusätzlich haben sie die Vorteile einer sehr niedrigen Konzentration im Serum von Gesunden (**53**) und eines bis zu 14 Tage langen diagnostischen Fensters (**100, 33**). Trotz ihrer kurzen Halbwertszeit im Serum von 120 Minuten (**79**) sind ihre Werte länger erhöht. Die Freisetzung hat (bei cTnT immer und bei cTnI teilweise) zwei Phasen: ein erster peak 4-6 Stunden nach Auftreten der Symptome (parallel zu CK-MB (**93**)), ein zweiter peak bzw. Plateau bis zu 14 Tage. Dies liegt darin begründet, dass das Troponin an zwei Orten in der Zelle vorliegt: bis zu ca. 6% liegen gelöst im Zytosol vor, die restlichen Anteile des Troponins sind in die Myofibrillen eingebunden. Der gelöste Anteil verursacht beim Ausströmen aus den Myozyten durch ischämiebedingten Verlust der Zellmembranintegrität den ersten Anstieg. Dessen Höhe hängt von der Reperfusion ab. Bei Reperfusion ist wegen einem „Auswaschphänomen“ dieser Peak schneller und höher, mit einer schnelleren Normalisierung, so dass diese Werte auch zur nichtinvasiven Verlaufskontrolle bei thrombolytischer Therapie eingesetzt werden können (**32, 92, 20, 1**). Der an die Myofibrillen gebundene Anteil des Troponins ist für das langanhaltende Plateau durch Untergang des kontraktiven Apparates der irreversibel verletzten Zellen verantwortlich. Dies ist ein Zeichen für den irreversiblen Schaden des subzellulären kontraktiven Apparates (**32**) und hängt von der Größe des akuten Myokardinfarkts ab (**80**). Der Gewebegehalt an Troponin T und I nimmt dabei nach einem Infarkt im infarzierten Gebiet proportional zum Erscheinen im Blut ab (**117**).

Wegen der lang erhöhten Werte können allerdings Reinfarkte nicht gut erkannt werden (**51**), so dass hier ein zusätzlicher Marker erforderlich ist, z. B. Myoglobin (**54**).

Troponin T und I können nicht nur zur Diagnose, sondern auch zur Risikostratifizierung von Patienten mit „akutem Koronarsyndrom“ herangezogen werden. Wie seit längerem bekannt ist, können aus einem Patientenkollektiv mit instabiler Angina pectoris mit Hilfe erhöhter cTnT-Werte diejenigen identifiziert werden, die ein höheres Risiko für Komplikationen während ihres Krankenhausaufenthaltes haben. So nimmt z. B. die 30-Tages-Mortalität (**107**) linear und direkt mit zunehmenden Maximalwerten von cTnT zu (Anstieg des cTnT um 1µg/l entspricht Anstieg der Letalität um 10% (**112**)), entsprechend anderer Risikofaktoren wie geringer Anstieg der CK-MB, höheres Alter, Hypertension und Schwere der Ischämie (**88**). Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris zeigen erhöhte Troponin T Werte entweder Mikroinfarkte an, oder aber reversible ischämische Myokardschäden (**79, 64, 53, 69, 129**). Indem kleinere Myokardzellschäden (sog. „minor myocardial cell damage“) erkannt werden, die mit einem erhöhten Risiko für Herzinfarkt und plötzlichen Herztod einhergehen, können Patienten in Hoch- bzw. Niedrigrisiko-Gruppen eingeteilt werden. Hier erreicht man einen hohen negativen prädiktiven Wert von 98% (**100, 52, 144, 65, 51**).

Mit älteren etablierten Markern wie der CK ist die Erkennung dieser Patientengruppe mit einem hohen Risiko nicht möglich (**65, 114**).

Ähnlich wie cTnT weisen erhöhte cTnI Werte auf ein höheres kardiales Risiko hin (**20**), so dass auch cTnI als unabhängiger Risikofaktor für eine höhere Mortalitätsrate gilt (**100**). Außerdem sollen hier neue Marker wie CRP oder BNP angesprochen werden, die ebenfalls bei Hochrisikopatienten erhöht sind (**119**). Zur Risikostratifizierung können auch mehrere Marker in Kombination angewandt werden, da sich das Risiko mit der Zahl der erhöhten Marker deutlich erhöht (**119**).

Neuere Untersuchungen zeigten, dass Troponin T und I nicht nur zur Risikostratifizierung beim „akuten Koronarsyndrom“ herangezogen werden können, sondern auch die Therapieentscheidung beeinflussen sollten (56, 30, 62). Patienten mit instabiler Angina pectoris und erhöhten Troponin T Werten, die somit ein dem klassischen Infarktpatienten vergleichbares Risiko hinsichtlich Infarkt und Tod haben, profitieren eindeutig von einer Therapie mit anti-thrombotischen Substanzen wie den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor-antagonisten (63). Sowohl die Früh- als auch die Langzeitmortalität lässt sich so durch Kombination der neueren Diagnose-Marker mit neuen Therapieansätzen reduzieren.

3 Fragestellung

Obwohl die kardialen Isoformen von Troponin T und I zuverlässige Marker für die Erkennung von Herzmuskelschäden sind, können unspezifische Erhöhungen bei Patienten mit Myopathien oder mit Niereninsuffizienz vor allem für cTnT nicht sicher ausgeschlossen werden. Für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz konnte von zwei Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass eine Expression in der myopathisch veränderten Skelettmuskulatur dieser Patienten nicht stattfindet (61) bzw. die exprimierte Isoform des cTnT vom Assay nicht erkannt wird (116). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression der kardialen Troponine T und I bei Patienten mit primären Myopathien zu untersuchen. Dazu wurde in Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit v.a. primäre Myopathien die mRNA-Expression der skelettalen und kardialen Isoformen von TnT und Tnl untersucht. Die gefundenen Ergebnisse wurden dann mit den histologisch gesicherten Diagnosen sowie Befunden verglichen und kritisch diskutiert.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Kontrollproben

Als Positivkontrollen dienten für die kardialen Isoformen zwei Herzmuskelproben (Herzohr: Herz 23.1., Herz 3.7.), die bei Operationen am offenen Herzen im Deutschen Herzzentrum gewonnen wurden. Diese Proben wurden freundlicherweise von Prof. Mandler zur Verfügung gestellt.

Als Positivkontrollen für die Skelettmuskelisoformen standen mehrere Muskelproben (Bein 16.12., SM. Allg., M. Soleus) zur Verfügung, die bei Unterschenkelamputationen von Patienten ohne Skelettmuskelerkrankungen gewonnen wurden. Diese Proben wurden freundlicherweise von PD Dr. Brandl zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Patientenproben

Es standen 18 Proben aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar zur Verfügung, die bei routinemäßigen, diagnostischen Biopsien 1998 gewonnen wurden und, auf Trockeneis, sofort in das Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar transportiert wurden. Dort wurden sie bis zur Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. In **Tabelle 4** sind die wichtigsten Daten der einzelnen Biopsien aufgelistet. Diese Biopsien wurden freundlicherweise von Dr. Quasthoff zur Verfügung gestellt.

Nr	Name, Initialen	Geschlecht	Alter	Diagnose
1.	F.B.	m.	1957	unauffällig, Ausschluss maligne Hyperthermie
2.	E.M.	m.	1951	Maligne Hyperthermie
3.	M.R.	w.	1932	unauffällig, neurogene Muskelatrophie
4.	S.D.	m.	1976	Gliedergürteldystrophie
5.	P.P.	w.	1970	Maligne Hyperthermie
6.	J.L.	m.	1968	unauffällig, Ausschluss maligne Hyperthermie
7.	G.P.	m.	1938	Maligne Hyperthermie
8.	A.S.	m.	1946	unauffällig, Ausschluss maligne Hyperthermie
9.	E.B.	w.	1933	Familiäre CK-Erhöhung unklarer Genese
10.	K.P.	m.	1971	unauffällig, Ausschluss maligne Hyperthermie
11.	T.H.	w.	1948	Maligne Hyperthermie
12.	G.S.	m.	1965	Maligne Hyperthermie
13.	G.M.	w.	1964	unauffällig, Ausschluss maligne Hyperthermie
14.	E.J.	m.	1972	unauffällig
15.	H.G.	m.	1973	McArdle Glykogenose Typ V
16.	R.S.	w.	1965	unauffällig, Ausschluss maligne Hyperthermie
17.	R.B.	w.	1954	unauffällig, Ausschluss maligne Hyperthermie
18.	J.R.I.	m.	1976	unauffällig, Ausschluss maligne Hyperthermie

Tabelle 4: Proben Neurologie

Die histologisch gesicherten Diagnosen der 8 Patienten mit muskulären Erkrankungen sind in **Tabelle 4** aufgelistet.

Insgesamt stammten die 18 Proben aus der Neurologie von einem Patienten mit McArdle Glykogenose, einem Patienten mit Gliedergürteldystrophie, einem Patienten mit familiärer CK-Erhöhung unklarer Genese, fünf Patienten mit maligner Hyperthermie und zehn Patienten mit unauffälligem histologischen Befund, die sich folgendermassen zusammensetzten: ein Patient ohne Myopathie, ein Patient mit neurogener Muskelatrophie, jedoch ohne Muskel-

erkrankung sowie acht Patienten, bei denen eine maligne Hyperthermie ausgeschlossen wurde.

Des weiteren wurden 24 Muskelproben aus dem Friedrich-Baur-Institut (**Tabelle 5**) untersucht, die dort bereits bei -70°C archiviert waren. Diese Biopsien wurden freundlicherweise von Frau Dr. Fischer zur Verfügung gestellt.

Nr	Name, Initialen	Ge-schl.	Alter	Biopsie zeitp.	Biopsiestelle	Diagnose
1	J.M.	m.	1950	1996	M. quadriceps femoris li.	unauffällig
2	M. G.	w.	1976	1996	M. deltoideus li.	FSH-Dystrophie
3	V. P.R.	w.	1986	1996	M. tibialis ant. li.	Dystrophie
4	I. L.	w.	1960	1996	M. vastus medialis re.	Distale Myopathie
5	K.W.	m.	1951	1996	M. pectoralis major re.	unauffällig
6	I.Z.	w.	1959	1996	M. rectus femoris re.	Metabolische Myopathie, M. Pompe
7	M. P.	w.	1966	1998	M. gastrocnemius li.	unauffällig
8	T.D.	m.	1959	1998	M. vastus lateralis li.	Prim. Sarkoglykanopathie
9	F. P.	m.	1958	1998	M. biceps brachii li.	FSH-Dystrophie
10	S. S.	m.	1994	1998	M. tibialis anterior li.	MD Typ Duchenne
11	S.B.	m.	1965	1998	M. deltoideus re.	unauffällig
12	D. S.	m.	1950	1998	M. rectus femoris re.	unauffällig
13	H.B.	m.	1933	1998	M. biceps brachii re.	Myopathie
14	J.P.	m.	1955	1998	M. biceps brachii li.	unauffällig
15	D.A.	m.	1941	1997	M. rectus femoris li.	Degen. Myopathie
16	D.S.	m.	1978	1996	M. vastus lateralis	Gliedergürteldystrophie
17	M.R.-V.	w.	1955	1996	M. deltoideus re.	unauffällig
18	U.H.	w.	1955	1996	Nicht bekannt	unauffällig
19	M. V.	m.	1970	1996	M. gastrocnemius re.	MD Typ Becker-Kiener
20	D.M.	m.	1991	1998	M. tibialis anterior re.	MD Typ Duchenne
21	D.S.	m.	1991	1998	M. tibialis anterior re.	MD Typ Duchenne
22	T.S.	m.	1993	1998	M. tibialis anterior li.	MD Typ Duchenne
23	A.V.	m.	1994	1998	Nicht bekannt	MD Typ Duchenne
24	J.P.	m.	1997	1998	Nicht bekannt	MD Typ Duchenne

Tabelle 5: Proben Friedrich-Baur-Institut

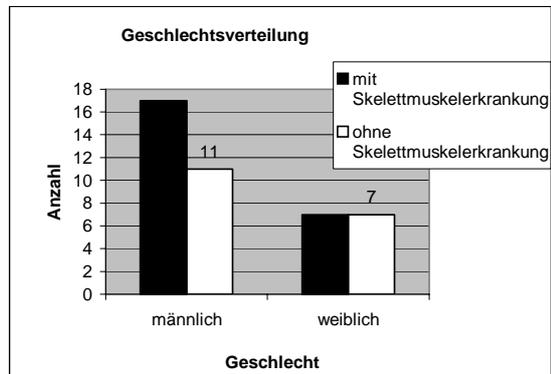
Zusammenfassend entsprach dies 8 Proben mit unauffälliger Histologie sowie 16 Proben von Patienten mit einer muskulären Erkrankung. Diese setzten sich aus verschiedenen Dystrophien und Myopathien zusammen: sechs MD Duchenne, einer MD Becker, einer Gliedergürteldystrophie, einer primären Sarkoglykanopathie, zwei Patienten mit FSH-Dystrophie, einer einfachen Dystrophie, und jeweils einem Patienten mit einer Myopathie, einer distalen Myopathie, einer degenerativen Myopathie und einem Patienten mit M. Pompe. Hierbei sollte noch angefügt werden, dass bei einem Patienten mit FSH-Dystrophie und dem Patienten mit Myopathie der jeweils biopsierte Muskel histologisch nicht betroffen war, ansonsten die Krankheit jedoch klinisch nachzuweisen war, so dass die Zuordnung zu den positiven Proben erfolgte.

Fasst man beide Patientenkollektive zusammen, so wurden insgesamt 18 Proben von Patienten ohne Skelettmuskelerkrankung sowie 24 Proben von Patienten mit Skelettmuskelerkrankung untersucht.

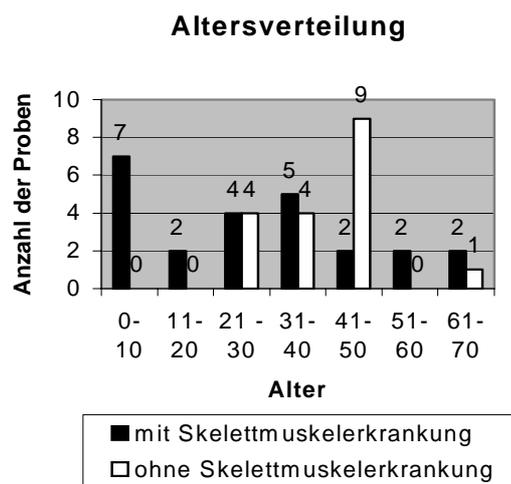
Demographische Daten der Patienten sind in **Tabelle 6**, **Grafik 1** und **Grafik 2** zusammengefasst.

	mit Skelettmuskelerkrankung	ohne Skelettmuskelerkrankung
Anzahl	24	18
Geschlecht m/w	17/7 70,8% / 29,2%	11/7 61,1% / 38,8%
Alter in Jahren: Mittel (min-max)	29,4 (1 – 65)	39,1 (22 – 66)

Tabelle 6: demographische Daten



Grafik 1: Geschlechtsverteilung



Grafik 2: Altersverteilung

4.1.3 Serumproben

Bei den 18 Proben aus der Neurologie konnte jeweils gleichzeitig zur Muskelbiopsie 10ml Blut gewonnen werden. Nach Gerinnung und Zentrifugation wurde das Serum abgehoben und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

4.2 Methoden

Die einzelnen Schritte der Experimente sind in **Abbildung 4** skizziert.

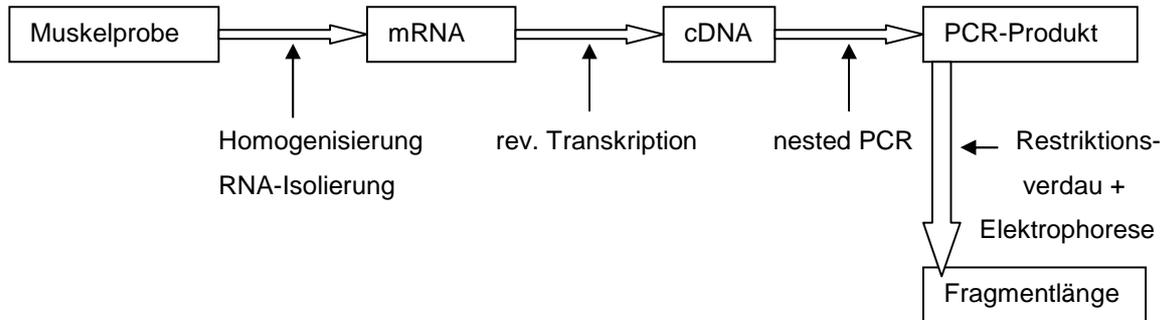


Abbildung 4: Methodenüberblick

4.2.1 Homogenisierung und RNA-Isolierung

Zur Vermeidung einer Verunreinigung der Proben oder Kontamination mit RNAsen wurde während allen Arbeitsschritten nur mit Handschuhen gearbeitet und lediglich sterile bzw. autoclavierte und mit RNase freiem Wasser ausgewaschene Materialien verwendet.

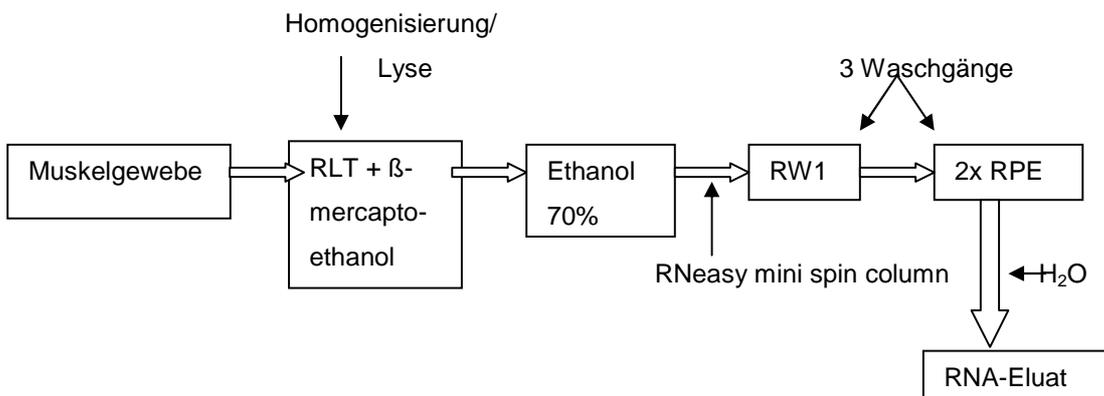


Abbildung 5: RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung aus dem Muskelgewebe wurde ein kommerzieller Kit (RNeasy Mini Kit von QIAGEN, Hilden) entsprechend den Vorschriften des Herstellers (RNeasy Mini Handbook von QIAGEN 03/97, S. 30 – 32, Protocol Animal Tissues) verwendet (siehe **Abbildung 5**). Dieser Kit bestand aus RNase-freiem Wasser, RPE-Puffer, RW1-Puffer, RLT-Puffer und RNeasy Mini Spin columns.

Die Homogenisierung des Muskelgewebes erfolgte mit einem Ultra-Turrax T25 mit einer Leerlaufdrehzahl von 24.000/min (von Janke&Kunkel, IKA-Labor-technik, Staufen). Zur Säuberung und zur Elimination von RNAsen wurde dieser Homogenisator 24 Stunden vor Gebrauch in 0,1 N NaOH und 0,001 M EDTA-Lösung gelegt. Jeweils etwa 50 - 100 mg Gewebe wurde zuerst mit einem Skalpell zerteilt und zusammen mit 1ml RLT-Lysepuffer und 10µl β-Mercaptoethanol in einem ebenfalls RNase freien 10ml Reagenzgefäß aus Polypropylen mit dem Homogenisator bei 24 000 Upm zerkleinert, bis die Viskosität des Lysates reduziert war. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 14 000 Upm mit einer Eppendorf Zentrifuge wurde der Überstand abgehoben. Zu 500µl dieses Überstandes wurde 500µl 70%-iger reinsten Alkohol (hergestellt aus Ethanol absolut von Merck, Darmstadt und RNase freiem 0,1% DEPC H₂O, das dem RNeasy Mini Handbuch entsprechend 12h bei 37°C unter dem Abzug inkubiert und dann autoklaviert wurde) zugegeben. Der Alkohol fördert die selektive Bindung der RNA an die RNeasy membrane der RNeasy mini spin column. 700µl der Mischung wurde in einem RNeasy mini spin column 15 Sekunden bei 10 000 Upm zentrifugiert. Dabei wurde die RNA auf der Säule gebunden. Nach Verwerfen des Eluats folgte ein Waschgang mit 700µl RW1-Puffer und Zentrifugation 15 s bei 10 000 Upm. Nach Verwerfen des Eluats folgten zwei Waschschrirte mit jeweils 500µl RPE-Puffer (dieser wurde zuvor mit Ethanol aufgefüllt), wobei nach dem 1. Waschschrirte 15 s bei 10 000 Upm zentrifugiert wurde, nach dem 2. Waschschrirte 2 Minuten. Durch diese Waschschrirte wurden etwaige Kontaminationen ausgewaschen. Anschließend wurde

auf die RNeasy mini spin column, aufgesetzt auf ein steriles Eppendorf-cup (Eppendorf, Hamburg), 30µl RNase freies Wasser pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 10 000 Upm) konnte die RNA im Eluat gewonnen werden.

