

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Thomas Haaf**

**Serum-Creatin-Kinase Spiegel von Konduktorinnen der Duchenneschen
und Beckerschen Muskeldystrophie unter besonderer Berücksichtigung
einer Schwangerschaft**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Simon Jonas Ernst

aus Ellwangen

Würzburg, November 2014

Referent: Professor Dr. med. Tiemo Grimm

Korreferent: Professor Dr. med. Peter U. Heuschmann

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2014

Der Promovend ist Arzt

Widmung

Meinen Eltern und Natalie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ziele dieser Arbeit.....	1
1.2	Duchennesche Muskeldystrophie.....	2
1.2.1	Allgemeines zur Duchenneschen Muskeldystrophie	2
1.2.2	Klinik der Duchennesche Muskeldystrophie	2
1.2.3	Molekulargenetik der Duchenneschen Muskeldystrophie.....	3
1.2.4	Neumutationsrate bei der Duchenneschen Muskeldystrophie.....	4
1.3	Beckersche Muskeldystrophie	4
1.3.1	Allgemeines zur Beckerschen Muskeldystrophie	4
1.3.2	Klinik der Beckerschen Muskeldystrophie	5
1.3.3	Molekulargenetik der Beckerschen Muskeldystrophie.....	6
1.4	Creatin-Kinase Wert	6
1.4.1	Allgemeines zum Creatin-Kinase Wert.....	6
1.4.2	Creatin-Kinase im peripheren Blut.....	7
1.4.3	Bestimmung des CK-Werts zur Bewertung des Überträgerinnenstatus	7
1.4.4	Einflussfaktoren auf den Creatin-Kinase Wert.....	8
1.4.4.1	Alter	8
1.4.4.2	Bewegung	8
1.4.4.3	Ethnie.....	9
1.4.4.4	Geschlecht	9
1.4.4.5	Hämolyse	9
1.4.4.6	Hormonelle Einflüsse	9
1.4.4.7	Temperatur	10
1.4.4.8	X-Inaktivierung	10
1.5	Risikoberechnung.....	10
2	Material und Methoden	14
2.1	Auswahlkriterien	14
2.1.1	Konduktorinnenidentifikation per Stammbaum	14
2.1.2	Kontrollgruppe	15
2.1.3	Schwangerschaft.....	15
2.1.4	Alter	15
2.2	Serum-Creatin-Kinase Bestimmung	15
2.3	Datengewinnung / Datenquellen	16

3	Ergebnisse	18
3.1	Beschreibende Statistik: Lage- und Streuungsmaße.....	18
3.1.1	Alter	18
3.1.2	CK-Werte.....	21
3.2	Kolmogorov-Smirnov Test, Prüfung auf Normalverteilung.....	23
3.3	Verschiedenheit der Subgruppen, t-Test nach Student oder Welch-Test	23
3.4	Analyse des β -Fehlers und der Power	26
3.5	Ideale Gruppengröße für die Gruppe OS BMD	26
3.6	Alterskorrelation.....	27
3.7	Berechnung der Regressionsgleichung	28
3.8	Alterskorrektur	29
3.9	Odds Ratio	30
3.9.1	Normalverteilung und Odds Ratio für nicht schwangere Frauen für die Risikoabschätzung bei BMD	32
3.9.2	Normalverteilung und Odds Ratio für schwangere Frauen für die Risikoabschätzung bei DMD	33
3.9.3	Normalverteilung und Odds Ratio für nicht schwangere Frauen für die Risikoabschätzung bei DMD.....	34
3.10	Odds-Ratio Tabellen für das Programm LINKAGE.....	36
3.11	Odds Ratio = 1	38
3.12	Sensitivität und Spezifität der CK-Bestimmung	41
4	Diskussion	43
4.1	Der ideale diagnostische Test	43
4.2	Neubewertung des CK-Werts	43
4.3	Altersabhängigkeit	44
4.3.1	Altersabhängigkeit des CK-Werts bei Konduktorinnen für die Muskeldystrophie Duchenne	44
4.3.2	Altersabhängigkeit des CK-Werts bei Konduktorinnen für die Beckersche Muskeldystrophie	44
4.3.3	Altersabhängigkeit des CK-Werts in der Kontrollgruppe.....	44
4.4	Schwangerschaft.....	45
4.4.1	Schwangerschaft bei Konduktorinnen DMD	45
4.4.2	Schwangerschaft bei Konduktorinnen BMD	46
4.5	Normwerte oder Odds Ratio unter Berücksichtigung der Testsensitivität.....	46
4.6	Die Bedeutung des Creatin-Kinase Werts für die humangenetische Beratung.....	47
5	Zusammenfassung.....	49

6	Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis.....	51
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	51
6.2	Tabellenverzeichnis.....	51
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	53
6.4	Literaturverzeichnis	54

1 Einleitung

1.1 Ziele dieser Arbeit

Das Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg führt seit April 2003 die Bestimmung der Gesamt Creatin-Kinase im Serum mit der 37 °C Methode nach IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) (Schumann et al. 2002) durch. Diese Bestimmungsmethode führt zu deutlich höheren Werten und Referenzbereichen für die Serum-Creatin-Kinase als frühere Methoden (Schumann et al. 2002; Stromme et al. 2004).

Der Serum-Creatin-Kinase Spiegel kann wichtige diagnostische Hinweise für die humangenetische Beratung von Frauen, die nach ihrem Heterozygotenstatus für die Beckersche und Duchennesche Muskeldystrophie fragen, erbringen. Die Arbeiten, die sich mit der Risikoberechnung für betroffene Frauen auseinandersetzten (Keller 1996; Apacik 1988), untersuchten bisher die Creatin-Kinase Werte nach der Methode von Rosalki (1967), hier wurde die Bestimmung bei 25 °C durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit soll die Veränderungen der Normbereiche für die Serum-Creatin-Kinase Werte neu erfassen und bewerten.

Ein weiteres Ziel ist es Unterschiede im CK-Wert zwischen Schwangeren und nicht Schwangeren aufzuzeigen (Blyth and Hughes 1971; Bunday et al. 1979; Emery and King 1971; Smith et al. 1979). Odds Ratio Berechnungen für die Gruppe der Schwangeren sollen es ermöglichen, auch nach bereits eingetretener Schwangerschaft, eine möglichst genaue Ermittlung des Carrierstatus durchzuführen. Bisher liegen für ratsuchende schwangere Frauen noch keine aussagekräftigen Daten vor.

1.2 Duchennesche Muskeldystrophie

1.2.1 Allgemeines zur Duchenneschen Muskeldystrophie

Die progressive Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD) ist die häufigste progressive Muskelerkrankung im Kindesalter. Sie wurde von Edward Meryon (1852) und von Guillaume Benjamin Amand Duchenne (1867) zum ersten Mal beschrieben. Männliche Anlageträger erkranken an DMD mit einer Wahrscheinlichkeit vom etwa 1:3500 (= 28,6:100000) (Emery 1991, 2002). Ein Defekt im Dystrophin Gen führt bei Männern aufgrund der Hemizygotie immer zur Erkrankung. Die Krankheit nimmt bei männlichen Anlageträgern einen malignen Verlauf und endet für die betroffenen Jungen meist im Alter von etwa 27 Jahren tödlich (Rall and Grimm 2012). Die betroffenen Männer sterben meist, ohne dass sie Nachkommen gezeugt haben (Emery 2002).

1.2.2 Klinik der Duchennesche Muskeldystrophie

Der Beginn der Erkrankung liegt gewöhnlich vor dem 3.-7. Lebensjahr. Die normale motorische Entwicklung ist verzögert. Typische Symptome sind Hyperlordose, positives Tredlenburgsches und Gowersches Zeichen und die Hypertrophie der Wadenmuskulatur. Im Verlauf wird die Muskulatur des Schultergürtels geschwächt. Scapulae alatae sind hierfür ein wegweisendes Zeichen. Die Krankheit zeigt eine rasche Progredienz. Zunächst im Beckengürtel, später im Schultergürtel. Ab dem 8.-15. Lebensjahr sind die Betroffenen meist gehunfähig und auf einen Rollstuhl angewiesen (Emery and Muntoni 2003). Der Herzmuskel wird ebenfalls von dystrophischen Prozessen erfasst. Es führen allerdings eher pathologische EKG-Veränderungen, als die kardiale Insuffizienz zum Tod der betroffenen Männer. Sie sterben aufgrund von kardialer Miterkrankung des Herzmuskels und teils resultierenden pathologischen EKG-Veränderungen (Perloff et al. 1967). Die Pneumonie, als schwere pulmonale Komplikation, kommt aufgrund der Ateminsuffizienz im fortgeschrittenen Erkrankungsalter neben den Herzproblemen als Todesursache infrage. Trotz optimaler supportiver und assistiver Therapie

sterben die Betroffenen zwischen dem 25.-40. Lebensjahr (Eagle et al. 2002; Kohler et al. 2009; Ishikawa et al. 2011; Rall and Grimm 2012).

Frauen sind durch die zufällige somatische X-Inaktivierung Mosaik (Sumita et al. 1998). In ca. 5 bis 10 % kann es bei ihnen vor allem im höheren Lebensalter, zum Auftreten von Symptomen kommen (Emery and Lee 1964; Emery 1994; Norman and Harper 1989). Sie kommen als Überträgerinnen infrage.

1.2.3 Molekulargenetik der Duchenneschen Muskeldystrophie

Mutationen im Dystrophin-Gen sind die molekulargenetische Grundlage der Erkrankung. In 65 % der Fälle liegen Deletionen und in 7-10 % Duplikationen vor. 22-26 % sind auf Punktmutationen zurückzuführen (Abbs et al. 2010; Den Dunnen et al. 1989; White et al. 2006). Bei ca. 2 % bleibt die Mutation trotz aller genetischen Tests weiterhin unbekannt (Monaco et al. 1988; Deburgrave et al. 2007). Als 1982 die Lokalisation des Dystrophin-Gens auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms bekannt war, wurde das Gen 1985 (Ray et al.) entdeckt und 1987 das dafür codierende Protein Dystrophin identifiziert (Hoffman et al.). Monaco et al. (1988) stellten folgende Hypothese zum Schweregrad und Verlauf der DMD auf: Mutationen im Dystrophin-Gen verursachen eine Änderung des Leserasters (frame-shift mutations). Das Resultat ist ein nicht funktionelles Protein.

Heute liefern molekulargenetische Tests Auskunft über die genetischen Veränderungen. Mit multiplex PCR und MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) ist es möglich, Deletionen und Duplikationen im Dystrophin-Gen mit einer Sensitivität von bis zu über 98 % zu detektieren. Für Punktmutationen und weitere seltenere Mutationen stehen weitere Verfahren wie z. B. die DNA-Sequenzanalyse zur Verfügung (Abbs et al. 2010).

Die Bestimmung des Serum-Creatin-Kinase Wertes ist trotz der modernen molekulargenetischen Tests eine anerkannte Methode zur Erfassung heterozygoter Trägerinnen geblieben. Beide Verfahren haben, zusammen mit den aus dem Stammbaum gewonnenen Informationen, für die Erfassung der Heterozygoten und deren genetischen Beratung ihre Berechtigung.

1.2.4 Neumutationsrate bei der Duchenneschen Muskeldystrophie

Neumutationen bei der Duchenneschen Muskeldystrophie treten mit einer Häufigkeit von ca. 10:100000 auf (Gardner-Medwin 1970).

Haldane (1935) ermittelte für x-chromosomale letale Erbkrankheiten einen theoretischen Wert für die Neumutationsrate von $\frac{1}{3}$. Er stellte jedoch ebenfalls fest, dass sich die Mutationsraten im männlichen Geschlecht von denen im weiblichen Geschlecht unterscheiden (Haldane 1956). Einen weiteren Hinweis auf die unterschiedlichen Mutationsraten in beiden Geschlechtern erbrachte Barbujani et al. (1990). In dessen Arbeit wurde ein signifikant unterschiedliches Ergebnis, zum theoretischen Wert von Haldane, bestimmt. Er ermittelte einen Wert von 0,229 für die Neumutationsrate.

Bei der Duchenneschen Muskeldystrophie kommen mehrere Arten von Mutationen vor. Man unterscheidet zwischen Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen. Die verschiedenen Mutationen treten in beiden Geschlechtern mit unterschiedlichen Häufigkeiten auf (Grimm et al. 1994). Es entstehen ca. 60 % der Punktmutationen in der Spermatogenese und ca. 40 % in der Oogenese. Fast alle Deletionen entstehen in der Oogenese (Krüger 2005). Duplikationen entstehen überwiegend in der Spermatogenese (Kawamura et al. 1997).

1.3 Beckersche Muskeldystrophie

1.3.1 Allgemeines zur Beckerschen Muskeldystrophie

Die Muskeldystrophie Becker (BMD) ist im Gegensatz zu der Duchenneschen Muskeldystrophie eine gutartig verlaufende Form der progressiven Muskeldystrophie. Von Becker und Kiener (1955) wurde die Erbkrankheit zum ersten Mal beschrieben. Die Inzidenz der männlichen Erkrankten beträgt ca. 14:100000 (Emery 1991). Es besteht Allelie zur Muskeldystrophie Duchenne (Koenig et al. 1987; Koenig and Kunkel 1990; Monaco et al. 1986). Die zur Krankheit führenden Mutationen befinden sich ebenfalls im Dystrophin-Gen.

Durch die Mutationen kommt es allerdings nicht zu einem kompletten Fehlen des Dystrophin Proteins, wie es bei der DMD der Fall ist. (Anthony et al. 2011; Koenig et al. 1989; Monaco et al. 1988). Es bleibt je nach Art der Mutation ein Protein mit einer gewissen Restfunktion erhalten.

1.3.2 Klinik der Beckerschen Muskeldystrophie

Das Erkrankungsalter liegt zwischen dem 2. und 36. Lebensjahr. Wie auch bei der DMD beginnt die Krankheit mit dystrophischen Prozessen am Beckengürtel und an den Oberschenkeln. Die Progression der Erkrankung ist allerdings um einiges langsamer und schleicher als bei der DMD. Eine Pseudohypertrophie der Waden kann ebenfalls regelmäßig beobachtet werden (Becker and Kiener 1955). Die Gehfähigkeit, der erkrankten Männer, kann noch 25 bis 30 Jahre nach dem Beginn erster Symptome erhalten sein (Bushby and Gardner-Medwin 1993). Einige wenige Patienten sind während ihres Lebens nie auf einen Rollstuhl angewiesen (Emery and Skinner 1976). Die Lebenserwartung ist höher als es bei der Duchenneschen Muskeldystrophie der Fall ist. Durchschnittlich werden die Patienten 42 Jahre alt (Emery and Skinner 1976). Durch moderne therapeutische Möglichkeiten dürfte es ähnlich wie bei der Muskeldystrophie Duchenne, zu einer Erhöhung der mittleren Lebenserwartung gekommen sein, die deutlich über den alten Werten liegt. Wie bei der DMD kann es im Verlauf der Erkrankung zu einer Beteiligung des Herzmuskels kommen (Nigro et al. 1995).

Die Patienten können Kinder bekommen. Allerdings ist die Fortpflanzungsfähigkeit der Erkrankten, im Vergleich mit der Normalbevölkerung geringer. Die Fertilitätsrate liegt bei ca. 0,7 (Bushby and Gardner-Medwin 1993). Aus dieser Tatsache heraus ergibt sich ein völlig anderes genetisches Modell, das für Beratung von Betroffenen und deren Angehörigen, verwendet wird.

Alle weiblichen Nachkommen, mit an BMD erkrankten Vätern, sind obligate Carrier. Alle männlichen Nachkommen sind nicht von der Krankheit betroffen. Konduktorinnen sind in der Regel klinisch unauffällig. Eine erhöhte Creatin-Kinase Aktivität im Serum kann jedoch einen Hinweis darauf geben, dass es

sich um eine Überträgerin handelt (Skinner and Emery 1974; Zatz et al. 1991; Zatz and Otto 1980).

1.3.3 Molekulargenetik der Beckerschen Muskeldystrophie

Die Leserasterhypothese von Monaco et al. (1988), die im Kapitel 1.2.3 erwähnt wird, lässt sich auch auf die BMD anwenden. Durch in-frame-Mutationen ist das Leseraster verschoben. Dadurch kommt es nicht zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese. Es wird ein Protein mit einem verringerten Molekulargewicht synthetisiert, welches durch die Zelle nicht vorzeitig abgebaut wird (Hoffman and Kunkel 1989). Die großen Schwankungen in der klinischen Ausprägung der Beckerschen Muskeldystrophie lassen sich wohl dadurch erklären, dass je nach Art der Mutation, ein in seiner Funktion unterschiedlich stark eingeschränktes Restprotein gebildet wird (Bushby and Gardner-Medwin 1993). Bei den Mutationen im Dystrophin-Gen handelt es sich um Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen.

1.4 Creatin-Kinase Wert

1.4.1 Allgemeines zum Creatin-Kinase Wert

Die Creatin-Kinase (= CK, Synonyme: Creatin-Phospho-Kinase = CPK; Serum Creatin-Kinase = SCK) ist primär ein intrazelluläres Enzym, das in allen Geweben unterschiedlich stark exprimiert wird. Dieses Enzym ist ein Homo- oder Heterodimer. Es setzt sich aus den unterschiedlichen Untereinheiten CK-M (Muskel), CK-B (*engl.* Brain) und CK-Mi (Mitochondrium) zusammen. Durch die Kombination aus zwei Untereinheiten sind verschiedene Isoformen des Enzyms möglich. Reine Isoformen sind CK-MM, CK-BB und CK-MiMi.

CK-MB ist ein Heterodimer (Dawson et al. 1967).

Die verschiedenen Subtypen sind je nach Art des Gewebes in typischen Konzentrationen vorhanden. CK-MM wird vor allem im Muskel exprimiert, CK-MB ist hochspezifisch für den Herzmuskel. Das CK-BB Isoenzym wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Die höchsten Konzentrationen des Enzyms

kommen jedoch im Gehirn vor (Burger et al. 1964; Jockers-Wretou and Pfeleiderer 1975).

