

**Aus dem Institut für Humangenetik
des Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Direktor: Prof. Dr. A. Gal

**Nachweis von drei neuen Mutationen im Ryanodinrezeptorgen (*RYR1*) bei
Patienten mit Maligner Hyperthermie und Human Stress Syndrom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Thorsten Krieger

aus Hamburg

Hamburg 2007

Meinen Eltern gewidmet

Gliederung

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	Seite 4
Abkürzungsverzeichnis.....	Seite 5
1. Fragestellung.....	Seite 7
2. Einleitung	
2.1 Die Maligne Hyperthermie (MH).....	Seite 8
2.2 Die Klinik der MH.....	Seite 8
2.3 Syndrome bei denen eine Verwandtschaft mit der MH diskutiert wird.....	Seite 9
2.3.1 Human Stress Syndrom.....	Seite 9
2.3.2 Maligne neuroleptische Syndrom.....	Seite 11
2.3.3 Central Core Disease.....	Seite 11
2.4 Die Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie.....	Seite 12
2.5 Die Genetik der Malignen Hyperthermie.....	Seite 15
2.6 Das Schweine Stress Syndrom.....	Seite 17
2.7 Therapie.....	Seite 18
2.8 Der <i>in vitro</i> Kontraktionstest (IVCT): Protokoll der EMHG.....	Seite 20
2.9 Molekularbiologische Diagnostik.....	Seite 21
3. Material und Methoden	
3.1 Chemikalien und Enzyme.....	Seite 23
3.2 Lösungen und Puffer.....	Seite 23
3.3 Verwendete Geräte.....	Seite 26
3.4 Patienten und Blut.....	Seite 27
3.5 DNA-Präparation aus Blut-Leukozyten.....	Seite 28
3.5.1 DNA-Molekülgrößenbestimmung mittels analytischer Gelelektrophorese.....	Seite 29
3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	Seite 30
3.6.1 Die Primer.....	Seite 33
3.7 PCR-Produkt-Molekülgrößenbestimmung mittels Gelelektrophorese.....	Seite 34
3.7.1 Herstellung der Agarosegele.....	Seite 35
3.7.2 Laden der Agarosegele.....	Seite 35

3.7.3	Durchführung der Elektrophorese.....	Seite 35
3.7.4	Färbung und Dokumentation.....	Seite 35
3.8	Untersuchung von DNA-Einzelstrangkonnformationspoly- morphismen in PCR-Produkten (SSCP-Elektrophorese).....	Seite 36
3.8.1	Prinzipien der SSCP-Analyse.....	Seite 36
3.8.2	Herstellung der SSCP-Gele.....	Seite 38
3.8.3	Probenvorbereitung und Polyacrylamidelektrophorese.....	Seite 39
3.8.4	Fixierung, Färbung und Dokumentation des SSCP-Polyacrylamidgels	Seite 40
3.9	DNA-Sequenzierung.....	Seite 41
3.9.1	Das Prinzip der DNA-Sequenzierung.....	Seite 41
3.9.2	Reinigung der PCR-Produkte durch Fällung in Ammoniumacetat –Äthanollösung.....	Seite 42
3.9.3	Sequenzierungs-PCR.....	Seite 42
3.9.4	Ethanol-Präzipitation und Sequenzierung der Produkte.....	Seite 43
3.10	Restriktionsenzymverdau.....	Seite 43
3.11.1	Spektrophotometrie.....	Seite 45
3.11.2	DNA-Konzentrationsabschätzung mittels eines DNA-Standards.....	Seite 45
4.	Ergebnisse	
4.1	DNA-Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Qualitätskontrolle durch die Gelelektro- phorese.....	Seite 46
4.2	SSCP-Mutationsanalyse.....	Seite 50
4.3	DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte.....	Seite 52
4.4	Restriktionsenzymverdau.....	Seite 60
5.	Diskussion.....	Seite 65
6.	Zusammenfassung.....	Seite 77
7.	Literaturverzeichnis.....	Seite 78
8.	Anhang	
	Danksagung.....	Seite 86
	Lebenslauf.....	Seite 87