Die gewonnene RNA wurde bei -70°C gelagert.

4.2.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der mRNA zur einsträngigen cDNA wurde mit Random Primern und Superscript II RNase H⁻ reverse Transkriptase von Gibco BRL (Life Technologies, Karlsruhe) entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Zuerst wurde die Konzentration des RNA-Eluates ermittelt, indem die Extinktion von 2µl Eluat, gemischt mit 98µl RNase freiem Wasser, bei 260nm (OD_{260}) und 280nm (OD_{280}) gegen 100µl dest. Wasser gemessen wurde (Unicam UV/Vis Spectrometer UV2). Der Quotient $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ zeigte die Qualität der RNA an. Die Quantität der RNA wurde mit der Formel „ $\text{OD}_{260} \times 100 / \text{Dil'n Factor}$ “ berechnet, wobei der Verdünnungsfaktor 50 betrug. Die Ausbeute wurde durch Multiplikation der Konzentration mit dem Volumen (30µl) berechnet. 1µg der RNA entsprach dem Kehrwert der Konzentration in µl (siehe **Tabelle 15** auf Seite 59).

Für die reverse Transkription wurde 1µg RNA entsprechend Spalte 10, **Tabelle 15** in µl umgerechnet, mit Wasser auf 11µl verdünnt und mit 1µl Random Primer (250 ng/µl) versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei 70°C im Wasserbad wurde die Lösung in Eis gekühlt, während der RT Master Mix entsprechend **Tabelle 7** angesetzt wurde.

Reagenz	Pro Reaktion (µl)
First Strand Buffer	4
0,1 M DTT	2
Superscript II RT	1
dNTP Mix	0,5
H ₂ O	0,5

Tabelle 7: RT Master Mix

Zu den 12µl aus RNA und Random Primer wurden 8µl des RT Master Mix (siehe **Tabelle 7**) hinzugegeben und die Mischung zur reversen Transkription 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Superscript II RT-Enzym 10 Minuten lang bei 70°C deaktiviert und somit die reverse Transkription terminiert.

Die gewonnene cDNA wurde in Aliquots von 20µl bei -20°C gelagert.

4.2.3 PCR

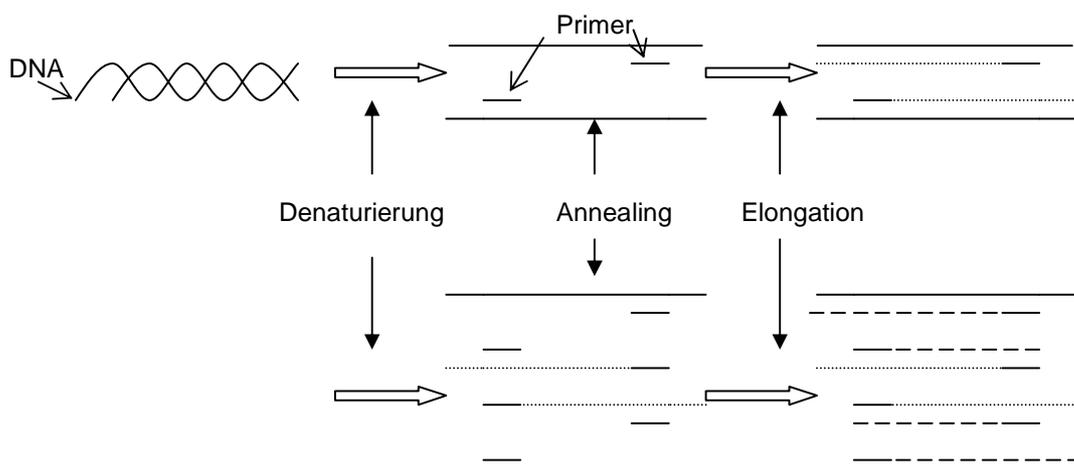


Abbildung 6: Ablauf der PCR

Die PCR ist eine in-vitro Reaktion, die kleinste Mengen DNA in wenigen Stunden millionenfach vermehren kann. Dies geschieht durch die repetitive Durchführung von drei Reaktionsschritten mit verschiedenen Temperaturen. Benötigt werden dafür die Ziel-DNA, zwei zu den 5'-Enden der beiden Stränge komplementäre Oligonukleotide (Primer), Desoxyribonukleosid-Triphosphate und hitzestabile Polymerase (Taq-DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*, **106**). Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die DNA bei etwa 94°C zu Einzelsträngen aufgetrennt, an welche sich die Primer bei Temperaturen zwischen 37°C und 65°C im nächsten Schritt (Annealing) anheften. Von diesen ausgehend synthetisiert die Polymerase neue DNA-Doppelstränge (Elongation). Diese drei Reaktionsschritte werden ca. 30-40x wiederholt, bis millionenfach amplifizierte DNA vorliegt.

Die Methode der rt-PCR testet die Transkription d.h. die Expression auf mRNA Ebene. Da allerdings als Template für die PCR eine DNA nötig ist, wird die mRNA in cDNA umgeschrieben. Da diese cDNA nur Exons enthält, kann sie ausschließlich Informationen über exprimierte Gene geben (siehe **Abbildung 3**).

4.2.3.1 Ansatz

4.2.3.1.1 Kontrolle der reversen Transkription

Zur Kontrolle der stattgefundenen reversen Transkription wurde eine PCR mit Primern eines sog. „house keeping gene“ durchgeführt. Amplifiziert wurde das „house keeping gene“ ABL mit spezifischen Primern.

4.2.3.1.2 Spezifische Nachweisreaktion

In methodischen Vorversuchen wurden verschiedene Programme des Cyclers bezüglich Temperaturen, Zeitdauer und Cyclezahl getestet. Außerdem wurden unterschiedliche Ansätze durchgeführt in Bezug auf die Konzentration der eingesetzten cDNA, einfache PCR versus nested PCR, Vorverdünnungen vor der 2. PCR, die Magnesium- und die Nukleotidkonzentration.

Im folgenden werden die für die einzelnen Isoformen optimierten Bedingungen dargestellt. In manchen Ansätzen wurden 18µl cDNA in der Wiederholung eingesetzt, um ein negatives Ergebnis zu verifizieren.

4.2.3.2 Durchführung

Als Enzym wurde die Taq DNA Polymerase (5000 units per ml) von Appligene Oncor (Heidelberg) benutzt. Als Puffer für das Enzym wurde der Appligene Incubation Mix T.Pol. verwendet. Die Nukleotide stammten von Eurogentec, Köln (dNTP Master Mix, 20µmol, je 5µmol von dATP, dGTP, dCTP, dTTP, jeweils Konzentration 5mM, pH 7,0). Ebenfalls von Eurogentec stammte das MgCl₂ (Sol. 1,5mL, Konzentration 25mM). In der 1. PCR betrug die MgCl₂-Zielkonzentration 1,5mMol, in der 2. PCR 2,5mMol. Das Wasser für die Reaktion war steril abgefülltes Aqua bidest (pH 5,3 - 7,0, Aqua Spüllösung Delta-Pharma, Pfullingen). Als Primer wurden spezifische cDNA Abschnitte für die einzelnen kardialen und Skelettmuskel-Troponine I und T (siehe **Sequenz 1** bis **Sequenz 6**) gewählt, so dass das PCR-Produkt jeweils im Bereich zwischen 500 und 900 bp lang war. In **Tabelle 8** sind die verwendeten Primer in 5'-3'-Richtung aufgelistet. Die Synthese erfolgte durch Eurogentec. Die lyophilisierten Primer wurden bis auf die Zielkonzentration von 25µMol/l verdünnt und in 80µl Portionen bei – 20°C aufbewahrt.

cTnT	1.PCR	cTnT1s	5' GTTCTGAGGGAGAGCAGA 3'
		cTnT1as	5' AGGAGCAGATCTTTGGTGAA 3'
	2.PCR	cTnT2s	5' GACCATGTCTGACATAGAAG 3'
		cTnT2as	5' CAAGTTATAGATGCTCTGCC 3'
cTnI	1.PCR	cTnI1s	5' AACCTCGCCCTGCACCAG 3'
		cTnI1as	5' GCTTTATTCCTCAGGGCCC 3'
	2.PCR	cTnI2s	5' CCTCCAACCTACCGCGCTTA 3'
		cTnI2as	5' AGTAGGCAGGAAGGCTCAG 3'

SMTnTf	1.PCR	SMTnTf1s	5' AAGTTGAACAGGTGGAGGA 3'
		SMTnTf1as	5' GCGTGGTGATGTCATATTTTC 3'
	2.PCR	SMTnTf2s	5' ACTCACTGCTCCTAAGATC 3'
		SMTnTf2as	5' CTCGAACTTGTCATCTCCA 3'
SMTnlf	1.PCR	SMTnlf1s	5' GCTCAGGACCTCAGGATG 3'
		SMTnlf1as	5' TTGACGGTGGTGGTGAGG 3'
	2.PCR	SMTnlf2s	5' GGGAGATGAGGAGAAGCG 3'
		SMTnlf2as	5' CTGGGTGCATCTCCCTAG 3'
SMTnTs	1.PCR	SMTnTs1s	5' CAAGATTCACAGCATCTCAG 3'
		SMTnTs1as	5' TTATTTCAAGCTACCGATGG 3'
	2.PCR	SMTnTs2s	5' GCACCAGGATGTCGGACA 3'
		SMTnTs2as	5' CTTCCGGAAGTTCTGGGC 3'
SMTnls	1.PCR	SMTnls1s	5' CAGCTCCACGAGGACTGA 3'
		SMTnls1as	5' TCCCAGTTCCAGAGGAGG 3'
	2.PCR	SMTnls2s	5' CATGCCGGAAGTCGAGAG 3'
		SMTnls2as	5' GAGAGGTGGGAAGGGATG 3'

Tabelle 8: Primer

Alle o.g. Reagentien wurden bei – 20°C aufbewahrt und unmittelbar vor Benutzung aufgetaut und gründlich gevortext.

In ein steriles Eppendorf-Cup wurden die in **Tabelle 9** und **Tabelle 10** aufgeführten Komponenten zusammenpipettiert, wobei die Stocklösung vor Zugabe der Taq Polymerase gemixt wurde. Die Polymerase wurde direkt aus dem Tiefkühlfach zugegeben, anschließend wurde erneut gemischt und zentrifugiert. Die Stocklösung wurde in 200µl Tubes entsprechend der jeweiligen Gesamtmenge von 45 bzw. 49µl aufgeteilt. Dann wurde die entsprechende cDNA (bzw. das entsprechende Produkt aus der 1. PCR) sowie für die Leerkontrolle die entsprechende Menge Wasser zugegeben. Die Ansätze wurden mit jeweils einem Tropfen Mineralöl (Fa. Sigma, Steinheim) bedeckt und

ohne Verzögerung schnellstmöglich in den Cycler (Perkin Elmer, Gene Amp. PCR System 9700, Norwalk, USA) gegeben und mit den in **Tabelle 11** angegebenen spezifischen Programmen amplifiziert.

Reagentien in µl:	für SMTnTf, SMTnlf, cTnl:	für cTnT:	für SMTnTs, SMTnls:
H ₂ O	41,25	37,25	36,75
Puffer (MgCl ₂)	5	5	5
dNTP (5mMol)	0,5	0,5	1
Primer sense (25µMol/l)	1	1	1
Primer antisense (25µMol/l)	1	1	1
Taq Polymerase (5.000 U/ml)	0,25	0,25	0,25
Gesamt:	49	45	45
Zugesetzte cDNA:	1	5	5

Tabelle 9: Stocklösung für 1. PCR

Reagentien in µl:	für alle Isoformen:
H ₂ O	39,25
Puffer (MgCl ₂)	5
dNTP (5mMol)	0,5
Primer sense (25µMol/l)	1
Primer antisense (25µMol/l)	1
MgCl ₂ (25mMol)	2
Taq Polymerase (5.000 U/ml)	0,25
Gesamt:	49
Produkt aus 1.PCR:	1

Tabelle 10: Stocklösung für 2. PCR

PCR-Programm für SMTnTf, SMTnlf, cTnT, cTnl:

Denaturierung	Cycle-Zahl	Denaturierung	Annealing	Elongation	Abschließ. Elongation	Temp. bis Entnahme
94°C 10min	30x	94°C 30s	60°C 30s	72°C 1min	72°C 5min	4°C

PCR-Programm für SMTnTs, SMTnls:

94°C 4min	30x	94°C 30s	58°C 30s	72°C 1min	72°C 5min	4°C
-----------	-----	----------	----------	-----------	-----------	-----

Tabelle 11: PCR-Programme für die verschiedenen Isoformen

4.2.4 Gelelektrophorese

4.2.4.1 Herstellung des Geles

Für ein 1,5% Agarosegel von 30ml wurde in einen sterilen Erlenmeyerkolben 0,45g Agarose (Molecular Biology Grade Agarose, Fa. Eurogentec, melting temperature 88,7°C, gelling temp. 36,4°C, gel strength 1,270 g/cm³ (1%Gel), 150nm Poren (1%Gel)) eingewogen. Dazu wurden 30ml 0,5x TBE-Puffer (1:20 mit Aqua bidest. verdünnter 10x TBE-Puffer, Fa. Gibco BRL, Concentration: 1,0M Tris, 0,9M Boric Acid, 0,001M EDTA; pH(25°C)) zugegeben. Mit Wachspapier bedeckt wurde diese Mischung in der Mikrowelle etwa 2 Minuten erhitzt, bis alle Luftblasen aufgestiegen waren. Anschließend wurde zu den 30ml unter dem Abzug zur Sichtbarmachung 3µl Ethidiumbromid (1:100 mit Wasser verdünnt) hinzupipettiert. Die Flüssigkeit wurde auf den in einer Schale liegenden Gelträger gegossen und mit einem Raster versehen. Nach 15 Minuten wurde das nun feste und kalte Gel mit 10ml 0,5x TBE-Puffer, versetzt mit 1µl Ethidiumbromid, überschichtet und zum Aushärten unter einer Aluminiumfolie in den Kühlschrank gestellt.

4.2.4.2 Probenvorbereitung und Auftrag

In den ersten Versuchen wurden die Produkte sowohl der 1., als auch der 2. PCR elektrophoretisch ausgewertet. Als sich im Laufe der Versuche herausstellte, dass nach der 1. PCR grundsätzlich keine Banden zu detektieren waren, wurden lediglich die Produkte aus der 2. PCR elektrophoretisch aufgetrennt.

Jeweils 10µl einer amplifizierten Probe wurden in einem sterilen Tube vor dem Auftragen mit 2µl Auftragspuffer (5+1) versetzt. Dieser bestand aus 10mg Xylenecyanol, 10mg Bromphenolblau und 4g D(+)-Sucrose auf 10 ml Wasser. Zur Identifizierung der Länge der PCR-Produkte liefen auf den Gelen jeweils Marker von 100 und 250bp Länge (Oligonucleotide Sizing Markers, Pharmacia Biotech, Ebersberg) auf separaten Spuren mit. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer (Mupid 2, Mini Gel Migration Trough, Cosmo Bio, Tokio, Japan, V=30 ml, 11 x 6 x 0,45 cm, 17 Spuren) eingesetzt, wobei der Gelträger an seiner Unterseite sorgfältig von Gelresten gereinigt wurde. Von der Proben-Auftragspuffer-Mischung wurden nach Vortexen und Zentrifugieren in jede Spur des Gels kathodenseitig 5µl hineinpipettiert. Von den Längenmarkern wurde pro Spur 1µl verwendet.

4.2.4.3 Elektrophorese

Die Laufzeit eines Gels betrug bei 100V 30min. Dies entspricht auf die Laufstrecke umgerechnet etwa 8,3 V/cm. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wanderten von der Kathode zur Anode, wobei sich die Nukleotide entsprechend ihrer Fragmentgröße auftrennten. Die Dokumentation der Fluoreszenz der mit Ethidiumbromid markierten DNA nach Anregung bei einer Wellenlänge von 302nm in UV B-Licht erfolgte mit einem Polaroid-Film.

4.2.5 Restriktionsverdau

4.2.5.1 Durchführung

Zum Nachweis des amplifizierten PCR-Produkts wurde ein Verdau mit den in **Tabelle 12** aufgeführten Restriktionsenzymen durchgeführt (Schnittstellen der Isoformen siehe **Sequenz 1** bis **Sequenz 6**). Alle Restriktionsenzyme und Puffer wurden von der Fa. New England BioLabs (Schwalbach) bezogen.

Restriktions-enzym	Aktivität	Puffer	Erkennungssequenz	Restriktionsstelle
Bsr I	5.000 U/ml	NEB 3	ACTGGN	nach 6. Nukleotid
BstN I	10.000 U/ml	NEB 2 + BSA, 10+1, 60°C	CCWGG	nach 2. Nukleotid
Hinf I	10.000 U/ml	NEB 2	GANTC	nach 1. Nukleotid
Hph I	5.000 U/ml	NEB 4	NNNNNNNTCACC	vor Erkennungs- sequenz
Msp I	20.000 U/ml	NEB 2	CCGG	nach 1. Nukleotid

Tabelle 12 : Restriktionsenzyme

Entsprechend **Tabelle 13** wurde in ein steriles Eppendorfgefäß die für das jeweilige Enzym entsprechende Menge an destilliertem Wasser, Enzypuffer und Enzym pipettiert. Nach Mischen und Zentrifugation wurden jeweils 10µl der Stocklösung in sterile Tubes gegeben, zu denen 10µl der Probe hinzupipettiert wurden. Anschließend folgte – bei BstN I mit Mineralölüberschichtung – die 60 bis 90 minütige Inkubation bei 37°C bzw. 60°C.

		Hinf I, Hph I, Msp I	Bsr I	BstN I
Stock- lösung 10µl	H ₂ O	7,85µl	7,4µl	7,5µl
	Enzympuffer	2µl	2µl	2µl
	Enzym	0,15µl	0,6µl	0,5µl
Probe		10µl	10µl	10µl
Inkubationszeit		60 bis 90 min	60 bis 90 min	60 min
Temperatur		37°C	37°C	60°C (überschichtet mit Mineralöl)

Tabelle 13: Restriktionsverdau

4.2.5.2 Elektrophorese

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese, wobei analog der Elektrophorese der PCR-Produkte vorgegangen wurde (siehe **4.2.4**).

Verwendet wurde ein 3%iges Agarosegel (0,9g Agarose auf 30ml 0,5x TBE-Puffer). Zu den 20µl Ansätzen wurde jeweils 4µl Auftragspuffer zugegeben. Davon wurden je 5µl auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeit eines Gels betrug 40min.

4.2.6 Auswertung

Die Auswertung der Gele erfolgte visuell sowie ein zweites Mal durch Auswertung der Fotografien. Dabei mussten die stets mitgeführten negativen und positiven Kontrollen korrekt sein. Zur Vermeidung evtl. systemischer Fehler wurden alle Ansätze 5 bis 7 Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

4.2.7 Vergleich der PCR-Ergebnisse mit den histologisch-klinischen Befunden.

Der Vergleich mit den klinisch erhobenen und histologisch gesicherten Befunden erfolgte nach Abschluss der Experimente.

4.2.8 Serum

Nach der Gewinnung von Serum aus den Blutproben der Patienten der Neurologie wurde in diesen mit den routinemässigen Methoden des Labors für Klinische Chemie folgende Parameter bestimmt: cTnT, cTnI, CK, CK-MB-Aktivität, Myoglobin und Kreatinin (siehe **Tabelle 14**).

	analyzer	manufacturer	Test principle	Cut-off	Upper reference limit
cTnT	Elecsys®	Roche	Elektrolumineszenz	0,1µg/l	0,03µg/l
cTnI	Dimension® RxL	Dade Behring	Elektrolumineszenz	0,4µg/l	0,05µg/l
CK	Vitros® 950 IRC	Ortho	Multilayer-Filmtechnik		80U/l ♂ (25°C) 70U/l ♀ (25°C)
CK-MB-Aktivität	Vitros® 950 IRC	Ortho	Multilayer-Filmtechnik		10U/l (25°C)
Myoglobin	BN II	Dade Behring	Nephelometrie		70µg/l
Kreatinin	Vitros® 950 IRC	Ortho	Multilayer-Filmtechnik		1,3mg/dl

Tabelle 14: Methoden für die Messung der Serumparameter

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der RNA-Isolierung

Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der RNA-Isolierung (siehe **4.2.1** und **4.2.2**). Die Qualität der RNA, ausgedrückt in dem Quotienten OD_{260} / OD_{280} (Spalte 6), schwankte für die verschiedenen Proben zwischen 0,98 und 1,09, wobei die Probe FBI 17 auf den Wert 1,45 nach oben abwich. Die Quantität der RNA (Spalte 8) schwankte zwischen 0,75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 1,20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ebenfalls mit einer Abweichung der Probe FBI 17 auf 1,40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dies wurde durch die erhöhte Ausbeute der Probe FBI 17 mit 42,12 im Vergleich zu den Werten der anderen Proben („Yield“) zwischen 22,62 und 36,06 bestätigt (Spalte 9).