Hauptaufgabe der Creatin-Kinase in der Zelle besteht aus der Katalyse folgender Reaktion:

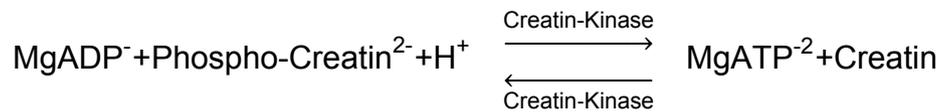


Abbildung 1.1: Reaktionsgleichung Creatin-Kinase nach (Kenyon and Reed 1983)

Dieser Vorgang dient, je nach energetischem Zustand der Zelle, der Speicherung oder der Bereitstellung von Energie. Phospho-Creatin stellt den Energiespeicher dar. Bei Energiebedarf der Zelle entsteht aus Phospho-Creatin Creatin und ATP (Wallimann et al. 1992).

1.4.2 Creatin-Kinase im peripheren Blut

Unter normalen Bedingungen ist im Blutserum in gewissen Mengen die Creatin-Kinase vorhanden. Bei der DMD kommt es im Muskel zum Abbau des kontraktiven Apparats und des Zytoskeletts (Emery 1993). Es entstehen Muskelnekrosen und Membranschäden. Dadurch tritt die primär intrazellulär vorhandene Creatin-Kinase in hohem Maße ins Blut über und lässt sich dort nachweisen (Dreyfus and Schapira 1962).

Im Rahmen von ischämischen (z. B. Myokardinfarkt) und entzündlichen Ereignissen am Herzen wird vor allem CK-MB freigesetzt (Wagner et al. 1973). CK-BB tritt normalerweise nur im Serum auf, wenn eine Störung in der Bluthirnschranke vorliegt, wie z. B. nach einem zerebralen Krampfanfall (Bell et al. 1978).

1.4.3 Bestimmung des CK-Werts zur Bewertung des Überträgerinnenstatus

1962 beschrieb Hughes, dass der CK-Wert zur Erfassung von Überträgerinnen der Muskeldystrophie Duchenne geeignet ist. Das Enzym ist im peripheren Blut nachweisbar und durch venöse Punktion sehr einfach zugänglich. Bei der

Duchenneschen und Beckerschen Muskeldystrophie ist die Serum-Creatin-Kinase, neben anderen im Serum nachweisbaren Enzymen wie Aldolase, Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase, Aspartat-Aminotransferase, Alanin-Aminotransferase, etc., am stärksten erhöht (Richterich et al. 1963).

Um den Überträgerstatus beurteilen zu können, muss man jedoch einige Einflussfaktoren berücksichtigen.

1.4.4 Einflussfaktoren auf den Creatin-Kinase Wert

Der CK-Wert im Serum unterliegt vielen Schwankungen sowie inneren und äußeren Einflussfaktoren. Im Folgenden wird genauer auf Alter, Bewegung, Ethnie, Geschlecht, Hämolyse, hormonelle Einflüsse (Kontrazeptiva und Schwangerschaft), Temperatur und X-Inaktivierung eingegangen.

1.4.4.1 Alter

Zwischen Alter und CK-Wert bestehen bei beiden Geschlechtern verschiedenste Beobachtungen.

Für Frauen existieren folgende Ergebnisse: Im Alter soll der Creatin-Kinase Wert ansteigen (Apacik 1988; Keller 1996). Neuere Studien zeigen für Frauen jedoch keine Altersabhängigkeit (Stromme et al. 2004). Lane et al. (1981) beschrieb einen sehr komplexen Altersverlauf. Im Jugendalter ist der CK-Wert am Höchsten und nimmt ab der Pubertät sprunghaft ab. Bis zur Menopause nimmt der CK-Wert noch geringfügig ab, um danach wieder anzusteigen.

Bei Männern, die an DMD leiden, nimmt man an, dass im Laufe des Lebens die dystrophischen Muskelfasern abgebaut werden. Für die heterozygoten Frauen geht man davon aus, dass es sich um den gleichen Pathomechanismus handelt. Das Resultat ist eine Abnahme des CK-Werts mit zunehmendem Alter (Nicholson et al. 1979; Zatz and Otto 1980).

1.4.4.2 Bewegung

Körperliche, physische Belastung durch Sport, oder andere körperliche Aktivitäten, lässt den CK-Wert ansteigen (Griffiths 1966; Shapiro et al. 1973).

Moderate und geringe körperliche Belastung lässt dagegen den Creatin-Kinase Wert nicht ansteigen (Schneider et al. 1995).

1.4.4.3 Ethnie

Die Volkszugehörigkeit nimmt Einfluss auf den CK-Wert. Bei Menschen mit afrikanischer Abstammung und Lateinamerikanern werden höhere Creatin-Kinase Werte bestimmt als bei Personen mit kaukasischen Vorfahren (Black et al. 1986; Passos-Bueno et al. 1989).

1.4.4.4 Geschlecht

Männer haben einen signifikant erhöhten CK-Wert im Vergleich zu Frauen. Eine Erklärung kann zum einen eine erhöhte Muskelmasse als auch ein anderes Verhältnis zwischen Muskelmasse und Blutvolumen sein (Thomson 1968).

1.4.4.5 Hämolyse

Die durch Hämolyse aus Erythrozyten freigesetzte Adenylatkinase stört den Reaktionsablauf bei der Bestimmung des CK-Werts. Das Resultat sind zu hohe Werte für die Creatin-Kinase (Hughes 1968; Szasz et al. 1976; Frank et al. 1978). Hämolytische Proben wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen.

1.4.4.6 Hormonelle Einflüsse

Bei Frauen werden Menarche, Menstruation, Schwangerschaft und Menopause als Zeitpunkte einer hormonellen Umstellung mit einer Veränderung des CK-Werts in Verbindung gebracht. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva und der natürliche Menstruationszyklus verändern den CK-Wert nicht. (Simpson et al. 1974)

Während der Schwangerschaft wurde sowohl bei obligat heterozygoten als auch bei gesunden Frauen ein signifikanter Abfall des Creatin-Kinase Spiegels beobachtet (Blyth and Hughes 1971). Nach der Menopause kommt es zu einem leichten Anstieg der Creatin-Kinase (Lane and Roses 1981).

1.4.4.7 Temperatur

Die Bestimmung der Serum-Creatin-Kinase kann nach unterschiedlichen Methoden erfolgen. Die Temperatur variiert je nach verwendetem Assay zwischen 25 und 37 °C. Das Verhältnis zwischen Temperatur und CK-Aktivität ist jedoch nicht linear (Rosalki 1967). Für einen Vergleich zwischen den Bestimmungsmethoden müssen Umrechnungsfaktoren bestimmt werden, die auf statistischen Methoden beruhen. Mittelwert (μ) und Standardabweichung (σ) sind wichtige Größen für die Herleitung des Umrechnungsfaktors (Gale and Murphy 1978).

$$y = f(x) = \frac{1}{x * \sigma * \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\log x - \mu}{\sigma}\right)^2}$$

Abbildung 1.2: Umrechnungsformel für unterschiedliche Creatin-Kinase Bestimmungsmethoden nach (Gale and Murphy 1978)

1.4.4.8 X-Inaktivierung

Die X-Inaktivierung spielt wohl bei den weiblichen Carriern eine Rolle. Es konnte allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen verschobener X-Inaktivierung und CK-Wert nachgewiesen werden (Sumita et al. 1998).

1.5 Risikoberechnung

Die nachstehenden Beispielrechnungen enthalten Vereinfachungen und geben die Realität nicht exakt wieder. Anhand dieser Beispiele soll lediglich der Einfluss des CK-Werts auf die humangenetische Beratung von Ratsuchenden potenziellen Konduktorinnen erläutert werden.

Es werden in der Beratung Ratsuchender noch weitere Informationen berücksichtigt, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen wird (Bridge 1994; Grimm et al. 2009; Grimm and Fischer 2011).

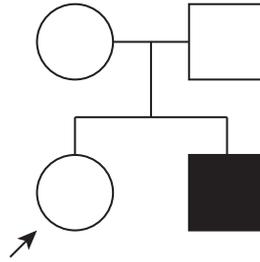


Abbildung 1.3: Stammbaum: Ratsuchende mit betroffenem Bruder, der Bruder leidet an DMD

Es wird nun beispielhaft anhand dieser Familienkonstellation eine Risikoberechnung für die ratsuchende Tochter vorgenommen. Die Berechnungen erfolgen anhand des Stammbaumes und des CK-Werts. Der betroffene Sohn leidet an einer Duchenneschen Muskeldystrophie. Da für die Duchennesche Muskeldystrophie, eine konstante Inzidenz beobachtet wird, kann das Mutations-Selektions-Gleichgewicht von Haldane (1935) angenommen werden. Die Mutationsraten sind in beiden Geschlechtern unterschiedlich (Grimm et al. 1994; Barbujani et al. 1990). Als Vereinfachung wird angenommen, dass die Mutationsraten in beiden Geschlechtern gleich sind $\mu = u = v$ (männliche Mutationsrate = u ; weibliche Mutationsrate = v). Es können nach den mendelschen Gesetzen folgende Annahmen gemacht werden. Die Tochter bekommt von der Mutter zu 50 % ein krankes X-Chromosom ($\frac{1}{2}A$). Ebenfalls kann es auf beiden X-Chromosomen der Mutter zu Neumutationen kommen (2μ). Da an DMD leidende Männer das Fertilitätsalter nicht erreichen, wird von Männern nur ein neu mutiertes X-Chromosom (1μ) vererbt. Für die Kindergeneration ergibt sich dann folgendes Produkt: Konduktorinnen $\frac{1}{2}A + 2\mu$ und für kranke Männer $\frac{1}{2}A + \mu$. Da die Inzidenz der Krankheit gleich bleibt, kann man die Wahrscheinlichkeiten der Elterngeneration für den Konduktorinnenstatus (A) und die Wahrscheinlichkeit ein an DMD erkrankter Mann (B) zu sein, gleich setzen. Folgende Abbildung fasst die Berechnungen zusammen:

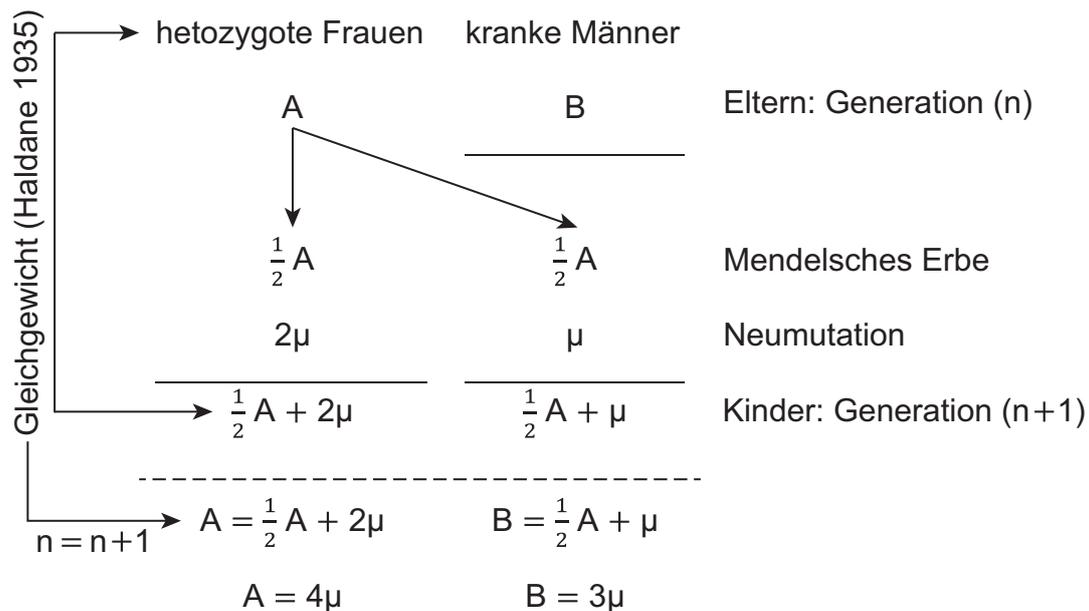


Abbildung 1.4: Mutations-Selektions-Gleichgewicht bei Duchennescher Muskeldystrophie mit Vereinfachung: $\mu = u = v$

Es gilt dann für heterozygote Frauen $A = \frac{1}{2}A + 2\mu \Rightarrow A = 4\mu$ und kranke Männer $B = \frac{1}{2}A + \mu \Rightarrow B = 3\mu$.

Im vorliegenden Beispiel ergeben sich nun verschiedene Konstellationen für Mutter und Tochter. Die nachfolgende Tabelle gibt die möglichen Konstellationen wieder.

		Wahrscheinlichkeit	Carrier	nicht Carrier	
Mutter	a priori		4μ	$1-4\mu \approx 1$	
	ein kranker Sohn	bedingt	0,5	μ	
			Carrier	nicht Carrier	
Tochter	Carrier-Status Mutter	bedingt	0,5	0,5	1
	verbunden		$4\mu * \frac{1}{2} * \frac{1}{2}$	$4\mu * \frac{1}{2} * \frac{1}{2}$	$1 * \mu * 1$
			μ	μ	μ

Tabelle 1.1: Risikoberechnung (DMD) für die Tochter ohne CK-Werte

Das Risiko für die Tochter, dass diese Überträgerin ist, ergibt sich aus den verbundenen Wahrscheinlichkeiten. Die a posteriori Wahrscheinlichkeit für die

Tochter Überträgerin zu sein, errechnet sich aus der Wahrscheinlichkeit Konduktorin zu sein, dividiert durch die Summe der verbundenen Wahrscheinlichkeiten. $\frac{\mu}{\mu+\mu+\mu} = \frac{1}{3}$. Das Risiko, dass die Tochter Carrierin ist, beträgt demnach ca. 33 %.

Durch die Bestimmung des CK-Werts bei Mutter und Tochter können die oben stehenden Wahrscheinlichkeitsrechnungen erweitert werden.

Es wird in der folgenden Beispielrechnung für Mutter und Tochter ein relativ unauffälliger CK-Wert gewählt. Die aus dem CK-Wert bedingte Odds-Ratio sei für Mutter und Tochter $0,2 = \frac{1}{5}$.

Die obige Tabelle wird mit der durch die Odds-Ratio bedingten Wahrscheinlichkeit erweitert.

		Wahrscheinlichkeit	Carrier	nicht Carrier
Mutter	a priori		4μ	$1-4\mu \approx 1$
	CK-Wert Odds-Ratio	bedingt	$\frac{1}{5}$	1
	ein kranker Sohn	bedingt	$\frac{1}{2}$	μ

			Carrier	nicht Carrier	nicht Carrier
Tochter	Carrier-Status Mutter	bedingt	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1
	CK-Wert Odds-Ratio	bedingt	$\frac{1}{5}$	1	1
	Tochter	verbunden	$4\mu * \frac{1}{5} * \frac{1}{2} * \frac{1}{2} * \frac{1}{5}$	$4\mu * \frac{1}{5} * \frac{1}{2} * \frac{1}{2} * 1$	$1 * 1 * \mu * 1 * 1$
			$\frac{1}{25}\mu$	$\frac{1}{5}\mu$	μ

Tabelle 1.2: Risikoberechnung (DMD) für die Tochter mit CK-Werten

Das Risiko für die Tochter, dass diese Carrierin ist, ergibt sich nun aus folgender Rechnung: Die a posteriori Wahrscheinlichkeit Konduktorin zu sein, dividiert durch die Summe der verbundenen Wahrscheinlichkeiten. $\frac{\frac{1}{25}\mu}{\frac{1}{25}\mu + \frac{1}{5}\mu + 1\mu} = \frac{1}{31}$. Das Risiko für die Tochter, dass Sie Überträgerin ist, beträgt also ca. 3,2 %.

2 Material und Methoden

2.1 Auswahlkriterien

Obligate Konduktorinnen wurden entweder per Stammbaum, Haplotypanalyse, MLPA (Multiplex Ligation-dependent-Probe-Amplification) zur Beurteilung von Duplikationen und Deletionen, sowie Punktmutationstests eindeutig als heterozygote Trägerinnen für einen Defekt im Dystrophin Gen identifiziert.

2.1.1 Konduktorinnenidentifikation per Stammbaum

Mögliche Konduktorinnen sind Mütter mit wenigstens einem kranken Sohn, oder einer Tochter die Konduktorin ist. Für sichere Konduktorinnen muss zusätzlich in der mütterlichen Verwandtschaft ein kranker Bruder oder ein kranker männlicher Verwandter höheren Grades betroffen sein.

Ebenfalls obligate Carrier sind Mütter, mit mindestens einem kranken Sohn und deren Schwester mit ebenfalls mindestens einem kranken Sohn.

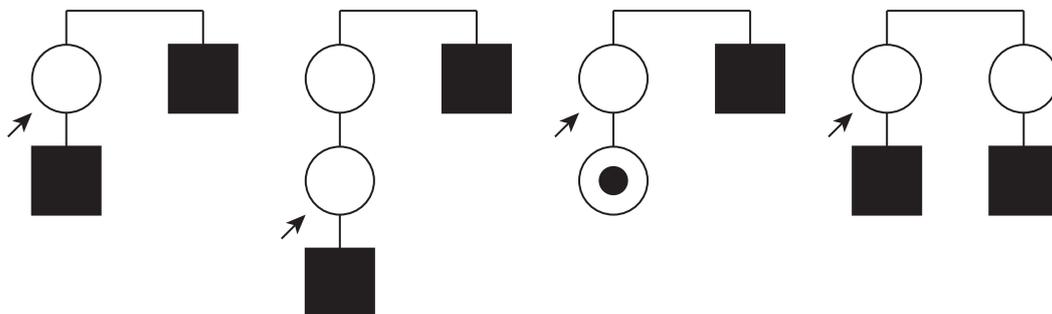


Abbildung 2.1: Stammbaum; verschiedene Konstellationen obligat heterozygoter Frauen

Frauen mit erkrankten Söhnen ohne einen weiteren betroffenen männlichen Verwandten wurden nicht als obligat heterozygot gewertet, da bei diesen Frauen ein Keimzellmosaik vorliegen kann.