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Kalziumstoffwechsel in der Zelle.....	Seite 14
Abb. 2.2	Strukturformel Dantrolen.....	Seite 19
Abb. 2.3	Vereinfachter experimenteller Versuchsaufbau nach dem Protokoll der EMHG.	Seite 21
Abb. 3.1	Das Prinzip der SSCP-Elektrophorese.....	Seite 37
Abb. 4.1	PCR Produkte der Exons 6 und 14.....	Seite 49
Abb. 4.2	SSCP-Analyse von Exon 40.....	Seite 51
Abb. 4.3	SSCP-Analyse von Exon 14.....	Seite 51
Abb. 4.4	Sequenzierung von Exon 14.....	Seite 55
Abb. 4.5	Sequenz von Intron 14.....	Seite 56
Abb. 4.6	Sequenzierung von Exon 39.....	Seite 58
Abb. 4.7	Restriktionsenzymverdau von Exon 14.....	Seite 60
Abb. 4.8	Restriktionsenzymverdau von Exon 17.....	Seite 61
Abb. 4.9	Restriktionsenzymverdau von Exon 40.....	Seite 62
Abb. 4.10	Restriktionsenzymverdau von Exon 11.....	Seite 63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Reaktionsansätze für den Restriktionsenzymverdau....	Seite 44
Tabelle 4.1	Mutationen die in dieser Arbeit identifiziert wurden....	Seite 59
Tabelle 4.2	Polymorphismen die in dieser Arbeit identifiziert wurden.....	Seite 59

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CCD	Central Core Disease / Syndrom
cDNA	komplementäre DNA
CK	Creatinkinase
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMHG	European Malignant Hyperthermia Group
HPP	Hyperkalämischen periodischen Paralyse
HSS	Human Stress Syndrom / Exercise-induced Rhabdomyolysis
IVCT	<i>in vitro</i> Kontraktionstest
MH	Maligne Hyperthermie
MHE	MH-equivocal
MHEh	MH-equivocal Halotan-susceptible
MHN	MH-negative
MHS	MH-susceptible
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PSS	Porcine (Schweine) Stress Syndrome
RYR1	Ryanodinrezeptor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism

TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin

1. Fragestellung

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine seltene, hypermetabole Stoffwechsellage, die durch volatile Anästhetika ausgelöst wird. Sie entsteht durch eine Störung der intrazellulären Kalziumregulation, die in vielen Fällen durch einen genetischen Defekt im Ryanodinrezeptor verursacht wird. Beim sehr seltenen Human Stress Syndrom (HSS) kommt es durch exzessiven Stress zu ähnlichen Krisen wie in der MH. Eine Verwandtschaft beider Syndrome wird diskutiert. In dieser Arbeit soll in einem Untersuchungskollektiv aus zehn MH-Patienten und acht HSS-Patienten molekulare Analysen in ausgewählten Regionen des Ryanodinrezeptorgens (*RYR1*) durchgeführt werden. Alle Achtzehn zeigten im *in vitro* Kontraktionstest (IVCT) pathologische Muskelkontraktionswerte und wurden als MH-susceptible (MHS) eingestuft. Die zu untersuchenden Exons liegen in der N-terminalen gelegenen MH-Region 1 und der zentral gelegenen MH-Region 2 des *RYR1*-Gens. In ihnen konnten bereits Mutationen identifiziert werden die zur MH führen. Für die molekulargenetische Untersuchung soll die DNA aus Blutleukozyten der Patienten und gesunden Kontrollen isoliert werden. Für das Mutationsscreening in 12 Exons des *RYR1*-Gens sollen Primer aus den publizierten Sequenzen des Ryanodinrezeptorgens abgeleitet werden. Mit ihnen synthetisierte PCR-Produkte sollen mit der Single-Strand-Conformation-Polymorphism(SSCP)-Analyse elektrophoretisch aufgetrennt werden. Zur Identifikation der Mutationen sollen die PCR-Produkte, die in der SSCP-Analyse ein verändertes Bandenmuster zeigten, sequenziert werden. Um zusätzlich auch die Mutationen aufzuspüren, welche mit der SSCP-Elektrophorese nicht zu detektieren sind und um die Sensitivität der SSCP-Methode zu überprüfen, sollen später auch alle übrigen Sequenzen der 12 ausgewählten Exons durch direkte genomische Sequenzierung untersucht werden. Gefundene Mutationen sollen nach Möglichkeit, durch Restriktionsenzymverdau bestätigt werden.