Datum	Probe	Dil'n Factor	A260	A280	A260/A280 ¹	Vol	Conc'n ²	Yield ³	1 $\mu\text{g}=\mu\text{l}$ ⁴
16.12.97	Bein	50	0,377	0,368	1,02	30	0,75	22,62	1,33
23.01.98	Herz	50	0,391	0,385	1,02	30	0,78	23,46	1,28
02.03.98	SM, N1	50	0,431	0,438	0,98	30	0,86	25,86	1,16
02.03.98	SM, N2	50	0,471	0,459	1,03	30	0,94	28,26	1,06
04.03.98	SM, N3	50	0,423	0,408	1,04	30	0,85	25,38	1,18
06.03.98	SM, N4	50	0,504	0,493	1,02	30	1,01	30,24	0,99
06.03.98	SM, N5	50	0,471	0,463	1,02	30	0,94	28,26	1,06
16.03.98	SM, FBI 1	50	0,377	0,368	1,02	30	0,75	22,62	1,33
16.03.98	SM, FBI 2	50	0,48	0,467	1,03	30	0,96	28,80	1,04
16.03.98	SM, FBI 3	50	0,431	0,418	1,03	30	0,86	25,86	1,16
25.03.98	SM, N6	50	0,468	0,451	1,04	30	0,94	28,08	1,07
25.03.98	SM, N7	50	0,486	0,461	1,05	30	0,97	29,16	1,03
14.04.98	SM, N8	50	0,423	0,395	1,07	30	0,85	25,38	1,18
14.04.98	SM, FBI 4	50	0,381	0,369	1,03	30	0,76	22,86	1,31
15.04.98	SM, FBI 5	50	0,438	0,416	1,05	30	0,88	26,28	1,14
15.04.98	SM, FBI 6	50	0,483	0,473	1,02	30	0,97	28,98	1,04
15.06.98	SM, N9	50	0,471	0,458	1,03	30	0,94	28,26	1,06
15.06.98	SM, N10	50	0,537	0,524	1,02	30	1,07	32,22	0,93

15.06.98	SM, N11	50	0,445	0,43	1,03	30	0,89	26,70	1,12
15.06.98	SM, N12	50	0,585	0,578	1,01	30	1,17	35,10	0,85
03.07.98	SM, N13	50	0,427	0,411	1,04	30	0,85	25,62	1,17
03.07.98	SM, N14	50	0,447	0,431	1,04	30	0,89	26,82	1,12
03.07.98	SM, N15	50	0,459	0,447	1,03	30	0,92	27,54	1,09
03.07.98	Herzohr	50	0,411	0,398	1,03	30	0,82	24,66	1,22
03.07.98	M.soleus	50	0,589	0,575	1,02	30	1,18	35,34	0,85
04.08.98	SM, FBI 7	50	0,439	0,422	1,04	30	0,88	26,34	1,14
04.08.98	SM, FBI 8	50	0,394	0,382	1,03	30	0,79	23,64	1,27
04.08.98	SM, FBI 9	50	0,397	0,383	1,04	30	0,79	23,82	1,26
04.08.98	SM, FBI 10	50	0,401	0,393	1,02	30	0,80	24,06	1,25
04.08.98	SM, FBI 11	50	0,554	0,532	1,04	30	1,11	33,24	0,90
04.08.98	SM, FBI 12	50	0,385	0,377	1,02	30	0,77	23,10	1,30
04.08.98	SM, FBI 13	50	0,384	0,376	1,02	30	0,77	23,04	1,30
04.08.98	SM, FBI 14	50	0,388	0,376	1,03	30	0,78	23,28	1,29
04.08.98	SM, N16	50	0,398	0,387	1,03	30	0,80	23,88	1,26
04.08.98	SM, N18	50	0,382	0,376	1,02	30	0,76	22,92	1,31
21.09.98	SM, N17	50	0,418	0,41	1,02	30	0,84	25,08	1,20
21.09.98	SM allg.	50	0,545	0,516	1,06	30	1,09	32,70	0,92
03.11.98	SM, FBI 15	50	0,601	0,563	1,07	30	1,20	36,06	0,83
03.11.98	SM, FBI 16	50	0,497	0,457	1,09	30	0,99	29,82	1,01
03.11.98	SM, FBI 17	50	0,702	0,483	1,45	30	1,40	42,12	0,71
03.11.98	SM, FBI 18	50	0,413	0,407	1,01	30	0,83	24,78	1,21
03.11.98	SM, FBI 19	50	0,421	0,402	1,05	30	0,84	25,26	1,19
30.06.99	SM, FBI 20	50	0,429	0,411	1,04	30	0,86	25,74	1,17
30.06.99	SM, FBI 21	50	0,422	0,414	1,02	30	0,84	25,32	1,18
30.06.99	SM, FBI 22	50	0,399	0,387	1,03	30	0,80	23,94	1,25
30.06.99	SM, FBI 23	50	0,394	0,385	1,02	30	0,79	23,64	1,27
30.06.99	SM, FBI 24	50	0,389	0,375	1,04	30	0,78	23,34	1,29

Tabelle 15: Umrechnung RNA Extinktion in Konzentration

¹= OD_{260} / OD_{280} = Qualität der RNA

²= $A_{260} \times 100 / \text{Dil'n Factor}$ = Quantität der RNA

³= $\text{Vol} \times \text{Conc'n}$

⁴= $1 / \text{Conc'n}$

5.2 Ergebnisse für Skelettmuskelisoformen

5.2.1 Schnelle Skelettmuskelisoformen

Für SMTnTf wurde die erwartete Bande bei 523bp, für SMTnlf bei 617bp gefunden.

Die Isoformen SMTnTf (523bp) und SMTnlf (617bp) konnten in beiden Positivkontrollen „Bein 16.12.“ und „SM. Allg.“ nachgewiesen werden. In der Probe „M. Soleus“, die eine Positivkontrolle für langsame Muskulatur darstellte, und in einer der beiden Herzproben ließ sich keine fast-twitch Isoform finden. Jedoch waren diese in der zweiten Herzmuskelprobe nachweisbar.

Die Form SMTnTf wurde in allen 42 Proben (100%) gefunden, die Form SMTnlf in 39 (92,9%).

Ein Patient mit M. Pompe (FBI 6) und ein Patient mit distaler Myopathie (FBI 4) wiesen kleinere Fragmente auf, ein Patient, bei dem eine maligne Hyperthermie ausgeschlossen wurde (N 13), war negativ für SMTnlf.

Kleinere Fragmente neben der erwarteten Länge wiesen ein Patient ohne pathologischen Befund für SMTnlf (N 17) und ein Patient mit Duchenne'scher Muskeldystrophie für SMTnTf auf (FBI 22).

5.2.2 Langsame Skelettmuskelisoformen

SMTnTs zeigte wie erwartet eine Bande bei 806bp, SMTnls bei 670bp.

In der Positivkontrolle „M. Soleus“ waren beide Isoformen darstellbar. Sie ließen sich auch in den anderen beiden Skelettmuskelkontrollproben nachweisen. In den beiden Herzmuskelproben waren sie in einer Kontrolle negativ, in der zweiten positiv.

SMTnTs konnte in vier Proben (9,5%) nicht nachgewiesen werden. Drei dieser Proben waren als maligne Hyperthermie diagnostiziert (N 2, 5, 7), eine als McArdle Glykogenose (N 15).

Drei dieser negativen Proben (N 2, 5, 15) waren auch für SMTnIs negativ (7,1%). Zwei Proben (eine mit maligner Hyperthermie, eine ohne Befund (N 12, 1)) waren erst mit vermehrter cDNA-Zugabe positiv für SMTnTs, während sieben Proben noch ein zusätzliches kleineres Fragment zeigten (drei Proben mit Duchenne'scher Muskeldystrophie, eine Gliedergürteldystrophie, eine distale Myopathie und zwei Proben ohne Befund (FBI 20, 21, 22, 16, 4, N 17, 18)). Zwei dieser Proben (FBI 4, N 17) wiesen diese kleineren Fragmente auch für SMTnIs auf.

In **Tabelle 16** sind die Ergebnisse für die Skelettmuskelisoformen der Troponine T und I für alle Patienten aufgelistet.

Einteilung der Myopathien (2.3.1)	Diagnose	Her- kunft	Nr.	Skelettmuskelisoform			
				smTnT fast	smTnI fast	smTnT slow	smTnI slow
		Soll		523	617	806	670
	Kontrolle	Bein	16.12.	523	617	806	670
		Herz	23.1.	neg.	neg.	neg.	neg.
		Herz	3.7.	523	617	806	670
		M. soleus		neg.	neg.	806	670
		SM. allg.		523	617	806	670
X-chromosomale Muskeldystrophien	MD Duchenne	FBI	10	523	617	806	670
		FBI	20	523	617	90+806	670
		FBI	21	523	617	140+806	670
		FBI	22	150+523	617	120+806	670
		FBI	23	523	280+617	806	670
		FBI	24	523	617	806	670
	MD Becker	FBI	19	523	617	806	670
rezessiv autosomale Muskeldystrophien	Gliedergürteldystrophie	N	4	523	617	806	670
		FBI	16	523	617	100+806	670
	Pr. Sarkoglykanopathie	FBI	8	523	617	806	670
dominant autosomale Muskeldystrophien	FSH-Dystrophie	FBI	2	523	617	806	670
		FBI	9	523	617	806	670
	Distale Myopathie	FBI	4	523	200,180	400+806	130+670
Muskelspeicher- krankheiten	McArdle Glykogenose	N	15	523	617	Neg.	Neg.
	M. Pompe	FBI	6	523	210	806	670

Dystrophia myotonica	Dystrophie	FBI	3	523	617	806	670		
Maligne Hyperthermie	Mal. Hyperthermie	N	2	523	617	Neg.	Neg.		
		N	5	523	617	Neg.	Neg.		
		N	7	523	617	Neg.	670		
		N	11	523	617	806	670		
		N	12	523	617	806!	670		
andere Muskelerkrankungen	Degen. Myopathie	FBI	15	523	617	806	670		
	Myopathie	FBI	13	523	617	806	670		
	Familiäre unklare CK-Erhöhung	N	9	523	617	806	670		
Proben ohne Befund	unauffällig	N	14	523	617	806	670		
		N	1	523	617	806!	670		
		N	6	523	617	806	670		
		N	8	523	617	806	670		
		N	10	523	617	806	670		
		N	13	523	Neg.	806	670		
		N	16	523	617	806	670		
		N	17	523	150+617	220+806	100+670		
		N	18	523	617	100+806	670		
		FBI	1	523	617	806	670		
		FBI	5	523	617	806	670		
		FBI	7	523	617	806	670		
		FBI	11	523	617	806	670		
		FBI	12	523	617	806	670		
		FBI	14	523	617	806	670		
		FBI	17	523	617	806	670		
			unauffällig, neurogene Muskelatrophie	N	3	523	617	806	670

! : Probe nach Wiederholung mit vermehrter cDNA-Zugabe
 grau hinterlegt: auffällige Befunde

Tabelle 16: Ergebnisse für Skelettmuskelisofornen

In **Abbildung 7** bis **Abbildung 10** sind beispielhaft Ergebnisse für die verschiedenen Skelettmuskelisofornen dargestellt.

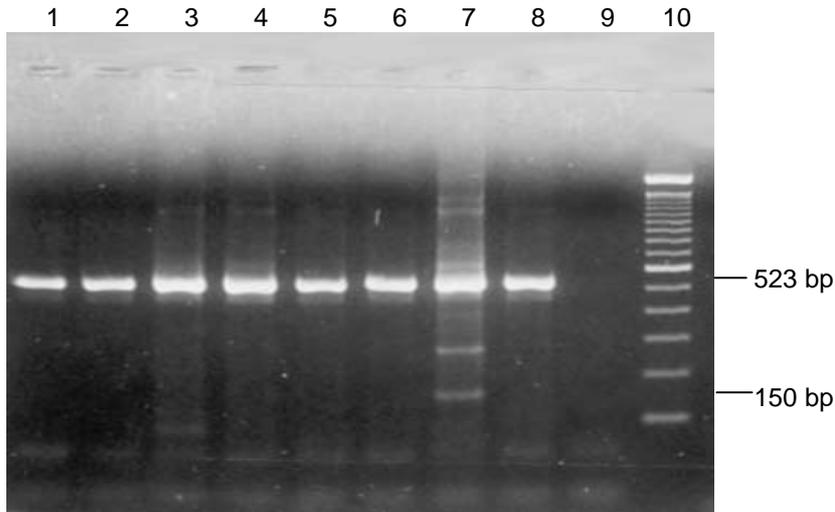


Abbildung 7: Skelettmuskelisofomen SMTnTf

Spur 1: Positivkontrolle SM. allg.	Spur 6: FBI 21 MD Duchenne
Spur 2: Kontrolle Herz 3.7.	Spur 7: FBI 22 MD Duchenne
Spur 3: N13 unauffällig	Spur 8: FBI 23 MD Duchenne
Spur 4: FBI 8 pr. Sarkoglykanopathie	Spur 9: Negativkontrolle
Spur 5: FBI 20 MD Duchenne	Spur 10: Längenmarker 100bp

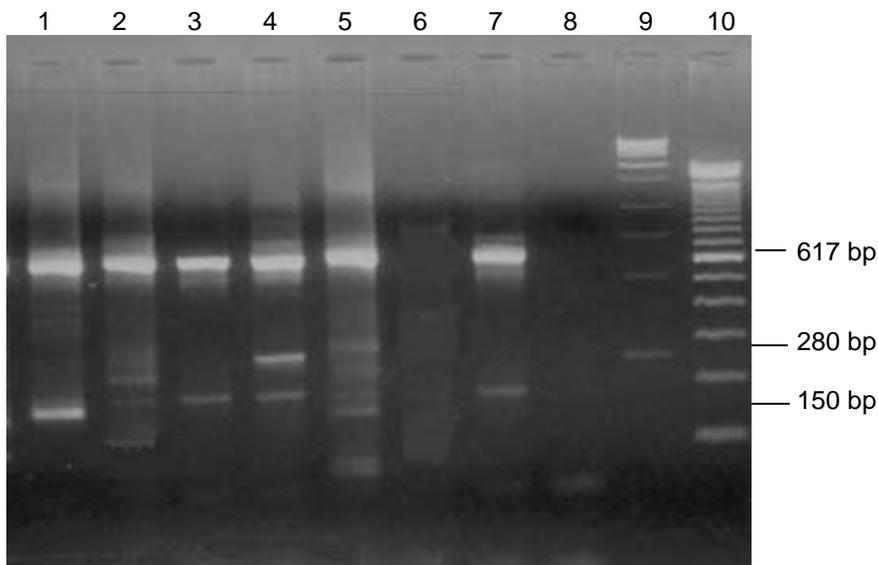


Abbildung 8: Skelettmuskelisofomen SMTnIf

Spur 1: N17 unauffällig	Spur 6: N13 unauffällig
Spur 2: FBI 8 pr. Sarkoglykanopathie	Spur 7: Positivkontrolle SM. allg.
Spur 3: FBI 22 MD Duchenne	Spur 8: Negativkontrolle
Spur 4: FBI 23 MD Duchenne	Spur 9: Längenmarker 250bp
Spur 5: FBI 24 MD Duchenne	Spur 10: Längenmarker 100bp

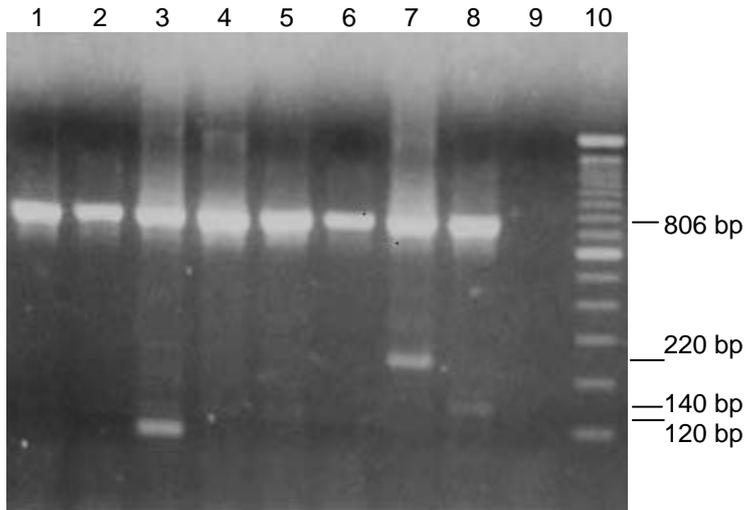


Abbildung 9: Skelettmuskelisformen SMTnTs

Spur 1: Positivkontrolle M. soleus
 Spur 2: Kontrolle Herz 3.7.
 Spur 3: FBI 22 MD Duchenne
 Spur 4: FBI 23 MD Duchenne
 Spur 5: FBI 24 MD Duchenne

Spur 6: FBI 8 pr. Sarkoglykanopathie
 Spur 7: N17 unauffällig
 Spur 8: FBI 21 MD Duchenne
 Spur 9: Negativkontrolle
 Spur 10: Längenmarker 100bp

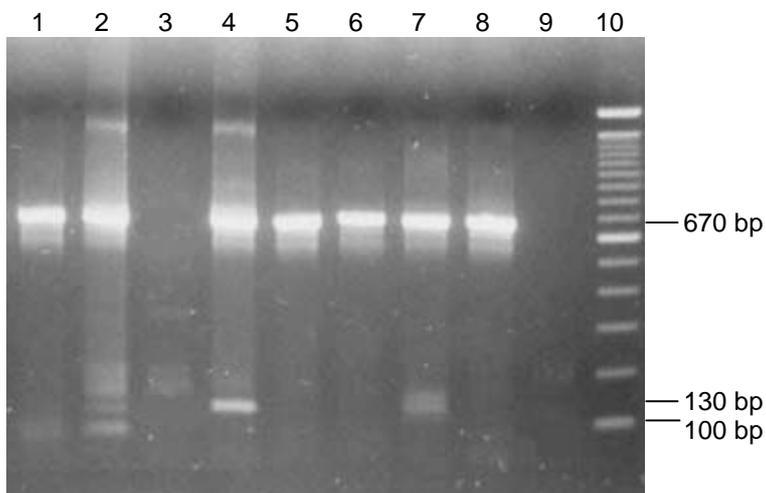


Abbildung 10: Skelettmuskelisformen SMTnIs

Spur 1: Positivkontrolle M. soleus
 Spur 2: N17 unauffällig
 Spur 3: N15 McArdle Glykogenose
 Spur 4: FBI 4 Distale Myopathie
 Spur 5: FBI 21 MD Duchenne

Spur 6: FBI 22 MD Duchenne
 Spur 7: FBI 23 MD Duchenne
 Spur 8: FBI 8 pr. Sarkoglykanopathie
 Spur 9: Negativkontrolle
 Spur 10: Längenmarker 100bp

5.2.3 Restriktionsverdau der Skelettmuskelisoformen

Zur Bestätigung der korrekten Amplifikation wurden die gefundenen Fragmente mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut und die gefundenen mit den erwarteten Fragmentlängen verglichen. In **Tabelle 17** sind die erwarteten und die tatsächlichen Fragmentlängen für die einzelnen Isoformen sowie die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme aufgeschlüsselt.

Die Restriktionsstellen der jeweiligen Enzyme sind aus den Gensequenzen **Sequenz 3** bis **Sequenz 6** unter Punkt **2.2** ersichtlich.

Isoform	Enzym	Fragmente(soll)	Fragmente(ist)
SMTnTf	Msp I	2: 118,405	3:120,123,280, Summe o.k.
	Bsr I	2: 240,283	2: 240,283
	Bst NI	3: 89,258,176	3: 89,258,176
	Hinf I	4: 159,40,207,117	4: 159,40,207,117
SmTnlf	Hinf I	3:533,6,78	3:533,6,78
SMTnTs	Hinf I	2: 708,98	2: 708,98
	Bsr I	2: 696,110	2: 696,110
SMTnls	Bsr I	2: 485,185	2: 485,185
	Hph I	2: 621,49	4: 35,135,180,320, Summe o.k.