Lagen zusätzlich zu den Stammbauminformationen weitere diagnostische Tests vor, wurden die daraus gewinnbaren Ergebnisse der reinen Stammbaumanalyse übergeordnet.

2.1.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe besteht aus Frauen, die im Rahmen einer Diagnostik auf Heterozygotie im Dystrophin-Gen am Institut für Humangenetik untersucht wurden und bei ihnen mittels Haplotypenanalyse, Punktmutations-, Deletionsscreening eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass kein Heterozygotenstatus vorliegt. Ebenfalls wurden alle Frauen von der Auswertung ausgeschlossen, bei denen der Verdacht bestand, dass sie an einer anderen Muskelerkrankung leiden, oder Überträgerinnen für diese sind.

2.1.3 Schwangerschaft

Mehrere Autoren (Blyth and Hughes 1971; Bunday et al. 1979; Emery and King 1971; King et al. 1972; Zatz et al. 1983) beobachteten, dass während der Schwangerschaft, sowohl bei den Heterozygoten als auch bei gesunden Frauen, signifikant niedrige Serum-Creatin-Kinase Werte vorliegen. Es werden in dieser Arbeit die Gruppen der schwangeren Frauen separat ausgewertet. Erfolgte die Bestimmung des CK-Wertes einer Frau bei bestehender Schwangerschaft, wurde dies auf den Laborzetteln dokumentiert. Das Untersuchungsdatum für eine Chorionzottenbiopsie wurde mit dem Bestimmungsdatum des CK-Werts verglichen. Um für die Gruppe der obligat schwangeren Konduktorinnen den Schwangerschaftsstatus eindeutig festzulegen.

2.1.4 Alter

Es ist bekannt, dass bei Frauen vor der Menarche erhöhte Serum-Creatin-Kinase Werte vorliegen, deshalb wurden Frauen unter 16 Jahren ebenfalls separat ausgewertet (Lane and Roses 1981).

2.2 Serum-Creatin-Kinase Bestimmung

Die Bestimmung der Serum-Creatin-Kinase erfolgte durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg.

Alle Werte wurden nach der Analysemethodik ermittelt, die gemäß der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) empfohlen wird (Schumann et al. 2002). Es wurden Reagenzien und Analysegeräte, COBAS INTEGRA, der Firma Roche verwendet.

Oliver beschrieb 1955 diese Bestimmungsmethode mit Creatinphosphat und ADP zum ersten Mal. Im Jahr 1967 wurde sie von Rosalki modifiziert.

Die Bestimmung erfolgte bei 37 °C mit einer Wellenlänge von 340 nm.

Reaktionsgleichung:

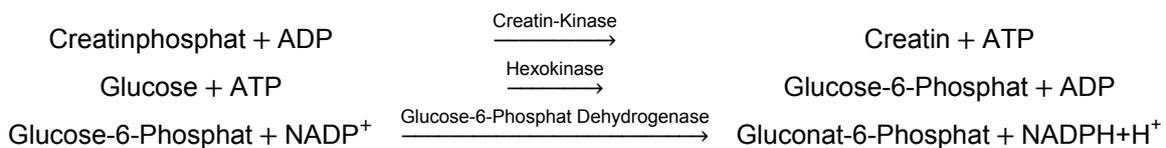


Abbildung 2.2: Reaktionsgleichung: Bestimmung der Serum-Creatin-Kinase Aktivität modifiziert nach (Schumann et al. 2002).

Das Vorgehen, für Frauen, bei denen mehrmals CK-Werte bestimmt wurden, stellt sich wie folgt dar: Zuerst erfolgte die Zuteilung zu den 3 Hauptgruppen: heterozygot DMD, heterozygot BMD und Kontrollen. Dann erfolgte die weitere Einteilung in Subgruppen nach folgenden Kriterien: schwanger, nicht schwanger, jünger als 16 Jahre. Falls nun für eine Frau in den einzelnen Subgruppen mehrere Werte vorlagen, wurde das arithmetische Mittel aus den vorhandenen Werten gebildet.

Die Ergebnisse von hämolytischen Proben fanden keine Berücksichtigung (Hughes 1968; Szasz et al. 1976; Frank et al. 1978).

Die CK-Werte wurden logarithmiert, um einer Normalverteilung zu entsprechen (Gale and Murphy 1978; Wilson et al. 1965; Perry and Fraser 1973; Emery 1965; Gardner-Medwin et al. 1971; Wiesmann et al. 1966).

2.3 Datengewinnung / Datenquellen

Die Daten zu den Creatin-Kinase Werten stammen aus dem Institut für Humangenetik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Das Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg führte die Bestimmung der CK-Werte

durch. Alle relevanten Daten wurden aus der PLIGU-Patienten-Datenbank abgefragt. Es erfolgte eine Prüfung auf Vollständigkeit und Richtigkeit anhand der zugehörigen Patientenakten.

Es liegen insgesamt 808 CK-Werte vor. Die Gesamtzahl der sicheren Konduktorinnen besteht aus 387 Frauen, davon sind 44 von obligaten Carriern unter 16 Jahre alt. Von diesen sind 32 heterozygot für DMD (O<16 DMD) und 12 heterozygot für BMD (O<16 BMD). 55 Werte sind von obligaten schwangeren Konduktorinnen, darunter sind 46 Werte von DMD Carriern (OS DMD) und 9 von BMD Frauen (OS BMD). 288 Daten stammen von obligaten nicht schwangeren Konduktorinnen. Davon entfallen 210 Werte auf die Gruppe der DMD-Frauen (ONS DMD) und 78 auf die BMD Trägerinnen (ONS BMD). Die Kontrollgruppe besteht insgesamt aus 421 Frauen. Es entfallen 28 CK-Werte auf Frauen, die jünger als 16 Jahre alt sind (K<16). 90 Daten entfallen auf die Kontrollgruppe der schwangeren Frauen (KS) und 303 CK-Werte stammen von Frauen, die nicht schwanger sind (KNS).

Verarbeitete Fälle	
Gruppe	Anzahl der Fälle (<i>n</i>)
O<16 DMD	32
O<16 BMD	12
K<16	28
OS DMD	46
OS BMD	9
KS	90
ONS DMD	210
ONS BMD	78
KNS	303
Gesamt	808

Tabelle 2.1: Übersicht der Fallzahlen in den einzelnen Gruppen

3 Ergebnisse

Die statistische Auswertung wurde mittels Excel 2010, PASW Statistics 18 und G*Power 3 (Faul et al. 2007) durchgeführt.

3.1 Beschreibende Statistik: Lage- und Streuungsmaße

3.1.1 Alter

In den unterschiedlichen Gruppen der Konduktorinnen und den Kontrollen wurden folgende Maßzahlen für das Alter ermittelt:

Abschließend folgt die grafische Darstellung der Altersverteilung in den einzelnen Gruppen als Boxplot mit Median, 5 % und 95 % Konfidenzintervall für alle Gruppen.

Alter			
Maßzahlen	Gruppen jünger als 16 Jahre		
	O<16 DMD	O<16 BMD	K<16
Anzahl	32	12	28
Mittelwert	8,78	7,58	10,86
Median	8,50	6,50	12,50
Standardabweichung	4,27	4,03	4,15
Minimum	1	1	3
Maximum	15	14	15
Spannweite	14	13	12

Tabelle 3.1: statistische Kennzahlen der Altersverteilung in den Gruppen der <16 Jahre alten Frauen

Alter			
Maßzahlen	Gruppen schwanger		
	OS DMD	OS BMD	KS
Anzahl	46	9	90
Mittelwert	28,57	29,22	28,58
Median	27,50	29,00	28,00
Standardabweichung	7,37	7,89	6,51
Minimum	16	16	15
Maximum	43	40	42
Spannweite	27	24	27

Tabelle 3.2: statistische Kennzahlen der Altersverteilung in den Gruppen der schwangeren Frauen

Alter			
Maßzahlen	Gruppen nicht schwanger		
	ONS DMD	ONS BMD	KNS
Anzahl	210	78	303
Mittelwert	40,19	36,44	37,44
Median	37,00	34,50	33,00
Standardabweichung	16,60	14,64	15,46
Minimum	16	16	16
Maximum	85	84	84
Spannweite	69	68	68

Tabelle 3.3: statistische Kennzahlen der Altersverteilung in den Gruppen der nicht schwangeren Frauen

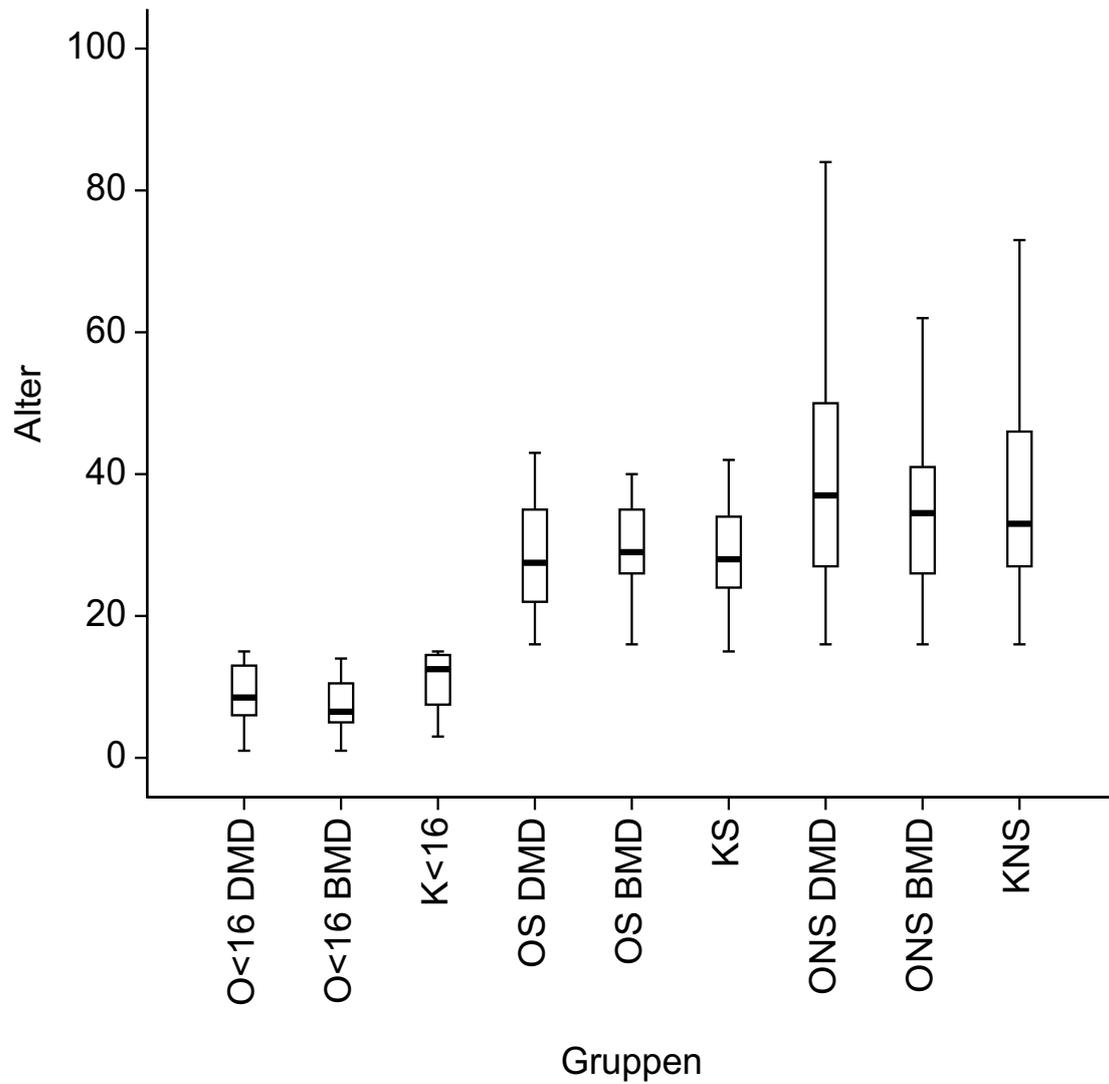


Abbildung 3.1: Boxplot Alter mit Median, 5 % und 95 % Konfidenzintervall für alle Gruppen

3.1.2 CK-Werte

In den unterschiedlichen Gruppen der Konduktorinnen und den Kontrollen wurden folgende Maßzahlen für die Creatin-Kinase Werte ermittelt.

Abschließend folgt die grafische Darstellung der $\log(\text{CK-Werte})$ als Boxplot mit Median, 5 % und 95 % Konfidenzintervall für alle Gruppen.

log(CK-Wert)			
Maßzahlen	Gruppen jünger als 16 Jahre		
	O<16 DMD	O<16 BMD	K<16
Anzahl	32	12	28
Mittelwert	3,1160	2,8273	2,0349
Median	3,1512	2,8215	2,0606
Standardabweichung	0,5548	0,6008	0,2273
Minimum	1,5798	1,7924	1,6335
Maximum	4,0763	3,9604	2,4232
Spannweite	2,4965	2,1680	0,7898

Tabelle 3.4: statistische Kennzahlen für die $\log(\text{CK-Werte})$ in den Gruppen der <16 Jahre alten Frauen

log(CK-Wert)			
Maßzahlen	Gruppen schwanger		
	OS DMD	OS BMD	KS
Anzahl	46	9	90
Mittelwert	2,2777	2,0810	1,8469
Median	2,3020	1,9868	1,8603
Standardabweichung	0,4035	0,3431	0,1794
Minimum	1,4150	1,6812	1,3324
Maximum	3,3056	2,7419	2,2730
Spannweite	1,8906	1,0607	0,9406

Tabelle 3.5: statistische Kennzahlen für die $\log(\text{CK-Werte})$ in den Gruppen der schwangeren Frauen

log(CK-Wert)			
Maßzahlen	Gruppen nicht schwanger		
	ONS DMD	ONS BMD	KNS
Anzahl	210	78	303
Mittelwert	2,4556	2,3199	1,9597
Median	2,3865	2,2175	1,9542
Standardabweichung	0,4316	0,4108	0,2075
Minimum	1,3617	1,5911	0,7782
Maximum	3,7913	3,4936	2,5966
Spannweite	2,4295	1,9025	1,8184

Tabelle 3.6: statistische Kennzahlen für die log (CK-Werte) in den Gruppen der nicht schwangeren Frauen

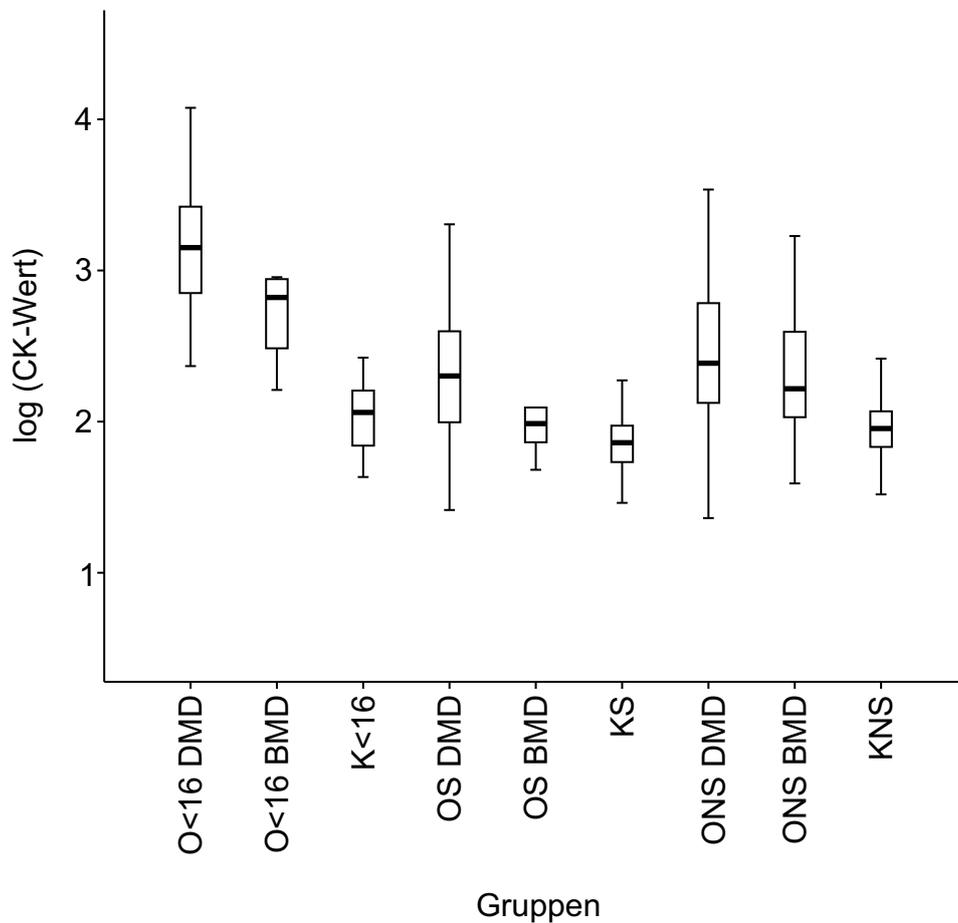


Abbildung 3.2: Boxplot log(CK-Werte) mit Median, 5 % und 95 % Konfidenzintervall für alle Gruppen

3.2 Kolmogorov-Smirnov Test, Prüfung auf Normalverteilung

Es wurde für alle Gruppen geprüft, ob eine Normalverteilung der Daten vorliegt. Eine Normalverteilung kann nicht abgelehnt werden, wenn der p-Value für die asymptotische Signifikanz $p > 0,05$ ist. Es ergaben sich folgende p-Values für die Gruppen: O<16 DMD $p = 0,506$, O<16 BMD $p = 0,448$, K<16 $p = 0,945$, OS DMD $p = 0,588$, OS BMD $p = 0,561$, KS $p = 0,809$, ONS DMD $p = 0,085$, ONS BMD $p = 0,151$, KNS $p = 0,363$.

