

Diplomarbeit

**Wie spezifisch ist cardiac Troponin T bei Myopathien
mit kardialer Beteiligung?**

eingereicht von

Christoph Oberschneider

Geb. Dat.: 18.09.1983

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Abteilung für Kardiologie

und

Universitätsklinik für Neurologie

unter der Anleitung von

OA Dr. Josepha Stephanie Binder

Prof. Dr. Stefan Quasthoff

Ort, Datum

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift

Danksagungen

Ich danke meinen Eltern für ihr Verständnis und ihre Liebe die mich wachsen ließen, meinen Geschwistern für das besondere Band, welches uns verbindet, und meinen Freunden für die Ehrlichkeit und den Austausch, die mich neue Wege beschreiten lassen.

Ebenso danke ich meinen Betreuern für die tatkräftige Unterstützung während des Schreibens meiner Diplomarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	ii
Tabellenverzeichnis	iii
Zusammenfassung	i
Abstract.....	i
1 Einleitung.....	3
2 Troponin T.....	5
2.1 Struktur und Funktion.....	5
2.2 Auswirkungen der strukturellen Unterschiede	5
2.3 Die Troponin-Tests.....	7
2.4 Die Spezifität von Troponin T.....	8
2.4.1 Vergleich von cTnI zu cTnT bei klinische Fragestellungen.....	8
2.4.2 Kritische Stimmen zur Spezifität.....	9
2.4.3 Weiterentwicklung der Testverfahren und Erklärungsmodelle für falsch-positive Ergebnisse	10
3 Myopathien.....	11
3.1 X-chromosomal vererbte Myopathien mit kardialer Beteiligung.....	13
3.2 Autosomal vererbte Myopathien mit kardialer Beteiligung.....	16
3.3 Myositiden mit kardialer Beteiligung.....	17
4 XMPMA - eine neu entdeckte X-chromosomal vererbte Myopathie.....	18
4.1 Methoden der XMPMA-Studie von 2008	19
4.2 Auswirkungen der Mutationen im FHL1-Gen	22
5 Die Rolle von cTnT bei Myopathien.....	24
6 Ergebnisse und Diskussion.....	27
7 Material und Methoden	29
8 Literaturverzeichnis	30
9 Anhang – Ethikantrag.....	36
10 Anhang – Patienteninformation.....	52
11 Anhang – Studienprotokoll.....	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilungsmuster der Muskelschwäche bei verschiedenen Formen der Muskeldystrophie.....	12
Abbildung 2: Hypertrophie des M. rhomboideus und M. triceps brachii	18

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Systematik der Myopathien	11
Tabelle 2: Myopathien mit Herzbeteiligung	15

Zusammenfassung

Kardiales Troponin T (cTnT) ist vor allem aufgrund seiner hohen Spezifität der bevorzugte Biomarker für die Diagnose myokardialer Schädigung. Die Spezifität der ersten Generation der von Roche Diagnostics produzierten cTnT-Assays wurde in Frage gestellt, als erhöhte cTnT-Konzentrationen bei Patienten mit Nierenversagen und Myopathien festgestellt wurden. Roche Diagnostics entwickelte einen neuen Antikörper, um diese re-exprimierten Skelettmuskel-Isoformen von cTnT nicht mehr zu detektieren. Die hohe kardiale Spezifität der neuen Generation der cTnT-Assays wurde in ausführlichen Studien bestätigt.

Dr. Windpassinger und Dr. Quasthoff entdeckten 2007 eine bisher unbekannte Form einer Myopathie (XMPMA), die außer dem Skelettmuskel auch die Herzmuskulatur befiel. Die betroffenen Patienten zeigten neben erhöhten Werten der Skelettmuskel-Creatinkinase (CK) auch einen Anstieg von cTnT, einem Marker für ischämische Kardiomyopathie, ohne jedoch die entsprechende klinische Symptomatik hierfür aufzuweisen.

Um eine mögliche Herzbeteiligung im Rahmen dieser Myopathie nachweisen zu können, wurde der Zusammenhang des für XMPMA spezifischen FHL1-Genotyps mit dem kardialen Phänotyp untersucht und eine neuartige Form der hypertrophen Kardiomyopathie entdeckt, die mit ausgeprägten Veränderungen der Morphologie, der Funktion und des Reizleitungssystems einhergeht.

Es ist anzunehmen, dass diese Veränderungen nicht zu einer klassischen Ischämie der großen Gefäße führen, sondern über den Befall kleiner Gefäße eine Erhöhung des cTnT-Spiegels verursachen. Es kann allerdings nicht mit absoluter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die erhöhten cTnT-Werte kardialen Ursprungs sind, diese könnten auch durch degenerierte Skelettmuskulatur verursacht werden.

Die Spezifität von cTnT wurde erneut in Frage gestellt, als entdeckt wurde, dass die mRNA der kardialen Isoformen von Troponin T und I in der Skelettmuskulatur von Myopathie-Patienten exprimiert wurde. Die klinischen Auswirkungen dieser Entdeckung blieben allerdings unklar. Die erhöhten cTnT-Werte waren entweder auf die kardiale Beteiligung im Rahmen der Myopathie zurückzuführen, oder die Exprimierung der mRNA für die kardialen Troponine, die im degenerierten und

sich regenerierenden Skelettmuskel stattfindet, war dafür verantwortlich und führte zur cTnT-Erhöpfung.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Überblick über die kardiale Beteiligung verschiedener Myopathien zu geben und die in früherer und aktueller medizinischer Fachliteratur zu findenden Hypothesen für die Erhöhung der cTnT-Werte zu diskutieren.

Um die Klärung der Frage nach der Spezifität moderner cTnT-Assays weiter voranzutreiben ist es nötig, eine Studie durchzuführen. Hierfür werden die Labor- und Untersuchungswerte von Myopathie-Patienten der neurologischen Ambulanz am Uniklinikum Graz erhoben und ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Studie werden direkte Auswirkungen auf das klinische Management und die Beratung von Myopathie-Patienten haben, da sie zeigen werden, ob eine Kardiomyopathie vorhanden ist und ob kardiales Troponin T auch in diesem Setting eine Daseinsberechtigung als herzspezifischer Marker hat.

Abstract

Cardiac troponin T (cTnT) is the biomarker of choice for the diagnosis of cardiac injury, largely because of its unique tissue specificity. The specificity of the first generation cTnT assay from Roche Diagnostics was initially questioned when increased concentrations of cTnT were found in patients with renal failure and skeletal muscle diseases. A new antibody was developed by Roche Diagnostics and validated to not detect these re-expressed skeletal muscle cTnT isoforms. Extensive experimental studies ultimately resulted in the conclusion that cTnT had unique cardiac specificity.

In 2007, Drs. Windpassinger and Quasthoff discovered a new form of muscular dystrophy (XMPMA) that involved not only skeletal muscle but also the heart muscle. The affected patients showed elevated levels of both skeletal muscle CK and of cardiac troponin T, a marker for ischemic heart disease, in the absence of any signs of ischemic heart disease. In order to establish a potential cardiac involvement in the disease, the correlation of the specific FHL1 genotype with the cardiac phenotype was examined and a novel phenotype of hypertrophic cardiomyopathy with distinct morphological, functional and electrical abnormalities was discovered.

It can be assumed that these pathologies cause myocardial injury not by classical large vessel ischemia but perhaps by a small vessel disease that increases cTnT concentrations in the blood samples. The origin of the highly elevated cTnT may predominantly be of cardiac origin; however, it cannot be ruled out that it may also come from the degenerating skeletal muscle.

There are some reports about the specificity of cTnT tests since expression of mRNA of the cardiac isoforms of troponin T and I in myopathic skeletal muscle has been found. Cardiac troponin T appears to be released from the regenerating skeletal muscle. The clinical significance of these findings remains unclear. Either the elevated cTnT values were due to involvement of heart muscle in skeletal muscle disease, or degenerating or regenerating skeletal muscles alone expressed mRNA for cTnT that could lead to a false positive cTnT test for ischemic heart disease in these patients.

The purpose of this thesis is to provide an overview of the cardiac involvement discovered in some myopathies and discuss different hypotheses for the origin of

the elevated cTnT levels by reviewing medical literature up to the present. In order to further improve the understanding of the aforementioned matters, it is essential to create a study with data collected from myopathy patients who present at the Neuromuscular Outpatient Clinic of the Department of Neurology, Medical University of Graz.

The study will have a direct effect on clinical management and counseling as the findings will show whether or not a cardiomyopathy is present, and whether the troponin T test is still valid as a marker for muscular diseases.

1 Einleitung

Kardiales Troponin T (cardiac Troponin T, cTnT) ist ein elementarer Testparameter im Rahmen der Herzinfarkt Diagnostik. Die kommerzielle Verfügbarkeit der ersten cTnT-Assays in den frühen 1990er Jahren führte bald zur Abkehr von der bisherigen diagnostischen Referenz bei Verdacht auf akuten Myokardinfarkt (AMI), der Bestimmung der Kreatinkinase-MB-Isoenzyme (CK-MB) im Serum. Variable Normalwerte der CK-MB, fehlende absolute Herzspezifität (CK-MB kann auch in der Skelettmuskulatur, im Gastrointestinaltrakt sowie im Uterus Schwangerer gefunden werden⁽¹⁾) und der nur kurz währende Anstieg der Serumwerte bei AMI schränken den diagnostischen Wert der Enzymbestimmung empfindlich ein.⁽²⁾

Das cTnT-Protein wird hingegen nur im Herzmuskel exprimiert, ebenso ist der Anteil von cTnT im Myokard höher als der von CK-MB. Dies führt zu den wesentlichen Vorteilen der kardialen Troponin T-Assays – ihrer hohen Spezifität und Sensitivität.^{(3),(4)} Im Jahr 2000 wurden die kardialen Troponine schließlich von der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie und dem American College of Cardiology zur Referenz im Bereich der biochemischen Marker für Myokardnekrosen ernannt.⁽⁵⁾

Durch konsequente Weiterentwicklung bis zur aktuell vierten Generation der Assays konnten die positiven Eigenschaften der Testverfahren ausgebaut werden. Kreuzreaktionen mit Troponinen der Skelettmuskulatur wurden beseitigt,⁽⁶⁾ und seit 2009 ist ein Troponin T „high sensitive“ Assay verfügbar, der auch die Erkennung geringstgradiger Myokardnekrosen ermöglichen soll.⁽⁷⁾

Trotz der vielfach belegten hohen Sensitivität dieses diagnostischen Markers und der erfolgreichen Anwendung in einem breit gefächerten klinischen Gebiet gibt es jedoch auch Berichte über falsch positive cTnT-Tests bei genetisch determinierten Myopathien ohne bestehenden Herzinfarkt. Dies warf die Frage nach der Spezifität dieses Tests im Rahmen der Herzinfarkt Diagnostik bei Myopathien auf und gab Anlass zur Entstehung der vorliegenden Diplomarbeit.

Der Neuigkeitswert dieser Arbeit besteht darin, dass zum Zeitpunkt des Verfassens nur wenige Fachartikel zum erwähnten Thema existierten, die zu keinem eindeutigen Ergebnis kamen.

Als Ergebnis ist zu erwarten, dass cTnT entweder weiterhin ein herzspezifischer Marker bleibt und auch bei Myopathien im Sinne einer möglichen Herzmuskelpathologie nachweisbar ist, oder durch den Nachweis falsch positiver Testergebnisse die Spezifität des Markers bei Myopathien neu diskutiert werden muss.

2 Troponin T

2.1 Struktur und Funktion

Die Troponin-Proteine sind wichtige Bestandteile in der Regulierung des kontraktiven Apparates der Skelett- und Herzmuskulatur. Der Troponin-Komplex befindet sich am dünnen Filament der kontraktiven Muskelfaser und besteht aus den drei Untereinheiten C („Calcium bindend“), T („Tropomyosin bindend“) und I („Inhibitorisch“).⁽⁸⁾

Troponin C bindet an Kalzium, das nach der neuronalen Stimulation aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird. Troponin T verbindet den Troponin-Komplex mit Tropomyosin und ist wichtig für die Aktivität der Kalzium-regulierten myofibrillären Adenosintriphosphatase. Troponin I wiederum verhindert, dass es ohne entsprechenden neuronalen Stimulus zur Koppelung zwischen Aktin und Myosin kommt.⁽⁹⁾

Troponin T und I existieren jeweils in einer kardialen und in zwei auf die Skelettmuskulatur beschränkten Isoformen (für langsam und schnell zuckende Fasern, „slow twitch“ und „fast twitch“).⁽¹⁰⁾ Troponin C hingegen besteht nur aus zwei Isoformen, da die kardiale mit der „slow twitch“-Form im Skelettmuskel identisch ist. Jede Isoform wird von einem eigenen Gen reguliert. cTnT wird zwar im fetalen Skelettmuskel exprimiert, aber pränatal hinunterreguliert; in der Skelettmuskulatur des gesunden Neugeborenen ist keine Spur der kardialen Form von Troponin T zu finden.^{(11),(12),(13)}

2.2 Auswirkungen der strukturellen Unterschiede

Die Unterschiede im Aminosäureaufbau zwischen den kardialen (cTnT bzw. cTnI) und den im Skelettmuskel vorkommenden Formen von Troponin T und I ermöglichen die Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die für herzspezifische Immunoassays verwendet werden können.⁽¹⁴⁾

cTnI und cTnT unterscheiden sich untereinander durch ihre biochemischen Eigenschaften und damit auch in ihrer Nachweisbarkeit. Einerseits enthält das

Myokard deutlich mehr cTnT als cTnI (10.8 zu 4.6mg/g Feuchtgewicht),⁽¹⁵⁾ andererseits werden die beiden kardialen Troponine im Blutkreislauf durch Proteolyse, Oxidation, Reduktion, Phosphorylierung und Fragmentierung unterschiedlich stark abgebaut, was die Testergebnisse dementsprechend beeinflusst.⁽¹⁴⁾

Das cTnI-Molekül besteht aus Bereichen unterschiedlicher Stabilität, vor allem der C- und N-terminale (herzspezifische) Teil sind proteolytischem Abbau ausgesetzt. Verschiedene Tests können dadurch beeinflusst werden, da die für die Erkennung durch die Antikörper nötigen Epitope auf dem Molekül weit auseinander liegen und so im Falle proteolytischen Abbaus in einem dieser Bereiche geringere Mengen von cTnI erkannt werden könnten, als tatsächlich in der Probe vorhanden sind.⁽¹⁶⁾ Insofern ist davon auszugehen, dass die Sensitivität der von dieser Problematik betroffenen cTnI-Tests durch die geringe Stabilität des Moleküls negativ beeinflusst wird.⁽¹⁴⁾

Da die Epitope für die Antikörper des cTnT-Tests von Roche (dem einzigen Anbieter von cTnT-Assays für die in vitro Diagnostik) direkt nebeneinander lokalisiert sind, werden die Ergebnisse durch eine eventuelle Proteolyse des cTnT-Moleküls nur in sehr geringem Ausmaß verfälscht.⁽¹⁷⁾

cTnI und cTnT unterscheiden sich auch in ihrer Anfälligkeit für Komplexbildung voneinander. Während es bei cTnT keine Hinweise auf dadurch beeinflusste Testergebnisse gibt,⁽¹⁸⁾ wurde nachgewiesen, dass cTnI eine hohe Affinität dafür besitzt, mit TnC Komplexe zu bilden, was wiederum zur Beeinflussung der Antikörperbindung und somit zur Verfälschung der cTnI-Testergebnisse führen kann.^{(18),(19)}

Ähnliche Erkenntnisse liefert die Frage nach der Beeinflussung der Antikörpertests durch Phosphorylierung des Troponin-Moleküls: Während bei cTnT keine Phosphorylierungsstelle vorhanden und dementsprechend keine Beeinflussung möglich ist, ist die Immunreaktivität von cTnI mit verschiedenen Antikörpertests abhängig von der Phosphorylierung des Moleküls,⁽²⁰⁾ was bei gleichem Probenmaterial zu unterschiedlichen Ergebnissen der verschiedenen cTnI-Tests führt.

Das cTnI-Protein ist Veränderungen durch verschiedene biochemische Einflussfaktoren unterworfen, die abhängig von den im Assay verwendeten Antikörpern zu mehr oder weniger stark verfälschten Ergebnissen und daher auch

zu mangelnder Vergleichbarkeit der Resultate der cTnI-Assays untereinander führen. Da cTnT weit weniger anfällig für Veränderungen durch äußerliche Einflüsse ist und schlichtweg keine alternativen Antikörperpaare als die von Roche Diagnostics angebotenen zur Verfügung stehen, lassen sich die Ergebnisse der cTnT-Tests untereinander vergleichen und Ergebnisbeeinflussung durch oben angeführte Faktoren weitestgehend ausschließen.⁽¹⁴⁾

2.3 Die Troponin-Tests

Troponin-Tests basieren auf der Fähigkeit spezifischer monoklonaler Antikörper, bestimmte vordefinierte Aminosäuresequenzen am jeweiligen Troponinmolekül als Epitope zu erkennen und daran zu binden. Man verwendet Antikörperpaare, die zwei verschiedene Epitope auf dem Analyten erkennen.

Roche Diagnostics ist der einzige Anbieter von Antikörpern für in vitro cTnT-Tests (MAB M7 und MAB M11.7 Antikörper, u.a. verwendet in Enzymun-Test Troponin T, Elecsys Troponin T, TROPT sensitive, CARDIAC T quantitative), was die Vergleichbarkeit der darauf basierenden Testsysteme von verschiedenen Herstellern ermöglicht.