Tabelle 17: Fragmentlängen der Skelettmuskelisoformen

Abbildung 11 bis **Abbildung 14** zeigen Beispiele der Gelelektrophoresen des Restriktionsverdaus der Skelettmuskelisoformen.

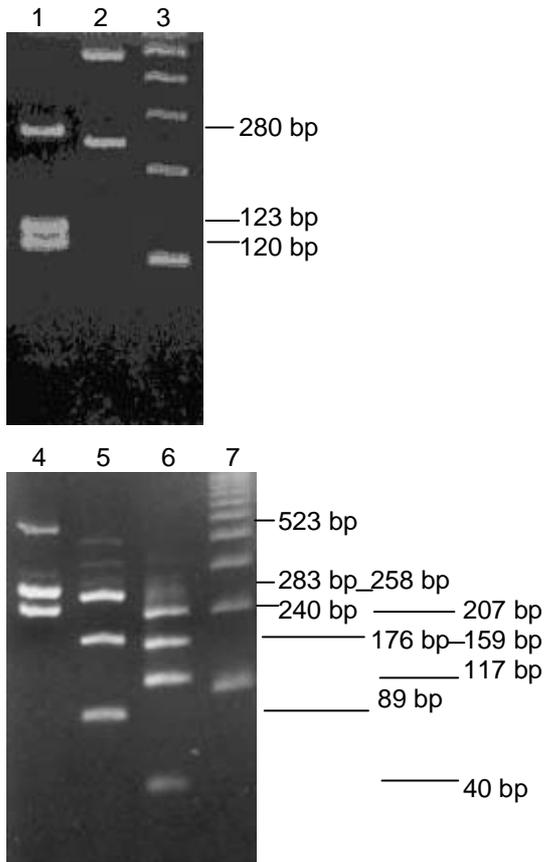


Abbildung 11: Restriktionsverdau Skelettmuskelisofomen SMTnTf

FBI 21 MD Duchenne:
 Spur 1: Msp I – Verdau
 Spur 2: Längenmarker 250bp
 Spur 3: Längenmarker 100bp

Spur 4: Bsr I – Verdau
 Spur 5: Bst NI – Verdau
 Spur 6: Hinf I – Verdau
 Spur 7: Längenmarker 100bp

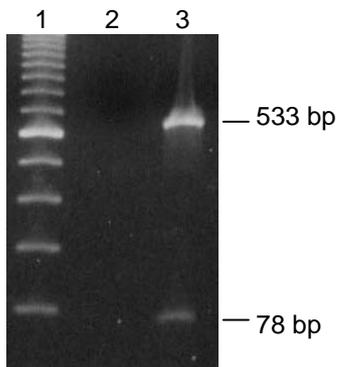


Abbildung 12: Restriktionsverdau Skelettmuskelisofomen SMTnlf

Spur 1: Längenmarker 100bp Spur 2: leere Spur
 Spur 3: FBI 22 MD Duchenne Hinf I – Verdau

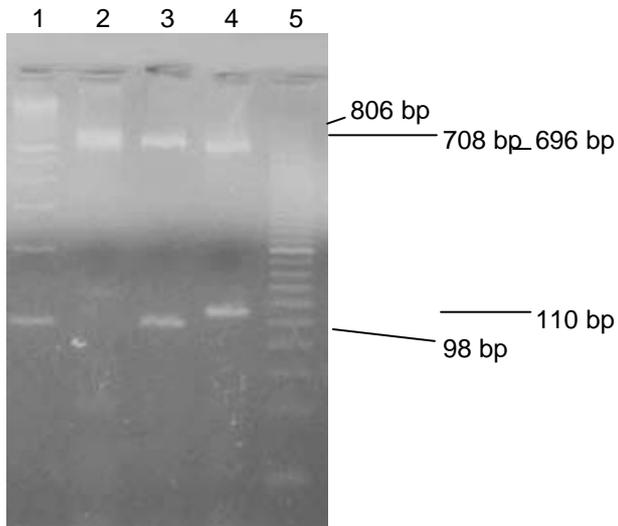


Abbildung 13: Restriktionsverdau Skelettmuskelisformen SMTnTs

Spur 1: Längenmarker 100bp
Spur 2: FBI 24 MD Duchenne
Spur 3: Hinf I – Verdau

Spur 4: Bsr I – Verdau
Spur 5: Längenmarker 25bp

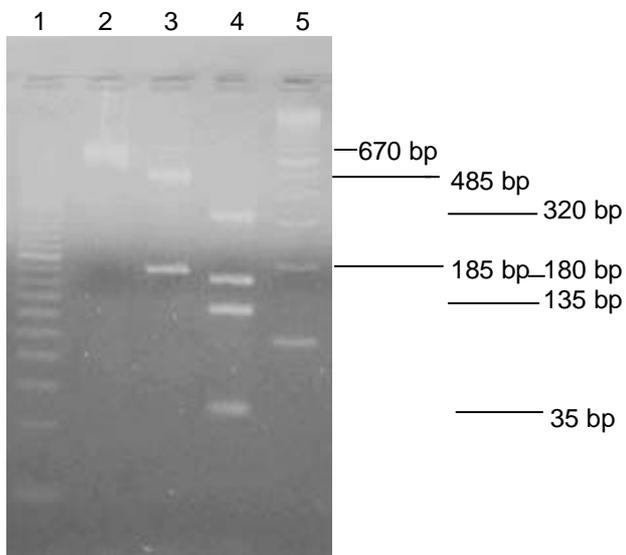


Abbildung 14: Restriktionsverdau Skelettmuskelisformen SMTnTs

Spur 1: Längenmarker 25bp
Spur 2: FBI 22 MD Duchenne
Spur 3: Bsr I – Verdau

Spur 4: Hph I – Verdau
Spur 5: Längenmarker 100bp

5.3 Ergebnisse für Herzmuskelisoformen

In **Tabelle 18** und **Tabelle 20** sind die Ergebnisse für die kardialen Isoformen von Troponin T und I für alle Patienten dargestellt. Die zwei verschiedenen cTnT-Isoformen von 634 und 733 bp Länge bzw. die cTnI-Isoform mit 581 bp Länge wurden in beiden Herzproben, die als Positivkontrollen verwendet wurden, gefunden.

In den drei Skelettmuskelproben ohne Skelettmuskelerkrankung, die für die Skelettmuskelisoformen als Positivkontrollen dienten, fanden sich keine Herzisoformen.

Im Vergleich zu den Positivkontrollen wurden in acht Proben (19,1%) die für die Herzisoformen erwarteten Banden gefunden.

5.3.1 Ergebnisse für cTnT

In **Tabelle 18** sind die Ergebnisse für die kardiale Isoform von Troponin T für alle Patienten aufgeführt.

Einteilung der Myopathien (2.3.1)	Diagnose	Herkunft	Nr.	cTnT
		Soll		634/733
	Kontrolle	Bein 16.12.		neg.
		Herz 23.1.		634
		Herz 3.7.		733
		M. Soleus		neg.
		SM. allg.		neg.
X-chromosomale Muskeldystrophien	MD Duchenne	FBI	10	634/ 733
		FBI	20	733
		FBI	21	733
		FBI	22	634/733
		FBI	23	733
		FBI	24	634/733
	MD Becker	FBI	19	Neg.

rezessiv autosomale Muskeldystrophien	Gliedergürteldystrophie	N	4	Neg.	
		FBI	16	Neg.	
	Pr. Sarkoglykanopathie	FBI	8	634/ 733	
dominant autosomale Muskeldystrophien	FSH-Dystrophie	FBI	2	Neg.	
		FBI	9	Neg.	
	Distale Myopathie	FBI	4	Neg.	
Muskelspeicher-krankheiten	McArdle Glykogenose	N	15	Neg.	
	M. Pompe	FBI	6	Neg.	
Dystrophia myotonica	Dystrophie	FBI	3	Neg.	
Maligne Hyperthermie	Mal. Hyperthermie	N	2	Neg.	
		N	5	Neg.	
		N	7	Neg.	
		N	11	Neg.	
		N	12	Neg.	
andere Muskelerkrankungen	Degen. Myopathie	FBI	15	Neg.	
	Myopathie	FBI	13	Neg.	
	fam. CK-Erhöhung	N	9	Neg.	
Proben ohne Befund	unauffällig	N	14	Neg.	
		N	1	Neg.	
		N	6	Neg.	
		N	8	Neg.	
		N	10	Neg.	
		N	13	Neg.	
		N	16	Neg.	
		N	17	Neg.	
		N	18	Neg.	
		FBI	1	Neg.	
		FBI	5	Neg.	
		FBI	7	Neg.	
		FBI	11	Neg.	
		FBI	12	Neg.	
		FBI	14	Neg.	
		FBI	17	Neg.	
		unauffällig, neurogene Muskelatrophie	N	3	Neg.

Tabelle 18: Ergebnisse für cTnT

Sieben Proben (16,7%) waren positiv für cTnT, wobei in vier Proben beide Isoformen von cTnT exprimiert wurden und in den restlichen drei nur cTnT3 mit 733 bp.

Gleichzeitige Expression von cTnT und cTnI konnte in fünf (11,9%) der sechs Patienten mit Duchenne'scher Muskeldystrophie gezeigt werden (FBI 10, 20, 22, 23, 24).

Nur die mRNA von cTnT wurde in zwei Proben gefunden, nämlich in einem Patienten mit Duchenne'scher Muskeldystrophie (FBI 21) und in einem Patienten mit primärer Sarkoglykanopathie (FBI 8).

Die Ergebnisse für cTnT sind in **Abbildung 15** dargestellt.

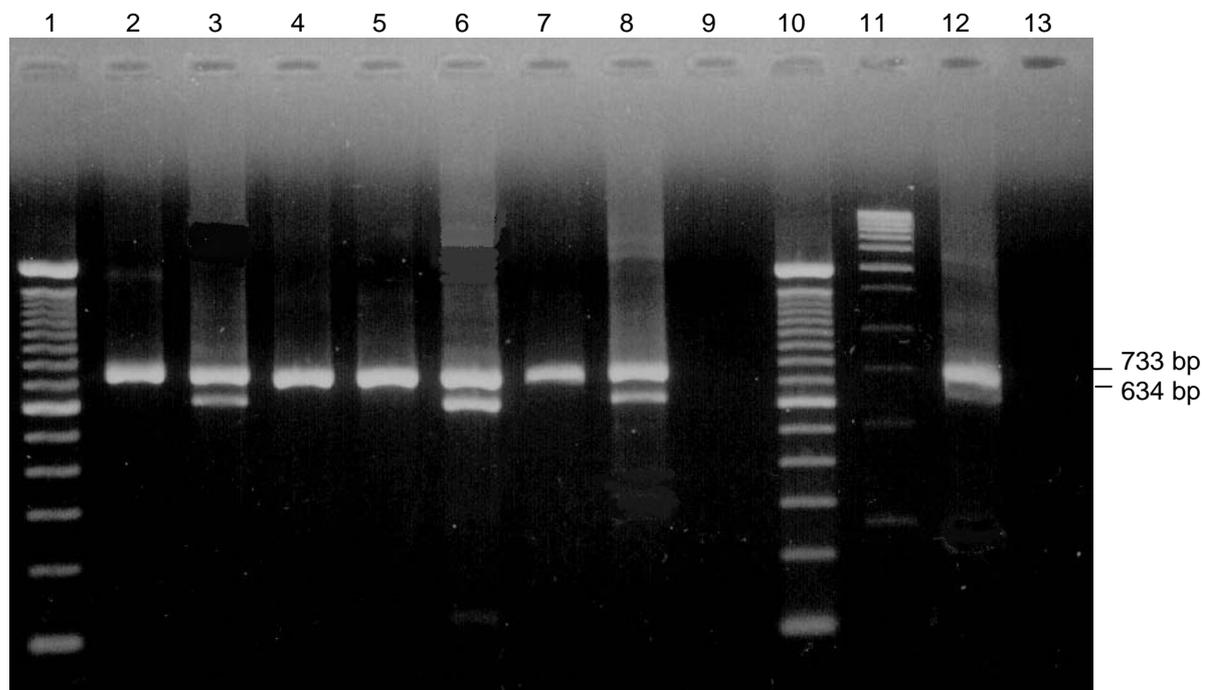


Abbildung 15: Ergebnisse cTnT

Spur 1: Längenmarker 100bp
Spur 2: Positivkontrolle Herz 3.7.
Spur 3: FBI 10 MD Duchenne
Spur 4: FBI 20 MD Duchenne
Spur 5: FBI 21 MD Duchenne
Spur 6: FBI 22 MD Duchenne
Spur 7: FBI 23 MD Duchenne

Spur 8: FBI 24 MD Duchenne
Spur 9: Negativkontrolle
Spur 10: Längenmarker 100bp
Spur 11: Längenmarker 250bp
Spur 12: FBI 8 pr. Sarkoglykanopathie
Spur 13: FBI 11 unauffällig

5.3.2 Restriktionsverdau cTnT

In **Tabelle 19** sind die erwarteten und die tatsächlichen Fragmentlängen für die Isoformen von cTnT sowie die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme aufgeschlüsselt. Ein Beispiel gibt **Abbildung 16**.

Die Schnittstellen der Enzyme sind in **Sequenz 2** unter Punkt **2.2.2** mit Symbolen eingezeichnet.

cTnT	Enzym	Fragmente(soll) = Fragmente(ist)
733:	Hinf I	3: 188,446,99
	Msp I	4: 277,147,96,213
634:	Hinf I	3: 215,320,99
	Msp I	3: 334, 96,204

Tabelle 19 : Fragmentlängen cTnT

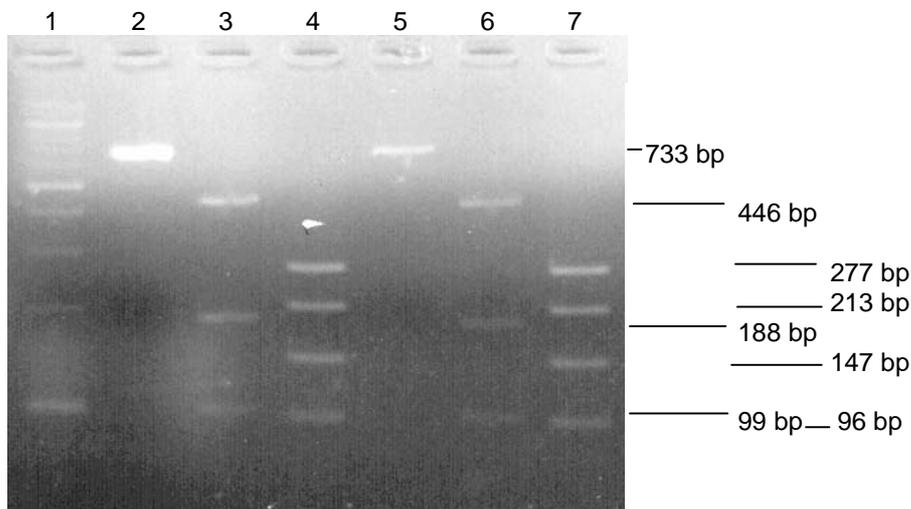


Abbildung 16 : Restriktionsverdau cTnT

Spur 1: Längenmarker 100bp
 Spur 2: Positivkontrolle Herz 3.7.
 Spur 3: Hinf I – Verdau
 Spur 4: Msp I – Verdau

Spur 5: FBI 23 MD Duchenne
 Spur 6: Hinf I – Verdau
 Spur 7: Msp I – Verdau

5.3.3 Ergebnisse für cTnI

In **Tabelle 20** sind die Ergebnisse der kardialen Isoform von Troponin I für alle Patienten aufgeführt und in **Abbildung 17** teilweise abgebildet.

Einteilung der Myopathien (2.3.1)	Diagnose	Herkunft	Nr.	cTnI
		Soll		581
	Kontrolle	Bein 16.12.		neg.
		Herz 23.1.		581
		Herz 3.7.		581
		M. Soleus		neg.
		SM. allg.		neg.
X-chromosomale Muskeldystrophien	MD Duchenne	FBI	10	581
		FBI	20	581
		FBI	21	Neg.
		FBI	22	581
		FBI	23	581
		FBI	24	581
	MD Becker	FBI	19	Neg.
rezessiv autosomale Muskeldystrophien	Gliedergürteldystrophie	N	4	Neg.
		FBI	16	Neg.
	Pr. Sarkoglykanopathie	FBI	8	Neg.
dominant autosomale Muskeldystrophien	FSH-Dystrophie	FBI	2	Neg.
		FBI	9	Neg.
	Distale Myopathie	FBI	4	Neg.
Muskelspeicherkrankheiten	McArdle Glykogenose	N	15	Neg.
	M. Pompe	FBI	6	Neg.
Dystrophia myotonica	Dystrophie	FBI	3	Neg.
Maligne Hyperthermie	Mal. Hyperthermie	N	2	Neg.
		N	5	Neg.
		N	7	Neg.
		N	11	Neg.
		N	12	Neg.

andere Muskelerkrankungen	Degen. Myopathie	FBI	15	Neg.
	Myopathie	FBI	13	Neg.
	familiäre unklare CK-Erhöpfung	N	9	Neg.
Proben ohne Befund	unauffällig	N	14	Neg.
		N	1	Neg.
		N	6	Neg.
		N	8	Neg.
		N	10	Neg.
		N	13	Neg.
		N	16	Neg.
		N	17	Neg.
		N	18	Neg.
		FBI	1	Neg.
		FBI	5	Neg.
		FBI	7	Neg.
		FBI	11	581
		FBI	12	Neg.
		FBI	14	Neg.
	FBI	17	Neg.	
unauffällig, neurogene Muskelatrophie	N	3	Neg.	

Tabelle 20: Ergebnisse für cTnI

In sechs Proben (14,3%) konnte cTnI nachgewiesen werden.

Neben den Proben, die sowohl cTnT als auch cTnI enthielten, wurde nur die mRNA von cTnI in einem Patienten gefunden, der zwar histologisch keine Myopathie hatte und folglich zu den Proben ohne Befund gerechnet wurde, aber klinisch typische Zeichen einer peripheren Myopathie aufwies (FBI 11).