2. Einleitung

2.1 Die Maligne Hyperthermie

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine akute, pharmakogenetische Erkrankung, die während oder nach einer Allgemeinanästhesie auftritt und ohne therapeutische Intervention rasch zum Tode des Patienten führen kann. Erstmalig wurde das Krankheitsbild von Denborough et al. 1962 beschrieben. Die Prädisposition zur MH wird autosomal dominant vererbt. Das Krankheitsbild wird bei bestehender Prädisposition durch sog. Triggersubstanzen ausgelöst. Zu den Triggersubstanzen gehören nach den heutigen Erkenntnissen nur die volatilen Anästhetika (Chloroform, Äther, Halothan, Enfluran, Isofluran, Desfluran, Sevofluran) und depolarisierende Muskelrelaxantien wie z.B. Succinylcholin (Denborough 1998). Die klassische MH-Krise entsteht durch eine Kontraktion der kompletten Skelettmuskulatur. Sie führt zu einem extremen Hypermetabolismus der Muskelzellen und hierdurch zu einer starken Körpertemperaturerhöhung. Unbehandelt führt die MH-Krise meist zum Tod des Patienten. Durch Erkennen der frühen Zeichen der MH-Krise und durch Einführung des Muskelrelaxans Dantrolen als Antidot konnte die Letalitätsrate von über 80% auf unter 7% gesenkt werden (Britt 1991).

Die Häufigkeit eines Vorfalles während einer Allgemeinanästhesie wird bei Kindern mit 1:15000 und bei Erwachsenen mit 1:50000 angegeben. Er tritt vor allem bei Patienten zwischen dem 3. und 30. Lebensjahr auf. Da bei Patienten mit Prädisposition zur Malignen Hyperthermie auch komplikationslose Narkosen mit Triggersubstanzen möglich sind, also nicht jede Applikation zu einer MH-Krise führt, liegt die vermutete Häufigkeit der Prädisposition zur MH in der Population bei 1:10000 (Kalow et al. 1995).

2.2 Die Klinik der MH

Durch volatile Anästhetika, Succinylcholin und insbesondere durch deren Kombination, kommt es bei MH-Patienten zu einem stark erhöhten Kalziumionenausstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), in dem

die größte intrazelluläre Ca^{2+} Menge gespeichert wird, ins Myoplasma. Der Ausstrom erfolgt durch die Öffnung der schnellen Ca^{2+} -Kanäle, welche aufgrund ihrer hohen Affinität zu dem Pflanzenalkaloid Ryanodin „Ryanodinrezeptoren (RYR1)“ genannt werden. Die erhöhte myoplasmatische Kalziumkonzentration führt durch die Aktivierung der Aktin- und Myosinfilamente zur Muskelkontraktion und erklärt so den oft beschriebenen gesteigerten Muskeltonus während der MH-Krise. Der Masseterspasmus ist häufig erstes Symptom der Krise. Im weiteren Verlauf ist häufig die gesamte quergestreifte Körpermuskulatur betroffen. Zusätzlich reguliert Kalzium als „second messenger“ den Muskelzellstoffwechsel extrem hoch, so dass die Kompensationsmechanismen des Körpers schnell an ihre Grenzen stoßen. Der Sauerstoffbedarf steigt bis auf ein vierfaches der Norm an. Kohlendioxid, Laktat und die charakteristische Wärme, die der MH ihren Namen gegeben hat, wird bei dieser hyperbolen Stoffwechsellage vermehrt frei. Die Folgen sind ein rascher Temperaturanstieg (bis zu 1°C pro 5 Minuten), ein starker Abfall der Sauerstoffsättigung, eine enorme Erhöhung des endexpiratorischen CO_2 Drucks und eine metabolische Azidose. Durch Schädigung der Zellmembranen kommt es zur Hyperkaliämie, Erhöhung der Kreatinkinasen (CK) und Myoglobinurie. Zusätzlich entwickelt sich häufig eine Arrhythmie und Tachykardie. Binnen Stunden kann sich ein Lungenödem oder eine Koagulopathie entwickeln, nach Tagen neurologische Ausfälle und Nierenversagen durch Rhabdomyolyse.