Da es cTnI-Tests von mehreren Firmen gibt (Stratus/Dade, Opus/Behring, Access/Sanofi u.a.), diese unterschiedliche Antikörperpaare verwenden und bis dato keine Standardisierung erreicht werden konnte, ergibt sich das im vorigen Unterkapitel bereits erwähnte Problem der mangelhaften Vergleichbarkeit der cTnI-Testergebnisse verschiedener Assays untereinander.

Ein weiterer Unterschied der verschiedenen cTnI-Testverfahren verglichen mit den cTnT-Assays liegt darin, dass es bei ersteren je nach Hersteller eigene Normal- und Cut-off-Werte zu beachten gibt, während das bei cTnT nicht der Fall ist. Weiters liegen die cTnI-Normalwerte zum Teil deutlich über denen von cTnT; der Grund hierfür ist jedoch nicht bekannt.⁽¹⁴⁾

2.4 Die Spezifität von Troponin T

Der große Vorteil der Nutzung der kardialen Troponine T und I (cTnT und cTnI) zur Diagnostik des akuten Koronarsyndroms besteht darin, dass sie im Vergleich zu den in den letzten Jahrzehnten genutzten Markern, allen voran den Isoenzymen der Kreatinkinase (CK-MB), sowohl eine höhere Sensitivität als auch Spezifität aufweisen. Die höhere Sensitivität ergibt sich aus dem höheren cTnT- bzw. cTnI-Gehalt des Myokards verglichen mit CK-MB (10.8 bzw. 4.6mg/g zu 1.4mg/g Feuchtgewicht), während die höhere Spezifität dadurch erklärt wird, dass sich die kardialen Isoformen der Troponine derart von den muskulären unterscheiden, dass die monoklonalen Antikörper der Troponin-Tests keine Kreuzreaktionen mit den muskulären Isoformen zeigen. Die Isoformen der CK-MB zeigen diesen Vorteil nicht, sodass sich für Troponin-Assays die Nutzung geringerer Cut-off-Konzentrationen und somit eine höhere Spezifität ergibt.^{(15),(4)}

2.4.1 Vergleich von cTnI zu cTnT bei klinischen Fragestellungen

Verschiedene Publikationen haben sich seit den 1990er Jahren mit der Frage nach möglichen Unterschieden in der Spezifität von cTnI und cTnT bei bestimmten klinischen Fragestellungen beschäftigt, „Troponin T ist wohl der am intensivsten medizinisch erforschte Herzmarker der letzten 10 Jahre“.⁽¹⁴⁾

Die höhere Anfälligkeit von cTnI gegenüber die Proteinstruktur beeinflussenden Faktoren (Proteolyse, Komplexbildung, Oxidation und Phosphorylierung) oder auch der höhere cTnT-Gehalt des Myokards wurden bereits ausführlich erläutert. Bei Bestimmung von cTnI mit verschiedenen Testmethoden führt die unterschiedliche Qualität der angebotenen Tests gemeinsam mit den (durch die fehlende Standardisierung bedingten) von 0,1 bis über 2 ng/ml schwankenden Cut-off-Werten zu Gefahren beim Vergleich und der Interpretation der Testergebnisse untereinander, wie bereits diskutiert, bieten die cTnT-Assays diese Problematik nicht.

Ein im Jahr 2000 veröffentlichter Artikel beschreibt einen Vergleich von histologischen Autopsie-Befunden mit vor dem Tod entnommenen Serumproben von 78 Patienten, die ohne klinische Hinweise auf einen Herzinfarkt verstorben waren. cTnT (Elecsys) wurde in diesem Setting als sensitiverer Indikator für einen Myokardinfarkt als cTnI (AxSYM) bewertet.⁽²¹⁾ Auch bei der Diagnostik und Risikostratifizierung der instabilen Angina pectoris ist cTnT cTnI überlegen - „kardiales Troponin T unterscheidet besser zwischen Patienten mit hohem und niedrigem Risiko als kardiales Troponin I“. ⁽²²⁾ Minimale Myokardverletzungen, wie sie im Rahmen einer Biopsie des Endomyokards auftreten, waren im Rahmen einer Studie bei der Hälfte der Patientin durch cTnT-Tests (Labor- als auch Schnelltests) nachweisbar, der cTnI-Schnelltest zeigte keine erhöhten Werte.⁽²³⁾ Weiters kann cTnT im Gegensatz zu cTnI auch als Marker für die frühe Identifizierung eines Transplantatverschlusses nach CABG dienen.⁽²⁴⁾

2.4.2 Kritische Stimmen zur Spezifität

Die hohe Spezifität von cTnT wurde des öfteren in Frage gestellt. Bei bis zu 30% der Patienten mit Nierenversagen im Endstadium wurden in zwischen 1995 und 1996 veröffentlichten Fachartikeln erhöhte cTnT-Serumspiegel gemessen, ebenso bei Fällen von Duchenne Muskeldystrophie (DMD), Polymyositis und Dermatomyositis, jeweils ohne klinische Hinweise auf eine myokardiale Schädigung, die den Anstieg der Werte hätte rechtfertigen können. Verglichen dazu zeigte cTnI nur beim Nierenversagen eine leichte Erhöhung der Spiegel.^{(25),(26),(27)} Man nahm an, dass die kardialen Isoformen der Troponine im geschädigten Skelettmuskel neu gebildet werden (wie das z.B. bei Ratten der Fall ist),⁽²⁸⁾ da cTnT die erste Troponin-Isoform ist, die im fetalen Muskel gebildet wird und dieser Vorgang analog zur Neubildung des B-Gens des CK (Kreatinkinase) - Enzyms im sich regenerierenden Skelettmuskel wäre, das ebenfalls eine Frühform der CK darstellt.^{(29),(30)} Eine weitere Theorie war, dass die im Skelettmuskel vorkommende Troponin-Isoform T4 über eine Kreuzreaktivität mit den monoklonalen cTnT-Antikörpern der Troponin-Assays zu falsch positiven Werten führen könnte.^{(2),(31)}

Die TnT-Tests der ersten Generation (ELISA Trop T 1991, TROPT Schnelltest 1994) verfügten noch über eine Kombination zweier Antikörper (1 MAB und 1 PAK, ein monoklonaler und ein polyklonaler Antikörper), die die beschriebene vermutete Kreuzreaktion mit TnT der Skelettmuskulatur zeigten.

2.4.3 Weiterentwicklung der Testverfahren und Erklärungsmodelle für falsch-positive Ergebnisse

Roche Diagnostics entwickelte einen neuen Antikörper, der die fetalen Isoformen von cTnT, die im geschädigten Skelettmuskel reexprimiert werden, nicht mehr detektierte.⁽³²⁾ Die zweite und dritte Generation der cTnT-Assays (TROPT sensitive 1996, CARDIAC T quantitative 1997, Enzymun-Test Troponin T 1995, Elecsys Troponin T 1996) zeigten dadurch nicht mehr das durch die oben beschriebene Kreuzreaktion verursachte Fehlverhalten, die Reproduktion der falsch positiven Resultate war nicht möglich.

Mit den neueren Testverfahren sank auch die Rate positiver cTnT-Werte bei Patienten mit chronischem Nierenversagen.⁽⁴⁾ Ebenso konnte mit den Tests der zweiten Generation weder bei Rhabdomyolyse-Patienten noch bei Marathonläufern nach Absolvierung eines dreitägigen Laufs ein cTnT-Anstieg nachgewiesen werden, klinisch nachweisbare Schäden an der Skelettmuskulatur führen also nicht zu einer Beeinflussung der kardialen Troponin-Tests der neueren Generation.

Weiters könnte der cTnT-Anstieg bei terminalem Nierenversagen durch Re-Expression von cTnT im Rahmen einer begleitenden Myopathie (urämische Polyneuropathie) erklärt werden,^{(33),(34)} genauso gibt es aber auch Studien, die weder cTnT-mRNA noch das finale Protein im Skelettmuskel von Patienten mit Nierenversagen im Endstadium nachweisen konnten.⁽³⁵⁾ Die fetalen Isoformen von cTnT, die bei chronisch Nierenkranken in der Skelettmuskulatur gebildet werden, werden von Tests der zweiten Generation ebenfalls nicht nachgewiesen, was wiederum für die Herzspezifität der Testverfahren spricht.⁽³⁶⁾

Eine weitere mögliche Ursache für das Zustandekommen falsch positiver Troponin T-Ergebnisse liegt im Umgang mit dem Probenmaterial: Fibrin kann dazu führen, dass die Trennung der gebundenen von den freien Analyten verzögert und damit

das Ergebnis falsch positiv beeinflusst wird, was bei vorzeitiger Bearbeitung der Proben durchaus passieren kann und bei den zunehmend unter Zeitdruck stehenden Laboranten keine allzu große Seltenheit mehr darstellt. Die Bestimmungsgrenze für cTnT im Serum liegt aktuell bei 0,03 µg/L, was die hohe Sensitivität dieser Testmethode bestätigt. So kann dieser Marker bei Patienten ohne eindeutige klinische Symptomatik ein Hinweis auf Mikroinfarzierungen sein, da er schon auf kleinste Schädigungen des Myokards reagiert.⁽¹⁴⁾

Mit der Einführung des hochsensitiven cTnT-Assays (cTnT-hs, Elecsys® Troponin T high-sensitive) parallel zur aktuell vierten Generation der Standard-Assays gibt es seit 2009 die Möglichkeit, „minor myocardial damage“ noch früher nachweisen zu können. Die Bestimmungsgrenze für cTnT liegt mit diesem Testverfahren bei < 0,013µg/L.⁽³⁷⁾

3 Myopathien

Myopathien sind Erkrankungen der quergestreiften Skelettmuskulatur, die mit struktureller oder funktioneller Beeinträchtigung des Muskelgewebes einhergehen. Die Einteilung erfolgt in primäre und symptomatische (als Teilsymptom einer anderen Grunderkrankung) Formen (Tab. 1).

Die Gruppe der primären Myopathien lässt sich weiter gliedern in genetisch bedingte (z.B. Dystrophinopathien) und autoimmunologisch verursachte, wie die Dermatomyositis, Polymyositis und Myasthenia gravis pseudoparalytica. Die allgemeine Symptomatik der Myopathien ist durch motorische Schwäche gekennzeichnet, der Verlauf meist über Jahre hinweg langsam progredient. Die Muskulatur ist in der Regel atrophiert, kann aber ebenso durch binde- und fettgewebigen Ersatz als Pseudohypertrophie (z.B. „Gnomenwaden“) imponieren, die Lokalisation ist meist symmetrisch (Abb. 1). Die Sensibilität ist intakt, Reflexe vermindert bis fehlend, in den meisten Fällen entwickeln sich nach Jahren Kontrakturen.⁽³⁸⁾ Einige Formen der primären

Tabelle 1: Systematik der Myopathien (38)

- Muskeldystrophien
- spinale Muskelatrophie und andere Motoneuronerkrankungen
- Myotonien und periodische Lähmungen („Channelopathien“)
- metabolische Myopathien
- mitochondriale Myopathien und Enzephalomyopathien
- kongenitale Myopathien
- entzündliche Myopathien
- Myopathien bei Endokrinopathien
- Muskelsymptome bei Elektrolytstörungen
- toxische und medikamentöse Myopathien
- Störungen der neuromuskulären Übertragung
- Tumoren
- Verletzungen

Myopathien beschränken sich nicht rein auf die Skelettmuskulatur, sondern greifen auch auf andere Organe über. Das Herz ist aufgrund seiner ähnlichen Struktur und Funktion eines der am häufigsten mitbetroffenen Organe (Tab. 2).

Die Herzbeteiligung kann lange vor, gleichzeitig mit oder auch erst lange nach dem ersten Auftreten der Myopathie symptomatisch werden. Noch ist nicht geklärt, weshalb nicht alle Patienten innerhalb einer Krankheitsgruppe gleichermaßen betroffen sind, eventuell ist der Grad der Herzbeteiligung je nach Mutation verschieden.

Die Folgen reichen von Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen, Myokardverdickung, Dilatation der Herzhöhlen mit eventueller Klappeninsuffizienz, Endo-/Myokardfibrose (kongenitale Muskeldystrophie Fukuyama, Barth-Syndrom), Angina pectoris durch Reduktion der Koronarreserve (Dystrophinopathien, Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, myotone Dystrophie), regionalen Wandbewegungsstörungen und systolischen oder diastolischen Funktionsstörungen bis hin zur Herzinsuffizienz.⁽³⁹⁾

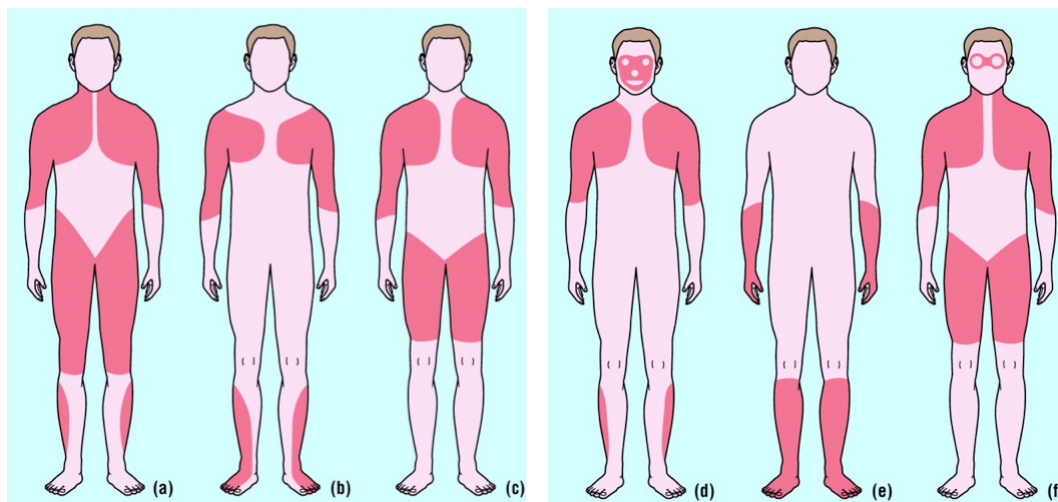


Abbildung 1: Verteilungsmuster der Muskelschwäche bei verschiedenen Formen der Muskeldystrophie. (40)
(a) Duchenne- und Becker-Typ (b) Emery-Dreifuss-Typ (c) Gliedergürtel-Typ (d) facioscapulohumeraler Typ (e) distaler Typ (f) oculopharyngealer Typ

3.1 X-chromosomal vererbte Myopathien mit kardialer Beteiligung

Die häufigste Form der X-chromosomal vererbten Myopathien ist die vom Typ Duchenne (DMD, Genlocus Xp21.2, Inzidenz 20-30/100.000, Prävalenz 4/100.000), die gemeinsam mit der Becker-Dystrophie die Gruppe der sogenannten Dystrophinopathien bildet.

Die DMD tritt aufgrund des Vererbungsmodus fast nur bei Knaben auf, die Mütter sind meist (gesunde) Konduktorinnen. Das Krankheitsbild manifestiert sich zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr, ist durch einen völligen Mangel an funktionellem Dystrophin (einem Strukturprotein der Muskelfasermembran) gekennzeichnet und führt aufgrund der raschen Progredienz bei den Betroffenen zu einer Lebenserwartung von 20-25 Jahren. Die Atrophie der Skelettmuskulatur beginnt im Beckengürtel und breitet sich bald auf die stammnahe Muskulatur der Beine sowie auf die Arme aus.

Erkrankte fallen spätestens ab dem Vorschulalter durch Mühe beim Treppensteigen, Hohlkreuzbildung, Pseudohypertrophie der Waden durch Fetteinlagerung sowie das typische Duchenne- bzw. Trendelenburg-Hinken („Watschelgang“) auf. Die Skoliose führt zu sekundären Atemproblemen, die Patienten sterben an Ateminsuffizienz oder sekundären Komplikationen.

Bei der Form der Becker-Muskeldystrophie (BMD, Genlocus Xp21.2, Inzidenz 3/100.000, Prävalenz ca. 1/100.000) hingegen führt eine nicht vollständig gestörte Proteinbildung zu reduzierten Spiegeln funktionellen Dystrophins oder zur Expression von nur teilweise funktionellem Protein.

Das klinische Erscheinungsbild ist ident zur DMD, aber weniger schwer ausgeprägt und mit dementsprechend deutlich geringerem negativen Einfluss auf die Lebenserwartung (40-50 Jahre).^{(41),(42)} Die Krankheit manifestiert sich zwischen dem ersten und zweiten Lebensjahrzehnt, bedingt durch die im Vergleich zur DMD weniger rasche Progression sind die Patienten oft noch bis in die vierte Lebensdekade gehfähig.⁽³⁸⁾

In bis zu 90% der Fälle sind Dystrophinopathien mit Herzbeteiligung verbunden, bei Konduktorinnen kann diese völlig fehlen oder aber auch sehr ausgeprägt sein.⁽⁴³⁾ Die Herzbeteiligung kann zu Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen, Wandverdickung, Dilatationen mit oder ohne sekundärer Klappeninsuffizienz und

systolischer/diastolischer Funktionsstörung mit oder ohne Herzinsuffizienz führen.⁽⁴⁴⁾

Die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EMD, Genlocus Xq28, selten aber auch autosomal dominant vererbt, Inzidenz 1/100.000, Prävalenz ca. 1-9/1.000.000) wird durch Mutationen im Emerin-Protein verursacht.