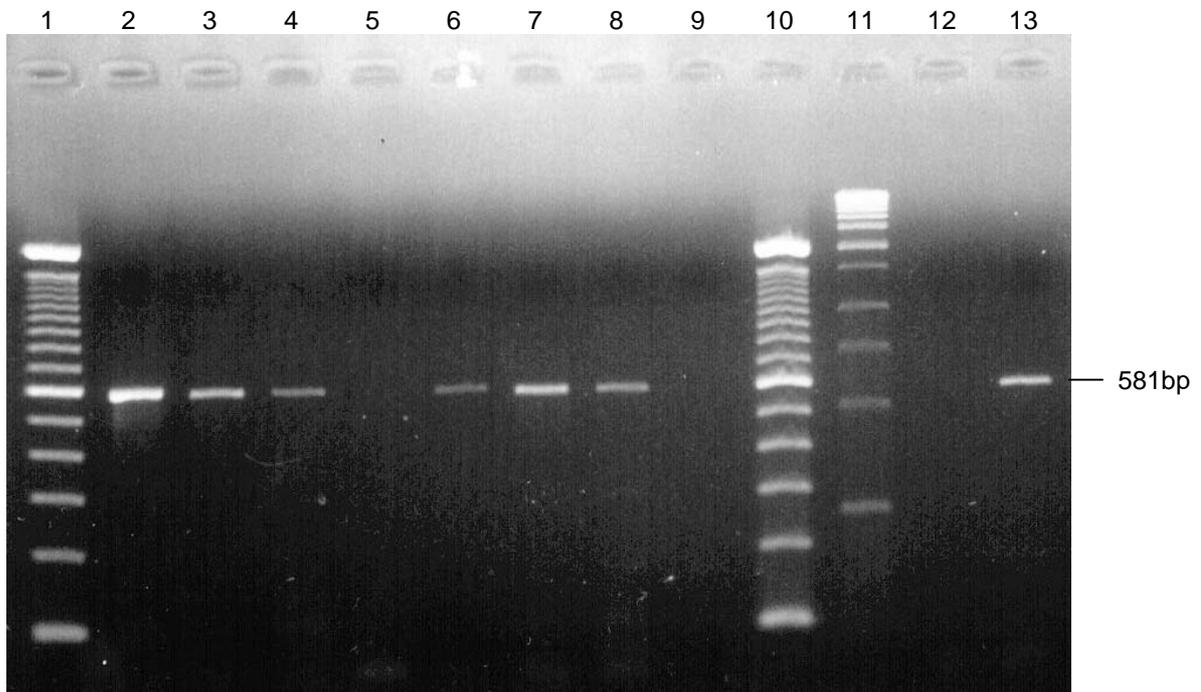


Abbildung 17: Ergebnisse cTnl

Spur 1: Längenmarker 100bp
 Spur 2: Positivkontrolle Herz 3.7.
 Spur 3: FBI 10 MD Duchenne
 Spur 4: FBI 20 MD Duchenne
 Spur 5: FBI 21 MD Duchenne
 Spur 6: FBI 22 MD Duchenne
 Spur 7: FBI 23 MD Duchenne

Spur 8: FBI 24 MD Duchenne
 Spur 9: Negativkontrolle
 Spur 10: Längenmarker 100bp
 Spur 11: Längenmarker 250bp
 Spur 12: FBI 8 pr. Sarkoglykanopathie
 Spur 13: FBI 11 unauffällig

5.3.4 Restriktionsverdau cTnl

In **Tabelle 21** sind die erwarteten und die tatsächlichen Fragmentlängen für die kardiale Isoform von Troponin I sowie die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme aufgeschlüsselt. Ein Beispiel gibt **Abbildung 18**. Die Restriktionsstellen der Enzyme sind an den Symbolen in **Sequenz 1** unter Punkt **2.2.1** zu erkennen.

cTnl	Enzym	Fragmente(soll)	=	Fragmente(ist)
	Hinf I			4: 83,234,109,155
	Msp I			4: 190,226,72,93
	Bsr I			2: 696,110

Tabelle 21 : Fragmentlängen cTnl

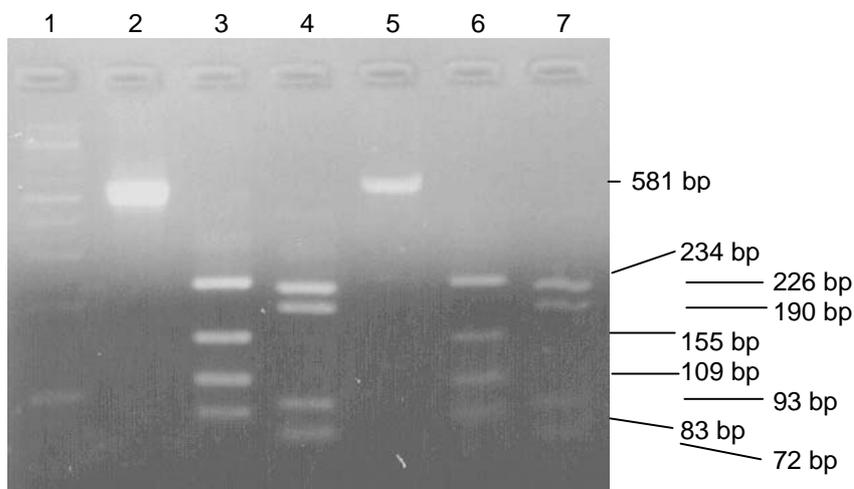


Abbildung 18 : Restriktionsverdau cTnl

Spur 1: Längenmarker 100bp
 Spur 2: Positivkontrolle Herz 3.7.
 Spur 3: Hinf I – Verdau
 Spur 4: Msp I – Verdau

Spur 5: FBI 23 MD Duchenne
 Spur 6: Hinf I – Verdau
 Spur 7: Msp I – Verdau

5.4 Serumproben

Die Messergebnisse der 18 Blutproben aus der Neurologischen Klinik sind in **Tabelle 22** nach Befunden geordnet dargestellt.

In 8 Seren zeigte sich eine CK-Erhöhung, die bei fünf Proben (N1, N6, N3, N12, N9) isoliert war. Bei zwei Patientenproben (N4 = Gliedergürteldystrophie, N15 = McArdle Glykogenose) wurden zusätzlich erhöhte CK-MB-Werte, erhöhte Myoglobin-Werte sowie leicht erhöhte, jedoch unter der diagnostischen Ent-

scheidungsgrenze liegende cTnT-Konzentrationen gemessen. Eine Probe (N2) wies neben einer CK-Erhöhung einen erhöhten Myoglobin-Wert auf. In einer Serumprobe (N18) wurden erhöhte Werte für Myoglobin sowie Kreatinin nachgewiesen.

Befund	Nr.	CK (U/l)	CK-MB-Akt (U/l)	CK-MB/CK	cTnT (µg/l)	cTnI (µg/l)	Myoglobin (µg/l)	Kreatinin (mg/dl)
unauffällig	14	44	nd*		<0,01	<0,03	<27,8	0,9
	1	98	nd*		<0,01	<0,03	44,5	1,1
	6	244	<8	<3,3%	<0,01	<0,03	<27,8	1,1
	8	78	nd*		<0,01	<0,03	<27,8	0,9
	10	37	nd*		<0,01	<0,03	<27,8	0,9
	13	34	nd*		<0,01	<0,03	<27,8	0,7
	16	44	nd*		<0,01	<0,03	<27,8	0,9
	17	28	nd*		<0,01	<0,03	<27,8	0,8
	18	36	nd*		<0,01	<0,03	190	14,5
unauffällig, neurogene Muskelatrophie	3	97	nd*		<0,01	<0,03	37,8	0,8
Mal. Hyperthermie	2	530	10	1,9%	<0,01	<0,03	72,5	1,1
	5	10	nd*		<0,01	<0,03	<27,8	1,1
	7	77	nd*		<0,01	<0,03	38,2	0,9
	11	45	nd*		<0,01	<0,03	<27,8	1,0
	12	284	<8	<2,8%	<0,01	<0,03	31,4	1,3
Gliedergürtel-dystrophie	4	431	14	3,2%	0,03	<0,03	205	0,6
McArdle Glykogenose	15	3457	34	0,98%	0,03	<0,03	116	1,0
familiäre unklare CK-Erhöhung	9	131	<8	<6,1%	<0,01	<0,03	35,9	1,1

* not done

Erhöhter Wert

Tabelle 22: Serumwerte

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die mögliche Expression der kardialen Isoformen von Troponin T und Troponin I in erkrankter Skelettmuskulatur untersucht werden.

6.1 Präanalytische Einflussfaktoren

Im folgenden werden zunächst die Faktoren diskutiert, welche die Qualität der Muskelbiopsien bzw. der daraus gewonnenen RNA beeinflussen können.

Die Muskelbiopsie dient der Gewinnung der Skelettmuskelzellen. Sie ist eine wichtige diagnostische Methode zur Abgrenzung einer Myopathie von einer Neuropathie, einer entzündlichen Myopathie von einer degenerativen Form und einer Muskeldystrophie von einer metabolischen Myopathie.

Bei der Biopsie ist die Wahl des richtigen Muskels von entscheidender Bedeutung (**23**): bei akuten Prozessen sollte ein stark betroffener Muskel gewählt werden, bei chronischen Myopathien dagegen ein nicht so stark betroffener, nur leicht paretischer Muskel, der noch im Stadium der Degeneration sein sollte und noch nicht in den Endzustand einer narbigen Fibrose (vollständig in Fett- und Bindegewebe) umgebaut ist. Auch sollte immer die für die entsprechende Krankheit typische Muskelgruppe biopsiert werden: progressive Muskeldystrophien treten meistens an den proximalen Muskeln auf, rein distal werden Veränderungen bei den sog. distalen Myopathien angetroffen (**123**). Bei proximal lokalisierten Prozessen sollten der M. quadriceps femoris, M. biceps brachii oder M. deltoideus biopsiert werden, bei distaler Manifestation der M. triceps surae, M. tibialis anterior oder der M. extensor carpi radialis. In einer Studie, in der die Expression von cTnT im Skelettmuskel auf mRNA und auf Proteinebene bei Patienten mit chronischem Nierenversagen untersucht wurde,

war die fehlende Expression in Rumpfmuskeln nicht aussagekräftig, da bei der urämischen Myopathie hauptsächlich die proximalen Extremitätenmuskeln betroffen sind (61).

Da uns die Biopsien von zwei erfahrenen Institutionen zur Verfügung gestellt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Patienten an den für die vermutete Krankheit richtigen (proximale bzw. distale Muskelgruppen) bzw. an klinisch betroffenen Muskeln biopsiert wurden. Bei etwa der Hälfte der Proben war die genaue Biopsiestelle nicht bekannt. Bei den anderen Proben (Tabelle 5) stimmt die Lokalisation mit den theoretisch am stärksten befallenen Muskelgruppen überein:

Dystrophia myotonica:	M. tibialis anterior = distal
M. Pompe:	M. rectus femoris = proximal
FSH-Dystrophie:	M. deltoideus bzw. M. biceps brachii = proximal
Gliedergürteldystrophie:	M. vastus lateralis = proximal
Sarkoglykanopathie:	M. vastus lateralis = proximal
MD Duchenne	M. tibialis anterior = distal
MD Becker	M. gastrocnemius = distal,

wobei bei den beiden letztgenannten Muskeldystrophien das Leiden in der Beckengürtelmuskulatur proximal beginnt und dann nach distal fortschreitet. In diesen Fällen waren bereits distale Muskeln betroffen, wobei der Grad des Ausbreitens nach distal variierte.

Die folgende Biopsiestelle entspricht nicht der im Lehrbuch vorgeschlagenen, aber vermutlich der klinisch am meisten betroffenen Muskelgruppe. Dies wird durch den positiven morphologischen Befund bestätigt:

Distale Myopathie:	M. vastus medialis = proximal statt distal
--------------------	--------------------------------------------

Die meisten untersuchten Muskelproben bestanden sowohl aus schnellen als auch aus langsamen Muskelfasern. Eine Mischung ist nicht ungewöhnlich. Der M. quadriceps femoris z. B. setzt sich aus jeweils 50% langsamen und schnellen Fasern zusammen. Zudem sind auch in langsamen Muskeln die zu den „fast-twitch“ gehörigen Typ-2A Fasern zu finden (121). Unsere Kontrolle für die

langsamen Muskelfasern (M. soleus) beinhaltete dagegen keine schnellen Muskelfasern. Drei der Proben, von denen die Biopsiestelle nicht bekannt war, wiesen nur die fast-twitch Isoformen auf.

Bei den untersuchten Muskelproben waren große Unterschiede in der Menge und der Qualität der Proben zu bemerken. In manchen Biopsien war der Muskel noch mit Fett und Bindegewebsfasern versetzt, die schwer abzupräparieren waren. Ebenso schwierig war bei den Proben des Friedrich-Baur-Institutes die Trennung von einem Klebstoff, der bei der Aufbewahrung zur Fixation an die identifizierende Korkplatte diente. So standen bei der RNA-Isolierung unterschiedliche Mengen unterschiedlicher Qualität zur Verfügung (siehe **Tabelle 15**). Bei molekularbiologischen Techniken wie der PCR ist die Qualität als wichtiger zu erachten als die Quantität. Die Qualität der extrahierten RNA kann jedoch einfach mittels Spektrophotometrie ermittelt werden. Der Quotient OD_{260} / OD_{280} steht für die Qualität der RNA und variierte in den hier untersuchten Biopsaten von 0,98 bis 1,45, wobei die Extinktion bei 260nm die RNA-Menge bestimmt, und die Extinktion bei 280nm die Proteinmenge misst. Die Quantität wird durch die Konzentration in $[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$ ausgedrückt, die zwischen $0,75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und $1,40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ lag. Unterschiedliche Konzentrationen der gewonnenen cDNA wurden durch die unterschiedliche Menge an eingesetzter RNA bei der reversen Transkription ausgeglichen.

Nach der Biopsie spielten Lagerung und Transport für die Qualität der gewonnenen Probe eine Rolle.

Eine Unterbrechung der Kühlkette während der Lagerung bzw. des Transportes, die zeitliche Dauer der Lagerung oder die Kontamination mit RNAsen können zu einer Degradation der empfindlichen RNA führen.

In manchen Proben fanden sich negative Ergebnisse, kleinere Banden oder auch die erwarteten Banden für die Skelettmuskelisofomen der Troponine zusammen

mit kleineren Bruchstücken. Diese wiesen meist Längen zwischen 100 und 280bp auf und könnten Abbauprodukte der RNA darstellen.

In einer früheren Studie konnte in etwa 80% der normalen und erkrankten Muskelproben nach einer SDS-Gel-Elektrophorese ein kleineres Fragment des Troponin T gefunden werden. Dies wurde ebenfalls als Degradationsprodukt der myofibrillären Proteine und nicht als eine spezielle Proteinform gedeutet (78). Auch Troponin I ist sehr anfällig für Proteolyse. In nekrotischem Gewebe und im Serum wurden proteolytische Peptide unterschiedlicher Stabilität gefunden (76).

Die ältesten untersuchten Biopsien stammten aus dem Jahr 1996 (FBI 1 – FBI 6, FBI 16 – FBI 19), lagerten also maximal zwei Jahre bis zur Aufarbeitung 1998. Die Proben aus der Neurologischen Klinik dagegen wurden sofort (bis maximal eine Woche nach Entnahme) weiterverarbeitet. In den Proben von 1996 traten vermehrt kleinere Fragmente auf. Alle Proben mit kleineren Banden ohne entsprechende Isoform aus dem Friedrich-Baur-Institut stammen aus dieser Gruppe. Möglicherweise spielt also die Lagerungsdauer eine Rolle.

Denkbar ist auch, dass bei manchen Erkrankungen kleinere Isoformen gefunden werden können. So gibt es z. B. bei der familiären hypertrophen Kardiomyopathie unterschiedliche Isoformen des cTnT in der Herzmuskulatur (132).

Zuletzt kann auch die Aufarbeitung der Proben deren Qualität beeinflussen. Während der PCR können theoretisch unspezifische Amplifikationen durch Kontaminationen oder aufgrund nicht optimaler PCR-Bedingungen auftreten, auch wenn diese zum großen Teil durch sauberes Arbeiten und Vorversuche vermieden wurden.

6.2 Skelettmuskelisoformen

Wie unter dem Kapitel Ergebnisse **5.1** dargestellt, konnten in den meisten untersuchten Skelettmuskelbiopsien die erwarteten Banden für die schnellen und langsamen skelettalen Isoformen von Troponin T und Troponin I gefunden werden. Mit Hilfe des Restriktionsverdau wurden die gefundenen Banden verifiziert. Restriktionsenzyme spalten DNA an definierten Stellen und es entstehen für dieses Enzym spezifische Fragmentlängen der DNA (siehe **Tabelle 21** und Sequenzen unter **2.2**). Teilweise wurden andere als die erwarteten Fragmente nachgewiesen. So wurden für die Isoform SMTnTf in den unauffälligen Proben N1 und N2 für das Enzym Msp I drei andere Fragmente gefunden. In der Probe N18 und in einer Herzprobe wurden für SMTnIs mit dem Enzym Hph I nicht die erwarteten Banden nachgewiesen, sondern vier Fragmente, die zusammen die richtige Summe bildeten. Da die Gesamtlänge der Sequenz der Isoform entsprach und für die anderen Restriktionsenzyme die erwarteten Teillängen gefunden wurden, lässt sich vermuten, dass nur wenige Basen ausgetauscht sind. Diese Punktmutationen betreffen genau die entsprechenden Schnittstellen, dürften aber für die Funktion der so veränderten Isoformen keine Folgen haben.

Auch in den acht Biopsien, in denen kardiale Isoformen nachgewiesen werden konnten, wurden die erwarteten Skelettmuskelisoformen nachgewiesen. Dies zeigt einerseits, dass die Muskelbiopsien ohne Unterbrechung der Kühlkette gelagert wurden und bei der Aufarbeitung keine Fehler auftraten. Andererseits bedeutet es, dass verletzter bzw. sich regenerierender Skelettmuskel seine gewebsspezifischen Isoformen immer noch exprimiert, unabhängig einer eventuell auftretenden zusätzlichen Expression anderer Isoformen. Dies konnte auch von einer anderen Arbeitsgruppe durch Messung von SMTnIf bei Duchenne'scher Muskeldystrophie und Polymyositis nachgewiesen werden (**131**).

Die fast-twitch wie auch die slow-twitch Isoformen von Troponin T und I wurden auch in einer Herzprobe gefunden. Dies hat vermutlich seine Ursache in der Probenqualität. Möglicherweise wurde die Biopsie mit Skelettmuskelanteilen (interkostale Muskulatur) intraoperativ „verunreinigt“.

6.3 Kardiale Isoformen

Die Ergebnisse zeigen, dass es mit der höchst sensitiven Technik der rt-PCR möglich ist, mRNA der kardialen Isoformen von Troponin T und I im quer-gestreiften Skelettmuskel von Patienten mit Myopathien nachzuweisen. Dies ist nicht auf cTnT beschränkt, sondern kann auch für cTnI gezeigt werden, sogar wenn cTnT selbst nicht exprimiert wird.

Die Banden beider kardialer Isoformen wurden in den Biopsien von fünf Patienten mit Duchenne'scher Muskeldystrophie gefunden. Die mRNA von cTnT konnte bei einem Patienten mit primärer Sarkoglykanopathie und bei einem weiteren Patienten mit Duchenne'scher Dystrophie nachgewiesen werden. Die mRNA von cTnI allein war bei einem Patienten vorhanden, der zwar klinische Beschwerden hatte, aber keine histologisch nachweisbare Myopathie.

In der Positivkontrolle für Skelettmuskelisoformen waren keine Herzisoformen nachzuweisen. Dies zeigt, dass die kardialen Isoformen von Troponin T und Troponin I nicht im gesunden Skelettmuskel exprimiert werden.

Die positiven Kontrollproben für die kardialen Isoformen stammten von Biopsien bei Operationen am offenen Herzen. Eine Probe stammte aus dem Herzohr, bei der anderen Probe ist nicht bekannt, ob sie aus dem Vorhof oder dem Ventrikel stammt. Möglicherweise gibt es jedoch Unterschiede in der Expression. Für cTnT konnte gezeigt werden, dass es im fetalen Herzen im Atrium stärker exprimiert

wird als im Ventrikel, während es im erwachsenen Herzen umgekehrt im Ventrikel in einer höheren Konzentration exprimiert wird als im Atrium (99).

6.3.1 cTnT

cTnT wird nicht nur bei Patienten mit einer klinisch nachweisbaren Herzmuskelschädigung erhöht gemessen (86). Erhöhte Werte für cTnT wurden in mehreren Studien auch bei anderen Erkrankungen, bei denen nicht primär an eine Herzmuskelschädigung gedacht wird, beschrieben: bei verschiedenen Skelettmuskelerkrankungen (78, 29), z. B. bei Duchenne'scher Muskeldystrophie (112), Polymyositis, Dermatomyositis (84), bei Verletzungen der Skelettmuskulatur (79, 91), bei Patienten mit Rhabdomyolyse (89) oder Sklerodermie (15), und in bis zu 40% bei chronischem Nierenversagen (36, 77, 85, 61, 105, 18), besonders bei Diabetes mellitus (86).

Dieser cTnT-Nachweis bei Patienten ohne klinischen Hinweis auf eine Herzmuskelschädigung wurde mit verschiedenen Erklärungsansätzen begründet:

- Kreuzreaktivität der Antikörper im eingesetzten Immunoassay
- Freisetzung aus dem Herzen infolge von Schädigungen der Herzmuskulatur, die mit den bisherigen Methoden nicht nachweisbar sind
- Reexpression der kardialen Isoformen im myopathisch veränderten Skelettmuskel

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass mit einem modifizierten Zweitgenerationsassay, der zwei monoklonale anti-cTnT-Antikörper zum Nachweis einsetzt, ohne nennenswerte Kreuzreaktivität (< 0,001%) erhöhte Serumwerte für cTnT bei Patienten mit Nierenversagen oder mit Duchenne'scher Muskeldystrophie nachweisbar sind, was gegen eine „unspezifische“ Erhöhung spricht (102, 16, 116).

Eine kardiale Freisetzung ist bei den hier untersuchten Patienten mit Muskeldystrophie sehr unwahrscheinlich (**123, 71**). Im Gegensatz dazu ist bei Patienten mit Nierenversagen ein kardialer Ursprung auf Grund einer urämischen Kardiomyositis oder des hämodynamischen Stresses bei chronischer Dialyse wahrscheinlich (**116, 77, 61**).

Isoformen von Proteinen und Enzymen, die während der fetalen Entwicklung im Skelettmuskel exprimiert werden und deren Expression nach Abschluss der Ontogenese reprimiert wird, werden nach Verletzung des Muskels beim erwachsenen Organismus oft unspezifisch reexprimiert, wie es für CK/CK-MB (**73**), LDH, die Myosin Leichtkette (**2**) und Myoglobin (**59**) bereits gezeigt wurde. Im folgenden wird beispielhaft die Expression der CK/CK-MB beschrieben:

Während der fetalen Entwicklung dominiert die B-Untereinheit im Skelettmuskel. Sie wird während der Ontogenese unterdrückt, während nach der Geburt das Gen der M-Untereinheit verstärkt aktiviert und exprimiert wird. Die B-Untereinheit existiert im erwachsenen Skelettmuskel nur noch in geringen Mengen im Isoenzym CK-MB, und – zumindest in der Ratte – in geringster Menge im Isoenzym CK-BB (**83**). Prädominant ist jedoch jeweils die Isoform CK-MM. Nach einer Verletzung des Muskels oder einer Denervierung (**95**) wird das Gen der B-Untereinheit verstärkt reexprimiert und die B-Ketten werden wieder vermehrt synthetisiert, da diese Untereinheit vom energetischen Standpunkt aus günstiger zu bewerten ist (**11**). Bei verschiedenen Muskelerkrankungen ist deshalb die CK-MB (absolut und proportional) konstant erhöht (**23, 82**). Auch in chronisch beanspruchter Muskulatur bei Leistungssportlern ist die CK-MB erhöht. Hierbei nähert sich das Enzymmuster dem des Herzens an (**11**).