Daraus ergibt sich, dass für alle Gruppen eine Normalverteilung angenommen werden kann.

3.3 Verschiedenheit der Subgruppen, t-Test nach Student oder Welch-Test

Der t-Test oder der Welch-Test darf verwendet werden, da für alle Gruppen gezeigt werden konnte, dass die Daten normalverteilt sind.

Mit dem Levene-Test wurde im Vergleich der einzelnen Subgruppen getestet, ob eine Gleichheit der Varianzen vorlag. Bei einem p-Value mit $\alpha < 0,05$ wurde die Varianzgleichheit verworfen und der Welch-Test anstelle des t-Tests verwendet.

Mit dem t-Test nach Student, bei Varianzenhomogenität, oder dem Welch-Test, bei Varianzenheterogenität, wurden die voneinander unabhängigen Gruppen verglichen, ob signifikante Unterschiede zwischen ihnen bestehen.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

	Vergleich zwischen		T-Wert	p-Value
log(CK-Wert)	O<16 DMD	K<16	10,097	0,001*
	O<16 BMD	K<16	4,434	0,001*
	OS DMD	KS	6,901	0,001*
	OS BMD	KS	2,019	0,076
	ONS DMD	KNS	15,460	0,001*
	ONS BMD	KNS	7,501	0,001*
	OS DMD	ONS DMD	-2,562°	0,011*
	OS BMD	ONS BMD	-1,676°	0,097
	KS	KNS	-4,660°	0,001*
Alter	O<16 DMD	K<16	-1,903°	0,062
	O<16 BMD	K<16	-2,304°	0,027*
	OS DMD	KS	-0,010°	0,992
	OS BMD	KS	0,278°	0,782
	ONS DMD	KNS	1,919°	0,055
	ONS BMD	KNS	-0,516°	0,606
	OS DMD	ONS DMD	-7,361	0,001*
	OS BMD	ONS BMD	-1,449°	0,151
	KS	KNS	-7,895	0,001*

Tabelle 3.7: t-Test nach Student oder Welch-Test für sinnvolle Gruppenpaare;
 Zeichenerklärung: *: signifikantes Ergebnis, °: t-Test nach Student

Eine Unterscheidung zwischen der Gruppe der schwangeren BMD Carrierinnen (OS BMD) mit der Kontrollgruppe für schwangere (KS), kann bezüglich ihrer log(CK-Wert) Verteilung nicht vorgenommen werden. Der p-Value beträgt 0,076 und ist damit größer als $\alpha = 0,05$. Die Hypothese, dass sich die beiden Gruppen bezüglich ihres log(CK-Wert) unterscheiden, muss abgelehnt werden. Somit lässt sich kein Referenzwert für diese Gruppe erstellen. Ebenfalls wird diese Gruppenkonstellation bei der Odds Ratio Berechnung nicht berücksichtigt. In dieser Untersuchung ist aufgrund der kleinen Gruppengröße ($n = 9$) für die Gruppe OS BMD keine aussagekräftige Datengrundlage gegeben. Falls es in zukünftigen Untersuchungen gelingt, die Anzahl der

Gruppenmitglieder zu erhöhen, kann gehofft werden, dass es möglich sein wird, für diese Gruppe genaue Aussagen zu treffen.

Ebenfalls lässt sich für Frauen, die heterozygot für die Beckersche Muskeldystrophie sind, keine Unterscheidung zwischen den schwangeren und nicht schwangeren aufgrund ihrer $\log(\text{CK-Wert})$ Verteilung vornehmen. Eine klinische Bedeutung ist dieser Tatsache nicht beizumessen, da aufgrund der Verfügbarkeit von Anamnese und von sensitiven Schwangerschaftstests, eine Unterscheidung auf Basis des CK-Werts nicht vorgenommen werden muss. Alle anderen Gruppen unterscheiden sich bezüglich ihres logarithmierten CK-Werts signifikant voneinander.

Um zu prüfen, wie hoch der Abfall der Serum-Creatin-Kinase während einer Schwangerschaft ist, wurde ein Vergleich zwischen der Gruppe KS und KNS sowie der Gruppe OS DMD und ONS DMD notwendig.

Allerdings unterscheiden sich die Altersverteilungen der Gruppen signifikant voneinander. Um eine Angleichung in der Altersverteilung zu erzielen, wurden die CK-Werte von Frauen, die sich nicht mehr im gebärfähigen Alter befinden, aus diesem Vergleich herausgenommen. Das Ausschlussalter wurde auf 45 Jahre festgelegt.

Es ergeben sich folgende neue p-Values für die $\log(\text{CK-Wert})$ Verteilung:

	Vergleich zwischen		T-Wert	p-Value
log(CK-Wert)	OS DMD	KS	6,901	0,001*
	ONS DMD	KNS	13,756	0,001*
	OS DMD	ONS DMD	-2,662°	0,008*
	KS	KNS	-4,276°	0,001*

Tabelle 3.8: altersadjustierter t-Test für die Gruppen OS DMD, ONS DMD, KS und KNS
 Zeichenerklärung: *: signifikantes Ergebnis, °: t-Test nach Student

Auch nach der Anpassung des Alters unterscheiden sich die Gruppen in ihrer $\log(\text{CK-Wert})$ Verteilung signifikant voneinander.

3.4 Analyse des β -Fehlers und der Power

Es wurde für alle Gruppen, die sich signifikant in ihren logarithmierten Creatin-Kinase Werten unterschieden, die zugehörige Power ermittelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf $\alpha = 5\%$ festgelegt.

	Vergleich zwischen		Effektstärke d	Power (1- β)
log(CK-Wert)	O<16 DMD	K<16	2,550	1,00
	O<16 BMD	K<16	1,744	1,00
	OS DMD	KS	1,380	1,00
	ONS DMD	KNS	1,465	1,00
	ONS BMD	KNS	1,107	1,00
	OS DMD	ONS DMD	-0,426	0,83
	KS	KNS	-0,581	1,00

Tabelle 3.9: Übersicht über die Power der Gruppenpaarungen, die sich signifikant in ihrem log(CK) unterscheiden.

Die Power ist für alle Vergleiche $> 80\%$. Die Wahrscheinlichkeit, dass die richtige Alternativhypothese, in diesem Fall: Die Gruppen unterscheiden sich in ihren logarithmierten CK-Werten voneinander, mit hinreichend großer Genauigkeit angenommen werden kann.

3.5 Ideale Gruppengröße für die Gruppe OS BMD

Die Gruppenvergleiche OS BMD mit KS und OS BMD mit ONS BMD erreichten nicht das angestrebte Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$. Als Grund für das Verfehlen des Signifikanzniveaus kann die Gruppengröße der schwangeren Frauen, die Überträgerinnen für die Beckersche Muskeldystrophie sind, identifiziert werden. Mit einem Umfang von nur neun Frauen ist die Gruppe deutlich zu klein. Damit in zukünftigen Untersuchungen signifikante Ergebnisse erreicht werden können, wurde für die Gruppe OS BMD die benötigte Gruppengröße errechnet. Die Berechnungen basieren auf den hier ermittelten

Mittelwerten und Standardabweichungen. Der β -Fehler wurde auf 10 % festgesetzt. Somit beträgt die Power 90 %. Die Gruppengrößen für die Gruppen KS ($n = 90$) und ONS BMD ($n = 78$) wurde beibehalten.

Somit sollte je nach Fragestellung der folgende Gruppenumfang nicht unterschritten werden:

Vergleich zwischen			Effektstärke d	Benötigtes n für OS BMD
log(CK-Wert)	OS BMD	KS	0,855	14
	OS BMD	ONS BMD	-0,631	30

Tabelle 3.10: ideale Gruppengröße für die Gruppe OS BMD

3.6 Alterskorrelation

Es wurde für alle Gruppen O<16 DMD, O<16 BMD, K<16, OS DMD, OS BMD, KS, ONS DMD, ONS BMD, KNS, mittels Korrelationstest nach Pearson geprüft, ob eine Korrelation zwischen dem Alter und dem CK-Wert besteht.

Gruppe	Korrelation nach Pearson	Signifikanz
O<16 DMD	-0,108	0,277
O<16 BMD	-0,496	0,051
K<16	-0,003	0,495
OS DMD	-0,102	0,249
OS BMD	-0,060	0,439
KS	-0,140	0,094
ONS DMD	-0,130	0,030*
ONS BMD	-0,047	0,341
KNS	0,077	0,091

Tabelle 3.11: Alterskorrelation nach Pearson Übersicht über die Signifikanzen
 Zeichenerklärung: *: signifikantes Ergebnis

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und CK-Wert besteht für die Gruppe der obligat nicht schwangeren DMD-Konduktorinnen (ONS DMD) $p = 0,02994$ für $\alpha \leq 0,05$.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt: $r = -0.13007$.

Für alle anderen Gruppen ließ sich keine Signifikanz auf dem $\alpha \leq 0,05$ Niveau zeigen.

Außerdem wurde für alle Gruppen eine grafische Darstellung angefertigt. In dieser wurde dem Alter einer jeden Frau der jeweilige CK-Wert zugeordnet. Für die Gruppen der unter 16 Jahre alten Teilnehmerinnen ergab sich, dass diese Gruppen sehr heterogen in ihrer Altersverteilung sind. Es lässt sich folgende grobe Tendenz feststellen: In allen Gruppen, mit unter 16 Jahre alten Frauen, ist der CK-Wert umso höher, je jünger die Frau zum Zeitpunkt der Bestimmung war. Diese grobe Tendenz lässt sich jedoch statistisch nicht beweisen. Es wurde aufgrund der optisch sehr inhomogenen wirkenden Datenverteilung auf eine weitere Auswertung für die folgernden Gruppen verzichtet: O<16 DMD, O<16 BMD, K<16.

3.7 Berechnung der Regressionsgleichung

Da sich für die Gruppe ONS DMD zeigen lies, dass eine Korrelation zwischen Alter und log (CK-Wert) vorliegt, lässt sich nun für diese Gruppe eine lineare Regressionsgerade konstruieren. Das Alter ist die unabhängige Variable und der log (CK) die abhängige Variable.

Allgemein gilt für eine lineare Regressionsgerade:

$$y = f(x) = a + b * x \quad (3.1)$$

Es ergeben sich für die lineare Regressionsgerade folgende Koeffizienten:

Der Ordinatenabschnitt beträgt $a = 2,59152$ und der Regressionskoeffizient beträgt $b = -0,00338$. Es lässt sich also folgende Gleichung aufstellen:

$$y = f(x) = 2,59152 + (-0,00338 * x) \quad (3.2)$$

mit $y \dots \log(\text{CK})$ und $x \dots \text{Alter}$

Grafisch stellt sich die Regressionsgerade wie folgt dar:

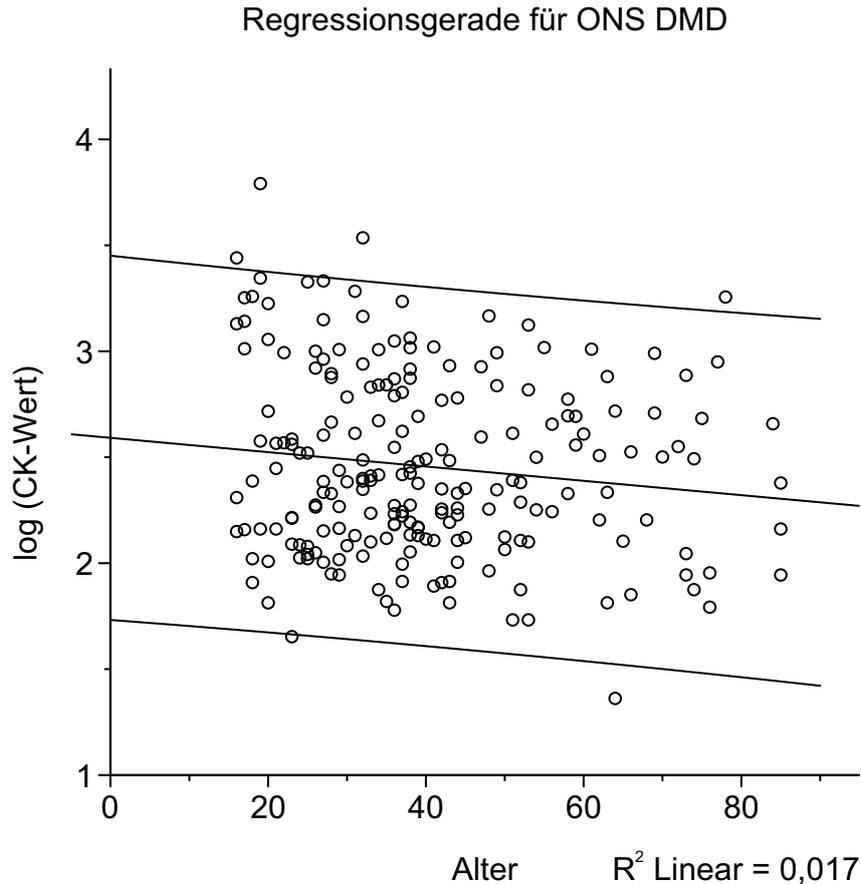


Abbildung 3.3: Regressionsgerade mit 95 % Konfidenzintervall für die Gruppe der heterozygoten DMD-Frauen; Darstellung der Altersabhängigkeit

3.8 Alterskorrektur

Für die Gruppe obligater Konduktorinnen DMD, nicht schwanger, wurde festgestellt, dass es mit zunehmendem Alter zu einer signifikanten Abnahme der CK-Werte kommt (Kapitel 3.6). Es konnte folgende lineare Regressionsgerade bestimmt werden (Kapitel 3.7):

$$y = f(x) = 2,59152 + (-0,00338 * x) \quad (3.2)$$

mit y ... $\log(\text{CK})$ und x ... Alter

Diese Gleichung wird bei der Berechnung der Odds Ratio berücksichtigt, um eine exaktere Aussage bezüglich der Wahrscheinlichkeit zu erreichen, ob eine

Frau in Bezug auf ihren CK-Wert eher als Konduktorin oder als homozygot gesunde Frau einzuordnen ist.

3.9 Odds Ratio

Die Berechnung der Odds Ratio dient dazu die relative Wahrscheinlichkeit einer Frau zu errechnen, welcher Gruppe aus einer Grundgesamtheit sie zugehört. Die Bestimmung der Odds Ratio ist somit Grundlage für jede Risikoberechnung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Gruppen ONS DMD, ONS BMD und KNS, sowie OS DMD und KS signifikant bezüglich der Verteilung des logarithmierten CK-Werts unterscheiden. Es ist somit epidemiologisch möglich, aus den erhobenen Daten, Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit vorzunehmen und Wahrscheinlichkeiten, die für die Beratung von Frauen in DMD oder BMD Familien relevant sind, zu berechnen.

Grafische Darstellung der Odds Ratio:

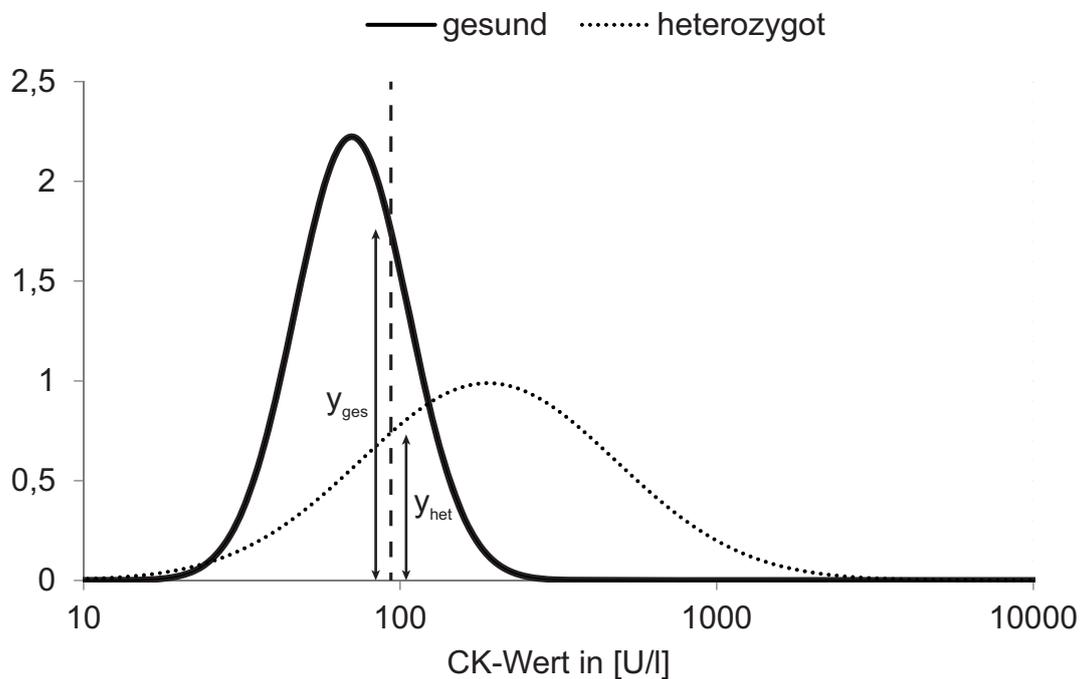


Abbildung 3.4: grafische Darstellung der Odds Ratio

Die Odds Ratio ist der Quotient aus der Wahrscheinlichkeit Überträgerin, heterozygot (y_{het}) zu sein, dividiert durch die Wahrscheinlichkeit nicht Trägerin also gesund (y_{ges}) zu sein:

$$\text{Odds Ratio} = \frac{y_{het}}{y_{ges}} \quad (3.3)$$

Die Wahrscheinlichkeiten für y_{het} und y_{ges} lassen sich aus den Normalverteilungskurven berechnen. Die Normalverteilung ist durch folgende Gleichung definiert:

$$y = f(x) = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu}{\sigma} \right)^2} \quad (3.4)$$

mit μ ... Mittelwert und σ ... Standardabweichung

Aus den Gleichungen (3.3) und (3.4) ergibt sich:

$$\text{Odds Ratio} = \frac{y_{het}}{y_{ges}} = \frac{\frac{1}{\sigma_{het} \cdot \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu_{het}}{\sigma_{het}} \right)^2}}{\frac{1}{\sigma_{ges} \cdot \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu_{ges}}{\sigma_{ges}} \right)^2}} \quad (3.5)$$

mit x ... $\log(\text{CK})$

oder:

$$\text{Odds Ratio} = \frac{y_{het}}{y_{ges}} = \frac{\frac{1}{\sigma_{het} \cdot \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\log(x)-\mu_{het}}{\sigma_{het}} \right)^2}}{\frac{1}{\sigma_{ges} \cdot \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\log(x)-\mu_{ges}}{\sigma_{ges}} \right)^2}} \quad (3.6)$$

mit x ... CK-Wert

Es lassen sich die oben erläuterten Formeln grafisch als zwei Normalverteilungen darstellen. Der Quotient der beiden Normalverteilungen, die Odds Ratio, ist grafisch eine Parabel. Für die Risikoabschätzung sind allerdings nur Werte von Interesse, die sich rechts vom Hoch- oder Tiefpunkt befinden. Dies wurde in den folgenden grafischen Darstellungen berücksichtigt.