Die Erkrankung manifestiert sich ab der Kindheit oder der frühen Adoleszenz mit skapulo-humero-peronealer Pseudohypertrophie, Kontrakturen der Achillessehnen und im Bereich des Ellenbogens sowie einer „rigid spine“-Symptomatik, die sie phänotypisch von den bereits erwähnten X-chromosomal vererbten Myopathien unterscheidbar macht.^{(45),(46)} Die Gehfähigkeit bleibt bis zur dritten Lebensdekade oder auch lebenslang erhalten.⁽³⁸⁾

Die EMD ist häufig mit kardialen Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen assoziiert. Vor allem bradykarde Herzrhythmusstörungen treten plötzlich und ohne vorhergehende Symptomatik auf und gelten als die häufigste mit EMD assoziierte Todesursache, weshalb die frühzeitige Implantation eines Schrittmachers empfohlen wird. In selteneren Fällen kann die EMD auch zur Herzinsuffizienz führen und so eine Transplantation erforderlich machen.⁽⁴⁷⁾

Das McLeod-Akanthozytose-Syndrom (MLS, Genlocus Xp21.1, weltweit erst ca. 150 bekannte Fälle) wird durch abnorme Expression der Kell-Blutgruppenantigene verursacht und führt zu Akanthozytose, Anämie, psychiatrischen und neuromuskulären Störungen wie Areflexie, neurogener Muskelatrophie, Myopathie und Kardiomyopathie, wobei die Herzbeteiligung nur in einem einzigen Fall konkret beschrieben wurde.^{(48),(49),(50),(51)}

Tabelle 2: Myopathien mit Herzbeteiligung (52)

Myopathie-Typ	Erbgang	Genlokalisierung	Genprodukt
Dystrophinopathien (Duchenne, Becker)	Xr	Xp21.2	Dystrophin
Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie	Xr	Xq28	Emerin
	ad	1q11-23	Lamin A/C
Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie	ad	4q35	ub
Gliedergürtel-Muskeldystrophie 1B [20]	ad		Lamin A/C
Gliedergürtel-Muskeldystrophie 2C [62]	ar	13q12	γ -Sarcoglycan
Gliedergürtel-Muskeldystrophie 2D	ar	17q12-q21.33	α -Sarcoglycan
Gliedergürtel-Muskeldystrophie 2E	ar	4q12	β -Sarcoglycan
Gliedergürtel-Muskeldystrophie 2F	ar	5q33-34	δ -Sarcoglycan
Kongenitale Muskeldystrophie Fukuyama	ar	9q31-33	Fukutin
Myotone Dystrophie Typ 1	ad	19q13.3	Myotone Dystrophie Phosphokinase
Myotone Dystrophie Typ 2	ad	3q	ub
Glykogenose II (Pompe)	ar	17q23	α -Glucosidase
Glykogenose III (Forbes)	ar	1p21	Debranching Enzyme
Glykogenose IV (Andersen)	ar	ub	Branching Enzyme
Glykogenose VII (Tarui)	ar	1cen-q32	Phosphofruktokinase
Glykogenose IX	Xr	Xq13	Phosphoglyceratkinase
Systemischer Carnitinmangel	ar	5q31	OCTN2
Myoadenylat-Deaminase-Mangel	ar	5q31	Myoadenylat-Deaminase
Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel	ub	ub	Acyl-CoA-Dehydrogenase
Lysosomale Glykogen-Speichererkrankung	ub	ub	ub
Mitochondriopathien	mv, ad, ar	mtDNA, nDNA	Atmungskettenenzyme, RNA
Desminopathien:			
- granulofilamentöser Typ [49]	ad	2q35	Desmin
- myofibrillärer Typ	ad	10q22.3	ub
- mit zytoplasmatischen Einschlusskörpern	ad	11q22	$\alpha\beta$ -Cristallin
- mit Mallory-Einschlusskörpern	ar	12q	ub
Nemalin-Myopathie	ar, ad	1q42	α -Actin
	ar	1q21-23	α -Tropomyosin
	ar	2q21.2-22	Nebulin
Central-Core-Erkrankung	ad	19q13.1	Kardiales Myosin
Kongenitale Fasertypen-Dysproportion	ub	ub	ub
Barth-Syndrom	Xr	Xq28	Tafazzin
Bethlem-Myopathie	ad	21q22.3	Kollagen VI α 1,2-Subunit
	ad	2q37	Kollagen VI α 3-Subunit
McLeod-Syndrom	Xr	Xp21.1	Kell-Antigen

ad: autosomal dominant, **ar:** autosomal rezessiv, **Xr:** X-chromosomal rezessiv, **mv:** maternal vererbt, **ub:** unbekannt, **OCTN:** organic cation/carnithine transporter

3.2 Autosomal vererbte Myopathien mit kardialer Beteiligung

Die Dystrophia myotonica Curschmann-Steinert oder myotone Dystrophie Typ 1 (DM1, Genlocus 19q13.3, autosomal dominanter Erbmodus, Inzidenz 13,5/100.000, Prävalenz 5/100.000) ist die häufigste Myopathie des Erwachsenenalters. Sie bildet gemeinsam mit der proximalen myotonen Myopathie (PROMM) die Gruppe der myotonen Dystrophien.

Eine instabile Expansion von CTG-Trinukleotid-Sequenzen führt zur verminderten Produktion der Myotonin-Proteinkinase und dadurch in weiterer Folge zu Schäden an der Muskelfasermembran und der Calciumpumpe SERCA.⁽⁵³⁾ Bei maternalen Vererbung nimmt die Länge der Expansionen zu und führt so bei nachfolgenden Generationen zu immer früher einsetzender Manifestation der Erkrankung.

Die DM1 wird meist ab dem frühen Erwachsenenalter symptomatisch. Der Muskelbefall steht im Vordergrund und äußert sich vor allem durch Schwäche der Gesichtsmuskeln („Facies myopathica“) und der distalen Extremitätenmuskulatur. Nach festem Griff um einen Gegenstand kann der Patient diesen nur mit viel Mühe wieder loslassen (verzögerte muskuläre Erschlaffung, Myotonie).

Der Befall anderer Organe kann zu weiteren Krankheitssymptomen wie Katarakt, Dysphagien, Kardiomyopathien, Diabetes, Hodenatrophie und Fertilitätsstörungen führen, die Patienten haben eine Lebenserwartung von ca. 50 Jahren.

Die proximale myotone Myopathie oder myotone Dystrophie Typ 2 (PROMM oder DM2, Genlocus 3q21, autosomal dominanter Erbmodus, Inzidenz 0,5/100.000, Prävalenz n.b.) imponiert ähnlich wie die DM1 durch Muskelschwäche und -atrophie (allerdings mit proximalem Verteilungsmuster), Myotonie und Katarakt, der Verlauf ist aber milder.⁽³⁸⁾

Die Herzbeteiligung bei den myotonen Dystrophien äußert sich häufig durch Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen (bei DM1 mit im Laufe der Erkrankung zunehmender Häufigkeit), seltener durch Wandverdickung, Herzinsuffizienz oder Befall der glatten Muskulatur der Koronarien.^{(54),(55),(56),(57)}

Die fazio-skapulo-humerale Dystrophie (FSHD, Dystrophie Duchenne-Landouzy-Déjérine, Genlocus 4q35, autosomal dominanter Erbmodus, Inzidenz 5/100.000, Prävalenz 1-5/100.000) manifestiert sich im zweiten bis dritten Lebensjahrzehnt, die Lebenserwartung ist nicht verringert.

Zu Beginn imponiert sie durch Schwäche der Gesichtsmuskeln und der Schultergürtelmuskulatur, im weiteren Verlauf werden dann über die nächsten Jahrzehnte hindurch Beckengürtel- und Extremitätenmuskulatur befallen. Eine Herzbeteiligung kann sich durch Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen, Verminderung der Koronarreserve oder Wandverdickung äußern.^{(38),(52)}

3.3 Myositiden mit kardialer Beteiligung

Wie bei einigen der bereits beschriebenen Myopathien kann auch bei Myositiden, entzündlich bedingten Erkrankungen der quergestreiften Muskulatur, das Herz mitbetroffen sein. Die Krankheitsgruppe lässt sich in autoimmunologisch bedingte, infektiöse und durch chronisch-entzündliche Erkrankungen ausgelöste Formen unterteilen. Die allgemeine Symptomatik der Myositiden umfasst den meist symmetrischen Muskelbefall, rasche Progredienz, Fehlen von sensiblen Ausfällen, gelegentlich stark erhöhte Serum-CK-Werte, lokale Schmerzen und Fehlen familiärer Belastung.

Bei der Polymyositis sind zelluläre, bei der Dermatomyositis hingegen humorale Immunmechanismen ursächlich für die jeweilige Erkrankung. Die Inzidenzraten bewegen sich jeweils zwischen fünf und zehn Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr, Frauen sind häufiger betroffen als Männer.

Ab der Kindheit oder dem frühen Erwachsenenalter entwickeln sich bei beiden Formen Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Myalgien, Arthralgien, häufig auch Fieber; im weiteren Verlauf dann proximal betonte Muskelschwäche und druckschmerzhaftes Muskulatur.

Die Dermatomyositis wird zusätzlich durch rötlich-livide Hautverfärbungen v.a. im Gesichtsbereich, auf der Brust oder beiden Handrücken symptomatisch. Eine kardiale Mitbeteiligung ist möglich und kann zu Extrasystolen und Herzinsuffizienz führen.⁽³⁸⁾

Die Einschlusskörperchenmyositis (Inclusion Body Myositis, IBM, Inzidenz ca. 1/100.000) stellt die häufigste Form einer entzündlichen Myopathie bei Patienten ab dem 50. Lebensjahr dar. Männer sind dreimal häufiger betroffen als Frauen. Die muskuläre Atrophie ist oft asymmetrisch und betrifft häufig die Fingerflexoren oder den M. quadriceps femoris, Myalgien stehen nicht im Vordergrund.

Eosinophile sarkoplasmatische Einschlüsse sind typisch für die Histologie der IBM. Die Herzbeteiligung kann zu atrioventrikulären Überleitungsstörungen, Tachyarrhythmie und dilatativer Kardiomyopathie führen.^{(58),(59)}

4 XMPMA - eine neu entdeckte X-chromosomal vererbte Myopathie

Im Januar 2008 erschien im „American Journal of Human Genetics“ ein Artikel unter dem Namen „An X-Linked Myopathy with Postural Muscle Atrophy and Generalized Hypertrophy, Termed XMPMA, Is Caused by Mutations in FHL1“⁽⁴⁶⁾, der eine am LKH Graz im Jahr 2007 entdeckte österreichische Familie beschrieb, die Symptome einer bis dahin unbekannten X-chromosomal rezessiv vererbten Myopathie zeigte.

Die sechs ausschließlich männlichen Betroffenen imponierten durch scapulooperoneale Muskelschwäche, Atrophie des M. soleus, peroneus longus, tibialis anterior, vastus medialis, biceps femoris, erector spinae, und des unteren Anteils des M. latissimus dorsi. Parallel zur Atrophie fanden sich auch hypertrophierte Muskeln, unter anderem der M. biceps brachii, rectus abdominis und sternocleido-mastoideus. Generell zeigten Muskeln mit vorrangig Typ I-Fasern ein atrophes, Muskeln mit überwiegend Typ II-Faseranteil hingegen ein hypertrophes Erscheinungsbild.

Kontrakturen der Achillessehnen und ein kurzer Nacken mit vermindertem Flexions- und Extensionsumfang führten mit erstmaligem Auftreten der Symptomatik ungefähr ab dem 30. Lebensjahr zu Rückenschmerzen, Skoliose und Gangstörungen.

Bei sechs im Alter von 45-72 Jahren verstorbenen männlichen Mitgliedern der Familie wurde eine kardiologische Todesursache festgestellt. Der Zusammenhang zwischen Myopathie und Herztod dieser Patienten blieb ungeklärt, anhand früherer echokardiographischer Untersuchungen bestand allerdings der Verdacht auf hypertrophe Kardiomyopathie.



Abbildung 2: Hypertrophie des M. rhomboideus und M. triceps brachii (A und B). (45)

Aufgrund dieser Familienanamnese wurden auch die Studienteilnehmer kardiologisch untersucht, bei vier Patienten konnte eine hypertrophe Kardiomyopathie festgestellt werden.

Ein 35-jähriger Patient aus einer englischen Familie zeigte eine sehr ähnliche Symptomatik (Hüftbeuger-Schwäche, Hypertrophien an Armmuskulatur und Schultergürtel, eingeschränkte Nackenflexion), über immunhistochemische Methoden und Western-Blotting konnten die typischen X-chromosomal vererbten Myopathien ausgeschlossen werden.

Im familiären Umfeld dieses Patienten wurden weitere, ausschließlich männliche Fälle mit der gleichen Symptomatik beschrieben, die allerdings bisher (wohl aufgrund des ähnlichen Krankheitsbildes) unter der Diagnose einer Becker-Muskeldystrophie bekannt waren. Aufgrund vieler Übereinstimmungen mit den Symptomen der bereits beschriebenen neuartigen Myopathie der österreichischen Familie wurden die Fälle aus England in die Studie miteinbezogen.⁽⁴⁶⁾

4.1 Methoden der XMPMA-Studie von 2008

Bekannte X-chromosomal vererbte Myopathien wie DMD, BMD und EDMD sowie autosomal vererbte Gliedergürtel-Muskeldystrophien wurden durch Western-Blotting und immunocytochemische Färbung als in Frage kommende Diagnosen ausgeschlossen, ebenso durch molekulargenetische Analysen myotone Dystrophie Typ I und II, das Kennedy-Syndrom und die McLeod-Myopathie.

Um auch Varianten der DMD oder BMD als Ursache für die beschriebene Symptomatik auszuschließen, wurde der DMD-Genlocus mittels immunocytochemischer Verfahren sowie direkter und indirekter DNA-Analysen untersucht.

Die Suche nach der dem Krankheitsbild zugrundeliegenden Veränderung im Erbgut konzentrierte sich nach Durchführung von STRP (single-tandem-repeat Polymorphismus) und SNP (singlenucleotid Polymorphismus)-Analysen auf vier Gene in der Region um Xq25-q27.1, die für die Exprimierung von Strukturproteinen verantwortlich sind: MBNL3, VGLL1, FGF13 und FHL1.

Die DNA-Sequenzierung der kodierenden exonischen Bereiche von FHL1 („four and a half LIM-domain 1“ Gen) bei den Betroffenen der österreichischen Familie

ergab eine Transversionsmutation (C224W) an Position 672 auf Xq26.3, die zum Austausch der Aminosäure Cystein durch Tryptophan führte; am FHL1-Gen der englischen Familie konnte eine Insertion von drei Basenpaaren nach Nukleotid 381 und daraus resultierend das Einfügen eines Isoleucin-Restes innerhalb der zweiten LIM-Domäne festgestellt werden.

Western-Blotting ergab einen nahezu völligen Verlust der FHL1-Proteinbanden bei den Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Da die FHL1-Banden auch in der Kontrollgruppe mit Muskeldystrophie-Patienten (LGMD und BMD) nur unwesentlich abgeschwächt waren, ergab sich die Schlussfolgerung, dass die Minderexpression des FHL1-Proteins nicht als typisch für die Pathogenese der bereits bekannten Myopathien angesehen werden kann und somit ein Alleinstellungsmerkmal der beschriebenen Erkrankung darstellt. Durch immunhistochemische Analysen konnte man zeigen, dass FHL1 beim Gesunden in allen Skelettmuskelfasern exprimiert wird, mit höherem Anteil in den schnellen Fasern. Das Muster bei der Gruppe der XMPMA-Patienten zeigte eine ähnliche Verteilung bei allerdings geringerer Intensität, wodurch die verminderte Bildung von FHL1 veranschaulicht wurde.⁽⁴⁶⁾

Bis Ende 2011 wurden im LKH Graz 17 männliche XMPMA-Patienten und 23 weibliche (heterozygote) Konduktorinnen (Verwandte 1. Grades) untersucht. Zum Vergleich wurde eine gesunde Kontrollgruppe bestehend aus 22 männlichen und 23 weiblichen Familienmitgliedern herangezogen.

Es erfolgte eine detaillierte klinische und kardiovaskuläre Phänotypisierung der Patienten mit EKG, Herzultraschall, Strain Rate Imaging zur Untersuchung der regionalen Myokardfunktion und kardialer Kernspintomographie (cMRI) zur Abklärung eventueller struktureller Myokardveränderungen. Mithilfe der Spiroergometrie wurde die kardiale und pulmonale Leistungsfähigkeit gemessen, ein Langzeit EKG diente der Detektion von Herzrhythmusstörungen, Patienten mit pathologischem Herzinfarktfermentmuster wurden einer Herzkatheteruntersuchung bzw. einem Herz CT zur Ischämiediagnostik zugeführt.

Bei allen betroffenen männlichen Patienten waren die Serum-Konzentrationen von CK, CK-MB, NT-proBNP und cTNT erhöht, die cTNT-Werte sogar um den Faktor 16 - so hoch wie bei keiner anderen Dystrophie. Phänotypisch zeigten alle männlichen XMPMA-Patienten die für das Krankheitsbild typischen und bereits diskutierten muskuloskeletalen Auffälligkeiten.

Drei der Konduktorinnen zeigten eine mildere Ausprägung der Symptome, wie Vergrößerung des Finger-Boden-Abstands beim Vorwärtsbeugen, Kontrakturen oder eine „rigid spine“ Symptomatik; NT-proBNP war als einziger Laborparameter bei den Genträgerinnen in sieben Fällen gering erhöht.