In mehreren Studien wurden im Tiermodell ähnliche Expressionsmuster beschrieben. So wird z. B. im quergestreiften Skelettmuskel der Maus neben dem Skelettaktin auch das Herzaktin als Herzmuskelbestandteil coexprimiert (**4**).

In Ratten und in Hühnchen (**136**) dedifferenzieren erkrankte oder regenerierende Skelettmuskelzellen zu fetalen Muskeltypen und reexprimieren kardiale Moleküle wie die Myosin Schwereketten bei der Ratte oder die Myosin Leichtketten beim Hühnchen.

Auch für Troponin T wurde eine Reexpression beim Tier bereits belegt. In der Ratte wird das cTnT bei Schäden des Skelettmuskels in sich regenerierenden Fasern reexprimiert (**120**).

Neben diesem Nachweis einer Reexpression der kardialen Isoform von Troponin T in verletztem Skelettmuskel beim Tier sprechen beim Menschen die Parallelen zwischen CK-MB und cTnT ebenfalls dafür.

Beim Menschen wird cTnT genauso wie die oben angeführten kontraktilen Isopeptide in allen quergestreiften Muskeln, d.h. sowohl im Herz- als auch im embryonalen Skelettmuskel als erste Isoform exprimiert (**38, 99**). Es ist die Isoform, die sich energetisch günstiger als die Skelettmuskelisoformen verhält, da sie eine höhere Calcium-Sensitivität hat (**96**).

Das Gen, das die kardiale Isoform des Troponin T kodiert, wird während den frühen Stadien der Skelettmuskelentwicklung vorübergehend exprimiert, bevor es während der Fetogenese unterdrückt wird. Dies geschieht zum gleichen Zeitpunkt, an dem seine Expression im Herzmuskel stark erhöht wird. Gleichzeitig werden als Ausgleich die Gene anderer kontraktiler Proteine im Skelettmuskel verstärkt exprimiert. In beiden Muskeltypen wird die Transkription des cTnT-Gens unterschiedlich reguliert (**38, 37**). Es wird vermutet, dass die embryonale Expression von mononukleären Myoblasten ausgeht, die im Muskel in den frühen Entwicklungsstadien prädominieren. Eine kleine Subpopulation dieser mononukleären embryonalen Satellitenzellen (= undifferenzierte Muskelzellen, die sich an das embryonale Programm erinnern) bleiben möglicherweise im erwachsenen Muskel bestehen, können wie Myoblasten proliferieren und bilden so authentische Myofibrillen mit entsprechender embryonaler Gen-

expression (**108**). Bei dem oben erläuterten ähnlichen Mechanismus der CK/CK-MB wird die BB-Isoform ebenfalls von Myoblasten gebildet, die aus Satellitenzellen hervorgehen (**83**).

Auch bei chronischem Nierenversagen wurde eine Reexpression von cTnT diskutiert, da sich eine begleitende generalisierte milde Myopathie, auch urämische Polyneuropathie genannt, entwickelt (**22, 143**). In einer Studie wurde dies bestätigt: trotz nicht erhöhter Serumwerte für cTnT und cTnI wurde mit Hilfe der Westernblot Technik in vier von fünf Patienten mit Nierenversagen und Dialyse eine Expression einer cTnT Isoform nachgewiesen, während cTnI nicht exprimiert wurde (**97**). Eine weitere Studie (**116**) wies ebenfalls verschiedene cTnT-Isoformen in der Skelettmuskulatur chronisch Nierenkranker mit Hilfe der Westernblottechnik nach. In einer anderen Studie wurde dies jedoch durch den fehlenden Nachweis sowohl der mRNA als auch des Proteins im Skelettmuskel bei chronischem Nierenversagen angezweifelt (**61**). Insgesamt scheint die Erhöhung von cTnT bei Patienten mit chronischem Nierenversagen jedoch nicht durch eine Reexpression in der Skelettmuskulatur bedingt zu sein. Klinische Studien zeigen eher, dass die hämodynamische Belastung des Herzens durch die chronische Dialyse bzw. die urämische Schädigung des Herzens zu einer kardialen Freisetzung des cTnT führt (**116, 77, 61**).

6.3.2 cTnI

cTnI wurde im Vergleich zu cTnT immer als ein höchst herzspezifischer Marker betrachtet, der im Skelettmuskel sowohl beim Hühnchen und der Ratte, als auch beim Menschen nie exprimiert wird (**25**), weder während der Ontogenese, noch nach einer Verletzung des Skelettmuskels (**112, 20, 131, 133**) oder während seiner Regeneration (**3, 100**), nicht bei Skelettmuskelerkrankungen wie Duchenne'scher Muskeldystrophie oder Polymyositis (**25, 115**), und auch nicht bei chronischem Nierenversagen (**97, 68, 137, 112, 143**).

cTnI wird während der Embryonalentwicklung nur im Myokard produziert. Zu dieser Zeit synthetisiert z.B. der Herzmuskel des Hühnchens eine embryonale Form des cTnI, die sich von der adulten Form unterscheidet, sowie zusätzlich noch die Skelettmuskelform des Troponin I (136). Das fetale menschliche cTnI im Herzen entspricht der ontogenetisch älteren slow-twitch Skelettmuskelisoform des Troponin I bis zu dem Switch des smTnIs zur erwachsenen Form des cTnI (60, 72).

Im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, dass cTnI im Skelettmuskel nie als Antwort auf einen pathologischen Stimulus exprimiert werden kann (2, 97, 89), konnte hier seine Expression in chronischen Myopathien nachgewiesen werden. Die Expression von cTnI muss auf Grund der fehlenden fetalen Expression nach einem anderen Mechanismus als die Reexpression von cTnT funktionieren. Die für die erstmalige Stimulation des Gens nötigen Regulationsmechanismen und Enhancer sind noch unbekannt. Dennoch müssen ähnliche Auslöser für die Expression von cTnT und cTnI vorliegen, da meistens beide Isoformen gleichzeitig exprimiert werden.

Die mRNA von cTnI allein war bei nur einem Patienten vorhanden, der zwar klinische Beschwerden hatte, aber keine histologisch nachweisbare Myopathie. Dass in dieser Probe, die histologisch negativ war, die kardiale Form des Troponin I gefunden wurde, kann unterschiedliche Gründe haben:

Es kann darin begründet sein, dass dieser Patient klinische Beschwerden und eine Myopathie hatte, die auf Grund schlechter Wahl des Biopsiezeitpunktes oder -ortes nicht diagnostiziert wurde. Möglicherweise stammte der Schnitt für die histologische Befundung von einem unauffälligen Muskel, während unsere Biopsie betroffen war.

Vielleicht wurde cTnI in einem gesunden Muskel nachgewiesen. Kardiales Troponin könnte auch in gesundem Muskel vorhanden sein, genauso wie CK-MB und CK-BB in manchen Muskeln wie dem Zwerchfell oder der Zunge in höherer Konzentration vorhanden sind (74). Es wurde bereits die immunhistologische Detektion von cTnT im gesunden Muskel wie dem Zwerchfell beschrieben (26).

Theoretisch ist es auch möglich, dass dieses Ergebnis ein falsch positives Ergebnis darstellt. Dies ist aber unwahrscheinlich, da unspezifische, falsch positive Banden eher nicht die Länge der erwarteten Isoformen hätten. Zudem konnte in allen Negativkontrollen sowie allen anderen Patienten, bei denen klinisch und histologisch eine primäre Myopathie ausgeschlossen wurde, keine cTnI-Expression nachgewiesen werden. Auch eine cTnT-Expression wurde weder in den Negativkontrollen, noch in den unauffälligen Biopsien beobachtet.

6.3.3 cTnT/cTnI-Expression bei Muskeldystrophie Typ Duchenne

cTnT konnte in allen Proben von Patienten mit Duchenne'scher Muskeldystrophie nachgewiesen werden. Auch cTnI war in fünf der sechs Patienten dieser Diagnosengruppe nachweisbar.

Auffälligerweise wurden in drei Proben mit Duchenne'scher Muskeldystrophie (FBI 10, FBI 22, FBI 24) zwei Formen von Troponin T, nämlich die im adulten Herzmuskel prädominante Isoform cTnT3 mit 733bp und die im fetalen und im erkrankten erwachsenen Herzen exprimierte Isoform cTnT4 mit 634bp gefunden (**5**, siehe **Sequenz 2**). In den anderen drei Proben mit Duchenne'scher Muskeldystrophie (FBI 20, FBI 21, FBI 23) konnte hingegen nur das adulte cTnT3 nachgewiesen werden. Im erkrankten Skelettmuskel scheint die normale adulte Herzisoform eher exprimiert zu werden als die fetale Isoform. Dies steht im Gegensatz zur Expression im fetalen Skelettmuskel, in dem die fetale Herzisoform stärker exprimiert wird als die adulte Herzisoform (**34**).

Die Isoform cTnT4 wird auch im Myokard bei schwerem angeborenen Herzschaden vermehrt exprimiert (**118**). Dabei ist die cTnT4 Expression im Herzen proportional zur Schwere der Erkrankung (**118**). Eine der cTnT4 ähnliche Isoform beim Rind hat eine erhöhte Sensitivität der ATPase gegenüber Calcium,

so dass die vermehrte Expression von cTnT4 eine Adaptation an veränderte Bedingungen darstellt (118). Bei Duchenne-Patienten besteht eine interindividuelle Variationsfähigkeit der adaptativen Kapazitäten. Bei ähnlichen Fehlern des Dystrophingenes kommen unterschiedlich schwere Krankheitsformen zustande, da die anderen Komponenten des Muskelsystems unterschiedlich stark adaptieren (4). So könnte durchaus ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Expression der Isoformen und der individuellen Adaptation an den Dystrophin-Defekt bzw. der Schwere der Krankheit bestehen.

Eine andere Erklärung wäre eine Analogie zum Expressionsverhalten der CK-MB oder MLC-1 (cardiale Form der Myosin-Leichtkette 1), die in sich regenerierenden, aber nicht in intakten normalen oder schon degenerierten Skelettmuskelfasern enthalten sind (45). Es wäre z. B. immunhistochemisch nachzuprüfen, ob Troponin nur in sich regenerierenden Fasern – und dies proportional zum Grad der Regeneration - nachzuweisen ist, oder im Gegensatz dazu in degenerativen Fasern. Mit immunhistochemischen Methoden konnte cTnT bereits bei Patienten mit Polymyositis und Duchenne'scher Muskeldystrophie in der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden. Hierbei variierte die Expressionsdichte und nicht alle Myofibrillen waren positiv (26).

Möglicherweise steht die Expression der verschiedenen Isoformen im Zusammenhang mit dem Alter der Patienten. Die Patienten mit Expression beider kardialer Isoformen sind jünger (1, 4 und 5 Jahre) als die Patienten, bei denen nur die cTnT3 Isoform exprimiert wird (4, 7 und 7 Jahre). Auch das typische CK-Isoenzymmuster des Erwachsenen stellt sich erst mit vier Jahren ein. Bei Kindern bis 2 Jahre mit Kardiomyopathie ist im Herzmuskel noch die embryonale slow-twitch Skelettmuskelisiform des Troponin I statt der adulten kardialen Form vorhanden (72).

Da die Zahl der Duchenne-Proben nicht allzu groß ist, kann hier keine allgemeine Aussage getroffen werden. Die schon früher aufgeworfene Frage, ob die adulte oder die fetale Herzisoform von Troponin T im regenerierenden

Skelettmuskel reexprimiert wird (47, 34), kann nicht endgültig beantwortet werden.

Da der Verdacht auf eine Duchenne'sche Muskeldystrophie vor allem im Frühstadium mit Hilfe der bis zu 50fach erhöhten CK-Werte diagnostiziert wird, stellt sich die Frage, ob cTnT bzw. cTnI auch zur molekularen Diagnosefindung beitragen können. Die Mutationen (zu 60% Deletionen) im Dystrophingen lassen sich mit der PCR-Technik bzw. der cDNA Hybridisierung bereits nachweisen (71). Interessant wäre auch die Möglichkeit, klinisch unauffällige Konduktorinnen zu detektieren, die nur zu 70% mit Hilfe der CK erfasst werden können. Bei 30% sind Biopsie oder aufwendige Stammbaumanalysen nötig (123).

Die kardialen Isoformen von cTnT wurden auch bei dem untersuchten Patienten mit primärer Sarkoglykanopathie gefunden (siehe 2.3.4.2.2).

Die Tatsache, dass bei dem 39jährigen Patienten beide Formen cTnT3 und cTnT4 exprimiert werden, spricht gegen die Vermutung der Altersabhängigkeit und für die Theorie, dass die unterschiedliche Expression der cTnT-Isoformen in der unterschiedlichen Schwere des Muskelbefalls bzw. der individuellen Adaptation begründet ist.

Den Dystrophino- und Sarkoglykanopathien ist gemeinsam, dass sie primär durch einen Mangel von Strukturproteinen im Dystrophinglykoproteinkomplex (DGK) bedingt sind (71). Beide Krankheitsformen werden sekundär von einem Mangel des jeweils anderen Proteins des DGK gefolgt. Möglicherweise führen diese Veränderungen der Strukturproteine direkt zu Veränderungen der Troponinexpression.

Bei dem Patienten mit Becker-Dystrophie, der zweiten untersuchten X-chromosomal vererbten Muskeldystrophie, und in den anderen Myopathien, bei denen im Serum erhöhte CK-Werte gemessen werden konnten, wurden keine kardialen Isoformen von Troponin T bzw. I gefunden. Dies könnte in dem mildereren Verlauf dieser Myopathien, die in den morphologischen Befunden meist

als „quantitativ nur leicht ausgeprägte Myopathie“ bezeichnet wurden, begründet sein. Die Expression scheint also auch abhängig vom Typ der Myopathie.

Bei den Myopathien, bei denen im Verlauf der Erkrankung eine Herzbeteiligung häufig ist, nämlich bei McArdle Glykogenose, M. Pompe und Dystrophia myotonica, konnte weder cTnT noch cTnI in den Biopsien nachgewiesen werden. Somit scheinen diese Untersuchungen zu zeigen, dass die kardialen Troponine im Rahmen der bei diesen Patienten häufigen kardialen Beteiligungen spezifisch eine Freisetzung aus dem Myokard anzeigen und für diese Diagnostik einsetzbar sind.

6.4 Nachweis kardialer Troponine im Serum

In den 18 Seren der Patienten der Neurologischen Klinik konnte in keinem Fall eine über der diagnostischen Entscheidungsgrenze nachweisbare Troponinkonzentration gemessen werden (siehe **Tabelle 22**). Dennoch waren in einigen Seren andere Leitmarker einer Muskelschädigung wie CK und Myoglobin nachweisbar. Diese erhöhten Serumwerte sind bei diesen Patienten auf ihre zu Grunde liegende Myopathie zurückzuführen (**23, 71, 82**). Bei einem Patienten ohne Myopathie waren die erhöhten Myoglobinwerte durch die bestehende Niereninsuffizienz verursacht, da dabei die renale Elimination des Myoglobins gestört ist und es zu einer Akkumulierung im Blut kommt.

Serumproben der untersuchten Patienten mit Duchenne'scher Muskeldystrophie aus dem Friedrich-Baur-Institut konnten nicht gewonnen werden. Somit kann nicht sicher dargelegt werden, ob nicht nur eine Transkription in mRNA stattfindet, sondern auch eine Translation in das Protein. Für eine Translation sprechen allerdings Befunde, die zeigen, dass auch mit dem spezifischen Zweigenerationsassay für cTnT in fast allen Seren von Patienten mit Duchenne'scher Muskeldystrophie cTnT nachweisbar ist (**16, 102, 116**). Es wurden bei Patienten

mit Duchenne'scher Muskeldystrophie erhöhte Werte für cTnT (112) sowie erhöhte Werte für cTnI (2), aber auch normale Werte für cTnI (25) beschrieben. Diese Widersprüchlichkeit kann mit verschiedenen Erklärungsansätzen gelöst werden. Bei erhöhten cTnI-Werten war eine kardiale Ursache nicht immer ausgeschlossen (2, 92). Möglicherweise findet aber bei cTnI eine Degradation (75, 126) oder aufgrund seines niedrigeren Molekulargewichts eine schnellere Elimination statt (54). Oder es wird nach seiner Komplexbildung mit Troponin C von den zur Verfügung stehenden Assays (33) nicht erkannt (55, 105, 75, 33, 96, 10, 76).

Neuere Studien deuten darauf hin, dass sogar bei Überträgern der Duchenne'schen Muskeldystrophie und der Becker-Dystrophie die Werte von cTnT in bis zu 50 % und seltener die Werte von cTnI erhöht sind (70, 66).

7 Zusammenfassung

Der Troponinkomplex aus den Untereinheiten T, I und C bildet einen Teil der kontraktiven Struktur der Skelett- und Herzmuskelzelle. Von Troponin T und Troponin I existieren jeweils drei Isoformen: die fast-twitch und die slow-twitch Isoform im Skelettmuskel sowie die kardiale Isoform im Herzmuskel. Die kardialen Isoformen können zur Diagnostik ischämischer Myokardschäden verwendet werden. Hierbei sind sie den bisher eingesetzten kardialen Markern wie CK-MB oder Myoglobin an Sensitivität und Spezifität deutlich überlegen.

Bei Patienten mit Myopathien oder chronischem Nierenversagen scheinen jedoch unspezifische Erhöhungen vor allem für cTnT nachweisbar zu sein.

Es werden verschiedene Theorien diskutiert:

- Kreuzreaktivität der Antikörper in den eingesetzten Immunoassays mit Skelettmuskel TnT
- Freisetzung aus dem Herzen, wobei auf Grund der sehr hohen diagnostischen Sensitivität und Spezifität alle anderen diagnostischen Möglichkeiten einen Myokardschaden noch nicht erfassen
- Reexpression der während der Fetalzeit im Skelettmuskel exprimierten und später reprimierten Isoform cTnT im myopathischen Skelettmuskel, wie im Tiermodell beobachtet.

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung des dritten Erklärungsansatzes bei Patienten mit Myopathie. Zu diesem Zweck wurde die mRNA-Expression der kardialen Isoformen von Troponin T und Troponin I in myopathischer Skelettmuskulatur mit der höchst sensitiven Technik der nested rt-PCR untersucht.

Insgesamt wurden 42 Biopsien von Patienten mit Verdacht auf Myopathie untersucht: sechs Patienten mit Duchenne'scher Muskeldystrophie, ein Patient mit Becker-Dystrophie, zwei mit Gliedergürteldystrophie, ein Patient mit primärer Sarkoglykanopathie, zwei mit Fazio-skapulo-humeraler Muskeldystrophie, ein Patient mit distaler Myopathie, einer mit degenerativer Myopathie, einer mit Myopathie, einer mit familiärer unklarer CK-Erhöhung, einer mit McArdlescher Glykogenose, ein Patient mit M. Pompe, einer mit Dystrophie, fünf Patienten mit maligner Hyperthermie, sowie 17 Patienten, deren Biopsien histologisch unauffällig waren. Als Positivkontrolle diente Gewebe aus dem Herzen.

Nach Isolation der mRNA wurde sie in cDNA umgeschrieben und diese mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern in einer nested PCR amplifiziert. Die daraus entstehenden Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und einem Restriktionsverdau zugeführt.

Bei allen sechs Patienten mit Duchenne'scher Muskeldystrophie und dem Patienten mit primärer Sarkoglykanopathie konnte im quergestreiften Skelettmuskel die mRNA der kardialen Isoform von Troponin T nachgewiesen werden. Bei fünf der sechs Patienten mit Duchenne'scher Muskeldystrophie sowie einem Patienten mit histologisch unauffälligem Befund konnte die mRNA der kardialen Isoform von Troponin I nachgewiesen werden.

Insgesamt scheint es bei bestimmten primären Myopathien zu einer regelmäßigen Expression von cTnT und/oder cTnI in der erkrankten Skelettmuskulatur zu kommen. Ob jedoch eine Translation in das Protein stattfindet, lässt sich hier nicht eindeutig klären. Allerdings zeigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, dass eine Translation nicht unwahrscheinlich ist.