3.9.1 Normalverteilung und Odds Ratio für nicht schwangere Frauen für die Risikoabschätzung bei BMD

Für die Gruppen KNS und ONS BMD sind: $\sigma_{het} = \sigma_{ONS\ BMD} = 0,4108$; $\mu_{het} = \mu_{ONS\ BMD} = 2,3199$; $\sigma_{ges} = \sigma_{KNS} = 0,2075$; $\mu_{ges} = \mu_{KNS} = 1,9597$:

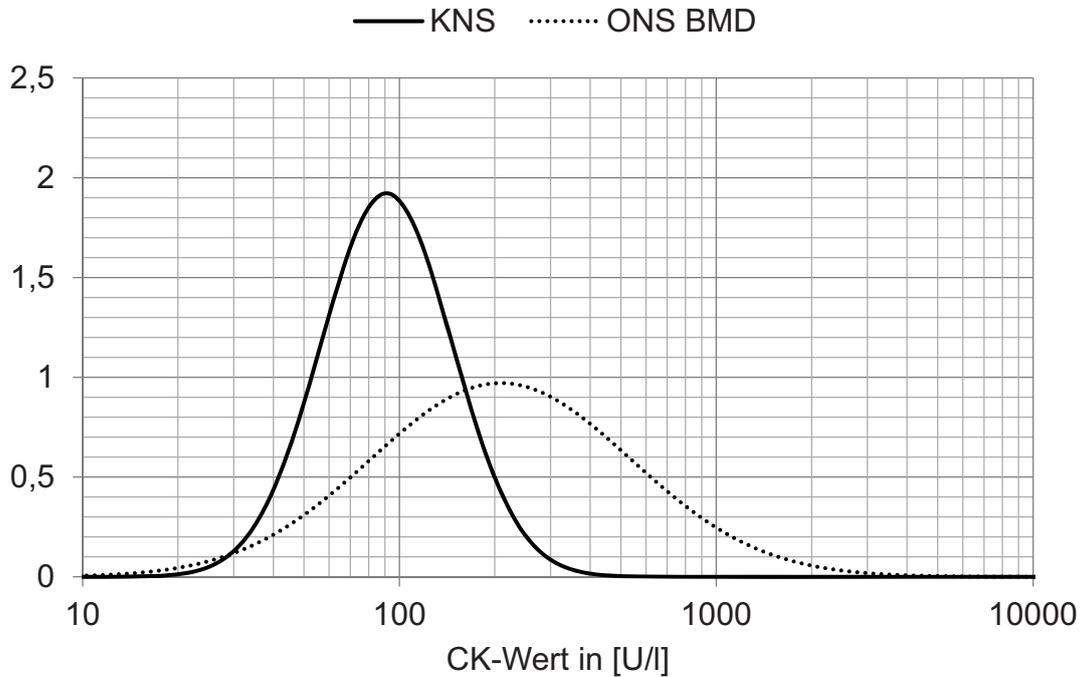


Abbildung 3.5: Normalverteilungen für nicht schwangere Frauen, Kontrollen und BMD Carrier

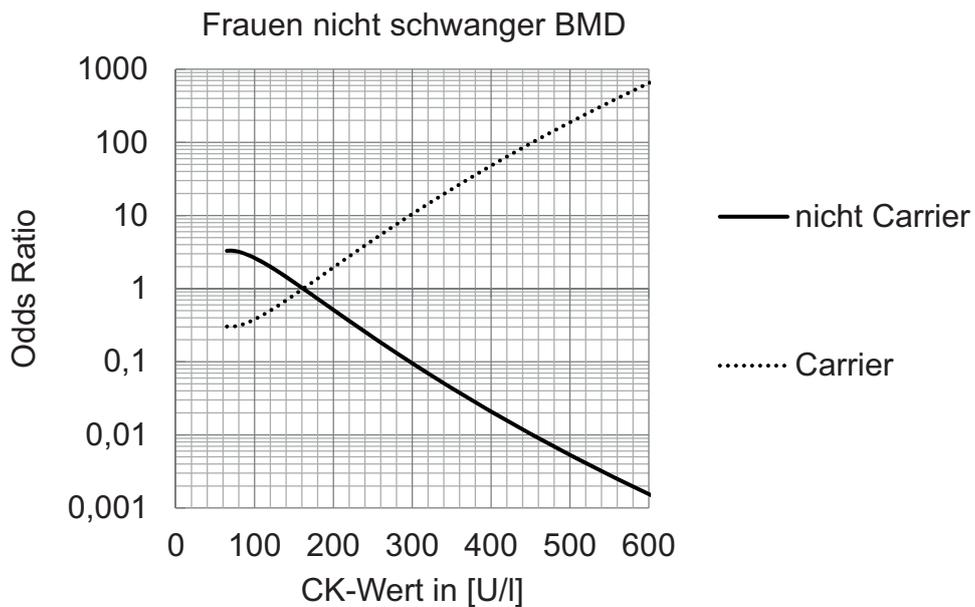


Abbildung 3.6: Odds Ratio für nicht schwangere Frauen; Kontrollen und BMD Trägerinnen

3.9.2 Normalverteilung und Odds Ratio für schwangere Frauen für die Risikoabschätzung bei DMD

Für die Gruppen KS und OS DMD sind: $\sigma_{het} = \sigma_{OS\ DMD} = 0,4035$; $\mu_{het} = \mu_{OS\ DMD} = 2,2777$; $\sigma_{ges} = \sigma_{KS} = 0,1794$; $\mu_{ges} = \mu_{KS} = 1,8469$:

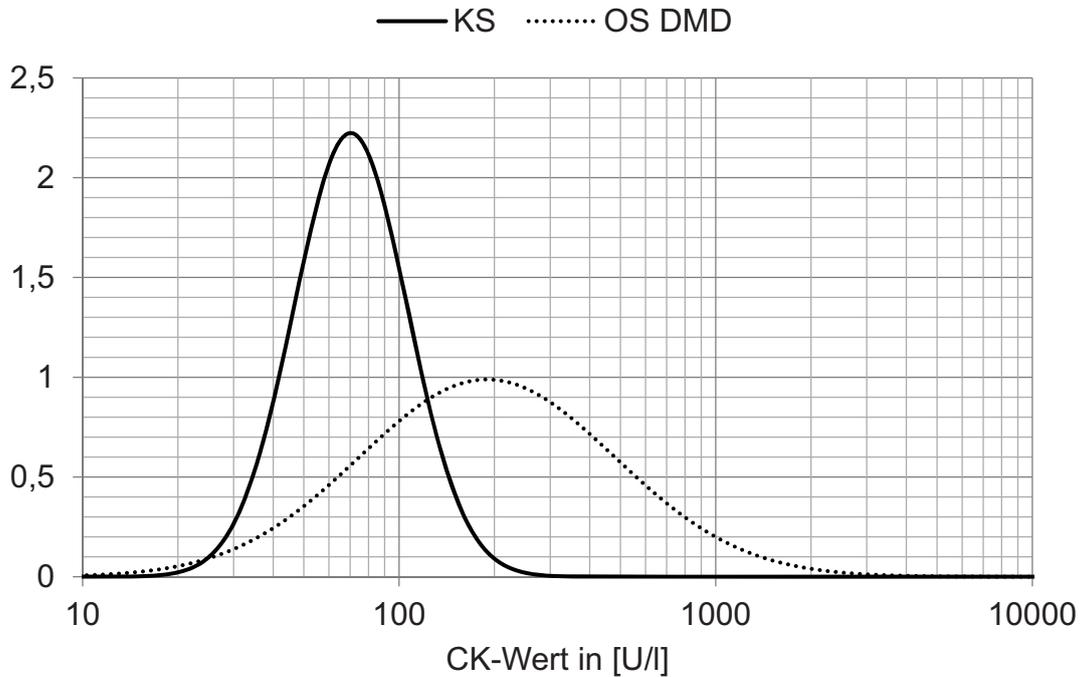


Abbildung 3.7: Normalverteilungen für schwangere Frauen, Kontrollen und DMD Trägerinnen

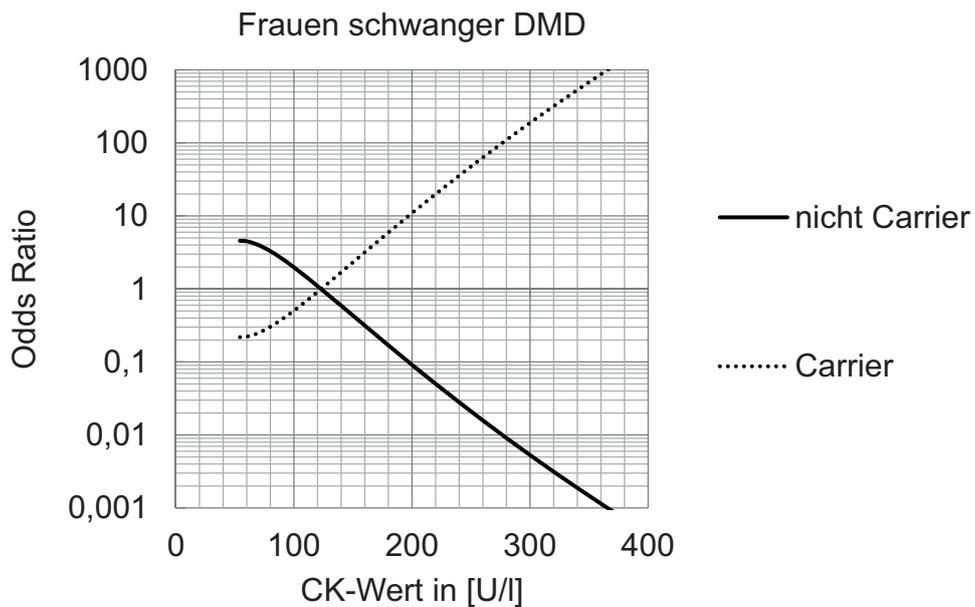


Abbildung 3.8: Odds Ratio für schwangere Frauen, Kontrollen und DMD Trägerinnen

3.9.3 Normalverteilung und Odds Ratio für nicht schwangere Frauen für die Risikoabschätzung bei DMD

Für nicht schwangere Frauen aus DMD Familien wurde die Odds Ratio Berechnung mit der Gleichung der linearen Regressionsgeraden erweitert. Diese Erweiterung der Gleichung berücksichtigt die in (Kapitel 3.6) bewiesene Altersabhängigkeit des CK-Werts. Folgende Gleichungen ergeben sich nun für die Odds Ratio:

Für die lineare Regressionsgerade gilt allgemein:

$$y = f(x) = a + b * x \quad (3.7)$$

Es ergibt sich folgende Gleichung für die lineare Alterskorrektur:

$$\log(\text{CK}_{\text{korrr}}) = \log(\text{CK}_{\text{Labor}}) - (a_{\text{Alter}} - \bar{x}_{\text{Alter}}) * b \quad (3.8)$$

Und speziell für die Gruppe ONS DMD:

$$\log(\text{CK}_{\text{korrr}}) = \log(\text{CK}_{\text{Labor}}) - (a_{\text{Alter}} - \bar{x}_{\text{Alter ONS DMD}}) * b_{\text{ONS DMD}} \quad (3.9)$$

Es lässt sich nun Gleichung (3.9) in die Gleichung (3.6) einsetzen:

$$\text{Odds ratio} = \frac{y_{\text{ONS DMD}}}{y_{\text{KNS}}} = \frac{\frac{1}{\sigma_{\text{ONS DMD}} * \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{(\log(x_{\text{Labor}}) - (a_{\text{Alter}} - \bar{x}_{\text{Alter ONS DMD}}) * b_{\text{ONS DMD}}) - \mu_{\text{ONS DMD}}}{\sigma_{\text{ONS DMD}}} \right)^2}}{\frac{1}{\sigma_{\text{KNS}} * \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\log(x_{\text{Labor}}) - \mu_{\text{KNS}}}{\sigma_{\text{KNS}}} \right)^2}} \quad (3.10)$$

mit ... $\bar{x}_{\text{Alter ONS DMD}} = 40,19$; $b_{\text{ONS DMD}} = -0,00338$; $\mu_{\text{ONS DMD}} = 2,4556$; $\sigma_{\text{ONS DMD}} = 0,4316$; $\mu_{\text{KNS}} = 1,9597$; $\sigma_{\text{KNS}} = 0,2075$

Um das Ausmaß der Alterskorrektur grafisch darzustellen, wurden für die Gruppe ONS DMD zwei Normalverteilungskurven erstellt. Das ausgewählte Alter stellt das Minimum (16 Jahre) und das Maximum (85 Jahre) der Altersverteilung der Gruppe ONS DMD dar.

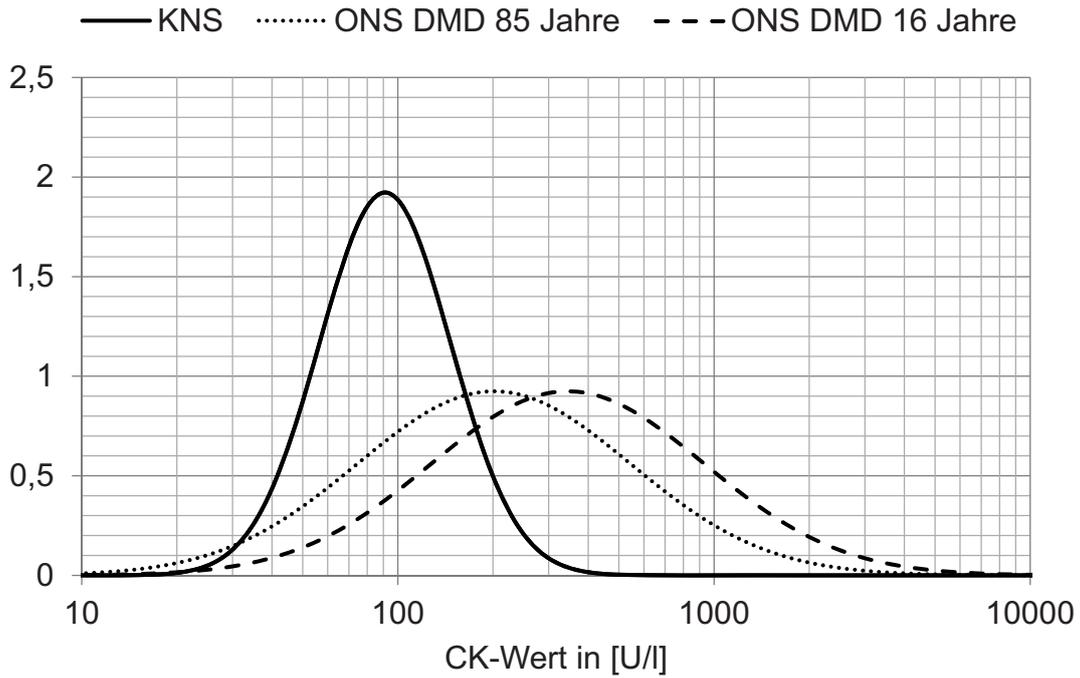


Abbildung 3.9: Normalverteilungen für nicht schwangere Frauen, Kontrollgruppe und DMD Trägerinnen mit Berücksichtigung der Altersabhängigkeit

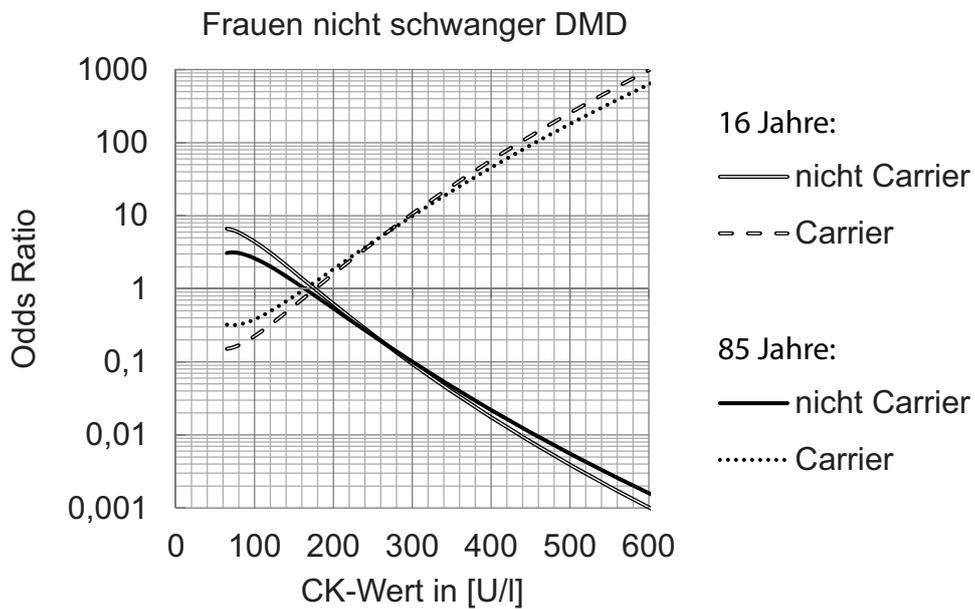


Abbildung 3.10: Odds Ratio für nicht schwangere Frauen, Kontrollgruppe und DMD Trägerinnen mit Berücksichtigung der Altersabhängigkeit

3.10 Odds-Ratio Tabellen für das Programm LINKAGE

Klinische Relevanz erhalten die ermittelten Daten durch die Erstellung von Tabellen für das Programm LINKAGE. Dieses Programm dient zur Risikoberechnung in Familien mit Duchennescher und Beckerscher Muskeldystrophie.