Die männlichen Patienten wiesen eine neue Form der hypertrophen Kardiomyopathie auf, die durch eine asymmetrische Septumhypertrophie mit Betonung des Apex, intramuraler Fibrose und besonders auffällig, spongiöser Umformung des linksventrikulären Myokards („swiss cheese-like“) gekennzeichnet war. Ein Teil der betroffenen Männer zeigte zusätzlich eine rechtsventrikuläre Hypertrophie mit verstärkter Trabekularisierung. Die globale systolische linksventrikuläre Funktion war normal, jedoch die diastolische und regionale systolische Funktion deutlich reduziert, sodass man von einer komplexen myokardialen Dysfunktion sprechen kann. Die Einschränkung der regionalen linksventrikulären Funktion war vor allem in den inferolateralen, septalen und anterioren Segmenten zu sehen, wo auch die morphologischen Veränderungen wie lokale Fibrosen am deutlichsten erkennbar waren. Mit Strain Rate Imaging können funktionelle Anomalien des Herzmuskels in einem frühen Stadium der Krankheit detektiert werden, was den Schluss zulässt, kardiales Screening auf diese moderne Ultraschalltechnik zu richten, um damit frühzeitig die phänotypischen Ausprägungen erkennen zu können.

Kennzeichnend für die FHL1 Kardiomyopathie waren außerdem EKG-Veränderungen mit pathologischen Q-Zacken und negativen T-Wellen vor allem in den linksanterioren Ableitungen sowie maligne Rhythmusstörungen. Den Autoren zufolge kann angenommen werden, dass all diese Pathologien eine Schädigung des Myokards nicht durch den klassischen Verschluss großer Gefäße verursachen, sondern diese möglicherweise durch kleinere Gefäßen bedingt ist und zu einer cTnT-Erhöhung in der Zirkulation führen. Die 16-fach erhöhte cTnT-Konzentration wurde bei allen betroffenen Männern gesehen und ist pathognomonisch; da die Troponin T-Werte bei anderen Muskeldystrophien deutlich weniger stark erhöht sind, könnte so eine bessere Differenzierung zu XMPMA möglich sein. Klinisch äußerten sich diese Befunde in verminderter körperlicher Leistungsfähigkeit bedingt durch Reduktion der maximalen Sauerstoffaufnahme-fähigkeit.

Der Vererbungsmodus von XMPMA wird als X-rezessiv angenommen. Da sich der kardiale Phänotyp in milder Ausprägung auch bei einem Teil der heterozygoten Frauen zeigte, stellt sich die Frage, ob nicht eher ein X-chromosomal dominanter Erbgang mit verminderter Penetranz und Expression der Symptome bei (weiblichen) Merkmalsträgerinnen anzudenken ist. Die Autoren sind aber der Meinung, dass der weibliche Phänotyp eher für eine zufällige, X-chromosomal verlinkte Inaktivierung spricht als für einen dominanten Erbgang.

Mögliche Ansatzpunkte für die zukünftige Therapie der XMPMA-Kardiomyopathie wären die diastolische Dysfunktion und Fibrosierung. Antagonisten des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) könnten die Wirkung von Angiotensin auf die Fibrosierung und die Relaxierung des Myokards beeinflussen, ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten wurden bereits erfolgreich bei hypertropher Kardiomyopathie im Rahmen von Tierversuchen eingesetzt.⁽⁶⁰⁾

Schlussfolgernd konnte postuliert werden, dass Patienten mit den klinischen Zeichen einer XMPMA frühzeitig kardial gescreent werden sollten, da der kardiale noch vor Auftreten des neurologischen Phänotyps evident wird und somit eine bessere Risikostratifizierung mit frühzeitigem therapeutischem Management erfolgen kann.

4.2 Auswirkungen der Mutationen im FHL1-Gen

FHL1 existiert in drei verschiedenen Isoformen. Es wird sowohl in der Skelett- als auch in der Herzmuskulatur gebildet und soll für die Synthese und den Aufbau der Sarkomere verantwortlich sein.⁽⁶¹⁾

Die am häufigsten vorkommende Isoform A (FHL1A) wird am stärksten in der Skelettmuskulatur exprimiert, ist seltener in der Herzmuskulatur und in geringen Konzentrationen in Plazenta, Ovar, Prostata, Testis, Dünndarm und Colon zu finden. Isoform B (FHL1B) existiert vorrangig in der Skelettmuskulatur, weniger häufig in Herz, Colon, Prostata und Dünndarm. Isoform C (FHL1C) wird in Testis, Herz und Skelettmuskulatur gebildet, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als Isoform A.^{(46),(62),(63)}

Die C224W-Mutation bei den Betroffenen der österreichischen Familie wirkt sich auf Isoform A und B aus, aber nicht auf C, während die bei den Patienten der englischen Familie gefundene Insertionsmutation alle drei Isoformen betrifft.

Da die Aminosäuresequenzen der Isoformen A und B nicht völlig ident sind, wird vermutet, dass sich unterschiedliche funktionelle Konsequenzen aus der C224W-Mutation ergeben. Bei FHL1A dürfte dadurch die Proteinbindungsfähigkeit, die über die dreidimensionale Konfiguration von Zink-Ionen gesteuert wird, funktionell beeinträchtigt sein, was zu Störungen bei der Interaktion zwischen Proteinen und zu geringerer struktureller Stabilität samt höherer Anfälligkeit des Proteins für die Proteolyse führt.^{(64),(65)}

Eine vom Mechanismus her ähnliche Mutation im Muskel-LIM-Protein (MLP bzw. CSRP3, wird in Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert ⁽⁶⁶⁾), bei der ebenfalls die Konfiguration der durch Zink-Ionen gesteuerten Proteinbindungsstellen gestört ist, ist als Ursache der hypertrophen Kardiomyopathie bekannt. Daher gilt es als sehr wahrscheinlich, dass eine Mutation in diesem Bereich bei FHL1 zur Hypertrophie der Skelett- und auch der Herzmuskulatur führt.^{(65),(46)}

Die C224W-Mutation bei FHL1B verursacht eine Beeinträchtigung des Proteintransports zwischen Nukleus und Cytoplasma.⁽⁶²⁾

Die verschiedenen LIM-Domänen von FHL1 dienen mehreren Myosin-bindenden Proteinen als Bindestelle, unter anderem SRF, MYBPC1 (Myosin-bindendes Protein C-Gen, spezifisch für Muskelfasern vom Typ I), MYBPC3 (Herzmuskulatur) und ERK2. Man vermutet, dass FHL1 über die Steuerung von MYBPC für den Aufbau der Sarkomere verantwortlich ist, während bekannt ist, dass Mutationen in MYBP3 die zweithäufigste Ursache der familiären hypertrophen Kardiomyopathie darstellen. Mutationen in verschiedenen Bereichen der Bindungsstellen innerhalb der LIM-Domänen von FHL1 könnten so zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen führen.^{(67),(68),(69),(46)}

Das pseudoathletische Erscheinungsbild der XMPMA-Patienten in Verbindung mit der parallel dazu auftretenden Atrophie der posturalen Muskulatur könnte man als typisch für FHL1-Mutationen im Bereich der Bindungsstellen für MYBPC1, SRF und ERK2 ansehen. Wahrscheinlich übernimmt FHL1 also eine wichtige Rolle in der Regulation der Hypertrophie der Skelettmuskulatur.

Zukünftig wird im Rahmen der Diagnostik bei genetisch bedingten Myopathien unklarer Ursache XMPMA differentialdiagnostisch abgeklärt werden bzw. von

anderen X-chromosomal vererbten Muskeldystrophien vom Duchenne-, Becker-, Emery-Dreifuss-, XMEA- und McLeod-Typ klar abgegrenzt werden müssen.

Da bei zumindest vier XMPMA-Patienten eine Kardiomyopathie bestand, wird FHL1 somit auch im Bereich der hereditären CMP eine bedeutendere Rolle spielen.⁽⁴⁶⁾

5 Die Rolle von cTnT bei Myopathien

Der 1997 in „Clinical Chemistry“ erschienene Artikel „Cardiac Troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle“⁽⁷⁰⁾ beschäftigt sich mit der Frage nach der Spezifität von cTnT bei Myopathien.

Mittels immunhistochemischer Methoden, Western Blotting und quantitativem cTnT ELISA wurde der cTnT-Gehalt von gesundem Myokard (n = 3), normalem Skelettmuskel (n = 6) und der Skelettmuskulatur von Polymyositis- (n = 13) und Muskeldystrophie Duchenne (DMD)-Patienten (n = 6) bestimmt.

Erwartungsgemäß enthielten alle Myokard-Proben cTnT, man konnte das Protein aber auch in bis zu 20% der Muskelfasern gesunder Skelettmuskulatur (Diaphragma) nachweisen, wobei die Autoren vermuten, dass es sich bei diesen Fasern um sich regenerierende Anteile in ansonsten „normaler“ (gesunder) Umgebung handelt, die cTnT nach einer Schädigung reexprimieren. Immunhistochemisch wurde cTnT im Skelettmuskel von acht der Polymyositis- und bei allen Duchenne-Patienten detektiert, Western Blotting bestätigte zumindest die cTnT-Exprimierung bei DMD, die Polymyositis-Proben wurden mit dieser Methode nicht untersucht.

cTnT wird diesem Artikel zufolge also sowohl im Myokard als auch in geschädigtem Skelettmuskel exprimiert und ist damit weit weniger herzspezifisch als angenommen. Zu beachten ist allerdings, dass die cTnT-Assays seit 1997 deutlich weiterentwickelt wurden, vor allem in Hinblick auf die bei früheren Generationen der Assays vorhandene Kreuzreaktivität der Antikörper mit TnT-Isoformen der Skelettmuskulatur.

Im „American Journal of Clinical Pathology“ erschien im Oktober 2000 ein Artikel mit dem Titel „Expression of messenger RNA of the cardiac isoforms of troponin T and I in myopathic skeletal muscle“⁽⁷¹⁾, der mithilfe der RT-PCR-Technik (Reverse

Transkriptase Polymerase Kettenreaktion, hohe Sensitivität bei gleichzeitiger Vermeidung von Kreuzreaktionen mit Troponin-Isoformen der Skelettmuskulatur) zeigen konnte, dass es bei Patienten mit histologisch verifizierter Myopathie (in diesem Fall Duchenne Muskeldystrophie) in der Skelettmuskulatur zur Bildung von Messenger-RNA (mRNA) der kardialen Troponine (cTnT und cTnI) kam, die den in gesundem und geschädigtem Myokard aufzufindenden Isoformen ähnlich waren. Ob die mRNA wirklich zur Expression der kardialen Troponine in der Skelettmuskulatur führt, konnte aber nicht eindeutig geklärt werden, da mit Hilfe von Western-Blotting weder das finale Protein noch erhöhte cTnT- bzw. cTnI-Serumspiegel festgestellt werden konnten.⁽⁴⁾

Eine Anfang 2001 veröffentlichte Studie mit dem Titel „Clinical and experimental results on cardiac troponin expression in Duchenne muscular dystrophy“⁽⁷²⁾ beschäftigte sich ebenfalls mit der Frage nach der möglichen Re-Expression von cTnT im Rahmen der Regeneration der Skelettmuskulatur bei DMD.

Western-Blotting der Skelettmuskulatur der im Mittel 7,5 Jahre alten DMD-Patienten sowie von mdx-Mäusen zeigte keinerlei Hinweise auf Bildung von cTnT oder cTnI, auch die Verwendung zweier zusätzlicher anti-cTnT-Antikörpertests lieferte negative Ergebnisse.

Die Plasmaspiegel von cTnI blieben unter dem Schwellenwert; bei der Hälfte der Patienten zeigte sich allerdings eine Erhöhung der cTnT-Konzentration um 11µg / L, die aber nicht mit einer Erhöhung des kardialen Risikos korrelierte.

Die Autoren merkten jedoch an, dass sie in ihrer Studie nur Proben von Patienten in der Frühphase der Erkrankung untersuchen konnten und somit eine Re-Expression kardialer Troponine in der Skelettmuskulatur von DMD-Patienten in einem fortgeschritteneren Stadium der Krankheit nicht ausgeschlossen werden kann.

Die ebenfalls untersuchten mdx-Mäuse wiesen zwar das Endstadium der DMD auf und zeigten auch da keine Bildung kardialer Troponine in der Skelettmuskulatur, da aber die Histopathologie und das Voranschreiten der Erkrankung nicht 1:1 mit denen des menschlichen Organismus gleichzusetzen sind, kann daraus kein endgültiger Schluss gezogen werden.

Als mögliche Erklärung für die gering erhöhte cTnT-Plasmakonzentration bei 50% der Patienten bei gleichzeitig jeglichem Fehlen klinischer Zeichen einer Kardiomyopathie könnte auch eine Limitierung der klinischen Möglichkeiten der

Detektierung minimaler kardialer Schädigungen in Frage kommen. Möglicherweise zeigt cTnT hier eine gegenüber cTnI deutlich höhere Sensitivität, was den Unterschied der Plasmakonzentrationen der beiden kardialen Troponine erklären würde.

Im November 2011 erschien im Journal of the American College of Cardiology ein Artikel mit dem Titel „Diseased Skeletal Muscle - A Noncardiac Source of Increased Circulating Concentrations of Cardiac Troponin T“⁽⁷³⁾, in dem die Autoren ebenfalls der Frage nachgingen, ob eine mögliche cTnT-Expression in geschädigtem Skelettmuskel zu einer Beeinflussung von cTnT-Assays führen kann.

Dazu wurde bei vier an der Mayo-Klinik behandelten Myopathie-Patienten, bei denen erhöhte cTnT-, aber normale cTnI-Serumspiegel festgestellt worden waren, eine Skelettmuskelbiopsie angefertigt. Mit Hilfe von Western-Blotting wurde die Reaktivität von cTnT-Assays der vierten Generation (Roche Diagnostics Elecsys E170) im biopsierten Gewebe mit der im normalen Myokard verglichen. Das Vorhandensein einer Kardiomyopathie wurde durch unauffällige EKG- und Herzultraschall-Untersuchungen ausgeschlossen, keiner der Patienten hatte in der Vergangenheit kardiovaskuläre Auffälligkeiten zu bieten.

Anzumerken ist aber, dass das reine Fehlen klinischer Hinweise auf eine Kardiomyopathie genauso wie unauffällige Untersuchungsergebnisse, ob EKG, Herzecho oder MR, eine minimale Schädigung des Myokards nicht ausschließen kann. Wie bereits mehrfach erwähnt beschränken sich einige Myopathien nicht ausschließlich auf die Skelettmuskulatur, sondern können auch zu einer Schädigung der Herzmuskulatur führen. Diese ist jedoch im Anfangsstadium klinisch unauffällig und mit herkömmlichen Methoden oft nicht nachweisbar.

Das Ergebnis des Western-Blottings ließ den Autoren des Artikels zufolge die Vermutung zu, dass die erhöhten cTnT-Werte der untersuchten Patienten eher durch die Re-Expression des Proteins im geschädigten Skelettmuskel verursacht wurden als durch eine Schädigung des Myokards. Allerdings ließ sich nicht mit absoluter Sicherheit sagen, wo der Ursprung der cTnT-Erhöhung lag, eine (anders als durch cTnT) nicht erfassbare Kardiomyopathie könnte ebenso die Ursache dafür sein. Auch war nicht eindeutig zu klären, ob es sich bei dem Protein, das von den cTnT-Assays detektiert wurde, wirklich um kardiales

Troponin T handelte, oder um ein strukturell und vom Molekulargewicht her sehr ähnliches Protein, das von den Assays aber als cTnT erkannt wurde.

Die Frage nach einer möglichen Expression von cTnT in der Skelettmuskulatur und einer damit verbundenen Erhöhung dieses Parameters für myokardiale Schädigung ohne zugrundeliegende Kardiomyopathie konnte auch durch diesen Artikel nicht eindeutig beantwortet werden.

6 Ergebnisse und Diskussion

Anhand der zahlreichen angeführten Beispiele lässt sich seitens der Fachliteratur kein eindeutiger Rückschluss auf die Herzspezifität von cTnT ziehen. Es gibt keine zwingenden Beweise für die Exprimierung von cTnT im (sich regenerierenden) Skelettmuskel, sondern nur Hinweise in diese Richtung. Andererseits lässt sich aber auch nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen, dass jeder Anstieg von cTnT ein Hinweis auf die hohe Sensitivität des Parameters und somit auf eine geringgradige (und mit heutigen Methoden nicht anders feststellbare) Myokardschädigung ist. Eine Myokardbiopsie könnte diese offenen Fragen beantworten, lässt sich aber schon rein aus ethischen Gründen nicht durchführen.

Am Beispiel der cTnT-Erhöhung bei XMPMA-Patienten lässt sich zeigen, dass cTnT hier einen Hinweis auf eine Myokardbeteiligung bei einer Myopathie geben und somit zumindest in diesem Setting einen wertvollen Screeningparameter darstellen könnte. Die morphologischen Veränderungen des Myokards konnten durch bildgebende Verfahren nachgewiesen werden und unterscheiden sich durch ihre typische Ausprägung von strukturellen Veränderungen des Herzmuskels, die bekanntermaßen ja auch im Rahmen anderer Myopathien auftreten können.

cTnT stellt hier aber möglicherweise keinen Marker für eine ischämische Kardiomyopathie dar, sondern entstammt entweder dem degenerierenden und sich regenerierenden Skelettmuskel oder ist durch eine Kardiomyopathie im Rahmen der Grunderkrankung bedingt.