8 Literaturverzeichnis

1. Abe, S., Arima, S., Yamashita, T., Miyata, M., Okino, H., Toda, H., Nomoto, K., Ueno, M., Tahara, M., Kiyonaga, K., Nakao, S., Tanaka, H.
Early Assessment of Reperfusion Therapy Using Cardiac Troponin T
J. Am. Coll. Cardiol. 23 (1994) 1382 – 1389
2. Adams III, J.E., Bodor, G.S., Dávila-Román, V.G., Delmez, J.A., Apple, F.S., Ladenson, J.H.
Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury
Circulation 88 (1993) 101 – 106
3. Adams III, J.E., Sicard, G.A., Allen, B.T., Bridwell, K.H., Lenke, L.G., Davila-Roman, V.G., Bodor, G.S., Ladenson, J.H., Jaffe, A.S.
Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac troponin I
N. Engl. J. Med. 330 (1994) 670 – 674
4. Alonso, S., Garner, I., Vanderkerckhove, J., Buckingham, M.
Genetic analysis of the interaction between cardiac and skeletal actin gene expression in striated muscle of the mouse
J. Molec. Biol. 211 (1990) 727 – 738
5. Anderson, P.A.W., Greig, A., Mark, T.M., Malouf, N.N., Oakeley, A.E., Ungerleider, R.M., Allen, P.D., Kay, B.K.
Molecular Basis of Human Cardiac Troponin T Isoforms Expressed in the Developing, Adult, and Failing Heart
Circ. Res. 76 (1995) 681 – 686
6. Anderson, P.A.W., Malouf, N.N., Oakeley, A.E., Pagani, E.D., Allen, P.D.
Troponin T Isoform Expression in Humans. A Comparison Among Normal and Failing Adult Heart, Fetal Heart, and Adult and Fetal Skeletal Muscle
Circ. Res. 69 (1991) 1226 – 1233
7. Anderson, P.A.W., Moore, G.E., Nassar, R.N.
Developmental Changes in the Expression of Rabbit Left Ventricular Troponin T
Circ. Res. 63 (1988) 742 – 747
8. Antman, E.M., Tanasijevic, M.J., Thompson, B., Schactman, M., McCabe, C.H., Cannon, C.P., Fischer, G.A., Fung, A.Y., Thompson, C., Wybenga, D., Braunwald, E.
Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes
N. Engl. J. Med. 335 (1996) 1342 – 1349

9. Apple, F.S.
Acute Myocardial Infarction and Coronary Reperfusion. Serum Cardiac Markers for the 1990s
Am. J. Clin. Pathol. 97 (1992) 217 – 226
10. Apple, F.S.
Clinical and Analytical Standardization Issues Confronting Cardiac Troponin I
Clin. Chem. 45 (1999) 18 – 20
11. Apple, F.S., Billadello, J.J.
Expression of creatine kinase M and B mRNAs in treadmill trained rat skeletal muscle
Life Sci. 55 (1994) 585 – 592
12. Apple, F.S., Christenson, R.H., Valdes, R., Andriak, A.J., Berg, A., Duh, S.-H., Feng, Y.-J., Jortani, S.A., Johnson, N.A., Koplen, B., Mascotti, K., Wu, A.H.B.
Simultaneous Rapid Measurement of Whole Blood Myoglobin, Creatine Kinase MB, and Cardiac Troponin I by the Triage Cardiac Panel for Detection of Myocardial Infarction
Clin. Chem. 45 (1999) 199 – 205
13. Apple, F.S., Maturen, A.J., Mullins, R.E., Painter, P.C., Pessin-Minsley, M.S., Webster, R.A., Flores, J.S., DeCresce, R., Fink, D.J., Buckley, P.M., Marsh, J., Ricchiuti, V., Christenson, R.H.
Multicenter Clinical and Analytical Evaluation of the AxSYM Troponin-I Immunoassay to Assist in the Diagnosis of Myocardial Infarction
Clin. Chem. 45 (1999) 206 – 212
14. Apple, F.S., Rogers, M.A., Sherman, W.M., Costill, D.L., Hagerman, F.C., Ivy, J.L.
Profile of Creatine Kinase Isoenzymes in Skeletal Muscles of Marathon Runners
Clin. Chem. 30 (1984) 413 – 416
15. Apple, F.S., Wu, A.H.B., Valdes, R.J.
Serum cardiac troponin T concentrations in hospitalized patients without acute myocardial infarction
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 56 (1996) 63 – 68
16. Baum, H., Braun, S., Gerhardt, W., Gilson, G., Hafner, G., Müller-Bardorff, M., Stein, W., Klein, G., Ebert, C., Hallermayer, K., Katus, H.A.
Multicenter evaluation of a second-generation assay for cardiac troponin T
Clin. Chem. 43 (1997) 1877 – 1884
17. Baum, H., Obst, M., Huber, U., Neumeier, D.
Cardiac Troponin T in Patients with High Creatinine Concentration but Normal Creatine Kinase Activity in Serum
Clin. Chem. 42 (1996) 474 – 475

18. Baum, H., Wayand, D., Schaerf, J., Obst, M., Neumeier, D.
Comparison of two cardiac troponin T assays and one cardiac troponin I assay in patients with end-stage renal failure
Clin. Chem. 42 (1996) S122
19. Baum, H.H.E., Schwab, I., Boekstegers, P., Steinbeck, G., Neumeier, D.
Differences in the time course of creatine kinase-MB activity and mass concentration after acute myocardial infarction
Clin. Chim. Acta 219 (1993) 183 – 188
20. Bertinchant, J.-P., Larue, C., Pernel, I., Ledermann, B., Fabbro-Peray, P., Beck, L., Calzolari, C., Trinquier, S., Nigond, J., Pau, B.
Release Kinetics of Serum Cardiac Troponin I in Ischemic Myocardial Injury
Clin. Biochem. 29 (1996) 587 – 594
21. Bhavsar, P.K., Dhoot, G.K., Cumming, D.V.E., Butler-Browne, G.S., Yacoub, M.H., Barton, P.J.R.
Developmental expression of troponin I isoforms in fetal human heart
FEBS 292 (1991) 5 – 8
22. Bhayana, V., Gougoulas, T., Cohoe, S., Henderson, A.R.
Discordance between results for serum troponin T and troponin I in renal disease
Clin. Chem. 41 (1995) 312 – 317
23. Bodechtel, G., Bernsmeier, A., Schrader, A., Struppler, A.
„Differentialdiagnose neurologischer Krankheitsbilder“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 1984, 4. Auflage
24. Bodor, G.S., Porter, S., Landt, Y., Ladenson, J.H.
Development of Monoclonal Antibodies for an Assay of Cardiac Troponin-I and Preliminary Results in Suspected Cases of Myocardial Infarction
Clin. Chem. 38 (1992) 2203 – 2214
25. Bodor, G.S., Porterfield, D., Voss, E.M., Smith, S., Apple, F.S.
Cardiac Troponin-I Is Not Expressed in Fetal and Healthy or Diseased Adult Human Skeletal Muscle Tissue
Clin. Chem. 41 (1995) 1710 – 1715
26. Bodor, G.S., Survant, L., Voss, E.M., Smith, S., Porterfield, D., Apple, F.S.
Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle
Clin. Chem. 43 (1997) 476 – 484
27. Boehringer Mannheim
PCR Applications Manual

28. Bonnefoy, E., Chevalier, P., Kirkorian, G., Guidolet, J., Marchand, A., Touboul, P.
Cardiac Troponin I Does Not Increase After Cardioversion
Chest 111 (1997) 15 – 18
29. Braun, S.L., Pongratz, D.E., Bialk, P., Liem, S., Schlotter, B., Vogt, W.
Discrepant Results for Cardiac Troponin T and Troponin I in Chronic Myopathy,
Depending on Instrument and Assay Generation
Clin. Chem. 42 (1996) 2039 – 2041
30. Braunwald, E., Califf, R.M., Cannon, C.P., Fox, K.A.A., Fuster, V., Gibler, W.B.,
Harrington, R.A., King, S.B., Kleiman, N.S., Theroux, P., Topol, E.J., Van de Werf, F.,
White, H.D., Willerson, J.T.
Redefining Medical Treatment in the Management of Unstable Angina
Am. J. Med. 108 (2000) 41 – 53
31. Briggs, M.M., Maready, M., Schmidt, J.M., Schachat, F.
Identification of a fetal exon in the human fast Troponin T gene
FEBS Lett. 350 (1994) 37 - 40
32. Burlina, A., Zaninotto, M., Secchiero, S., Rubin, D., Accorsi, F.
Troponin T as a Marker of Ischemic Myocardial Injury
Clin. Biochem. 27 (1994) 113 – 121
33. Chapelle, J.-P.
Cardiac Troponin I and Troponin T: Recent Players in the Field of Myocardial Markers
Clin. Chem. Lab. Med. 37 (1999) 11 – 20
34. Collinson, P.O.
To T or Not to T, That Is the Question
Clin. Chem. 43 (1997) 421 – 423
35. Collinson, P.O., Gerhardt, W., Katus, H.A., Müller-Bardorff, M., Braun, S., Schricke, U.,
Vogt, W., Nagel, D., Zander, M., Leinberger, R., Mangold, D., Zerback, R.
Multicentre Evaluation of an Immunological Rapid Test for the Detection of Troponin T in
Whole Blood Samples
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 34 (1996) 591 – 598
36. Collinson, P.O., Stubbs, P.J., Rosalki, S.B.
Cardiac troponin T in renal disease
Clin. Chem. 41 (1995) 1671 – 1673
37. Cooper, T.A., Ordahl, C.P.
A single cardiac troponin T gene generates embryonic and adult isoforms via
developmentally regulated alternate splicing
J. Biol. Chem. 260 (1985) 11140 – 11148

38. Cooper, T.A., Ordahl, C.P.
A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development
Science 226 (1984) 979 – 982
39. Corin, S.J., Juhasz, O., Zhu, L., Conley, P., Kedes, L., Wade, R.
Structure and Expression of the Human Slow Twitch Skeletal Muscle Troponin I Gene
J. Biol. Chem. 269 (1994) 10651 – 10659
40. Coudrey, L.
The Troponins
Arch. Intern. Med. 158 (1998) 1173 – 1180
41. Cummins, P., Young, A., Auckland, M.L., Michie, C.A., Stone, P.C.W., Shepstone, B.J.
Comparison of serum cardiac specific troponin-I with creatine kinase, creatine kinase-MB isoenzyme, tropomyosin, myoglobin and C-reactive protein release in marathon runners: cardiac or skeletal muscle trauma?
Eur. J. Clin. Invest. 17 (1987) 317 – 324
42. Deetjen, P., Speckmann, E.-J.
Physiologie
Urban & Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore, 1994, 2. Auflage
43. Deetjen, P., Speckmann, E.-J., Hirche, H., Kuschinsky, W
Physiologie: Motorisches System, Herz-Kreislauf-Funktion
Urban & Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore, 1994, 2. Auflage
44. Dörner, K., Battista, H.-J., Gibitz, H.J., Witt, I., Bidlingmaier, F., Löffler, H.
Klinische Chemie, Kapitel 8: Enzyme
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1992, 2. Auflage, S. 118 – 146
45. Emancipator, K., Urankar-Nagy, N., Leonard, K.A., Bradford, G., Emancipator, S.N.
Immunohistologic demonstration of myocardial proteins with applications
Am. J. Clin. Pathol. 97 (1992) 376 – 380
46. Farah, C.S., Reinach, F.C.
The troponin complex and regulation of muscle contraction
FASEB J. 9 (1995) 755 – 767
47. Fredericks, S., Merton, G., Lerena, M.-J., Holt, D.W., Bodor, G.S., Apple, F.S., Voss, E.M.
Markers of Myocardial Damage
Clin. Chem. 44 (1998) 362 – 365
48. Freeman, K., Nakao, K., Leinwand, L.A.
Low sequence variation in the gene encoding the human beta-myosin heavy chain.
Genomics 76 (2001) 73 – 80

49. Gahlmann, R., Troutt, A.B., Wade, R.P., Gunning, P., Kedes, L.
Alternative Splicing Generates Variants in Important Functional Domains of Human Slow Skeletal Troponin T
J. Biol. Chem. 262 (1987) 16122 – 16126
50. Gahlmann, R., Wade, R., Gunning, P., Kedes, L.
Differential Expression of Slow and Fast Skeletal Muscle Troponin C, Slow Skeletal Muscle Troponin C is Expressed in Human Fibroblasts
J. Mol. Biol. 201 (1988) 379 – 391
51. Galvani, M.
Are Cardiac Troponins the Myocardial Markers for the New Millennium?
Clin. Chem. Lab. Med. 37 (1999) 605 – 606
52. Gerhardt, W., Katus, H., Ravkilde, J., Hamm, C., Jørgensen, P.J., Peheim, E.
S-troponin T in suspected ischemic myocardial injury compared with mass and catalytic concentrations of S-creatine kinase isoenzyme MB
Clin. Chem. 37 (1991) 1405 – 1411
53. Gerhardt, W., Katus, H.A., Ravkilde, J., Hamm, C.W.
S-Troponin-T as a marker of ischemic myocardial injury
Clin. Chem. 38 (1992) 1194 – 1195
54. Gerhardt, W., Ljungdahl, L.
Troponin T: A sensitive and specific diagnostic and prognostic marker of myocardial damage
Clin. Chim. Acta 272 (1998) 47 – 57
55. Giuliani, I., Bertinchant, J.-P., Granier, C., Laprade, M., Chocron, S., Toubin, G., Etievent, J.-P., Larue, C., Trinquier, S.
Determination of Cardiac Troponin I Forms in the Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction and Patients Receiving Crystalloid or Cold Blood Cardioplegia
Clin. Chem. 45 (1999) 213 – 222
56. Goldmann, B.U., Hamm, C.W.
Risk stratification in acute coronary syndrome
Herz 26 Suppl. 1 (2001) 24 – 29
57. Greig, A., Hirschberg, Y., Anderson, P.A.W., Hainsworth, C., Malouf, N.N., Oakeley, A.E., Kay, B.K.
Molecular Basis of Cardiac Troponin T Isoform Heterogeneity in Rabbit Heart
Circ. Res. 74 (1994) 41 – 47
58. Gulati, J., Akella, A.B., Nikolic, S.D., Starc, V., Siri, F.
Shifts in contractile regulatory protein subunits troponin T and troponin I in cardiac

- hypertrophy
Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 (1994) 384 – 390
59. Hafner, G., Thome-Kromer, B., Schaube, J., Kupferwasser, I., Ehrental, W., Cummins, P.
Cardiac troponins in serum in chronic renal failure
Clin. Chem. 40 (1994) 1790 – 1791
60. Haider, Kh.H., Stimson, W.H.
Cardiac troponin-I: a biochemical marker for cardiac cell necrosis
Dis. Markers 11 (1993) 205 – 215
61. Haller, C., Zehelein, J., Remppis, A., Müller-Bardorff, M., Katus, H.A.
Cardiac troponin T in patients with end-stage renal disease: absence of expression in truncal skeletal muscle
Clin. Chem. 44 (1998) 930 – 938
62. Hamm, C.W.
Risk stratification for acute coronary syndromes
Intensivmed 37 (2000) 133 – 138
63. Hamm, C.W., Heeschen, C., Goldmann, B., Vahanian, A., Adgey, J., Miguel, C.M., Rutsch, W., Berger, J., Kootstra, J., Simoons, M.L.
Benefit of abciximab in patients with refractory unstable angina in relation to serum troponin T levels
N. Engl. J. Med. 340 (1999) 1623 – 1629
64. Hamm, C.W., Ravkilde, J., Gerhardt, W., Jørgensen, P., Peheim, E., Ljungdahl, L.
The prognostic value of serum troponin T in unstable angina
N. Engl. J. Med. 327 (1992) 146 – 150
65. Hamm, C.W., Ravkilde, J., Gerhardt, W., Jørgensen, P., Peheim, E., Ljungdahl, L., Goldmann, B., Katus, H.A.
The prognostic value of serum troponin T in unstable angina
N. Engl. J. Med. 327 (1992) 146 – 150
66. Hammerer-Lercher, A., Erlacher, P., Bittner, R., Korinthenberg, R., Skladal, D., Sorichter, S., Sperl, W., Puschendorf, B., Mair, J.
Clinical and experimental results on cardiac troponin expression in Duchenne muscular dystrophy
Clin. Chem. 47 (2001) 451 – 458
67. Harms, V.
„Biomathematik, Statistik und Dokumentation“
Harms Verlag, Kiel, 1992, 6. Auflage

68. Heeschen, C., Goldmann, B.U., Moeller, R.H., Hamm, C.W.
Analytical performance and clinical application of a new rapid bedside assay for the detection of serum cardiac troponin I
Clin. Chem. 44 (1998) 1925 – 1930
69. Heeschen, C., Hamm, C.W., Bruemmer, J., Simoons, M.L.
Predictive Value of C-Reactive Protein and Troponin T in Patients With Unstable Angina: A Comparative Analysis
J. Am. Coll. Cardiol. 35 (2000) 1535 – 1542
70. Hoogerwaard, E.M., Schouten, Y., van der Kooi, A.J., Gorgels, J.P.M.C., de Visser, M., Sanders, G.T.B.
Troponin T and Troponin I in Carriers of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy with Cardiac Involvement
Clin. Chem. 47 (2001) 962 – 963
71. Hopf, H.C., Deuschl, G., Diener, H.C., Reichmann, H.
Neurologie in Praxis und Klinik: Muskelkrankheiten
Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 1999, 3. Auflage, Band II
72. Hunkeler, N.M., Kullman, J., Murphy, A.M.
Troponin I Isoform Expression in Human Heart
Circ. Res. 69 (1991) 1409 – 1414
73. Jaffe, A.S., Ritter, C., Meltzer, V., Harter, H., Roberts, R.
Unmasking artifactual increases in creatine kinase isoenzymes in patients with renal failure
J. Lab. Clin. Med. 104 (1984) 193 – 202
74. Jockers-Wretou, E., Pfeleiderer, G.
Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method
Clin. Chim. Acta 58 (1975) 223 – 232
75. Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Esakova, T.V., Pettersson, K., Lövgren, T., Severina, M.E., Pulkki, K., Vuopio-Pulkki, L.-M., Gusev, N.B.
Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex
Clin. Chem. 43 (1997) 1379 – 1385
76. Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Filatov, V.L., Esakova, T.V., Kolosova, O.V., Pettersson, K., Lövgren, T., Bulargina, T.V., Trifonov, I.R., Gratsiansky, N.A., Pulkki, K., Voipio-Pulkki, L.-M., Gusev, N.B.
Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection
Clin. Chem. 44 (1998) 2433 – 2440

77. Katus, H.A., Haller, C., Müller-Bardorff, M., Scheffold, T., Remppis, A., Hafner, G.
Cardiac troponin T in end-stage renal disease patients undergoing chronic maintenance hemodialysis
Clin. Chem. 41 (1995) 1201 – 1203
78. Katus, H.A., Looser, S., Hallermayer, K., Remppis, A., Scheffold, T., Borgya, A.
Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T
Clin. Chem. 38 (1992) 386 – 393
79. Katus, H.A., Remppis, A., Neumann, F.J., Scheffold, T., Diederich, K.W., Vinar, G., Noe, A., Matern, G., Kuebler, W.
Diagnostic Efficiency of Troponin T Measurements in Acute Myocardial Infarction
Circulation 83 (1991) 902 – 912
80. Katus, H.A., Remppis, A., Scheffold, T., Diederich, K.W., Kuebler, W.
Intracellular Compartmentation of Cardiac Troponin T and Its Release Kinetics in Patients with Reperfused and Nonreperfused Myocardial Infarction
Am. J. Cardiol. 67 (1991) 1360 – 1367
81. Katus, H.A., Simon, M., Zorn, M., Scheffold, T., Remppis, A., Zehelein, J., Gruenig, E., Fiehn, W.
Cardiac Troponin T Measurements are Highly Specific for Myocardial Cell Damage
J. Am. Coll. Cardiol. 21 (1993) 88A
82. Keshgegian, A.A., Feinberg, N.V.
Serum Creatine Kinase MB Isoenzyme in Chronic Muscle Disease
Clin. Chem. 30 (1984) 575 – 578
83. Kloosterboer, H.J., Stoker-de Vries, S.A., Hommes, F.A.
The development of creatine kinase in rat skeletal muscle. Changes in isoenzyme ratio, protein, RNA and DNA during development.
Enzyme 21 (1976) 448 – 458
84. Kobayashi, S., Tanaka, M., Tamura, N., Hashimoto, H., Hirose, S.
Serum cardiac troponin T in polymyositis / dermatomyositis
Lancet 340 (1992) 726
85. Li, D., Jialal, I., Keffer, J.
Greater frequency of increased cardiac troponin T than increased troponin I in patients with chronic renal failure
Clin. Chem. 42 (1996) 114 – 115
86. Li, D., Keffer, J., Corry, K., Vazquez, M., Jialal, I.
Nonspecific elevation of troponin T levels in patients with chronic renal failure
Clin. Biochem. 28 (1995) 474 – 477