DMD nicht schwanger:

		Alter								
		20	30	40	50	60	70	80		
		Odds Ratio								
CK [in U/l]	log CK	31,6	1,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
		39,8	1,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
		50,1	1,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
		63,1	1,8	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
		79,4	1,9	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
		100,0	2,0	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
		125,9	2,1	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5
		158,5	2,2	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9
		199,5	2,3	1,6	1,7	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8
		251,2	2,4	4,4	4,5	4,5	4,6	4,6	4,5	4,5
		316,2	2,5	14,2	14,3	14,2	14,0	13,8	13,5	13,1
		398,1	2,6	55,3	54,3	53,1	51,6	49,8	47,8	45,6
	501,2	2,7	256,6	247,7	237,7	226,8	215,0	202,5	189,6	

Tabelle 3.12: Odds Ratio in Abhängigkeit vom CK-Wert bzw. Log CK-Wert für DMD nicht schwanger

DMD schwanger:

			Odds Ratio
CK in [U/l]	log CK	31,6	0,2
		39,8	0,2
		50,1	0,2
		63,1	0,2
		79,4	0,3
		100,0	0,5
		125,9	1,1
		158,5	3,0
		199,5	10,8
		251,2	49,2
		316,2	288,7
		398,1	2171,4
		501,2	20959,5

Tabelle 3.13: Odds Ratio in Abhängigkeit vom CK-Wert bzw. Log CK-Wert für DMD schwanger

BMD nicht schwanger:

			Odds Ratio
CK in [U/l]	log CK	31,6	0,3
		39,8	0,3
		50,1	0,3
		63,1	0,3
		79,4	0,3
		100,0	0,4
		125,9	0,6
		158,5	0,9
		199,5	1,9
		251,2	4,7
		316,2	13,6
		398,1	46,7
		501,2	190,9

Tabelle 3.14: Odds Ratio in Abhängigkeit vom CK-Wert bzw. Log CK-Wert für BMD nicht schwanger

3.11 Odds Ratio = 1

Um die Schnittpunkte der beiden Normalverteilungen, oder anders ausgedrückt die Punkte bei denen die Odds Ratio den Wert 1 annimmt zu bestimmen, wurden sowohl die allgemeine Odds Ratio Formel (3.6) als auch die Formel für die Altersabhängigkeit (3.10) berücksichtigt.

Die Formeln werden mit 1 gleichgesetzt und nach x aufgelöst.

Es ergeben sich folgende Umformungen:

Für die Formel (3.6) gilt:

$$\text{Odds Ratio} = \frac{y_{het}}{y_{ges}} = \frac{\frac{1}{\sigma_{het} \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\log(x) - \mu_{het}}{\sigma_{het}} \right)^2}}{\frac{1}{\sigma_{ges} \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\log(x) - \mu_{ges}}{\sigma_{ges}} \right)^2}} = 1 \quad (3.11)$$

$$\frac{\sigma_{het}}{\sigma_{ges}} = e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\log(x) - \mu_{het}}{\sigma_{het}} \right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{\log(x) - \mu_{ges}}{\sigma_{ges}} \right)^2} \quad (3.12)$$

$$2 * \ln \left(\frac{\sigma_{het}}{\sigma_{ges}} \right) = - \left(\frac{\log(x) - \mu_{het}}{\sigma_{het}} \right)^2 + \left(\frac{\log(x) - \mu_{ges}}{\sigma_{ges}} \right)^2 \quad (3.13)$$

$$2 * \ln \left(\frac{\sigma_{het}}{\sigma_{ges}} \right) * \sigma_{ges}^2 * \sigma_{het}^2 = \sigma_{het}^2 * (\log(x) - \mu_{ges})^2 - \sigma_{ges}^2 * (\log(x) - \mu_{het})^2 \quad (3.14)$$

$$2 * \ln \left(\frac{\sigma_{het}}{\sigma_{ges}} \right) * \sigma_{ges}^2 * \sigma_{het}^2 = \log^2(x) * \sigma_{het}^2 - 2 \log(x) * \mu_{ges} * \sigma_{het}^2 + \mu_{ges}^2 * \sigma_{het}^2 - \log^2(x) * \sigma_{ges}^2 + 2 \log(x) * \mu_{het} * \sigma_{ges}^2 - \mu_{het}^2 * \sigma_{ges}^2 \quad (3.15)$$

Substitution: $y = \log(x)$:

$$2 * \ln \left(\frac{\sigma_{het}}{\sigma_{ges}} \right) * \sigma_{ges}^2 * \sigma_{het}^2 = y^2(x) * \sigma_{het}^2 - 2 y(x) * \mu_{ges} * \sigma_{het}^2 + \mu_{ges}^2 * \sigma_{het}^2 - y^2(x) * \sigma_{ges}^2 + 2 y(x) * \mu_{het} * \sigma_{ges}^2 - \mu_{het}^2 * \sigma_{ges}^2 \quad (3.16)$$

$$y^2(\sigma_{het}^2 - \sigma_{ges}^2) + y(2\mu_{het} * \sigma_{ges}^2 - 2\mu_{ges} * \sigma_{het}^2) - 2 * \ln \left(\frac{\sigma_{het}}{\sigma_{ges}} \right) * \sigma_{ges}^2 * \sigma_{het}^2 + \mu_{ges}^2 * \sigma_{het}^2 - \mu_{het}^2 * \sigma_{ges}^2 \quad (3.17)$$

Es wird nun die obige quadratische Gleichung mit der allgemeinen Form $y^2a + yb + c$ mit Hilfe der Mitternachtsformel bestimmt:

$$y_{1/2} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

mit...

$$a = \sigma^2_{het} - \sigma^2_{ges}; \tag{3.18}$$

$$b = 2\mu_{het} * \sigma^2_{ges} - 2\mu_{ges} * \sigma^2_{het};$$

$$c = -2 * \ln\left(\frac{\sigma_{het}}{\sigma_{ges}}\right) * \sigma^2_{ges} * \sigma^2_{het} + \mu^2_{ges} * \sigma^2_{het} - \mu^2_{het} * \sigma^2_{ges}$$

$$y_{1/2} = \frac{-(2\mu_{het} * \sigma^2_{ges} - 2\mu_{ges} * \sigma^2_{het}) \pm \sqrt{(2\mu_{het} * \sigma^2_{ges} - 2\mu_{ges} * \sigma^2_{het})^2 - 4(\sigma^2_{het} - \sigma^2_{ges}) * \left(-2 * \ln\left(\frac{\sigma_{het}}{\sigma_{ges}}\right) * \sigma^2_{ges} * \sigma^2_{het} + \mu^2_{ges} * \sigma^2_{het} - \mu^2_{het} * \sigma^2_{ges}\right)}}{2(\sigma^2_{het} - \sigma^2_{ges})} \tag{3.19}$$

Resubstitution: $y = \log(x)$

$$x_{1/2} = \frac{10^{-\frac{-(2\mu_{het} * \sigma^2_{ges} - 2\mu_{ges} * \sigma^2_{het}) \pm \sqrt{(2\mu_{het} * \sigma^2_{ges} - 2\mu_{ges} * \sigma^2_{het})^2 - 4(\sigma^2_{het} - \sigma^2_{ges}) * \left(-2 * \ln\left(\frac{\sigma_{het}}{\sigma_{ges}}\right) * \sigma^2_{ges} * \sigma^2_{het} + \mu^2_{ges} * \sigma^2_{het} - \mu^2_{het} * \sigma^2_{ges}\right)}}{2(\sigma^2_{het} - \sigma^2_{ges})}}{10}} \tag{3.20}$$

Es ergeben sich nun folgende Werte für die einzelnen Gruppen:

Das Ergebnis besteht für jede Gruppe aus 2 x-Werten: $x_{1/2}$ es wird allerdings nur der klinisch relevante x-Wert als Ergebnis dargestellt:

Gruppe:	CK-Wert in [U/l]
KNS ONS DMD	170,9
KS OS DMD	123,0
KNS ONS BMD	161,7

Tabelle 3.15: CK-Wert bei Odds Ratio = 1 für die einzelnen Gruppen

Für die Formel (3.10) gilt:

$$\text{Odds Ratio} = \frac{y_{\text{ONS DMD}}}{y_{\text{KNS}}} = \frac{\frac{1}{\sigma_{\text{ONS DMD}} * \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\log(x_{\text{Labor}}) - (a_{\text{Alter}} - \bar{x}_{\text{Alter ONS DMD}}) * b_{\text{ONS DMD}} - \mu_{\text{ONS DMD}}}{\sigma_{\text{ONS DMD}}} \right)^2}}{\frac{1}{\sigma_{\text{KNS}} * \sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\log(x_{\text{Labor}}) - \mu_{\text{KNS}}}{\sigma_{\text{KNS}}} \right)^2}} = 1 \tag{3.10}$$

Substitution: $\mu_{het} = (a_{\text{Alter}} - \bar{x}_{\text{Alter ONS DMD}}) * b_{\text{ONS DMD}} + \mu_{\text{ONS DMD}}$

Mit dieser Substitution ergibt sich dieselbe Form wie für die Gleichung (3.6).

Auf die Herleitung im Detail wird daher verzichtet.

Für die Lösungsformel der quadratischen Gleichung ergeben sich folgende Glieder:

$$y_{1/2} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

mit...

$$a = \sigma^2_{\text{ONS DMD}} - \sigma^2_{\text{KNS}}; \tag{3.21}$$

$$b = 2\mu_{\text{het}} * \sigma^2_{\text{KNS}} - 2\mu_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}};$$

$$c = -2 * \ln\left(\frac{\sigma_{\text{ONS DMD}}}{\sigma_{\text{KNS}}}\right) * \sigma^2_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}} + \mu^2_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}} - \mu^2_{\text{het}} * \sigma^2_{\text{KNS}}$$

$$x_{1/2} = 10^{\frac{-(2\mu_{\text{het}} * \sigma^2_{\text{KNS}} - 2\mu_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}}) \pm \sqrt{(2\mu_{\text{het}} * \sigma^2_{\text{KNS}} - 2\mu_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}})^2 - 4(\sigma^2_{\text{ONS DMD}} - \sigma^2_{\text{KNS}}) \left(-2 * \ln\left(\frac{\sigma_{\text{ONS DMD}}}{\sigma_{\text{KNS}}}\right) * \sigma^2_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}} + \mu^2_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}} - \mu^2_{\text{het}} * \sigma^2_{\text{KNS}}\right)}}{2(\sigma^2_{\text{ONS DMD}} - \sigma^2_{\text{KNS}})}} \tag{3.22}$$

Resubstitution: $y = \log(x)$

$$x_{1/2} = 10^{\frac{-(2\mu_{\text{het}} * \sigma^2_{\text{KNS}} - 2\mu_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}}) \pm \sqrt{(2\mu_{\text{het}} * \sigma^2_{\text{KNS}} - 2\mu_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}})^2 - 4(\sigma^2_{\text{ONS DMD}} - \sigma^2_{\text{KNS}}) \left(-2 * \ln\left(\frac{\sigma_{\text{ONS DMD}}}{\sigma_{\text{KNS}}}\right) * \sigma^2_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}} + \mu^2_{\text{KNS}} * \sigma^2_{\text{ONS DMD}} - \mu^2_{\text{het}} * \sigma^2_{\text{KNS}}\right)}}{2(\sigma^2_{\text{ONS DMD}} - \sigma^2_{\text{KNS}})}} \tag{3.23}$$

Es ergeben sich in Abhängigkeit vom Alter folgende Werte:

Das Ergebnis besteht für die Gruppen KNS und ONS DMD aus 2 x-Werten: $x_{1/2}$

es wird nur der klinisch relevante x-Wert als Ergebnis dargestellt:

Alter:	CK-Wert in [U/l]
20	175,6
40	170,9
60	167,1
80	164,4

Tabelle 3.16: CK-Wert bei Odds Ratio = 1 mit Alterskorrektur für die Gruppen KNS und ONS DMD

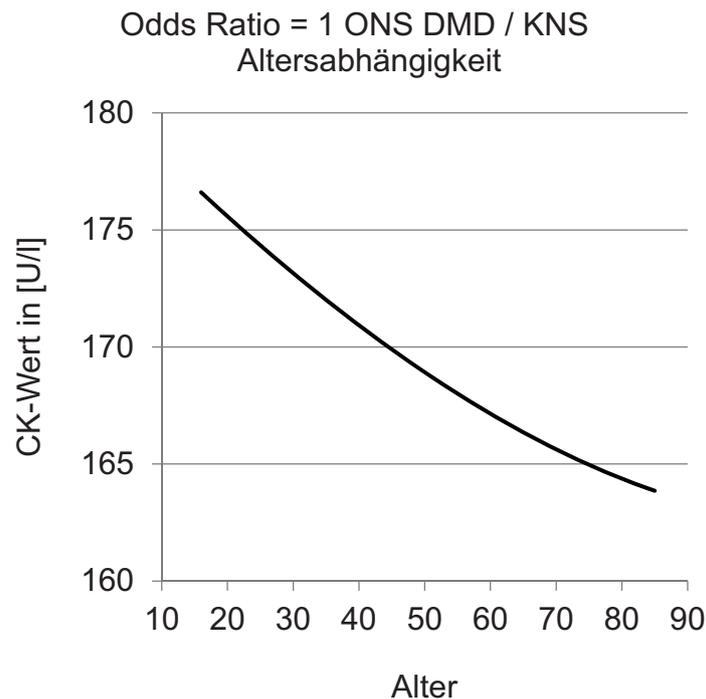


Abbildung 3.11: grafische Darstellung des Ergebnisses für die Gruppen KNS und ONS DMD
Odds Ratio = 1

3.12 Sensitivität und Spezifität der CK-Bestimmung

Es wird im Folgenden die Sensitivität und Spezifität der CK-Wert Bestimmung ermittelt. Sie werden für folgende Gruppen im Vergleich bestimmt: KNS ONS BMD (nicht schwangere Frauen BMD), KS OS DMD (schwängere Frauen DMD), KNS ONS DMD (nicht schwängere Frauen DMD). Als Grenzwert für die Zuteilung nach dem CK-Wert zu den jeweiligen Gruppen werden die Odds=1 Werte benutzt.

Tabelle Übersicht Grenzwerte:

Gruppen:	Grenzwerte der CK in [U/l]
KNS; ONS BMD	161,7
KS; OS DMD	123,0
KNS; ONS DMD	170,9*
	*Dieser Wert wird alterskorrigiert

Tabelle 3.17: Odds Ratio in Abhängigkeit vom CK-Wert bzw. Log CK-Wert für DMD nicht schwanger

Es ergeben sich folgende Vierfeldertafeln für die einzelnen Gruppen:

Ergebnisse

KNS ONS BMD:

	BMD liegt vor	BMD liegt nicht vor	Summe
Test positiv	40	27	67
Test negativ	38	276	314
Summe	78	303	

Tabelle 3.18: Vierfeldertafel über die Fallzahlen bei BMD nicht schwanger

Die Sensitivität beträgt somit $40/78 = 51,3 \%$

Die Spezifität beträgt somit $282/309 = 91,1 \%$

KNS ONS DMD:

	DMD liegt vor	DMD liegt nicht vor	Summe
Test positiv	133	24	157
Test negativ	77	279	356
Summe	210	303	

Tabelle 3.19: Vierfeldertafel über die Fallzahlen bei DMD nicht schwanger

Sensitivität der beträgt somit $213/335 = 63,3 \%$

Die Spezifität beträgt somit $285/309 = 92,1 \%$

KS OS DMD:

	DMD liegt vor	DMD liegt nicht vor	Summe
Test positiv	28	5	33
Test negativ	18	85	103
Summe	46	90	

Tabelle 3.20: Vierfeldertafel über die Fallzahlen bei DMD schwanger

Sensitivität der beträgt somit $213/335 = 60,9 \%$

Die Spezifität beträgt somit $87/94 = 94,4 \%$

4 Diskussion

4.1 Der ideale diagnostische Test

Ein idealer diagnostischer Test zur Bestimmung des Überträgerstatus für die Beckersche und Duchennesche Muskeldystrophie sollte passenderweise nur zwei konkrete Werte annehmen. Bisher schafft dies kein diagnostischer Test. Eine Entscheidungshilfe im Sinne einer Ja-Nein-Klassifikation lässt derzeit auf sich warten. Die Bestimmung der Creatin-Kinase liefert kein absolutes Ergebnis 0 % oder 100 % heterozygot. Unter den diagnostischen Tests, die Serumenzyme verwenden, ist die Bestimmung des CK-Werts die sensitivste Methode (Ebashi et al. 1959). Die Detektionsrate beträgt ca. 70 % (Thompson et al. 1967). Durch das Anwenden des Bayestheorem und der Verwendung der Odds Ratio wird jedoch jeder CK-Wert zu einer sinnvollen Information.