Um diesen Fragen weiter nachgehen zu können ist die Durchführung einer im folgenden Abschnitt dargestellten Studie nötig. Patientinnen und Patienten mit genetisch gesicherten und erworbenen Muskelerkrankungen, die sich in der neuromuskulären Ambulanz der neurologischen Klinik der MUG Graz vorgestellt

hatten und bei denen eindeutig eine Muskelerkrankung nachgewiesen werden konnte, werden in die Studie eingeschlossen.

Die Patienten werden einer klinischen Untersuchung, einem Laborscreening mit Bestimmung der cardialen Isoenzyme Trop T und I, CK, CK-MB, NT-proBNP und Aldolase unterzogen, sowie einem cardialen Screening mit elektrokardiographischer, echokardiographischer und radiologischer Herzdiagnostik.

Die elektrokardiographische Untersuchung umfasst ein 12- Ableitungs-EKG und ein Langzeit-EKG zur Detektion von Herzrhythmusstörungen; im Rahmen der Echokardiographie werden standardisierte echokardiographische Messungen erhoben und Farbdopplerdaten für die regionale ventrikuläre Funktion (Strain und strain rate) analysiert. Die radiologische Diagnostik umfasst ein Cardiac-MRI um Late enhancement als Marker für Fibrose zu detektieren, sowie bei Patienten mit pathologischem Herzinfarktfermentmuster eine Ischämiediagnostik im Sinne einer Herzkatheteruntersuchung bzw. eines Herz CTs.

Um die genaue Herkunft des cardialen Troponin T zu eruieren ist eine biochemische Untersuchung (Western-Blot) der vorhandenen Skelett- und Herzmuskelbiopsien vorgesehen.

Ziel der Studie ist, die im Rahmen der Labordiagnostik erhobenen Troponin T und I Werte mit den klinischen Herzdaten zu verbinden, um:

- 1) Die Herkunft des im Serum gefundenen Troponin T und I zu eruieren (Herzmuskel versus Skelettmuskel) und mit dem CK Wert zu korrelieren.
- 2) Eine mögliche Herzmuskelpathologie der Myopathien mittels MRI und echokardiographischen Messungen für ventrikuläre regionale Funktion (Strain und strain rate) zu charakterisieren.

Die Resultate und Erkenntnisse der Studie bilden eine entscheidende Grundlage für die Beurteilung der Bedeutung des Herzmuskelmarkers Troponin T und I bei Patientinnen und Patienten mit Skelettmuskelerkrankungen. Sie hat direkte Auswirkungen auf das klinische Management und Beratung inwieweit bei den Betroffenen eine ischämische oder myopathische Herzmuskelerkrankung vorliegt oder nicht und in Zukunft der Troponin T Test bei Muskelerkrankungen als Marker noch Gültigkeit hat.

7 Material und Methoden

Für die Studie sind folgende Methoden geplant:

- Labordiagnostik: kardiales Troponin T (cTnT) und I (cTnI), CK, CK-MB, NT-proBNP und Aldolase
- Echokardiographie (inkl. Analyse der regionalen ventrikulären Funktion, Strain und Strain Rate)
- Elektrokardiographie (12-Ableitungs-EKG und Langzeit-EKG)
- MRI des Herzens
- Herzkatheteruntersuchung bzw. Cardiac-CT (bei Patienten mit pathologischem Herzinfarktfermentmuster)

Die Datenerhebung erfolgt retrospektiv anhand der vorliegenden Daten neuromuskulärer Ambulanzpatienten mit genetisch gesicherten Myopathien.

Der Ethikantrag (siehe Kapitel 9: Anhang – Ethikantrag) wird den zuständigen Ethikkommissionen vorgelegt und definiert die Eckdaten der Studie (u.a. Art des Projektes, zugrundeliegende Hypothesen, Ein- und Ausschlusskriterien für die Auswahl der Studienteilnehmer, voraussichtlich zu verwendende Arzneimittel, geplante Untersuchungen, zeitlicher Ablauf, Sponsoren).

Die Patienten werden mithilfe eines Informationsblattes über die Hintergründe, Untersuchungsmethoden und damit verbundene mögliche Risiken aufgeklärt (siehe Kapitel 10: Anhang – Patienteninformation).

Im Studienprotokoll (siehe Kapitel 11: Anhang – Studienprotokoll) werden Hintergründe und Ziele der Studie, Studiendesign und -Teilnehmer sowie der zu erwartende „clinical impact“ in englischer Sprache präsentiert.

8 Literaturverzeichnis

1. Mair J. Cardiac troponin I and troponin T: are enzymes still relevant as cardiac markers? *Clin. Chim. Acta.* 1997 Jan 3;257(1):99–115.
2. Katus H, Remppis A, Neumann F, Scheffold T, Diederich K, Vinar G, et al. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1991 Mar 1;83(3):902–912.
3. Wu A. *Cardiac markers.* Totowa N.J.: Humana Press; 1998.
4. Wu AH, Jialal I. How specific is cardiac troponin? *Am. J. Clin. Pathol.* 2000 Oct;114(4):509–11.
5. Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, et al. It's time for a change to a troponin standard. *Circulation.* 2000 Sep 12;102(11):1216–20.
6. Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ.* 2005 Nov 8;173(10):1191–202.
7. Kristen AV, Giannitsis E, Lehrke S, Hegenbart U, Konstandin M, Lindenmaier D, et al. Assessment of disease severity and outcome in patients with systemic light-chain amyloidosis by the high-sensitivity troponin T assay. *Blood.* 2010 Oct 7;116(14):2455–61.
8. Townsend PJ, Barton PJ, Yacoub MH, Farza H. Molecular cloning of human cardiac troponin T isoforms: expression in developing and failing heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1995 Oct;27(10):2223–36.
9. Anderson PA, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM, et al. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ. Res.* 1995 Apr;76(4):681–6.
10. Vallins WJ, Brand NJ, Dabhade N, Butler-Browne G, Yacoub MH, Barton PJ. Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction. *FEBS Lett.* 1990 Sep 17;270(1-2):57–61.
11. Apple FS. Acute myocardial infarction and coronary reperfusion. Serum cardiac markers for the 1990s. *Am. J. Clin. Pathol.* 1992 Feb;97(2):217–26.
12. Toyota N, Shimada Y. Differentiation of troponin in cardiac and skeletal muscles in chicken embryos as studied by immunofluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 1981 Nov;91(2 Pt 1):497–504.
13. Anderson PA, Malouf NN, Oakeley AE, Pagani ED, Allen PD. Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ. Res.* 1991 Nov;69(5):1226–33.

14. Beigl E. Troponin - Skript. 2003.
15. Dean KJ. Biochemistry of Troponin. Cardiac markers. Totowa N.J.: Humana Press; 1998. p. 193–204.
16. Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, Esakova TV, Kolosova OV, Pettersson K, et al. Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin. Chem.* 1998 Dec;44(12):2433–40.
17. Wu AH, Feng YJ. Biochemical differences between cTnT and cTnI and their significance for diagnosis of acute coronary syndromes. *Eur. Heart J.* 1998 Nov;19 Suppl N:N25–29.
18. Wu AH, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, et al. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. American Association for Clinical Chemistry Subcommittee on cTnI Standardization. *Clin. Chem.* 1998 Jun;44(6 Pt 1):1198–208.
19. Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, Pettersson K, Lövgren T, Severina ME, et al. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex. *Clin. Chem.* 1997 Aug;43(8 Pt 1):1379–85.
20. Katrukha A, Severina M, Bereznikova A, Esakova T, Gusev N. Phosphorylation of human cardiac troponin I by protein kinase A affects its immunological activity. Cambridge, UK; 1996. p. 51 (Abstract M12/P24).
21. Ooi DS, Isotalo PA, Veinot JP. Correlation of antemortem serum creatine kinase, creatine kinase-MB, troponin I, and troponin T with cardiac pathology. *Clin. Chem.* 2000 Mar;46(3):338–44.
22. Lindahl B, Toss H, Venge P. Comparison of troponin T and troponin I for prediction of mortality in unstable coronary artery disease. *Eur Heart J.* 1997;18:123.
23. Lang K, Börner A, Figulla HR. Comparison of biochemical markers for the detection of minimal myocardial injury: superior sensitivity of cardiac troponin--T ELISA. *J. Intern. Med.* 2000 Jan;247(1):119–23.
24. Jurlander B. Coronary bypass graft patency status assessed non-invasively by measurement of serum troponin-T, troponin-I, CK-MB and myoglobin. *Circulation.* 1997;96(8):Abstract suppl. (Abstract 1517).
25. Baum H, Wayand D, Schaerf J, et al. Comparison of two cardiac troponin T assays and one cardiac troponin I assay in patients with end-stage renal failure. [Abstract]. *Clin Chem.* 1996;(42):S122 [Abstract].
26. Prellwitz W, Hafner G, Rupprecht HJ, Meyer J. Diagnostische und differentialdiagnostische Wertigkeit der Troponine. *Med. Klin. (Munich).* 1996 Jun 15;91(6):336–42.

27. Kobayashi S, Tanaka M, Tamura N, Hashimoto H, Hirose S. Serum cardiac troponin T in polymyositis/dermatomyositis. *Lancet*. 1992 Sep 19;340(8821):726.
28. Saggin L, Gorza L, Ausoni S, Schiaffino S. Cardiac troponin T in developing, regenerating and denervated rat skeletal muscle. *Development*. 1990 Oct;110(2):547–54.
29. Sabry MA, Dhoot GK. Identification of and pattern of transitions of cardiac, adult slow and slow skeletal muscle-like embryonic isoforms of troponin T in developing rat and human skeletal muscles. *J. Muscle Res. Cell. Motil*. 1991 Jun;12(3):262–70.
30. 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*. 1987 Jul;97(1):128–34.
31. Katus HA, Remppis A, Scheffold T, Diederich KW, Kuebler W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am. J. Cardiol*. 1991 Jun 15;67(16):1360–7.
32. Ricchiuti V, Voss EM, Ney A, Odland M, Anderson PA, Apple FS. 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*. 1998 Sep;44(9):1919–24.
33. Bhayana V, Gougoulas T, Cohoe S, Henderson AR. Discordance between results for serum troponin T and troponin I in renal disease. *Clin. Chem*. 1995 Feb;41(2):312–7.
34. Li D, Keffer J, Corry K, Vazquez M, Jialal I. Nonspecific elevation of troponin T levels in patients with chronic renal failure. *Clin. Biochem*. 1995 Aug;28(4):474–7.
35. Haller C, Zehelein J, Remppis A, Müller-Bardorff M, Katus HA. Cardiac troponin T in patients with end-stage renal disease: absence of expression in truncal skeletal muscle. *Clin. Chem*. 1998 May;44(5):930–8.
36. Apple FS, Ricchiuti V, Voss EM, Anderson PA, Ney A, Odland M. Expression of cardiac troponin T isoforms in skeletal muscle of renal disease patients will not cause false-positive serum results by the second generation cardiac troponin T assay. *Eur. Heart J*. 1998 Nov;19 Suppl N:N30–33.
37. Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, Birkmeier KA, Byrne RA, Ott I, et al. Prognostic value of sensitive troponin T in patients with stable and unstable angina and undetectable conventional troponin. *Am. Heart J*. 2011 Jan;161(1):68–75.
38. Mumenthaler M, Mattle H. *Erkrankungen der Muskulatur (Myopathien). Kurzlehrbuch Neurologie : Fortführung des Grundkurs Neurologie ; 135 Tabellen*. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2006. p. 380–7.
39. Finsterer J, Stöllberger C. Cardiac involvement in primary myopathies. *Cardiology*. 2000;94(1):1–11.

40. Emery AE. The muscular dystrophies. *BMJ*. 1998 Oct 10;317(7164):991–5.
41. Masuhr K, Neumann M. Progressive Muskeldystrophien. *Neurologie*. 6. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2007. p. 491–3.
42. Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006 Sep 13;7:762–73.
43. Hoogerwaard EM, van der Wouw PA, Wilde AA, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, et al. Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord*. 1999 Jul;9(5):347–51.
44. Finsterer J, Stöllberger C, Keller H, Slany J, Mamoli B. Cardiac involvement in patients with myotonic dystrophy, Becker’s muscular dystrophy and mitochondrial myopathy. *Herz*. 1997 Apr;22(2):96–103.
45. Ellis JA. Emery-Dreifuss muscular dystrophy at the nuclear envelope: 10 years on. *Cell. Mol. Life Sci*. 2006 Dec;63(23):2702–9.
46. Windpassinger C, Schoser B, Straub V, Hochmeister S, Noor A, Lohberger B, et al. An X-Linked Myopathy with Postural Muscle Atrophy and Generalized Hypertrophy, Termed XMPMA, Is Caused by Mutations in FHL1. *The American Journal of Human Genetics*. 2008 Jan;82:88–99.
47. Funakoshi M, Tsuchiya Y, Arahata K. Emerin and cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord*. 1999 Mar;9(2):108–14.
48. Jung HH, Danek A, Walker RH. Neuroacanthocytosis syndromes. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:68.
49. Pagon RARA, Bird TDTD, Dolan CRCR, Stephens KK, Adam MPMP, editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2012 May 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301528>
50. Danek A, Rubio JP, Rampoldi L, Ho M, Dobson-Stone C, Tison F, et al. McLeod neuroacanthocytosis: genotype and phenotype. *Ann. Neurol*. 2001 Dec;50(6):755–64.
51. Witt TN, Danek A, Reiter M, Heim MU, Dirschinger J, Olsen EG. McLeod syndrome: a distinct form of neuroacanthocytosis. Report of two cases and literature review with emphasis on neuromuscular manifestations. *J. Neurol*. 1992 Jul;239(6):302–6.
52. Finsterer J, Stöllberger C, Blazek G. Herzbeteiligung bei Myopathien. *J Kardiolog*. 2001;8(11):451–6.
53. Hino S-I, Kondo S, Sekiya H, Saito A, Kanemoto S, Murakami T, et al. Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet*. 2007 Dec 1;16(23):2834–43.

54. Gunkel O, Reichenbach H, Thamm B, Wetzel U, Bratanow S, Kirchhof M, et al. Late diagnosis of Curschmann-Steinert myotonic dystrophy in a female patient with dilated cardiomyopathy and in her son. *Z Kardiol.* 2000 Jul;89(7):599–605.
55. Lagrange A, Lagrange P, Boveda S, Espaliat E, Penot JP, Defaye P, et al. Ventricular tachycardia by branch to branch re-entry. Familial case with Steinert's disease. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2000 Jun;93(6):743–9.
56. von zur Mühlen F, Klass C, Kreuzer H, Mall G, Giese A, Reimers CD. Cardiac involvement in proximal myotonic myopathy. *Heart.* 1998 Jun;79(6):619–21.
57. Phillips MF, Harper PS. Cardiac disease in myotonic dystrophy. *Cardiovasc. Res.* 1997 Jan;33(1):13–22.
58. Hacke W, Poeck K, Poeck K. *Neurologie mit 83 Tabellen.* Heidelberg: Springer-Medizin-Verl.; 2010.
59. Dalakas MC. Polymyositis, Dermatomyositis, and Inclusion Body Myositis. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition.* McGraw-Hill Companies, Incorporated; 2011. p. 3509–18.
60. Quasthoff S. *XMPMA - Skript.* 2010.
61. McGrath MJ, Cottle DL, Nguyen M-A, Dyson JM, Coghill ID, Robinson PA, et al. Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J. Biol. Chem.* 2006 Mar 17;281(11):7666–83.
62. Brown S, McGrath MJ, Ooms LM, Gurung R, Maimone MM, Mitchell CA. Characterization of two isoforms of the skeletal muscle LIM protein 1, SLIM1. Localization of SLIM1 at focal adhesions and the isoform slimmer in the nucleus of myoblasts and cytoplasm of myotubes suggests distinct roles in the cytoskeleton and in nuclear-cytoplasmic communication. *J. Biol. Chem.* 1999 Sep 17;274(38):27083–91.
63. Ng EK, Lee SM, Li HY, Ngai SM, Tsui SK, Waye MM, et al. Characterization of tissue-specific LIM domain protein (FHL1C) which is an alternatively spliced isoform of a human LIM-only protein (FHL1). *J. Cell. Biochem.* 2001 Apr 2;82(1):1–10.
64. Michelsen JW, Schmeichel KL, Beckerle MC, Winge DR. The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993 May 15;90(10):4404–8.
65. Geier C, Perrot A, Ozcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, et al. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2003 Mar 18;107(10):1390–5.
66. Geier C, Gehmlich K, Ehler E, Hassfeld S, Perrot A, Hayess K, et al. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* 2008 Sep 15;17(18):2753–65.

67. Loughna PT, Mason P, Bayol S, Brownson C. The LIM-domain protein FHL1 (SLIM 1) exhibits functional regulation in skeletal muscle. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 2000 Mar;3(3):136–40.
68. Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, et al. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.* 1995 Dec;11(4):434–7.
69. Carrier L, Bonne G, Bährend E, Yu B, Richard P, Niel F, et al. Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res.* 1997 Mar;80(3):427–34.
70. Bodor GS, Servant L, Voss EM, Smith S, Porterfield D, Apple FS. Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle. *Clin. Chem.* 1997 Mar;43(3):476–84.
71. Messner B, Baum H, Fischer P, Quasthoff S, Neumeier D. Expression of messenger RNA of the cardiac isoforms of troponin T and I in myopathic skeletal muscle. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000 Oct;114(4):544–9.
72. Hammerer-Lercher A, Erlacher P, Bittner R, Korinthenberg R, Skladal D, Sorichter S, et al. Clinical and experimental results on cardiac troponin expression in Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chem.* 2001 Mar;47(3):451–8.
73. Jaffe AS, Vasile VC, Milone M, Saenger AK, Olson KN, Apple FS. Diseased skeletal muscle: a noncardiac source of increased circulating concentrations of cardiac troponin T. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011 Oct 18;58(17):1819–24.