87. Liebsch, R.
„Intensivkurs: Neurologie“
Urban & Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore, 1996
88. Lindahl, B., Venge, P., Wallentin, L.
Relation Between Troponin T and the Risk of Subsequent Cardiac Events in Unstable
Coronary Artery Disease
Circulation 93 (1996) 1651 – 1657
89. Löfberg, M., Tähtelä, R., Härkönen, M., Somer, H.
Myosin Heavy-Chain Fragments and Cardiac Troponins in the Serum in Rhabdomyolysis
Arch. Neurol. 52 (1995) 1210 – 1214
90. Mair, J.
Cardiac troponin I and troponin T: Are enzymes still relevant as cardiac markers?
Clinical Chimica Acta 257 (1997) 99 – 115
91. Mair, J., Artner-Dworzak, E., Lechleitner, P., Smidt, J., Wagner, I., Dienstl, F.,
Puschendorf, B.
Cardiac troponin T in diagnosis of acute myocardial infarction
Clin. Chem. 37 (1991) 845 – 852
92. Mair, J., Genser, N., Morandell, D., Maier, J., Mair, P., Lechleitner, P., Calzolari, C.,
Larue, C., Ambach, E., Dienstl, F., Pau, B., Puschendorf, B.
Cardiac troponin I in the diagnosis of myocardial injury and infarction
Clin. Chim. Acta 245 (1996) 19 – 38
93. Mair, J., Wagner, I., Puschendorf, B., Mair, P., Lechleitner, P., Dienstl, F., Calzolari, C.,
Larue, C.
Cardiac troponin I to diagnose myocardial injury
Lancet 341 (1993) 838 – 839
94. Mar, J.H., Iannello, R.C., Ordahl, C.P.
Cardiac Troponin T Gene Expression in Muscle
Symp. Soc. Exp. Biol. 46 (1992) 237 – 249
95. Matsushita, H., Yamada, S., Adachi, M., Satoh, T., Kato, K., Haimoto, H.
Fetal-type creatine kinase in rat fast and slow muscles during denervation and
reinnervation
Exp. Neurol. 97 (1987) 128 – 134
96. McConnell, B.K., Moravec, C.S., Bond, M.
Troponin I phosphorylation and myofilament calcium sensitivity during decompensated
cardiac hypertrophy
Am. J. Physiol. 274 (1998) H385 - H396

97. McLaurin, M.D., Apple, F.S., Voss, E.M., Herzog, C.A., Sharkey, S.W.
Cardiac troponin I, cardiac troponin T, and creatine kinase MB in dialysis patients without ischemic heart disease: evidence of cardiac troponin T expression in skeletal muscle
Clin. Chem. 43 (1997) 976 – 982
98. Mesnard, L., Logeart, D., Taviaux, S., Diriong, S., Mercadier, J.-J., Samson, F.
Human Cardiac Troponin T: Cloning and Expression of New Isoforms in the Normal and Failing Heart
Circ. Res. 76 (1995) 687 – 692
99. Mesnard, L., Samson, F., Espinasse, I., Durand, J., Neveux, J.Y., Mercadier, J.J.
Molecular cloning and developmental expression of human cardiac troponin T
FEBS Lett. 328 (1993) 139 – 144
100. Metzler, H., Gries, M., Rehak, P., Lang, Th., Fruhwald, S., Toller, W.
Perioperative myocardial cell injury: the role of troponins
Br. J. Anaesth. 78 (1997) 386 – 390
101. Müller-Bardorff, M., Freitag, H., Scheffold, T., Remppis, A., Kübler, W., Katus, H.A.
Development and Characterization of a Rapid Assay for Bedside Determinations of Cardiac Troponin T
Circulation 92 (1995) 2869 – 2875
102. Müller-Bardorff, M., Hallermayer, K., Schröder, A., Ebert, C., Borgya, A., Gerhardt, W., Remppis, A., Zehelein, J., Katus, H.A.
Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation
Clin. Chem. 43 (1997) 458 – 466
103. Müller-Bardorff, M., Rauscher, T., Kampmann, M., Schoolmann, S., Laufenberg, F., Mangold, D., Zerback, R., Remppis, A., Katus, H.A.
Quantitative Bedside Assay for Cardiac Troponin T: A Complementary Method to Centralized Laboratory Testing
Clin. Chem. 45 (1999) 1002 – 1008
104. Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A.
The Polymerase Chain Reaction
Birkhäuser, Boston – Basel – Berlin, 1994
105. Musso, P., Cox, I., Vidano, E., Zambon, D., Panteghini, M.
Cardiac Troponin Elevations in Chronic Renal Failure: Prevalence and Clinical Significance
Clin. Biochem. 32 (1999) 125 – 130
106. Neumeister, B., Besenthal, I., Liebich, H.
Klinikleitfaden Labordiagnostik;

- Arbeitsmethoden, Referenzbereiche, Differentialdiagnose, Diagnosestrategien
Urban & Fischer-Verlag, München – Jena, 2000, 2.Auflage
107. Ohman, E.M., Armstrong, P.W., Christenson, R.H., Granger, C.B., Katus, H.A., Hamm, C.W., O'Hanesian, M.A., Wagner, G.S., Kleiman, N.S., Harrell, F.E., Califf, R.M., Topol, E.J.
Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia
N. Engl. J. Med. 335 (1996) 1333 – 1341
 108. Ordahl, C.P., Kioussis, D., Tilghman, S.M., Ovitt, C., Fornwald, J.
Molecular Cloning of Developmentally Regulated, Low Abundance mRNA Sequences from Embryonic Muscle
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4519 – 4523
 109. Parmacek, M.S., Leiden, J.M.
Structure, Function, and Regulation of Troponin C
Circulation 84 (1991) 991 – 1003
 110. Pearlstone, J.R., Carpenter, M.R., Smillie, L.B.
Amino acid sequence of rabbit cardiac troponin T
J. Biol. Chem. 261 (1986) 16795 – 16810
 111. Philips, A.V., Timchenko, L.T., Cooper, T.A.
Disruption of Splicing Regulated by a CUG-Binding Protein in Myotonic Dystrophy
Science 280 (1998) 737 – 741
 112. Prellwitz, W., Hafner, G., Rupprecht, H.-J., Meyer, J.
Diagnostische und differentialdiagnostische Wertigkeit der Troponine
Med. Klin. 91 (1996) 336 – 342
 113. Rama, D., Margaritis, I., Orsetti, A., Marconnet, P., Gros, P., Larue, C., Trinquier, S., Pau, B., Calzolari, C.
Troponin I Immunoenzymometric Assays for Detection of Muscle Damage Applied to Monitoring a Triathlon
Clin. Chem. 42 (1996) 2033 – 2035
 114. Ravkilde, J., Nissen, H., Hørder, M., Thygesen, K.
Independent Prognostic Value of Serum Creatine Kinase Isoenzyme MB Mass, Cardiac Troponin T and Myosin Light Chain Levels in Suspected Acute Myocardial Infarction: Analysis of 28 Months of Follow-Up in 196 Patients
J. Am. Coll. Cardiol. 25 (1995) 574 – 81
 115. Ricchiuti, V., Apple, F. S.
RNA expression of cardiac troponin T isoforms in diseased human skeletal muscle
Clin. Chem. 45 (1999) 2129 – 2135

116. Ricchiuti, V., Voss, E.M., Ney, A., Odland, M., Anderson, P.A.W., Apple, F.S.
Cardiac troponin T isoforms expressed in renal diseased skeletal muscle will not cause false-positive results by the second generation cardiac troponin T assay by Boehringer Mannheim
Clin. Chem. 44 (1998) 1919 – 1924
117. Ricchiuti, V., Zhang, J., Apple, F.S.
Cardiac troponin I and T alterations in hearts with severe left ventricular remodeling
Clin. Chem. 43 (1997) 990 – 995
118. Saba, Z., Nassar, R., Ungerleider, R.M., Oakley, A.E., Anderson, P.A.W.
Cardiac troponin T isoforms expression correlates with pathophysiological descriptors in patients who underwent corrective surgery for congenital heart disease
Circulation 94 (1996) 472 – 476
119. Sabatine, M.S., Morrow, D.A., de Lemos, J.A., Gibson, C.M., Murphy, S.A., Rifai, N., McCabe, C., Antman, E.M., Cannon, C.P., Braunwald, E.
Multimarker Approach to Risk Stratification in Non-ST Elevation Acute Coronary Syndromes. Simultaneous Assessment of Troponin I, C-Reactive Protein, and B-Type Natriuretic Peptide
Circulation 105 (2002) 1760 – 1763
120. Saggin, L., Gorza, L., Ausoni, S., Schiaffino, S.
Cardiac troponin T in developing, regenerating and denervated rat skeletal muscle
Development 110 (1990) 547 – 554
121. Saggin, L., Gorza, L., Ausoni, S., Schiaffino, S.
Troponin I Switching in the Developing Heart
J. Biol. Chem. 264 (1989) 16299 – 16302
122. Samson, F., Mesnard, L., Mihovilovic, M., Potter, T.G., Mercadier, J.J., Roses, A.D.
A new human slow skeletal troponin T (TnTs) mRNA isoform derived from alternative splicing of a single gene
Biochem. Biophys. Res. Commun. 199 (1994) 841 – 847
123. Scheid, W., Gibbels, E.
„Lehrbuch der Neurologie“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 1983, 5. Auflage
124. Schiebler, T.H., Schneider, F., Junqueira, L.C., Carneiro, J.
Histologie: Muskelgewebe
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-NewYork, 1991, 3. Auflage
125. Schmidt, R.F., Thews, G., Rüegg, J.C.
Physiologie des Menschen: Muskel, Regulation der Muskelkontraktion
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-NewYork, 1990, 24. Auflage

126. Shi, Q., Ling, M., Zhang, X., Zhang, M., Kadrijevic, L., Liu, S., Laurino, J.P.
Degradation of Cardiac Troponin I in Serum Complicates Comparisons of Cardiac Troponin I Assays
Clin. Chem. 45 (1999) 1018 – 1025
127. Silbernagl, S., Despopoulos, A.
Taschenatlas der Physiologie: Grundlagen, Zellphysiologie: Nerv und Muskel
Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 1991, 4. Auflage
128. Sorichter, S., Mair, J., Koller, A., Gebert, W., Rama, D., Calzolari, C., Artner-Dworzak, E., Puschendorfer, B.
Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage
J. Appl. Physiol. 83 (1997) 1076 – 1082
129. Störk, T., Gareis, R., Müller, R., Müller-Bardorff, M., Koenig, W., Both, A., Katus, H., Möckel, M.
Diagnosis and risk stratification in patients with acute coronary syndrome by means of myoglobin, troponin T and CK/CK-MB
Intensivmed 38 (2001) 385 – 393
130. Stryer, L.
Biochemie: Molekularphysiologie
Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994, 3. Auflage
131. Takahashi, M., Lee, L., Shi, Q., Gawad, Y., Jackowski, G.
Use of Enzyme Immunoassay for Measurement of Skeletal Troponin-I Utilizing Isoform-Specific Monoclonal Antibodies
Clin. Biochem. 29 (1996) 301 – 308
132. Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H.-P., Seidman, J.G., Seidman, C.E.
 α -Tropomyosin and Cardiac Troponin T Mutations Cause Familial Hypertrophic Cardiomyopathy: A Disease of the Sarcomere
Cell. 77 (1994) 701 – 712
133. Thome-Kromer, B., Michel, G.
Human Cardiac Troponin I – Detectability after Myocardial Infarction and Severe Skeletal Muscle Damage
Clin. Chem. 39 (1993) 1248
134. Thygesen, K., Alpert, J.S., Rydén, L., Garson, A.
Myocardial infarction redefined? A consensus document of The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction
Eur. Heart J. 21 (2000) 1502 – 1513

135. Townsend, P.J., Barton, P.J.R., Yacoub, M.H., Farza, H.
Molecular Cloning of Human Cardiac Troponin T Isoforms: Expression in Developing and Failing Heart
J. Mol. Cell. Cardiol. 27 (1995) 2223 – 2236
136. Toyota, N., Shimada, Y.
Differentiation of troponin in cardiac and skeletal muscles in chicken embryos as studied by immunofluorescence microscopy
J. Cell. Biol. 91 (1981) 497 – 504
137. Trinquier, S., Flecheux, O., Bullenger, M., Castex, F.
Highly specific immunoassay for cardiac troponin I assessed in noninfarct patients with chronic renal failure or severe polytrauma
Clin. Chem. 41 (1995) 1675 – 1676
138. Väänänen, H.K., Syrjälä, H., Rahkila, P., Vuori, J., Melamies, L.M., Myllylä, V., Takala, T.E.S.
Serum Carbonic Anhydrase III and Myoglobin Concentrations in Acute Myocardial Infarction
Clin. Chem. 36 (1990) 635 – 638
139. Vallins, W.J., Brand, N.J., Dabhade, N., Butler-Browne, G., Yacoub, M.H., Barton, P.J.R.
Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction
FEBS Lett. 270 (1990) 57 – 61
140. Vuori, J., Rasi, S., Takala, T., Väänänen, K.
Dual-Label Time-Resolved Fluoroimmunoassay for Simultaneous Detection of Myoglobin and Carbonic Anhydrase III in Serum
Clin. Chem. 37 (1991) 2087 – 2092
141. Wade, R., Eddy, R., Shows, T.B., Kedes, L.
cDNA Sequence, Tissue-Specific Expression, and Chromosomal Mapping of the Human Slow-Twitch Skeletal Muscle Isoform of Troponin I
Genomics 7 (1990) 346 – 357
142. Watkins, H., McKenna, W.J., Thierfelder, L., Suk, H.J., Anan, R., O'Donoghue, A., Spirito, P., Matsumori, A., Moravec, C.S., Seidman, J.G., Seidman, C.E.
Mutations in the genes for cardiac troponin T and α -tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy
N. Engl. J. Med. 332 (1995) 1058 – 1064
143. Willging, S., Keller, F., Steinbach, G.
Specificity of Cardiac Troponins I and T in Renal Disease
Clin. Chem. Lab. Med. 36 (1998) 87 – 92

144. Wu, A.H.B., Valdes, R.Jr., Apple, F.S., Gornet, T., Stone, M.A., Mayfield-Stokes, S.
Cardiac troponin-T immunoassay for diagnosis of acute myocardial infarction
Clin. Chem. 40 (1994) 900 – 907
145. Wu, Q.-L., Jha, P.K., Raychowdhury, M.K., Du, Y., Leavis, P.C., Sarkar, S.
Isolation and Characterization of Human Fast Skeletal β Troponin T cDNA: Comparative
Sequence Analysis of Isoforms and Insight into the Evolution of Members of a Multigene
Family
DNA Cell Biol. 13 (1994) 217 – 233
146. Zhu, L., Perez-Alvarado, G., Wade, R.
Sequencing of a cDNA encoding the human fast-twitch skeletal muscle isoform of
troponin I
Biochim. Biophys. Acta 1217 (1994) 338 – 340
147. Zimmerman, J., Fromm, R., Meyer, D., Boudreaux, A., Wun, C.-C. C., Smalling, R.,
Davis, B., Habib, G., Roberts, R.
Diagnostic Marker Cooperative Study for the Diagnosis of Myocardial Infarction
Circulation 99 (1999) 1671 - 1677
148. Zimmermann, R., Baki, S., Dengler, T.J., Ring, G.H., Remppis, A., Lange, R.
Troponin T release after heart transplantation
Br. Heart J. 69 (1993) 395 – 398

9 Anhang

9.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Struktur eines dünnen Filamentes. Anordnung von Tropomyosin (Tm), Troponin (TnC, TnI und TnT) und F-Aktin (42)	7
Abbildung 2: Ablauf der Muskelkontraktion (124)	10
Abbildung 3: Genexpression	13
Abbildung 4: Methodenüberblick	45
Abbildung 5: RNA-Isolierung	45
Abbildung 6: Ablauf der PCR.....	48
Abbildung 7: Skelettmuskelisofomen SMTnTf.....	63
Abbildung 8: Skelettmuskelisofomen SMTnlf	63
Abbildung 9: Skelettmuskelisofomen SMTnTs	64
Abbildung 10: Skelettmuskelisofomen SMTnls	64
Abbildung 11: Restriktionsverdau Skelettmuskelisofomen SMTnTf	66
Abbildung 12: Restriktionsverdau Skelettmuskelisofomen SMTnlf	66
Abbildung 13: Restriktionsverdau Skelettmuskelisofomen SMTnTs	67
Abbildung 14: Restriktionsverdau Skelettmuskelisofomen SMTnls.....	67
Abbildung 15: Ergebnisse cTnT	70
Abbildung 16: Restriktionsverdau cTnT.....	71
Abbildung 17: Ergebnisse cTnI.....	74
Abbildung 18: Restriktionsverdau cTnI.....	75
Sequenz 1: cTnI	14
Sequenz 2: cTnT	17
Sequenz 3: SMTnls	19
Sequenz 4: SMTnTs.....	20
Sequenz 5: SMTnlf.....	21
Sequenz 6: SMTnTf.....	22

Tabelle 1: Muskelfasertypen.....	11
Tabelle 2: Einteilung Myopathien	24
Tabelle 3: Einteilung Muskeldystrophien	24
Tabelle 4: Proben Neurologie.....	41
Tabelle 5: Proben Friedrich-Baur-Institut.....	42
Tabelle 6: demographische Daten.....	43
Tabelle 7: RT Master Mix	48
Tabelle 8: Primer	51
Tabelle 9: Stocklösung für 1. PCR	52
Tabelle 10: Stocklösung für 2. PCR.....	52
Tabelle 11: PCR-Programme für die verschiedenen Isoformen	53
Tabelle 12: Restriktionsenzyme	55
Tabelle 13: Restriktionsverdau	56
Tabelle 14: Methoden für die Messung der Serumparameter	57
Tabelle 15: Umrechnung RNA Extinktion in Konzentration	59
Tabelle 16: Ergebnisse für Skelettmuskelisoformen.....	62
Tabelle 17: Fragmentlängen der Skelettmuskelisoformen.....	65
Tabelle 18: Ergebnisse für cTnT	69
Tabelle 19: Fragmentlängen cTnT	71
Tabelle 20: Ergebnisse für cTnl.....	73
Tabelle 21: Fragmentlängen cTnl.....	75
Tabelle 22: Serumwerte	76

9.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar durchgeführt (Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier).

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. D. Neumeier für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten an diesem Institut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H. Baum für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die stets freundliche Betreuung und Unterstützung bei allen praktischen Problemen sowie für seine Hilfestellung, seinen wissenschaftlichen Beistand bei theoretischen Fragen und seine kritische Durchsicht.

Für die Überlassung der Muskelbiopsien möchte ich mich bei Frau Dr. med. P. Fischer und Herrn Dr. med. S. Quasthoff bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Dr. med. B. Müller für die Beratung bei der Durchführung der Arbeit und für die hilfreichen kritischen Diskussionen, die mir die Erschließung der Methodik erleichterten.

Nicht zuletzt möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Karin Fischer, Frau Manuela Bursian und Frau Ingrid Schwab bedanken für die gute Zusammenarbeit, die freundliche Hilfsbereitschaft und die tatkräftige, engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

9.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Meßner
Vorname: Barbara Sabine
Wohnort: Hörselbergstr. 8, 81677 München
Tel.: 0179 / 46 39 668
e-mail: barbaramessner@gmx.de
Geburtsdatum: 01.11.1974
Geburtsort: Landshut
Familienstand: ledig
Religion: ev.
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

09.1981 – 08.1985 Carl-Orff-Grundschule in Landshut
09.1985 – 07.1994 Gymnasium Seligenthal in Landshut
07.1994 allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

11.1994 – 09.1996 Vorklinisches Studium / Universität Regensburg
09.1996 Ärztliche Vorprüfung
11.1996 – 05.2001 Klinisches Studium / Technische Universität München
08.1997 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03.2000 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04.2000 – 03.2001 Praktisches Jahr / Klinikum rechts der Isar
05.2001 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12.2002 Approbation als Ärztin

Berufserfahrung:

06.2001 – 03.2002 ÄiP in der Frauenklinik und Poliklinik der TU München,
Klinikum rechts der Isar
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. Kiechle)
04.2002 – 11.2002 ÄiP am Institut für Klinische Chemie und Pathobio-
chemie der TU München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)
seit 12.2002 Assistenzärztin am Institut für Klinische Chemie und
Pathobiochemie der TU München, Klinikum rechts der
Isar (Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)