4.2 Neubewertung des CK-Werts

Die Bestimmung des CK-Werts bei 37 °C liefert deutlich höhere Ergebnisse, als frühere Bestimmungsmethoden bei geringerer Temperatur (Schumann et al. 2002; Stromme et al. 2004). Durch statistische Methoden, wie sie aus der Arbeit von Gale and Murphy (1978) bekannt sind, konnten bereits vor der Entstehung dieser Arbeit, die für die Risikoberechnung notwendige Odds Ratio durch geeignete Approximationen an das neue Bestimmungsverfahren angepasst werden (Grimm and Fischer 2011). Die hier neu entstandenen Tabellen zeigen vor allem im Bereich der hohen CK-Werte deutliche Abweichungen von den hier entstandenen Tabellen und Formeln. Das Problem liegt vor allem in der Schätzung der Varianz für die Gruppe der obligaten Konduktorinnen. Die hier bestimmten Verteilungen der CK-Werte konnten durch ihren großen Umfang an Fällen eine gute Grundlage für diese bieten. Die Reevaluation der CK-Werte ist

also eine Verbesserung der bisher bestehenden Datengrundlage, die für die Risikoberechnung zur Verfügung stand.

4.3 Altersabhängigkeit

4.3.1 Altersabhängigkeit des CK-Werts bei Konduktorinnen für die Muskeldystrophie Duchenne

Es konnte für Frauen, die heterozygot für die Duchennesche Muskeldystrophie sind, gezeigt werden, dass der CK-Wert mit zunehmendem Alter abnimmt.

Ähnliche Ergebnisse konnten bereits von anderen Autoren beobachtet werden (Apacik 1988; Keller 1996; Lane and Roses 1981; Nicholson et al. 1979; Zatz and Otto 1980). In den Formeln für die Odds Ratio Berechnung konnte dieses Verhalten implementiert werden. Dieses Vorgehen soll einer möglichst genauen Risikoberechnung Rechnung tragen.

4.3.2 Altersabhängigkeit des CK-Werts bei Konduktorinnen für die Beckersche Muskeldystrophie

Für die Muskeldystrophie Becker war eine Alterskorrelation nicht signifikant. Der p-Value lag bei 0,341 das Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0,05$ wurde somit deutlich verfehlt. In der Dissertationsschrift von Heike Keller (1996) konnte allerdings eine signifikante Regressionsgerade bestimmt werden. Die Gruppe bestand aus 76 nicht schwangeren obligaten Überträgerinnen für BMD. Die Gruppengröße in dieser Arbeit war mit 78 Frauen in ihrem Umfang durchaus vergleichbar.

Abschließend bleibt zu sagen, dass die Frage, ob bei der Beckerschen Muskeldystrophie eine Altersabhängigkeit des CK-Werts besteht, noch nicht abschließend geklärt werden kann.

4.3.3 Altersabhängigkeit des CK-Werts in der Kontrollgruppe

Die Altersabhängigkeit bei den nicht schwangeren Kontrollen verfehlte das angestrebte Signifikanzniveau mit $\alpha \leq 0,05$. Der p-Value beträgt hier 0,091. Es ist mit zunehmendem Alter ein leichter Anstieg der Serum-Creatin-Kinase zu

beobachten. Die Steigung einer möglichen Regressionsgerade fällt allerdings sehr gering aus. Vergleicht man den Betrag der Steigung mit dem, der bei den nicht schwangeren DMD-Carriern vorliegt, fällt diese sehr gering aus. In 100 Frauenjahren kommt es zu einem Anstieg von 7,66 U/l. Lane und Roses (1981) teilten in ihrer Arbeit die Gruppen nochmals in Frauen vor und nach der Menopause ein. Sie wählten für den Eintritt der Menopause ein Alter von 40 Jahren. Auch dieses Vorgehen konnte keine signifikante Alterskorrelation für die Kontrollgruppe nicht schwangerer Frauen zeigen. Die Anzahl der untersuchten Frauen, die älter als 15 Jahre waren, betrug 86. In der vorliegenden Arbeit betrug das N 303 und übersteigt die Anzahl deutlich. In der Arbeit von Stromme et al (2004) wurde die CK-Wert Bestimmung bereits nach der 37 °C Methode durchgeführt. Hier konnte mit einer Gruppengröße von 1048 Kontrollen keine Altersabhängigkeit gezeigt werden. Zusammenfassung: In dieser Arbeit kann keine Altersabhängigkeit des CK-Werts für nicht schwangere Frauen gezeigt werden, was die Arbeit von Stromme et al bestätigt. Falls eine Altersabhängigkeit besteht, fällt diese wohl sehr gering aus.

4.4 Schwangerschaft

In der Beratung schwangerer Frauen bezüglich ihres Konduktorinnenstatus für die Beckersche und die Duchennesche Muskeldystrophie gab es bisher keine aussagekräftigen Daten.

Es wurde allerdings bereits von mehreren Autoren beschrieben, dass es in der Schwangerschaft zu einem Abfall der CK-Werte kommt (Blyth and Hughes 1971; Bunday et al. 1979; Emery and King 1971; King et al. 1972; Smith et al. 1979).

4.4.1 Schwangerschaft bei Konduktorinnen DMD

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Serum-Creatin-Kinase Werte sowohl für Konduktorinnen der Duchenneschen Muskeldystrophie als auch für gesunde Frauen (Kontrollgruppe) im Vergleich mit Frauen, die nicht schwanger

sind, höchst signifikant niedriger sind. Der p-Value beträgt für beide Gruppen 0,001.

Für die Duchennesche Muskeldystrophie gelang es, aufgrund der Analysierten 46 Fälle, eine aussagekräftige Datenbasis für eine Odds-Ratio Berechnung zu schaffen. Mittels der Datenlage war es für die Muskeldystrophie Duchenne möglich, die Odds Ratio für Frauen zu bestimmen, die zum Zeitpunkt der genetischen Beratung bereits schwanger sind. Die Erstellung der Formel für die Bestimmung der Odds Ratio ist für die Beratung von schwangeren ein Novum und für die humangenetische Beratung eine Bereicherung.

4.4.2 Schwangerschaft bei Konduktorinnen BMD

Für die Beckersche Muskeldystrophie blieb die Gruppengröße mit 9 Frauen zu klein um valide Aussagen zu treffen. Die Analyse der Mittelwerte für diese kleine Gruppe lässt lediglich vermuten, dass sich der CK-Wert auch für Überträgerinnen der Beckerschen Muskeldystrophie während einer Schwangerschaft erniedrigt. Es wurde aus den hier ermittelten statistischen Maßzahlen der Mindestumfang für diese Gruppe berechnet, damit signifikante Unterschiede nachgewiesen werden können. Für zukünftige Auswertungen bleibt zu hoffen, dass die Fallzahl höher ist, als in dieser Arbeit.

4.5 Normwerte oder Odds Ratio unter Berücksichtigung der Testsensitivität

Die hier bei dem als Grenzwert festgelegten Wert für Odds=1 wurde eine Sensitivität von ca. 60 % bei der Duchenneschen Muskeldystrophie und von ca. 50 % bei der Beckerschen Muskeldystrophie erreicht. Dies entspricht den in der Literatur verfügbaren Angaben über die Testsensitivität, die bei der Creatin-Kinase Bestimmung erreicht werden können (Davie and Emery 1978; Emery et al. 1967; Gardner-Medwin et al. 1971; Skinner et al. 1975).

Da sich die Verteilungen der $\log(\text{CK-Werte})$ in weiten Bereichen überschneiden, scheint es nicht sinnvoll, dass allein die Angabe von Normbereichsgrenzen für den CK-Wert der humangenetischen Risikoermittlung

gerecht wird. Es wurden daher die Schnittpunkte der Normalverteilungen ermittelt. An diesen Schnittpunkten nimmt die Odds Ratio den Wert 1 an. Diese Werte stellen keine absoluten Grenzen dar, allein durch die mathematische Definition der Odds Ratio darf dies nie der Fall sein. Der Wert stellt vielmehr das Verhältnis von verschiedenen statistischen Risiken dar. Jedem CK-Wert kann eine bestimmte Odds Ratio zugeordnet werden. Wenn die Odds Ratio einen Wert größer eins annimmt, kann davon ausgegangen werden, dass eine erhöhte Wahrscheinlichkeit besteht, dass es sich um einen pathologischen Creatin-Kinase Wert handelt. Eine Zugehörigkeit zum Kollektiv der Überträgerinnen wird wahrscheinlicher.

4.6 Die Bedeutung des Creatin-Kinase Werts für die humangenetische Beratung

Jegliche Tests und Methoden, die zur Identifikation von Überträgerinnen der Duchenneschen und Beckerschen Muskeldystrophie herangezogen werden, dienen der Verringerung der Inzidenz dieser Erkrankungen. Da bis heute keine kausale Therapie der Muskeldystrophie Duchenne und Becker existiert. Stellt die genetische Beratung und die Bestimmung des individuellen Heterozygotenrisikos mitunter die einzige Möglichkeit dar um die Anzahl der Neuerkrankungen zu erniedrigen.

Die CK-Wert Bestimmung ist vor allem durch die sehr sensitiven molekulargenetischen Verfahren in letzter Zeit immer unbedeutender geworden. Die genetischen Verfahren kommen allerdings nicht in allen Fällen zu einem sicheren Ergebnis. In ca. 2 % kann trotz MLPA und Sequenzierung die ursächliche Mutation nicht gefunden werden (Deburgrave et al. 2007). Für diese Frauen kann die Bestimmung des CK-Werts durchaus nützliche Informationen liefern. Allerdings sollten nicht anhand von absoluten Grenzwerten Entscheidungen getroffen werden. Vielmehr sollte die Errechnung der individuellen Odds-Ratio als ein Baustein von vielen in die Risikoberechnung mit einfließen.

Die DNA basierenden Verfahren sind im Vergleich zu der CK-Bestimmung sehr teuer. Nicht immer muss eine solch teure Untersuchung notwendig sein. Wenn z. B. die klassische Risikoberechnung schon sehr geringe oder sehr große Risiken ermitteln kann.

Somit kann die CK-Wert Bestimmung, auch wenn Sie immer unwichtiger erscheint, in einfachen und auch schwierigen Fällen eine Bereicherung sein und korrekt angewandt, zu guten Ergebnissen führen.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit analysiert die Serum-Creatin-Kinase Spiegel von Konduktorinnen der Duchenneschen und Beckerschen Muskeldystrophie. Besonderes Augenmerk dieser Arbeit liegt auf den CK-Werten von schwangeren Konduktorinnen für die Muskeldystrophie Duchenne und Becker. Es werden Unterschiede im CK-Wert zwischen Schwangeren und nicht Schwangeren aufgezeigt. Die Berechnung der Odds-Ratio für die Gruppen der schwangeren Frauen soll es ermöglichen, auch nach bereits eingetretener Schwangerschaft, eine möglichst genaue Ermittlung des Carrierstatus durchzuführen. Die CK-Werte wurden auch für nicht schwangere Frauen reevaluiert.

Es wurden retrospektiv über einen Zeitraum von 7 Jahren Daten für die CK-Werte von Frauen gesammelt und ausgewertet, bei denen es innerhalb der Familie zu Fällen von Beckerscher oder Duchennescher Muskeldystrophie kam. Die Bestimmung der Serum Creatin-Kinase erfolgte nach der von der IFCC empfohlenen Methode bei 37 °C.

Die Auswertung der Daten erfolgte nach folgenden Kriterien. Es wurden folgende Gruppen gebildet: Muskeldystrophie Duchenne, Muskeldystrophie Becker und Kontrollen. Innerhalb dieser Gruppen wurden zwei Altersgruppen gebildet. Die Altersgrenze lag bei 16 Jahren. Schwangere Frauen wurden getrennt von Frauen bei denen keine Schwangerschaft bestand analysiert.

Die gewonnenen Daten wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewertet: Die CK-Werte wurden logarithmiert, um einer Normalverteilung zu entsprechen. Die logarithmierten Creatin-Kinase Werte aller Gruppen waren normalverteilt. Die Verteilung der Daten innerhalb der relevanten Gruppen unterschied sich signifikant voneinander.

Die Anzahl der ausgewerteten CK-Werte für die Gruppe der schwangeren BMD Überträgerinnen war deutlich zu klein. Es wurde der Mindestumfang für diese Gruppe ermittelt, um in zukünftigen Analysen signifikante Ergebnisse zu erhalten.

Für die Gruppe der nicht schwangeren Überträgerinnen für die Duchennesche Muskeldystrophie bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und CK-Wert. Es konnte eine Regressionsgerade bestimmt werden und anhand dieser eine Alterskorrektur durchgeführt werden.

Die Odds Ratio, die anhand des CK-Werts einer Frau errechnet wird, ist ein Element für die individuelle Risikoberechnung. Es ließ sich anhand der statistischen Kennwerte, Mittelwert μ und Standardabweichung σ , der einzelnen Gruppen Formeln zur Berechnung der Odds Ratio herleiten.

Abschließend erfolgte die Berechnung der Sensitivität und Spezifität der CK-Wert Bestimmung.

6 Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis

6.1 Abkürzungsverzeichnis

μ	Mittelwert
σ	Standardabweichung
σ^2	Varianz
DMD	Duchennesche Muskeldystrophie
BMD	Beckersche Muskeldystrophie
CK	Creatin-Kinase
ONS	Heterozygote Konduktorinnen nicht schwanger
KNS	Kontrolle nicht schwanger
OS	Heterozygote Konduktorinnen schwanger
KS	Kontrolle schwanger
*	Signifikant auf dem $\alpha \leq 0,05$ Niveau

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Risikoberechnung (DMD) für die Tochter ohne CK-Werte.....	12
Tabelle 1.2: Risikoberechnung (DMD) für die Tochter mit CK-Werten.....	13
Tabelle 2.1: Übersicht der Fallzahlen in den einzelnen Gruppen.....	17
Tabelle 3.1: statistische Kennzahlen der Altersverteilung in den Gruppen der <16 Jahre alten Frauen	18
Tabelle 3.2: statistische Kennzahlen der Altersverteilung in den Gruppen der schwangeren Frauen.....	19
Tabelle 3.3: statistische Kennzahlen der Altersverteilung in den Gruppen der nicht schwangeren Frauen	19

Tabelle 3.4: statistische Kennzahlen für die log (CK-Werte) in den Gruppen der <16 Jahre alten Frauen	21
Tabelle 3.5: statistische Kennzahlen für die log (CK-Werte) in den Gruppen der schwangeren Frauen.....	21
Tabelle 3.6: statistische Kennzahlen für die log (CK-Werte) in den Gruppen der nicht schwangeren Frauen	22
Tabelle 3.7: t-Test nach Student oder Welch-Test für sinnvolle Gruppenpaare; Zeichenerklärung: *: signifikantes Ergebnis, °: t-Test nach Student	24
Tabelle 3.8: altersadjustierter t-Test für die Gruppen OS DMD, ONS DMD, KS und KNS Zeichenerklärung: *: signifikantes Ergebnis, °: t-Test nach Student.....	25
Tabelle 3.9: Übersicht über die Power der Gruppenpaarungen, die sich signifikant in ihrem <i>logCK</i> unterscheiden.	26
Tabelle 3.10: ideale Gruppengröße für die Gruppe OS BMD	27
Tabelle 3.11: Alterskorrelation nach Pearson Übersicht über die Signifikanzen Zeichenerklärung: *: signifikantes Ergebnis.....	27
Tabelle 3.12: Odds Ratio in Abhängigkeit vom CK-Wert bzw. Log CK-Wert für DMD nicht schwanger	36
Tabelle 3.13: Odds Ratio in Abhängigkeit vom CK-Wert bzw. Log CK-Wert für DMD schwanger	37
Tabelle 3.14: Odds Ratio in Abhängigkeit vom CK-Wert bzw. Log CK-Wert für BMD nicht schwanger.....	37
Tabelle 3.15: CK-Wert bei Odds Ratio = 1 für die einzelnen Gruppen	39
Tabelle 3.16: CK-Wert bei Odds Ratio = 1 mit Alterskorrektur für die Gruppen KNS und ONS DMD	40
Tabelle 3.17: Odds Ratio in Abhängigkeit vom CK-Wert bzw. Log CK-Wert für DMD nicht schwanger	41
Tabelle 3.18: Vierfeldertafel über die Fallzahlen bei BMD nicht schwanger.....	42
Tabelle 3.19: Vierfeldertafel über die Fallzahlen bei DMD nicht schwanger.....	42
Tabelle 3.20: Vierfeldertafel über die Fallzahlen bei DMD schwanger	42