9 Anhang – Ethikantrag

Antrag	
Version 6.3 vom 25.03.2011	Bitte immer die <u>aktuelle</u> Version verwenden (http://ethikkommissionen.at)!

Dieses Formular soll für Einreichungen bei österreichischen Ethikkommissionen verwendet werden.
 Es setzt sich aus einem allgemeinen Teil A - Angaben zur Studie und zum Sponsor -
 und aus einem speziellen Teil B - Angaben zu der/den einzelnen Prüfstelle(n) - zusammen.
 Bei Einreichungen für mehrere Zentren (Prüfer/innen) muss nur der Teil B an das jeweilige Zentrum angepasst werden.

Adresse der Ethikkommission (optional)	Raum für Eingangsstempel, EK-Nummer, etc. Bitte Freilassen!
--	--

ANTRAG AUF BEURTEILUNG EINES KLINISCHEN FORSCHUNGSPROJEKTES

für folgende Prüfer/innen bei folgenden österreichischen Ethikkommissionen:

- ▶ Bitte **alle** Ethikkommissionen eintragen, an die der Antrag gesendet wird (**Kurzbezeichnung!**) ◀
- ▶ Im Falle einer **multizentrischen Arzneimittelstudie** ist die **Leitethikkommission** als erste anzuführen! ◀

Zuständige Ethikkommission	Prüferin/Prüfer (lokale Studienleitung)
MUG Graz	OA Dr. Josepha Binder Univ.-Prof. Dr. Stefan Quasthoff

Teil A

1. Allgemeines:

1.1 Projekttitel: **"Bedeutung der kardialen Troponin T Isoformen bei erblichen oder erworbenen Skelettmuskelerkrankungen"**

1.2 Protokollnummer/-bezeichnung: 1.2.1 EudraCT-Nr.:

1.3 Datum des Protokolls: **15.11.2012** 1.3.1 ISRCTN-Nr.:

1.4 Daten der beiliegenden Amendments: 1.4.1 Nr. 1.4.2 Datum:

1.4.3 Nr. 1.4.4 Datum:

1.4.5 Nr. 1.4.6 Datum:

1.5 Sponsor / RechnungsempfängerIn (Kontaktperson in der Buchhaltung):

Sponsor
RechnungsempfängerIn

1.5.1 Name:

1.5.2 Adresse:

1.5.3 Kontaktperson:

1.5.4 Telefon:

1.5.5 FAX:

1.5.6 e-mail:

1.5.7 UID-Nummer

(wenn nicht gleich wie „Sponsor“)

2. Eckdaten der Studie

- 2.1 Art des Projektes: 2.1.1 Klinische Prüfung eines nicht registrierten **Arzneimittels**
 2.1.2 Klinische Prüfung eines registrierten **Arzneimittels**
 2.1.2.1 gemäß der Indikation 2.1.2.2 nicht gemäß der Indikation
-
- 2.1.3 Klinische Prüfung einer neuen **medizinischen Methode**
-
- 2.1.4 Klinische Prüfung eines **Medizinproduktes**
 2.1.4.1 mit CE-Kennzeichnung 2.1.4.2 ohne CE-Kennzeichnung
 2.1.4.3 Leistungsbewertungsprüfung (In-vitro-Diagnostika)
-
- 2.1.5 **Nicht-therapeutische biomedizinische Forschung** am Menschen (Grundlagenforschung)
-
- 2.1.6 **Genetische Untersuchung**
-
- 2.1.10 **Register**
-
- 2.1.11 **Biobank**
-
- 2.1.12 **Retrospektive Datenauswertung**
-
- 2.1.13 **Fragebogen Untersuchung**
-
- 2.1.14 **Psychologische Studie**
-
- 2.1.15 **Pflegewissenschaftliche Studie**
-
- 2.1.16 **Nicht-interventionelle Studie (NIS)**
-
- 2.1.7 **Sonstiges** (z.B. Diätetik, Epidemiologie, etc.), bitte spezifizieren:
prospektive Follow-up Studie
-
- Zusatzinformation:** 2.1.8 **Dissertation** 2.1.9 **Diplomarbeit**

2.2 Fachgebiet: **Kardiologie, Neurologie, Humangenetik**

2.3 Arzneimittelstudie (wenn zutreffend)

2.4 Medizinproduktstudie (wenn zutreffend)

2.3.1 Prüfsubstanz(en):

2.4.1 Prüfprodukt(e):

2.3.2 Referenzsubstanz:

2.4.2 Referenzprodukt:

2.5 Klinische Phase: ____ (unbedingt angeben, bei Medizinprodukten die am ehesten zutreffende Phase)

2.6 Nehmen andere Zentren an der Studie teil: ja nein. Wenn **ja**:
2.6.1 im Inland 2.6.2 im Ausland

2.7 Liste der Zentren: **2**

2.8 Liegen bereits Voten anderer Ethikkommissionen vor?
 ja nein. Wenn **ja**, **Voten beilegen!**

2.9 Geplante **Gesamtzahl** der **Prüfungsteilnehmer/innen** (in allen teilnehmenden Zentren): **80**

2.10 Charakterisierung der Prüfungsteilnehmer/innen: 2.10.1 Mindestalter: **18** 2.10.2 Höchstalter: **80**

2.10.3 Sind auch nicht persönlich Einwilligungsfähige einschließbar? ja nein

2.10.4 Einschließbar sind weibliche (und/oder) männliche Teilnehmer/innen.

2.10.5 Sind gebärfähige Frauen einschließbar? ja nein. Wenn **nein**: Begründung unter 7.5

2.11 Dauer der Teilnahme der einzelnen Prüfungsteilnehmer/innen an der Studie: **2 Jahre**

2.11.1 Aktive Phase: **1 Jahr**

2.11.2 Nachkontrollen: **1 Jahr**

2.12 Voraussichtliche Gesamtdauer der Studie: **2 Jahre**

3a. Betrifft nur Studien gemäß AMG: Angaben zur Prüfsubstanz (falls nicht in Österreich registriert):

3.1 Registrierung in anderen Staaten? ja nein. Wenn ja, geben Sie an, in welchen:

3.2 Liegen über das zu prüfende Arzneimittel bereits aussagekräftige Ergebnisse von klinischen Prüfungen vor? ja nein

Wenn ja, bitte geben Sie folgende Daten an:

3.2.1 In welchen Staaten wurden die Prüfungen durchgeführt:

3.2.2 Phase: ____ (Wenn Studien in mehreren Phasen angeführt sind, die höchste Phase angeben)

3.2.3 Zeitraum:

3.2.4 Anwendungsart(en):

3.2.5 Wurde(n) die klinische(n) Prüfung(en) gemäß GCP-Richtlinien durchgeführt? ja nein

3.2.6 Liegt ein Abschlußbericht vor? ja nein

Wenn ja, bitte legen Sie die **Investigator's Brochure, relevante Daten** oder ein **Gutachten des Arzneimittelbeirates** bei.

3b. Sonstige im Rahmen der Studie verabreichte Medikamente, deren Wirksamkeit und/oder Sicherheit nicht Gegenstand der Prüfung sind:

Generic Name	Darreichungsform	Dosis

4. Betrifft nur Studien gemäß MPG: Angaben zum Medizinprodukt:

4.1 Bezeichnung des Produktes:

4.2 Hersteller:

4.3 Zertifiziert für diese Indikation: ja nein

4.4 Zertifiziert, aber für eine andere Indikation: ja nein

4.5 Das Medizinprodukt trägt ein CE-Zeichen ja nein

4.6 Die Produktbroschüre liegt bei.

4.7 Welche Bestimmungen bzw. Normen sind für die Konstruktion und Prüfung des Medizinproduktes herangezogen worden (Technische Sicherheit):

4.8 Allfällige Abweichungen von den o.a. Bestimmungen (Normen):

5. Angaben zur Versicherung (gemäß §32 Abs.1 Z.11 und Z.12 und Abs.2 AMG; §§47 und 48 MPG)

5.1 Eine Versicherung ist erforderlich: ja nein. Wenn ja:

5.1.1 Versicherungsgesellschaft

5.1.2 Adresse:

5.1.3 Telefon:

5.1.4 Polizzenummer:

5.1.5 Gültigkeitsdauer:

Diese Angaben müssen in der Patienten- / Probandeninformation enthalten sein!

7. Strukturierte Kurzfassung des Projektes (*in deutscher Sprache, kein Verweis auf das Protokoll*)

<p>7.1 Wenn Original-Projekttitle nicht in Deutsch: Deutsche Übersetzung des Titels: "Bedeutung der kardialen Troponin T Isoformen bei erblichen und erworbenen Skelettmuskelerkrankungen"</p>
<p>7.2 Zusammenfassung des Projektes (Rechtfertigung, Relevanz, Design, Maßnahmen und Vorgehensweise):</p> <p>Myopathien sind eine Gruppe von erblich bedingten oder erworbenen Muskelerkrankungen, die durch eine ausgeprägte Schwäche und Atrophie der Skelettmuskeln charakterisiert sind (1). Manche Formen zeigen zusätzlich eine Beteiligung des Herzmuskels. Dies wurde auch bei einer neuen Form der Muskeldystrophie beobachtet, die erst kürzlich von Dr. Windpassinger und Dr. Quasthoff erstmalig beschrieben wurde (2). Auffällig dabei war der erhöhte Wert des kardialen Troponin T, der als Marker für eine ischämische Herzerkrankung herangezogen wird ohne dass die betroffenen PatientInnen an einer Herzmuskelschämie litten. Dr. Quasthoff (Neurologie Graz) konnte schon im Jahr 2000 anhand von Serumproben und Skelettmuskelbiopsien von PatientInnen mit gesicherten Muskelerkrankungen nachweisen, dass mRNA für cardiale Troponin T Isoformen (cTNT) exprimiert und im Blut nachweisbar waren (3). Das cardiale Troponin T scheint aus dem sich regenerierenden Skelettmuskel freigesetzt zu werden (4, 5). Troponin T wurde sowohl bei dystrophischen Myopathien als auch erworbenen entzündlichen Myopathien gefunden (6, 7, 9). Bei entzündlichen Myopathien ist Troponin T, aber kein Troponin I im Serum nachweisbar (8). Die klinische Bedeutung dieser Befunde blieb jedoch unklar, nämlich ob die erhöhten cTNT Werte auf eine Herzmuskeltbeteiligung der Skelettmuskelerkrankungen zurückzuführen waren oder ob der degenerierende bzw. sich regenerierende Skelettmuskel alleine mRNA für cTNT exprimiert und somit zum Nachweis von cTNT im Serum führt. Auch die Korrelation von Troponin T und I und dem aktuellen CK-Wert als Ausdruck des Skelettmuskeluntergangs ist nicht bekannt.</p> <p>Patientinnen und Patienten mit genetisch gesicherten und erworbenen Muskelerkrankungen, die sich in der neuromuskulären Ambulanz der neurologischen Klinik des LKH Graz vorgestellt hatten und bei denen eindeutig eine Muskelerkrankung nachgewiesen werden konnte, werden in die Studie eingeschlossen. Die PatientInnen werden einer klinischen Untersuchung, einem Laborscreening mit Bestimmung der kardialen Isoenzyme Trop T und I, CK, CK-MB, NT-proBNP und Aldolase unterzogen, sowie einem kardialen Screening mit elektrokardiographischer, echokardiographischer und radiologischer Herzdiagnostik. Die elektrokardiographische Untersuchung umfasst ein 12-Kanal-EKG und ein Langzeit-EKG zur Detektion von Herzrhythmusstörungen; im Rahmen der Echokardiographie werden standardisierte echokardiographische Messungen erhoben und Farbdopplerdaten für die regionale ventrikuläre Funktion (Strain und strain rate) analysiert. Die radiologische Diagnostik umfasst ein Cardiac-MRI um Late enhancement als Marker für Fibrose zu detektieren. Bei PatientInnen mit pathologischem Herzinfarktfermentmuster ist eine Ischämiediagnostik im Sinne einer Herzkatheteruntersuchung bzw. eines Herz CTs vorgesehen.</p> <p>Um die genaue Herkunft des kardialen Troponin T zu eruieren ist eine biochemische Untersuchung (Western-Blot) der vorhandenen Skelett- und Herzmuskelbiopsien vorgesehen.</p> <p>Ziel der Studie ist die im Rahmen der Labordiagnostik erhobenen Troponin T und I Werte mit den klinischen Herzdaten zu verbinden um:</p> <ol style="list-style-type: none">1) Die Herkunft des im Serum gefundenen Troponin T und I zu eruieren (Herzmuskel versus Skelettmuskel) und mit dem CK Wert korrelieren.2) Eine mögliche Herzmuskelpathologie der Myopathien mittels MRI und echokardiographischen Messungen für ventrikuläre regionale Funktion (Strain und strain rate) zu charakterisieren. <p>Die Resultate und Erkenntnisse der Studie bilden eine entscheidende Grundlage für die Beurteilung der Bedeutung des Herzmuskelmarkers Troponin T und I bei Patientinnen und Patienten mit Skelettmuskelerkrankungen. Sie hat direkte Auswirkungen auf das klinische Management und die Beratung inwieweit bei den Betroffenen eine ischämische oder myopathische Herzmuskelerkrankung vorliegt oder nicht und inwieweit in Zukunft der Troponin T Test bei Muskelerkrankungen als Marker noch Gültigkeit hat.</p> <p>References:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:762-732. Windpassinger et al. An X-linked Myopathy with postural muscle atrophy and generalized hypertrophy, termed XMPMA, is caused by mutations in FHL1. Am J Hum Genet. 2008

<p>Jan;82(1):88-99.</p> <p>3. Messner B, Baum H, Fischer P, et al. Expression of messenger RNA of the cardiac isoforms of troponin T and I in myopathic skeletal muscle. <i>Am J Clin Pathol.</i> 2000;114:544-549.</p> <p>4. Bodor GS, Porterfield D, Voss EM, Smith S, Apple FS (1995) Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. <i>Clin Chem</i> 41:1710-1715</p> <p>5. Bodor GS, Survant L, Voss EM, Smith S, Porterfield D, Apple FS (1997) Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle. <i>Clin Chem</i> 43:476-484</p> <p>6. Hammerer-Lercher A, Erlacher P, Bittner R, Korinthenberg R, Skladal D, Sorichter S, Sperl W, Puschendorf B, Mair J (2001) Clinical and Experimental Results on Cardiac Troponin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy. <i>Clinical Chemistry</i> 47:3 451-458.</p> <p>7. Lindberg C, Klintberg L, Oldfors A (2006) Raised troponin T in inclusion body myositis is common and serum levels are persistent over time. <i>Neuromuscul Disord</i> 16:495-497.</p> <p>8. AGGARWAL R, LEBIEDZ-ODROBINA D, SINHA A, (2009) Serum Cardiac Troponin T, But Not Troponin I, Is Elevated in Idiopathic Inflammatory Myopathies. <i>J Rheumatol</i> 36:2711-2714.</p> <p>9. Cox FM, Delgado V, Verschuuren JJ, Ballieux BE, Bax JJ, Wintzen AR, Badrising UA (2010) The heart in sporadic inclusion body myositis: a study in 51 patients. <i>J Neurol</i> 257:447-451.</p>
<p>7.3 Ergebnisse der prä-klinischen Tests oder Begründung für den Verzicht auf prä-klinischen Tests:</p>
<p>7.4 Primäre Hypothese der Studie (wenn relevant auch sekundäre Hypothesen): Die erhöhten cardialen Troponin T und Troponin I Werte bei Patientinnen und Patienten mit Skelettmuskelerkrankungen sind nicht auf eine ischämische Herzbeteiligung zurückzuführen, sondern entstammen den degenerierenden und sich regenerierenden Sklettmuskeln oder einer Kardiomyopathie im Rahmen der Grundkrankheit.</p>
<p>7.5 Relevante Ein- und Ausschlusskriterien: Alle Patientinnen und Patienten mit erworbenen und erblichen Muskelerkrankungen.</p>
<p>7.6 Ethische Überlegungen (Identifizieren und beschreiben Sie alle möglicherweise auftretenden Probleme. Beschreiben Sie den möglichen Wissenszuwachs, der durch die Studie erzielt werden soll und seine Bedeutung, sowie mögliche Risiken für Schädigungen oder Belastungen der Prüfungsteilnehmer/innen. Legen Sie Ihre eigene Bewertung des Nutzen/Risiko-Verhältnisses dar): Komplikationen bei Cardiac-CT (Strahlenbelastung, KM-Unverträglichkeit, Nierenkomplikationen) bzw. MRI (KM-Unverträglichkeit, Nierenkomplikationen) Die Resultate und Erkenntnisse der Untersuchungen bilden eine wesentliche und entscheidende Grundlage für eine umfassende cardiale Beratung und das klinische Management der Betroffenen.</p>
<p>7.7 Begründung für den Einschluss von Personen aus geschützten Gruppen (z.B. Minderjährige, temporär oder permanent nicht-einwilligungsfähige Personen; wenn zutreffend): Kein Einschluss von Personen aus geschützten Gruppen vorgesehen.</p>
<p>7.8 Beschreibung des Rekrutierungsverfahrens (alle zur Verwendung bestimmte Materialien, z.B. Inerate inkl. Layout müssen beigelegt werden): Rekrutiert werden Patientinnen und Patienten mit gesicherten Muskelerkrankungen, die sich im Rahmen einer Abklärung bei bestehender muskulärer Beschwerdesymptomatik in der Datenbank der neuro-muskulären Ambulanz an der Neurologischen Klinik des LKH Graz zuvor (studienunabhängig) vorgestellt hatten und nach eingehender Beratung und umfangreicher Aufklärung ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie gegeben haben.</p>
<p>7.9 Vorgehensweise an der/den Prüfstelle(n) zur Information und Erlangung der informierten Einwilligung von Prüfungsteilnehmer/inne/n, bzw. Eltern oder gesetzlichen Vertreter/inne/n, wenn zutreffend (wer wird informieren und wann, Erfordernis für gesetzliche Vertretung, Zeugen, etc.): Nicht zutreffend</p>
<p>7.10 Risikoabschätzung, vorhersehbare Risiken der Behandlung und sonstiger Verfahren, die verwendet werden sollen (inkl. Schmerzen, Unannehmlichkeiten, Verletzung der persönlichen Integrität und Maßnahmen zur Vermeidung und/oder Versorgung von unvorhergesehenen / unerwünschten Ereignissen): Im Rahmen der CT- und MRT-Untersuchungen: Kontrastmittelallergie, Nierenkomplikationen als</p>

<p>Folge der Kontrastmittelapplikation. Zur Vermeidung der Kontrastmittelreaktion erfolgt die Erhebung einer genauen Allergianamnese sowie seitens der Radiologie die Bereitstellung der Notfallversorgung im Bedarfsfall. Bzgl. der Nierenkomplikationen wird ausschließlich im Falle eines vertretbaren Kreatininwertes (üblicherweise 1,0, im Zweifelsfall obliegt die Letztentscheidung dem Radiologen) Kontrastmittel appliziert.</p>
<p>7.11 Voraussichtliche Vorteile für die eingeschlossenen Prüfungsteilnehmer/innen: Verbesserung des klinischen Managements des Krankheitsbildes, Vorbeugung und Therapie von möglichen Herzmuskelerkrankungen.</p>
<p>7.12 Relation zwischen Prüfungsteilnehmer/in und Prüfer/in (z.B. Patient/in - Ärztin/Arzt, Student/in - Lehrer/in, Dienstnehmer/in - Dienstgeber/in, etc.): Patient/in - Arzt</p>
<p>7.13 Verfahren an der/den Prüfstelle(n) zur Feststellung, ob eine einzuschließende Person gleichzeitig an einer anderen Studie teilnimmt oder ob eine erforderliche Zeitspanne seit einer Teilnahme an einer anderen Studie verstrichen ist (von besonderer Bedeutung, wenn gesunde Proband/inn/en in pharmakologische Studien eingeschlossen werden): Nicht zutreffend</p>
<p>7.14 Methoden, um unerwünschte Effekte ausfindig zu machen, sie aufzuzeichnen und zu berichten (Beschreiben Sie wann, von wem und wie, z.B. freies Befragen und/oder an Hand von Listen): Nicht zutreffend</p>
<p>7.15 Optional: Statistische Überlegungen und Gründe für die Anzahl der Personen, die in die Studie eingeschlossen werden sollen (ergänzende Informationen zu Punkt 8, wenn erforderlich):</p>
<p>7.16 Optional: Verwendete Verfahren zum Schutz der Vertraulichkeit der erhobenen Daten, der Quelldokumente und von Proben (ergänzende Informationen zu Punkt 8, wenn erforderlich):</p>
<p>7.17 Plan zur Behandlung oder Versorgung nachdem die Personen ihre Teilnahme an der Studie beendet haben (wer wird verantwortlich sein und wo): Klinische Abteilung für Kardiologie, Medizinische Universitätsklinik Graz Neuromuskuläre Ambulanz, Medizinische Universitätsklinik Graz</p>
<p>7.18 Betrag und Verfahren der Entschädigung oder Vergütung an die Prüfungsteilnehmer/innen (Beschreibung des Betrages, der während der Prüfungsteilnahme bezahlt wird und wofür, z.B. Fahrtspesen, Einkommensverlust, Schmerzen und Unannehmlichkeiten, etc.): Nicht zutreffend</p>
<p>7.19 Regeln für das Aussetzen oder vorzeitige Beenden der Studie an der/den Prüfstelle(n) in diesem Mitgliedstaat oder der gesamten Studie: Nicht zutreffend</p>
<p>7.20 Vereinbarung über den Zugriff der Prüferin/des Prüfers/der Prüfer auf Daten, Publikationsrichtlinien, etc. (wenn nicht im Protokoll dargestellt):</p>
<p>7.21 Finanzierung der Studie (wenn nicht im Protokoll dargestellt) und Informationen über finanzielle oder andere Interessen der Prüferin/des Prüfers/der Prüfer:</p>
<p>7.22 Weitere Informationen (wenn erforderlich):</p>

8. Biometrie, Datenschutz:

(Hier nur Kurzinformationen in Stichworten, ausführlicher - wenn erforderlich - unter Punkt 7.15 und 7.16)

8.1 Studiendesign (z.B. doppelblind, randomisiert, kontrolliert, Placebo, Parallelgruppen, multizentrisch)

- 8.1.1 offen 8.1.2 randomisiert 8.1.3 Parallelgruppen 8.1.4 monozentrisch
 8.1.5 blind 8.1.6 kontrolliert 8.1.7 cross-over 8.1.8 multizentrisch
 8.1.9 doppelblind 8.1.10 Placebo 8.1.11 faktoriell 8.1.12 Pilotprojekt
 8.1.13 observer-blinded 8.1.14 Äquivalenzprüfung
 8.1.15 sonstiges: **prospektive Follow-up Studie**

8.1.16 Anzahl der Gruppen: **1**

8.1.17 Stratifizierung: nein ja: Kriterien:

8.1.18 Messwiederholungen: nein ja: Zeitpunkte: **2, um Stabilität der Messwerte anzuzeigen**

8.1.19 Hauptzielgröße:

Kardiomyopathie mit Hypertrophie des Herzmuskels, reduzierte Kontraktilität des Herzmuskels, pathologische systolische und diastolische Funktion, pathologische Laborwerte

8.1.20 Nullhypothese(n):

- 1. Betroffene zeigen einen gesunden Herzmuskel.**
- 2. Bei betroffenen Patienten liegt keine pathologische Erhöhung der Herzfermentmarker vor.**
- 3. Cardiales Troponin T ist ausschließlich auf den Herzmuskel zurückzuführen.**

8.1.21 Alternativhypothese(n):

- 1. Betroffene zeigen eine Kardiomyopathie mit Hypertrophie des Herzmuskels, reduzierter Kontraktilität und pathologischer diastolischer und systolischer Funktion des Herzmuskels;**
- 2. Betroffene zeigen erhöhte Herzfermente**
- 3. Die erhöhten cardialen Troponin T und Troponin I Werte bei Patientinnen und Patienten mit Skelettmuskelerkrankungen sind nicht auf eine ischämische Herzbeteiligung zurückzuführen, sondern entstammen den degenerierenden und sich regenerierenden Skelettmuskeln oder einer Kardiomyopathie im Rahmen der Grundkrankheit.**

8.1.22 Nebenzielgrößen:

8.2 Studienplanung

Die Fallzahlberechnung basiert auf (Alpha = Fehler 1. Art, Power = 1 – Beta = 1 – Fehler 2. Art):

8.2.1 Alpha: 8.2.2 Power: 8.2.3 Stat.Verfahren:

8.2.4 Multiples Testen: nein ja: Korrekturverfahren.:

8.2.5 Erwartete Anzahl von Studienabbrecher/inne/n (Drop-out-Quote):

8.3 Geplante statistische Analyse

Population: 8.3.1 Intention-to-treat 8.3.2 Per protocol

8.3.3 Zwischenauswertung: nein ja: Abbruchkriterien:

8.3.4 Geplante statistische Verfahren: **explorative Methoden: Korrelation- und Regressionsmethoden**

8.4 Dokumentationsbögen / Datenmanagement

8.4.1 Angaben zur Datenqualitätsprüfung

8.4.2 Angaben zum Datenmanagement

MS Excel Tabellen

8.5 Verantwortliche und Qualifikation

8.5.1 Wer führte die biometrische Planung durch (ggf. Nachweis der Qualifikation)?

Univ.-Prof. DI. Dr. Andrea Berghold

8.5.2 Wer wird die statistische Auswertung durchführen (ggf. Nachweis der Qualifikation)?

Institut f. Med. Informatik, Statistik u. Dokumentation (Frau Univ.-Prof. DI. Dr. Andrea Berghold)

8.6 Datenschutz

8.6.1 Die Datenverarbeitung erfolgt a) personenbezogen b) indirekt personenbezogen
c) nicht personenbezogen

8.6.2 Wenn a): Begründung:

DVR-Nummer:

8.6.3 Wenn b): Wie erfolgt die Verschlüsselung?

Code-Nummern

9. Liste der eingereichten Unterlagen (wenn nicht gesondert dem Antrag beiliegend):

Dokument	Version/Identifikation	Datum
Protokoll	1	10.03.13
Kurzfassung		
Patienteninformation / Einwilligungserklärung	1	10.03.13
Prüfbogen (Case Report Form, CRF)		
Versicherungsbestätigung		
Amendment Nr.		
Amendment Nr.		
Amendment Nr.		
Lokales Amendment Nr.		

Name und Unterschrift der Antragstellerin/des Antragstellers

- 9.1 Name: **OA Dr. J. Binder / Univ.-Prof. Dr. S. Quasthoff**
- 9.2 Institution/ Firma: **Medizinische Univ. Klinik Graz, Klinische Abteilung für Kardiologie / Klinische Abteilung für Neurologie**
- 9.3 Position: **Oberarzt / Professor**
- 9.4 Antragsteller/in ist 9.4.1 koordinierende/r Prüfer/in (multizentrische Studie)
 (nur AMG-Studien) 9.4.2 Hauptprüfer/in (monozentrische Studie)
 9.4.3 Sponsor bzw. Vertreter/in des Sponsors
 9.4.4 vom Sponsor autorisierte Person/Organisation

Ich bestätige hiermit, dass die in diesem Antrag gemachten Angaben korrekt sind und dass ich der Meinung bin, dass die Durchführung der Studie in Übereinstimmung mit dem Protokoll, nationalen Regelungen und mit den Prinzipien der Guten Klinischen Praxis möglich sein wird.

Weiters stimme ich mit meiner Unterschrift zu, dass folgende Daten aus meinem Antrag ggf. durch die Ethikkommission veröffentlicht werden, um die Anträge nach Zahl und Inhalt transparent zu machen: EK-Nummer, Einreich-Datum, Projekttitel, Hauptprüfer, Sponsor/CRO, weitere Zentren.
(Im Falle der Nicht-Zustimmung bitte diesen Absatz durchzustreichen)

.....
 Unterschrift der Antragstellerin/des Antragstellers

.....
 Datum

!!! Achtung: Diese Unterschrift ist in jedem Fall erforderlich !!!

Teil B

Studienkurzbezeichnung: "Bedeutung der kardialen Troponin T Isoformen bei erblichen und erworbenen Skelettmuskelerkrankungen"

10. Angaben zur Prüferin/zum Prüfer

10.1 Name: **OA Dr. Binder/Prof. Dr. Quasthoff**

10.2 Krankenhaus/Institut/Abteilung: **Medizinische Universitätsklinik Graz, Klinische Abteilung für Kardiologie / Klinische Abteilung für Neurologie**

10.3 Telefon	10.4 „Pieps“/Mobil	10.5 Fax	10.6 e-mail-Adresse:
	0316 / 385 80630 0316 / 385 81139		josepha.binder@medunigraz.at stefan.quasthoff@medunigraz.at

10.7 Jus practicandi: ja nein 10.8 Facharzt für: **Kardiologie, Neurologie**

10.9 Prüfärztekurs: ja nein

10.10 Sofern relevant: Präklinische Qualifikation (z.B. Labordiagnostik) bzw. Name der Verantwortlichen:
Univ.-Prof. Dr. Quasthoff

11. Geplante Anzahl der PatientInnen bzw. ProbandInnen an dieser Prüfstelle

80

12. Verantwortliche MitarbeiterInnen an der klinischen Studie (an Ihrer Prüfstelle)

Fr/Hr	Titel	Vorname	Name	Institution
Fr.	Dr.	Nina	Hörlesberger	Abteilung für Kardiologie
Fr.	OA Dr.	Josepha St.	Binder	Abteilung für Kardiologie
Fr.	Prof. Dr.	Andrea	Berghold	Institut für Medizinische Statistik und Informatik
Fr.	Doz. Dr.	Tatjana	Stojakovic	Institut für Labormedizin
Hr.	Dr.	Christoph	Oberschneider	Abteilung für Kardiologie
Hr.	Prof. Dr.	Burkert M.	Pieske	Abteilung für Kardiologie
Hr.	Prof. Dr.	Meinrad	Beer	Kinderradiologie Graz
	OA Dr.	Ralph	Maderthaler	Abteilung für Radiologie
	Prof. Dr.	Michael	Fuchsjäger	Abteilung für Radiologie
	Dr. DI	Ursula	Reiter	Abteilung für Radiologie
Hr.	Prof. Dr.	Christian	Windpassinger	Institut für Humangenetik
Hr.	Prof. Dr.	Stefan	Quasthoff	Univ. Klinik für Neurologie Graz

13. Unterschrift der Prüferin/des Prüfers

Ich bestätige hiermit, dass die in diesem Antrag gemachten Angaben korrekt sind und dass ich der Meinung bin, dass die Durchführung der Studie in Übereinstimmung mit dem Protokoll, nationalen Regelungen und mit den Prinzipien der Guten Klinischen Praxis möglich sein wird.

.....
Unterschrift der Prüferin/des Prüfers

.....
Datum

Bei multizentrischen AMG-Studien sind die Teile B von der Hauptprüferin/dem Hauptprüfer des jeweiligen Zentrums zu unterzeichnen. Alternativ zur Unterschrift auf den Teilen B können die Unterschriften der Hauptprüfer/innen auch auf den Unterschriftenseiten des Protokolls oder der Prüfärzteverträge vorgelegt werden. Es muss jedenfalls eine eindeutige - durch Unterschrift dokumentierte - Zustimmung aller Hauptprüfer/innen zum Protokoll vorliegen.

14. Name und Unterschrift der Leiterin/des Leiters

der Einrichtung*

des Pflegedienstes*

14.1 Name: **Univ.-Prof. Dr. B. Pieske**

.....
Unterschrift der Leiterin/des Leiters

.....
Datum

- * Die Unterschrift der Leiterin/des Leiters des Pflegedienstes ist für Pflegeforschungsprojekte und die Anwendung neuer Pflegekonzepte und -methoden erforderlich, ansonsten die Unterschrift der Leiterin/des Leiters der jeweiligen Einrichtung.
Einrichtung: die Klinik (wenn gegliedert: die klinische Abteilung), die Abteilung oder die gemeinsame Einrichtung

!!! Achtung: Teil B ist in jedem Fall vollständig auszufüllen, bei multizentrischen klinischen Prüfungen nach AMG für jedes in Österreich teilnehmende Zentrum separat !!!

10 Anhang – Patienteninformation

Patienteninformation und Einverständniserklärung für Studienteilnehmer (für manifest Erkrankte)

Betrifft: Studienprojekt:

„Bedeutung der kardialen Troponin T Isoforme bei erblichen und erworbenen Skelettmuskelerkrankungen“

Studienleiter:

OA Dr. Josepha Binder, Facharzt für Innere Medizin und Kardiologie, Medizinische Universität Graz; Tel: 0316 385 80630

Univ.-Prof. Dr. Stefan Quasthoff, Facharzt für Neurologie, Medizinische Universität Graz; Tel: 0316 385 81139

(Planung und Überwachung der Studie)

Studienmitarbeiter:

Dr. N. Hörlesberger, PD Mag. Dr. Ch. Windpassinger, Doz. Dr. T. Stojakovic, Prof. Dr. B. Pieske, Prof. Dr. M. Beer, Prof. Dr. A. Berghold sind ebenfalls an Planung, Durchführung und Überwachung der Studie beteiligt.

Lieber Patient!

Wir möchten Sie gerne einladen, an einer Studie zur Erforschung der Herzbeteiligung einer neuen familiären Muskelerkrankung teilzunehmen. Selbstverständlich ist Ihre Teilnahme an dieser Studie völlig freiwillig und Sie können diese auch jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile ablehnen bzw. Ihr Einverständnis zur Teilnahme auch später zurückziehen. Wir erwarten, dass die Resultate und Erkenntnisse dieser Studie eine entscheidende Grundlage für das klinische Management der betroffenen Patienten darstellen.

Beschreibung der Studie:

Myopathien sind eine Gruppe von erblich bedingten und erworbenen Muskelerkrankungen, die durch eine ausgeprägte Schwäche und Atrophie der Skelettmuskel charakterisiert sind. Manche Formen zeigen zusätzlich eine Beteiligung des Herzmuskels. Dies wurde auch bei einer neuen Form der Muskelerkrankung beobachtet, die erst vor kurzer Zeit von Dr. Windpassinger und Dr. Quasthoff erstmalig beschrieben wurde. Auffällig dabei war der erhöhte Wert des kardialen Troponin T der als Marker für eine ischämische Herzerkrankung herangezogen wird, ohne dass die betroffenen Patienten an einer Herzmuskelischämie litten.