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Reaktionsgleichung Creatin-Kinase nach (Kenyon and Reed 1983)	7
Abbildung 1.2: Umrechnungsformel für unterschiedliche Creatin-Kinase Bestimmungsmethoden nach (Gale and Murphy 1978)	10
Abbildung 1.3: Stammbaum: Ratsuchende mit betroffenem Bruder, der Bruder leidet an DMD.....	11
Abbildung 1.4: Mutations-Selektions-Gleichgewicht bei Duchennescher Muskeldystrophie mit Vereinfachung: $\mu=u=v$	12
Abbildung 2.1: Stammbaum; verschiedene Konstellationen obligat heterozygoter Frauen	14
Abbildung 2.2: Reaktionsgleichung: Bestimmung der Serum-Creatin-Kinase Aktivität modifiziert nach (Schumann et al. 2002).....	16
Abbildung 3.1: Boxplot Alter mit Median, 5 % und 95 % Konfidenzintervall für alle Gruppen	20
Abbildung 3.2: Boxplot logCK-Werte mit Median, 5 % und 95 % Konfidenzintervall für alle Gruppen.....	22
Abbildung 3.3: Regressionsgerade mit 95 % Konfidenzintervall für die Gruppe der heterozygoten DMD-Frauen; Darstellung der Altersabhängigkeit	29
Abbildung 3.4: grafische Darstellung der Odds Ratio.....	30
Abbildung 3.5: Normalverteilungen für nicht schwangere Frauen, Kontrollen und BMD Carrier	32
Abbildung 3.6: Odds Ratio für nicht schwangere Frauen; Kontrollen und BMD Trägerinnen	32
Abbildung 3.7: Normalverteilungen für schwangere Frauen, Kontrollen und DMD Trägerinnen.....	33
Abbildung 3.8: Odds Ratio für schwangere Frauen, Kontrollen und DMD Trägerinnen	33

Abbildung 3.9: Normalverteilungen für nicht schwangere Frauen, Kontrollgruppe und DMD Trägerinnen mit Berücksichtigung der Altersabhängigkeit 35

Abbildung 3.10: Odds Ratio für nicht schwangere Frauen, Kontrollgruppe und DMD Trägerinnen mit Berücksichtigung der Altersabhängigkeit 35

Abbildung 3.11: grafische Darstellung des Ergebnisses für die Gruppen KNS und ONS DMD Odds Ratio = 1..... 41

6.4 Literaturverzeichnis

- Abbs S, Tuffery-Giraud S, Bakker E, Ferlini A, Sejersen T, Mueller CR (2010) Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscular disorders* : NMD 20 (6):422-427. doi:10.1016/j.nmd.2010.04.005
- Anthony K, Cirak S, Torelli S, Tasca G, Feng L, Arechavala-Gomez V, Armaroli A, Guglieri M, Straathof CS, Verschuuren JJ, Aartsma-Rus A, Helderma-van den Enden P, Bushby K, Straub V, Sewry C, Ferlini A, Ricci E, Morgan JE, Muntoni F (2011) Dystrophin quantification and clinical correlations in Becker muscular dystrophy: implications for clinical trials. *Brain : a journal of neurology* 134 (Pt 12):3547-3559. doi:10.1093/brain/awr291
- Apacik C (1988) Verteilung der Aktivität für die Kreatinkinase im Serum obligater Konduktorinnen der Duchenne'schen Muskeldystrophie und deren Töchter.
- Barbujani G, Russo A, Danieli GA, Spiegler AW, Borkowska J, Petruszewicz IH (1990) Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Human genetics* 84 (6):522-526
- Becker PE, Kiener F (1955) [A new x-chromosomal muscular dystrophy]. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten, vereinigt mit Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 193 (4):427-448

- Bell RD, Rosenberg RN, Ting R, Mukherjee A, Stone MJ, Willerson JT (1978) Creatine kinase BB isoenzyme levels by radioimmunoassay in patients with neurological disease. *Annals of neurology* 3 (1):52-59. doi:10.1002/ana.410030108
- Black HR, Quallich H, Gareleck CB (1986) Racial differences in serum creatine kinase levels. *The American journal of medicine* 81 (3):479-487
- Blyth H, Hughes BP (1971) Pregnancy and serum C.P.K. levels in potential carriers of severe X-linked muscular dystrophy. *Lancet* 1 (7704):855-856
- Bridge PJ (1994) The calculation of genetic risks : worked examples in DNA diagnostics. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore [u.a.]
- Bunday S, Crawley JM, Edwards JH, Westhead RA (1979) Serum creatine kinase levels in pubertal, mature, pregnant, and postmenopausal women. *Journal of medical genetics* 16 (2):117-121
- Burger A, Richterich R, Aebi H (1964) [the Heterogenicity of Creatine Kinase]. *Biochemische Zeitschrift* 339:305-314
- Bushby KM, Gardner-Medwin D (1993) The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. I. Natural history. *Journal of neurology* 240 (2):98-104
- Davie AM, Emery AE (1978) Estimation of proportion of new mutants among cases of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of medical genetics* 15 (5):339-345
- Dawson DM, Eppenberger HM, Kaplan NO (1967) The comparative enzymology of creatine kinases. II. Physical and chemical properties. *The Journal of biological chemistry* 242 (2):210-217
- Deburgrave N, Daoud F, Llense S, Barbot JC, Recan D, Peccate C, Burghes AH, Beroud C, Garcia L, Kaplan JC, Chelly J, Leturcq F (2007) Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. *Human mutation* 28 (2):183-195. doi:10.1002/humu.20422

- Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, van Paassen HM, van Broeckhoven C, Pearson PL, van Ommen GJ (1989) Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *American journal of human genetics* 45 (6):835-847
- Dreyfus JC, Schapira G (1962) [Biochemistry of progressive muscular dystrophy]. *Klinische Wochenschrift* 40:373-379
- Duchenne (1867) *The Pathology of Paralysis with Muscular Degeneration (Paralysie Myosclerotique), or Paralysis with Apparent Hypertrophy.* *British medical journal* 2 (363):541-542
- Eagle M, Baudouin SV, Chandler C, Giddings DR, Bullock R, Bushby K (2002) Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscular disorders : NMD* 12 (10):926-929
- Ebashi S, Toyokura Y, Momoi H, Sugita H (1959) High Creatine Phosphokinase Activity of Sera of Progressive Muscular Dystrophy. *J Biochem-Tokyo* 46 (1):103-104
- Emery AE (1965) Carrier detection in sex-linked muscular dystrophy. *Journal de genetique humaine* 14 (4):318-329
- Emery AE (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscular disorders : NMD* 1 (1):19-29
- Emery AE (1994) Some unanswered questions in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders : NMD* 4 (4):301-303
- Emery AE (2002) Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscular disorders : NMD* 12 (4):343-349
- Emery AE, Clack ER, Simon S, Taylor JL (1967) Detection of carriers of benign X-linked muscular dystrophy. *British medical journal* 4 (5578):522-523
- Emery AE, King B (1971) Pregnancy and serum-creatine-kinase levels in potential carriers of Duchenne X-linked muscular dystrophy. *Lancet* 1 (7707):1013

- Emery AE, Lee CS (1964) Manifestations in Carriers of X-Linked Muscular Dystrophy. *Lancet* 2 (7368):1066
- Emery AE, Skinner R (1976) Clinical studies in benign (Becker type) X-linked muscular dystrophy. *Clinical genetics* 10 (4):189-201
- Emery AEH (1993) Duchenne muscular dystrophy. Oxford monographs on medical genetics, vol 24, 2. ed edn. Oxford Univ. Press, Oxford [u.a.]
- Emery AEH, Muntoni F (2003) Duchenne muscular dystrophy. 3. edn. Oxford University Press, Oxford [u.a.]
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A (2007) G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior research methods* 39 (2):175-191
- Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF (1978) Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. *Clinical chemistry* 24 (11):1966-1970
- Gale AN, Murphy EA (1978) The use of serum creatine phosphokinase in genetic counseling for Duchenne muscular dystrophy. I. Analysis of results from 29 studies. *Journal of chronic diseases* 31 (2):101-109
- Gardner-Medwin D (1970) Mutation rate in Duchenne type of muscular dystrophy. *Journal of medical genetics* 7 (4):334-337
- Gardner-Medwin D, Pennington RJ, Walton JN (1971) The detection of carriers of X-linked muscular dystrophy genes. A review of some methods studied in Newcastle upon Tyne. *Journal of the neurological sciences* 13 (4):459-474
- Griffiths PD (1966) Serum levels of ATP: creatine phosphotransferase (creatine kinase). The normal range and effect of muscular activity. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 13 (4):413-420
- Grimm T, Fischer C (2011) Risikoberechnungen beim X-chromosomal rezessiven Erbgang. *Medizinische Genetik* 23 (3):373-376. doi:10.1007/s11825-011-0294-8
- Grimm T, Kress W, Meng G, Müller-Reible CR (2009) Muskeldystrophien Duchenne und Becker. *Medizinische Genetik* 21 (3):327-331. doi:10.1007/s11825-009-0186-3

- Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Müller CR, Müller B (1994) On the origin of deletions and point mutations in Duchenne muscular dystrophy: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *Journal of medical genetics* 31 (3):183-186
- Haldane JB (1935) The rate of spontaneous mutation of a human gene. *Journal of genetics* 83 (3):235-244
- Haldane JB (1956) Mutation in the sex-linked recessive type of muscular dystrophy; a possible sex difference. *Annals of human genetics* 20 (4):344-347
- Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51 (6):919-928
- Hoffman EP, Kunkel LM (1989) Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 2 (1):1019-1029
- Hughes BP (1962) Serum enzymes in carriers of muscular dystrophy. *British medical journal* 2 (5310):963-964
- Hughes BP (1968) Serum creatine phosphokinase and haemolysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 21 (2):287-288
- Ishikawa Y, Miura T, Ishikawa Y, Aoyagi T, Ogata H, Hamada S, Minami R (2011) Duchenne muscular dystrophy: survival by cardio-respiratory interventions. *Neuromuscular disorders : NMD* 21 (1):47-51.
doi:10.1016/j.nmd.2010.09.006
- Jockers-Wretou E, Pfeleiderer G (1975) Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 58 (3):223-232
- Kawamura J, Kato S, Ishihara T, Hiraishi Y, Kawashiro T (1997) [Difference of new mutation rates in dystrophin gene between deletion and duplication mutation in Duchenne and Becker muscular dystrophy]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology* 37 (3):212-217
- Keller HE, A. E. H.; Spiegler, A. W. J.; Apacik, C.; Müller, C. R.; Grimm, T.; (1996) Age effects on Serum Creatine Kinase (SCK) levels in

- obligate carriers of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) and Becker Muscular Dystrophy (BMD) and its implication on genetic counselling. *Acta Cardiologica* VIII:27-34
- Kenyon GL, Reed GH (1983) Creatine kinase: structure-activity relationships. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 54:367-426
- King B, Spikesman A, Emery AE (1972) The effect of pregnancy on serum levels of creatine kinase. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 36 (1):267-269
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, et al. (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *American journal of human genetics* 45 (4):498-506
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50 (3):509-517
- Koenig M, Kunkel LM (1990) Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *The Journal of biological chemistry* 265 (8):4560-4566
- Kohler M, Clarenbach CF, Bahler C, Brack T, Russi EW, Bloch KE (2009) Disability and survival in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80 (3):320-325.
doi:10.1136/jnnp.2007.141721
- Krüger M (2005) Schätzungen der männlichen und weiblichen Mutationsraten bei Duchennescher Muskeldystrophie
- Lane RJ, Roses AD (1981) Variation of serum creatine kinase levels with age in normal females: implications for genetic counselling in Duchenne muscular dystrophy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 113 (1):75-86

- Meryon E (1852) On Granular and Fatty Degeneration of the Voluntary Muscles. *Medico-chirurgical transactions* 35:73-84 71
- Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2 (1):90-95
- Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM (1986) Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323 (6089):646-650.
doi:10.1038/323646a0
- Nicholson GA, Gardner-Medwin D, Pennington RJ, Walton JN (1979) Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy: Assessment of the effect of age on detection-rate with serum-creatine-kinase-activity. *Lancet* 1 (8118):692-694
- Nigro G, Comi LI, Politano L, Limongelli FM, Nigro V, De Rimini ML, Giugliano MA, Petretta VR, Passamano L, Restucci B, et al. (1995) Evaluation of the cardiomyopathy in Becker muscular dystrophy. *Muscle & nerve* 18 (3):283-291. doi:10.1002/mus.880180304
- Norman A, Harper P (1989) A survey of manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Wales. *Clinical genetics* 36 (1):31-37
- Oliver IT (1955) A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *The Biochemical journal* 61 (1):116-122
- Passos-Bueno MR, Rabbi-Bortolini E, Azevedo E, Zatz M (1989) Racial effect on serum creatine-kinase: implications for estimation of heterozygosity risks for females at-risk for Duchenne dystrophy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 179 (2):163-168
- Perloff JK, Roberts WC, de Leon AC, Jr., O'Doherty D (1967) The distinctive electrocardiogram of Duchenne's progressive muscular dystrophy. An electrocardiographic-pathologic correlative study. *The American journal of medicine* 42 (2):179-188

- Perry TB, Fraser FC (1973) Variability of serum creatine phosphokinase activity in normal women and carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 23 (12):1316-1323
- Rall S, Grimm T (2012) Survival in Duchenne muscular dystrophy. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases* 31 (2):117-120
- Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, Sylvester JE, Gorski JL, Schmickel RD, Worton RG (1985) Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 318 (6047):672-675
- Richterich R, Rosin S, Aebi U, Rossi E (1963) Progressive Muscular Dystrophy. V. The Identification of the Carrier State in the Duchenne Type by Serum Creatine Kinase Determination. *American journal of human genetics* 15 (2):133-154
- Rosalki SB (1967) An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 69 (4):696-705
- Schneider CM, Dennehy CA, Rodearmel SJ, Hayward JR (1995) Effects of physical activity on creatine phosphokinase and the isoenzyme creatine kinase-MB. *Annals of emergency medicine* 25 (4):520-524
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L, International Federation of Clinical C, Laboratory M (2002) IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clinical chemistry and laboratory*

medicine : CCLM / FESCC 40 (7):725-733.

doi:10.1515/CCLM.2002.125

- Shapiro Y, Magazanik A, Sohar E, Reich CB (1973) Serum enzyme changes in untrained subjects following a prolonged march. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 51 (4):271-276
- Simpson J, Zellweger H, Burmeister LF, Christee R, Nielsen MK (1974) Effect of oral contraceptive pills on the level of creatine phosphokinase with regard to carrier detection in Duchenne muscular dystrophy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 52 (2):219-223
- Skinner R, Emery AE (1974) Letter: Serum-creatine-kinase levels in carriers of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 2 (7887):1023-1024
- Skinner R, Emery AE, Anderson AJ, Foxall C (1975) The detection of carriers of benign (Becker-type) X-linked muscular dystrophy. *Journal of medical genetics* 12 (2):131-134
- Smith I, Elton RA, Thomson WH (1979) Carrier detection in X-linked recessive (Duchenne) muscular dystrophy: serum creatine phosphokinase values in premenarchal, menstruating, postmenopausal and pregnant normal women. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 98 (3):207-216
- Stromme JH, Rustad P, Steensland H, Theodorsen L, Urdal P (2004) Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system at 37 degrees C: part of the Nordic Reference Interval Project. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 64 (4):371-384.
doi:10.1080/00365510410002742
- Sumita DR, Vainzof M, Campiotto S, Cerqueira AM, Canovas M, Otto PA, Passos-Bueno MR, Zatz M (1998) Absence of correlation between skewed X inactivation in blood and serum creatine-kinase levels in Duchenne/Becker female carriers. *American journal of medical genetics* 80 (4):356-361

- Szasz G, Gerhardt W, Gruber W, Bernt E (1976) Creatine kinase in serum: 2. Interference of adenylate kinase with the assay. *Clinical chemistry* 22 (11):1806-1811
- Thompson MW, Murphy EG, McAlpine PJ (1967) An assessment of the creatine kinase test in the detection of carriers of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr* 71 (1):82-93. doi:10.1016/s0022-3476(67)80235-x
- Thomson WH (1968) Determination and statistical analyses of the normal ranges for five serum enzymes. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 21 (3):469-478
- Wagner GS, Roe CR, Limbird LE, Rosati RA, Wallace AG (1973) The importance of identification of the myocardial-specific isoenzyme of creatine phosphokinase (MB form) in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Circulation* 47 (2):263-269
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *The Biochemical journal* 281 (Pt 1):21-40
- White SJ, Aartsma-Rus A, Flanigan KM, Weiss RB, Kneppers AL, Lalic T, Janson AA, Ginjaar HB, Breuning MH, den Dunnen JT (2006) Duplications in the DMD gene. *Human mutation* 27 (9):938-945. doi:10.1002/humu.20367
- Wiesmann U, Colombo JP, Adam A, Richterich R (1966) Determination of cysteine activated creatine kinase in serum. *Enzymologia biologica et clinica* 7 (4):266-284
- Wilson KM, Evans KA, Carter CO (1965) Creatine Kinase Levels in Women Who Carry Genes for Three Types of Muscular Dystrophy. *British medical journal* 1 (5437):750-753
- Zatz M, Otto PA (1980) Effect of age on the detection rate in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the neurological sciences* 47 (3):407-410

Zatz M, Passos MR, Bortolini ER (1983) Serum pyruvate-kinase (PK) activity during pregnancy in potential carriers for Duchenne muscular dystrophy. *American journal of medical genetics* 15 (1):149-151.
doi:10.1002/ajmg.1320150121

Zatz M, Rapaport D, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Bortolini ER, Pavanello Rde C, Peres CA (1991) Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *Journal of the neurological sciences* 102 (2):190-196

Danksagung

Ich möchte mich abschließend herzlichst bei Herrn Prof. Dr. med. T. Grimm für die Überlassung des Themas und für die große Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Peter U. Heuschmann danke ich recht herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Ich danke Herrn Patrick Scharpfenecker für die Überprüfung der Rechnungen im Kapitel 3.11.

Des weiteren möchte ich allen danken, die mir Mut gemacht haben diese Arbeit fertigzustellen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname	Ernst, <u>Simon</u> Jonas
Geburtsdatum, Ort	04.05.1987 in Ellwangen (Jagst)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

09/1993 bis 07/1997	St. Georg Grundschule, Schrezheim
09/1997 bis 06/2006	Hariolf-Gymnasium, Ellwangen (Jagst)
30. Juni 2006	Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/2007 bis 11/2013	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2. September 2009	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
22. Oktober 2013	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Approbation

6. November 2013	Approbation als Arzt
------------------	----------------------

Ellwangen, den 24. November 2014