Aus diesem Grund werden die Patienten einem kardialen Screening unterzogen. Dieses umfasst die Durchführung eines Elektrokardiogramms (EKG), Holter EKGs¹, Blutdruck-Holters², Herzultraschalls, Laborscreenings, sowie eine Magnetresonananzuntersuchung des Herzens.³ Bei Patienten mit pathologischem Herzinferktfermentmuster wird eine Ischämiediagnostik im Sinne einer Herzkatheteruntersuchung bzw. eines Herz CT durchgeführt.

Ziel der Studie ist die im Rahmen der Labordiagnostik erhobenen Troponin T und I Werte mit dem klinischen Herzdaten zu verbinden mit dem Ziel,

- 1) Die Herkunft des im Serum gefundenen Troponin T und I zu eruieren (Herzmuskel versus Skelettmuskel) und mit dem CK Wert zu korrelieren.
- 2) Eine mögliche Herzmuskelpathologie der Myopathien zu charakterisieren.

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten ist eine systematische Herzuntersuchung mit denselben kardialen Untersuchungen an einem gesunden Kollektiv vorgesehen.

Zu dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz eine befürwortende Stellungnahme abgegeben.

¹ Holter EKG: Registrierung des Elektrokardiogramms über einen längeren Zeitraum (24–120 Stunden). Das Langzeit-EKG wird eingesetzt, um das Ausmaß von Herzrhythmusstörungen aufspüren zu können.

² Blutdruckholter: Der Blutdruck wird über einen Zeitraum von 24 Stunden regelmäßig gemessen und ein Blutdruckprofil erstellt.

³ Magnetresonananzuntersuchung des Herzens: Nichtinvasive Darstellung von morphologischen, strukturellen und funktionellen Veränderungen des erkrankten Herzens sowie der großen Gefäße.

Zur Auswertung der Daten werden in anonymisierter Form folgende Daten gespeichert:

- Ihre Eigenanamnese
- Ihre Familienanamnese
- Ihre Untersuchungsergebnisse

Eine Mitteilung der Studienergebnisse ist nicht vorgesehen. Fragen können Sie jederzeit an uns (Medizinische Universität Graz, Abteilung für Kardiologie, Auenbruggerplatz 15, 8010 Graz, Tel: 0316 385 80630) stellen.

Bei allen anfallenden Untersuchungen wird Ihnen voller Datenschutz unter Einhaltung des Datenschutzgesetzes gewährleistet. Für die wissenschaftliche Bearbeitung werden alle Daten anonymisiert.

Einverständniserklärung

Ich habe die obige Patienteninformation gelesen und verstanden und bestätige mit meiner Unterschrift meine Einwilligung zur freiwilligen Teilnahme an dieser Studie. Ich bin damit einverstanden, dass die aus dieser Studie erhobenen wissenschaftlichen Erkenntnisse in anonymisierter Form in medizinischen Fachzeitschriften veröffentlicht werden. Meine Teilnahme an der Studie kann ich jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne dass mir daraus Nachteile erwachsen, zurückziehen.

Ich habe eine Kopie der Einverständniserklärung (Seite 1-3) erhalten.

Name, Geburtsdatum der Probandin

Unterschrift der Probandin

11 Anhang – Studienprotokoll

PROJECT TITLE:

Project / Version 01 "The role of troponin T isoforms in hereditary and acquired skeletal muscle diseases"

Date of final version: März 10, 2013

Coordinating Investigator:

OA Dr. Josepha Binder

Abteilung für Innere Medizin und Kardiologie

Medizinische Universität Graz

Medical Study Coordinator:

Dr. Nina Hörlesberger

Abteilung für Innere Medizin und Kardiologie

Medizinische Universität Graz

Biostatistics:

Univ.-Prof. Dipl. Ing. Dr. Andrea Berghold

Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation

Medizinische Universität Graz

Table of Contents

1 Background

2 Study Design

3 Patient Population

 3.1 Inclusion Criteria

 3.2 Exclusion Criteria

4 Aims

5 Assessments and Follow-up

6 Data Collection

7 Statistical Considerations

8 Risks and Benefits

9 Administrative Agreements

 9.1 Publication

10 References

1 Background

Cardiac troponin(cTnT or CTnI) is the biomarker of choice for the diagnosis of cardiac injury, largely because of its unique tissue specificity (1, 2). The specificity of the first generation cTnT assay (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana) was initially questioned when an increased concentration of cTnT was found in patients with renal failure and skeletal muscle diseases (3,4). Subsequent studies documented a lack of specificity of the capture antibody in the first generation assay, which detected both cardiac isoforms and some fetal skeletal muscle cTnT isoforms re-expressed in skeletal muscle in response to injury (3-5). These re-expressed fetal isoforms were characterized, and a new antibody was developed by Roche Diagnostics and validated not to detect these re-expressed skeletal muscle cTnT isoforms (6-9). Two extensive experimental studies conducted by different groups ultimately resulted in the conclusion that cTnT had unique cardiac specificity that was equal to that of cTnI (1, 2).

Our interest in the specificity of cTnT assay was stimulated by our experience with a group of patients with FHL1 mutation (Binder et al., *Cardiovasc Genet.* 2012)(10) as well as with patients with a variety of diseases of the skeletal muscles such as myotonic dystrophy types I and II, some inflammatory muscle diseases and muscular dystrophies (Duchenne and Becker).

Drs. Windpassinger and Quasthoff described a new form of muscular dystrophy (XMPMA) that involved not only skeletal muscle but the heart muscle as well (11). The affected patients showed elevated levels of skeletal muscle CK but to our surprise also elevated levels of cardiac Troponin T, a marker for ischemic heart disease, in the absence of any signs of ischemic heart disease. We examined the correlation of FHL1 genotype with the cardiac phenotype to establish a potential cardiac involvement in the disease and found a novel phenotype of hypertrophic cardiomyopathy with distinct morphological, functional and electrical abnormalities. It can be assumed that the pathologies cause myocardial injury not by classical large vessel ischemia but perhaps by a small vessel disease that increases cTnT concentrations in the blood samples. The origin of the highly elevated cTnT may be predominantly of cardiac origin; however, it cannot be ruled out that to some extent, it may also come from the degenerating skeletal muscle. There are some reports on the specificity of cTnT tests since expression of mRNA of the cardiac isoforms of troponin T and I in myopathic skeletal muscle has been found (12, 13). Cardiac troponin T appears to be released from the regenerating skeletal muscle (4, 14). The second-generation cTnT assay showed increased cTnT values in 50% of Duchenne's muscular dystrophy patients (15) and in acquired inflammatory myopathies (16, 17) without clinical evidence of cardiac involvement. In inflammatory myopathies, troponin T is present in the serum but troponin I is not (18). The clinical significance of these findings remains unclear. Either the elevated cTnT values were due to involvement of heart muscle in skeletal muscle disease, or degenerating or regenerating skeletal muscles alone expressed mRNA for cTnT, which could lead to a false positive cTnT test for ischemic heart disease in these patients. The correlation between troponin T and I with the corresponding creatinine kinase (CK) levels in patients with muscle diseases has been discussed but has not been substantiated by solid data.

2 Study design

Patients with a diagnosis of genetic or acquired neuromuscular diseases will be prospectively followed-up to characterize potential cardiac manifestations and to describe morphological and functional alterations of the heart.

3 Patient Population

About eighty patients of both sexes with a clear diagnosis of genetic or acquired neuromuscular diseases who presented at the Neuromuscular Outpatient Clinic of the Department of Neurology, Medical University of Graz since 1993 will be asked to participate in this follow-up study.

3.1 Inclusion Criteria

Patients ≥ 18 with congenital or acquired musculoskeletal disease.

3.2 Exclusion Criteria

Patients < 18 years

Patients unable to give informed consent

Patients with cardiac pacemakers or metal implants except surgical osteosynthesis material

Patients with renal dysfunction (creatinine clearance less than 30 ml/min)

Patients with allergy to contrast agents

Patients with hyperthyreosis

4 Aims

The purpose of the study is to clarify whether cardiac TnT and I detected in blood samples from patients with muscular diseases are released from the heart and thus reflects elevated cardiac risk or is released from the diseased skeletal muscle and therefore has no implications for cardiac muscle. For that reason we correlate troponin T and I in serum to the skeletal muscle specific CK level (myocardium versus skeletal muscle)

1. Determine whether there is immunoreactive troponin T (cTnT) expression in diseased skeletal muscle that might cause false-positive increases in cTnT.
2. Describe a possible myocardial myopathy with cardiac MRI and echocardiographic measurements.

5 Assessments and Follow-up

All subjects are routinely examined by echocardiography including strain and strain rate, ECG, 24-hour ECG, 24-hour blood pressure measurement and a standard laboratory workup including heart specific parameters (e.g. Troponin T, troponin I). Specific DNA analyses will also be included if they have not already been done at the Department of Neurology, Medical University of Graz.

All patients will undergo cardiac MRI to evaluate late enhancement. If patients have elevated Trop T enzymes, cardiac CT will be performed to exclude ischemia and/or coronary artery disease.

Standard echocardiography including strain and strain rate

Transthoracic echocardiography is performed with the Vivid 7 3.5 MHz ultrasound scanner (GE Ultrasound, Horten, Norway). Besides standard echocardiography for the evaluation of the left and right heart dimensions, strain and strain rate are assessed. Real-time 2-dimensional color Doppler myocardial imaging data are recorded from the left and right ventricular walls using a standard apical 4-chamber view to evaluate longitudinal function. Radial function of the posterior wall is assessed with parasternal long-axis views. Strain rate curves are extracted for the basal, mid and apical segments (longitudinal function) and the basal posterior wall (radial function). From the averaged strain rate and strain data, systolic strain (which is related to regional stroke volume) and peak systolic strain rate (which is related to regional contractility) are calculated.

Cardiac magnetic resonance imaging

All patients without contraindications for magnetic resonance undergo 1.5T MR (Siemens Erlangen, Germany) ECG-gated cardiac magnetic resonance imaging (CMR) with late gadolinium enhancement (LGE). Investigation will be performed in a single session lasting not more than 40 min. CMR protocol is performed according to current guidelines (19, 20). Due to the limited breath-hold and communication abilities of elderly patients (hearing aids cannot be used in the MR), protocols are adapted for free breathing (21). Short axis images will be used to quantify left ventricular global (EDV, ESV, SV, EF, LV myocardial mass) and regional (wall thickness and wall thickening) function by ARGUS software (Siemens Erlangen, Germany). During intravenous application of 0.1 mmol/kg body weight Gd-containing contrast agent at a rate of 4 ml/s followed by a 30 ml saline flush, rest perfusion images (single shot inversion recovery fast low angle shot (Flash) sequence) are acquired in 3 short axis and one long axis slices. Immediately after first pass, a second dose of 0.1 mmol/kg body weight Gd-containing contrast agent is applied to optimize contrast in late enhancement imaging. Ten minutes' time delay between contrast agent application and late gadolinium enhancement is used to acquire 2D and/or 3D flash based phase contrast images of left ventricular in- and outflow of blood to evaluate net blood flow volumes and maximum blood velocities (LV stroke volume, aortic and mitral maximum velocities and/or regurgitation volumes). Ten minutes after 0.2 mmol/kg body-weight contrast agent application, single shot inversion-recovery steady state free precision image sequence with phase sensitive reconstruction (PSIR) will be obtained to determine LGE images covering the entire heart in gapless short axes,

4-chamber, LV 2-chamber and 3-chamber slices. Presence/absence of LGE will be evaluated qualitatively and quantitatively according to the standardized nomenclature for imaging of the heart (17 segment model).

Laboratory

Screening for elevated CK and cTnT and/or cTnI values in blood from patients with musculoskeletal diseases (e.g. Dystrophic myotonia types I and II, muscular dystrophies, sporadic inclusion body myositis, inflammatory myopathy, facioscapulohumeral muscular dystrophy (FHSD)). The laboratory values for cTnT and cTnI will be related to clinical cardiac data and correlated with troponin and CK values.

1. Western blot (WB) analysis of skeletal muscle biopsy specimen from the selected patients using cTnT and cTnI specific antibodies. Preferably, 2-D electrophoresis will be used for protein separation.
2. Sequence analysis of the positive spots obtained in Western blot analysis to identify the nature of the detected peptides/proteins. Question: is there re-expression of cTnT in diseased skeletal muscle?

6 Data Collection

Patient data will be entered in a Microsoft Excel® database that can be assessed only by authorized personnel. Each patient is pseudonymized with a number.

7 Statistical considerations

Explorative analyses will be done for all parameters. Continuous variables will be presented as mean and standard deviation or median and range, categorical variables as frequency and percentage. Correlations between laboratory parameters will be computed using Pearson or Spearman correlation coefficient as appropriate. Comparison of patients with and without elevated cTnT will be performed using parametric or non-parametric methods as appropriate. All significance testing done will be exploratory. The analyses will be performed using SPSS 20.0

8 Risks and Benefits

The results and information provided by the study will be decisive for the evaluation of the significance of the cardiac markers troponin T and I in patients with diseases of the skeletal musculature. The study will have a direct effect on clinical management and counseling in that the findings will show whether or not a cardiomyopathy is present, and whether the troponin T test is still valid as a

marker for muscular diseases. The patients will receive information about all examinations and will sign consent forms.

The risks include allergic reactions to contrast agents used for cardiac CTs or MRIs as well as exposure to radiation.

Muscle biopsies if taken could cause soft tissue infection, bleeding, haematomas, nerve and vascular lesions and wound healing disorders. There can also be allergic reactions to local anaesthetics.

9 Administrative Agreement

9.1 Publication

The right of publication rests with the coordinating investigator and the other investigators involved.

10 References:

- (1) Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, Jaffe AS, Apple FS, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2007 Nov 27;116(22):2634-2653.
- (2) Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010 Sep;31(18):2197-2204.
- (3) Anderson PA, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM, et al. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res* 1995 Apr;76(4):681-686.
- (4) Bodor GS, Survant L, Voss EM, Smith S, Porterfield D, Apple FS. Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle. *Clin Chem* 1997 Mar;43(3):476-484.
- (5) Katus HA, Looser S, Hallermayer K, Remppis A, Scheffold T, Borgya A, et al. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992 Mar;38(3):386-393.
- (6) Muller-Bardorff M, Hallermayer K, Schroder A, Ebert C, Borgya A, Gerhardt W, et al. Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation. *Clin Chem* 1997 Mar;43(3):458-466.
- (7) Haller C, Zehelein J, Remppis A, Muller-Bardorff M, Katus HA. Cardiac troponin T in patients with end-stage renal disease: absence of expression in truncal skeletal muscle. *Clin Chem* 1998 May;44(5):930-938.
- (8) Ricchiuti V, Voss EM, Ney A, Odland M, Anderson PA, Apple FS. 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* 1998 Sep;44(9):1919-1924.
- (9) Ricchiuti V, Apple FS. RNA expression of cardiac troponin T isoforms in diseased human skeletal muscle. *Clin Chem* 1999 Dec;45(12):2129-2135.
- (10) Binder JS, Weidemann F, Schoser B, Niemann M, Machann W. Spongious hypertrophic cardiomyopathy in patients with mutations in the four-and-a-half LIM domain 1 gene. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Oct 1;5(5):490-502.
- (11) Windpassinger C, Schoser B, Straub V, Hochmeister S, Noor A, Lohberger B, et al. An X-linked myopathy with postural muscle atrophy and generalized hypertrophy, termed XMPMA, is caused by mutations in FHL1. *Am J Hum Genet* 2008 Jan;82(1):88-99.
- (12) Messner B, Baum H, Fischer P, Quasthoff S, Neumeier D. Expression of messenger RNA of the cardiac isoforms of troponin T and I in myopathic skeletal muscle. *Am J Clin Pathol* 2000 Oct;114(4):544-549.

- (13) Wu AH, Jialal I. How specific is cardiac troponin? *Am J Clin Pathol* 2000 Oct;114(4):509-511.
- (14) Bodor GS, Porterfield D, Voss EM, Smith S, Apple FS. Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. *Clin Chem* 1995 Dec;41(12 Pt 1):1710-1715.
- (15) Hammerer-Lercher A, Erlacher P, Bittner R, Korinthenberg R, Skladal D, Sorichter S, et al. Clinical and experimental results on cardiac troponin expression in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chem* 2001 Mar;47(3):451-458.
- (16) Lindberg C, Klintberg L, Oldfors A. Raised troponin T in inclusion body myositis is common and serum levels are persistent over time. *Neuromuscul Disord* 2006 Aug;16(8):495-497.
- (17) Cox FM, Delgado V, Verschuuren JJ, Ballieux BE, Bax JJ, Wintzen AR, et al. The heart in sporadic inclusion body myositis: a study in 51 patients. *J Neurol* 2010 Mar;257(3):447-451.
- (18) Aggarwal R, Lebiecz-Odrobina D, Sinha A, Manadan A, Case JP. Serum cardiac troponin T, but not troponin I, is elevated in idiopathic inflammatory myopathies. *J Rheumatol* 2009 Dec;36(12):2711-2714.
- 19) Kramer CM, Barkhausen J, Flamm SD, Kim RJ, Nagel E, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance Board of Trustees Task Force on Standardized Protocols. Standardized cardiovascular magnetic resonance imaging (CMR) protocols, society for cardiovascular magnetic resonance: board of trustees task force on standardized protocols. *J Cardiovasc Magn Reson* 2008 Jul 7;10:35.
- (20) Morello A, Gelfand EV. Cardiovascular magnetic resonance imaging for valvular heart disease. *Curr Heart Fail Rep* 2009 Sep;6(3):160-166.
- (21) SCMR recommended CMR protocols. *Magnetom Flash* 2/2010.