2.3 Syndrome bei denen eine Verwandtschaft mit der MH diskutiert wird

2.3.1 Human Stress Syndrom

Das Human Stress Syndrom (HSS) ist ein außerordentlich seltenes Krankheitsbild. Es könnten MH-ähnliche Episoden beobachtet werden, welche in Abwesenheit jeglicher Anästhetika auftreten. Das HSS manifestiert sich an sehr warmen Aufenthaltsorten (z.B. in der Sauna oder im türkischem Bad) oder nach exzessiven körperlichen Belastungen, vor allem, wenn diese in einer

warmen Umgebung stattfinden. Ferner wurden Fälle vom HSS als Komplikation einer infektiösen Erkrankung beschrieben (Wingard 1974; Hopkins et al. 1991; Hackl et al. 1991; Jurkat-Rott et al. 2000, Wappler et al. 2001).

Häufig wurde eine Erstmanifestation im Militärdienst beim ausgiebigen Marschieren im Sommer mit schwerem Gepäck beobachtet (Jardon 1982). Es kommt zu Kopfschmerzen, Schwindel mit Übelkeit und evtl. Bewusstlosigkeit. Der Patient ist kurzatmig, die Körpertemperatur steigt über 40°C, die Pulsfrequenz nimmt zu, der Blutdruck bleibt zunächst normal und fällt später ab. Die Haut ist rot, trocken und heiß. Durch Schwellungen und Krämpfe der quergestreiften Muskulatur kommt es zu Muskelschmerzen, die über Stunden bis zu Tagen persistieren. Aufgrund der Muskelschädigung wird das Krankheitsbild im angelsächsischen Sprachraum auch als „Exercise-induced Rhabdomyolysis“ bezeichnet. Häufig ist als Zeichen der Myoglobinurie einige Stunden nach Beginn der Beschwerden eine Braunverfärbung des Urins zu beobachten. Im weiteren Verlauf kann es zu Nierenfunktionsstörungen kommen.

In einigen Fällen, bei denen der Tod kurz nach Krankheitsbeginn einsetzte, wurden vorwiegend Schäden im Nervensystem gefunden. Bei den übrigen Patienten kommt es zu Gewebseinblutungen und degenerativen Gewebsveränderungen wie Schwellung und Verlust der Zell- und Gewebsstruktur. Hirnödeme und petechiale Einblutungen im Bereich des dritten und vierten Ventrikels sind häufig. Subendocardiale Hämorrhagie, Niereninsuffizienz durch den massiven Anfall von Myoglobin, Lebernekrose und einige Fälle von Hämorrhagie des Pankreas wurden beobachtet. In seltenen Fällen gab es auch eine Schädigung der Nebenniere. Als Ursache der Einblutungen wurde eine dissimilierte intravasale Gerinnung verantwortlich gemacht. Im Rahmen des Muskelzelluntergangs kommt es zu einem drastischen Anstieg der Kreatinkinase (bis 10^6 U/L) und der Laktatdehydrogenase (bis 10^5 U/L).

Wappler et al. konnte zeigen, dass der überwiegende Teil der von ihm untersuchten HSS-Patienten im *in vitro* Kontraktionstest (siehe 2.8) pathologische Werte zeigte. Bei einem Teil der Patienten gelang ihm außerdem der Nachweis von Mutationen im Ryanodinrezeptorgen (*RYR1*), in denen auch

für die MH determinierende Mutationen detektiert wurden (Wappler et al. 2001). Dies untermauert die Annahme, dass die Syndrome eng miteinander verwandt sind.

2.3.2 Maligne neuroleptische Syndrom

Das maligne neuroleptische Syndrom ist eine seltene, aber potentiell fatale abnorme Reaktion auf antipsychotische Medikamente. Haloperidol und Fluphenazine sind meistens die Triggersubstanzen. Aber auch andere wie Butyrophenone, Phenothiazide und Thioxanthine scheinen das Syndrom auslösen zu können. Es ist nicht dosisrelevant und beginnt üblicherweise zu Beginn der Therapie, möglicherweise schon nach Erstgabe. Das volle Syndrom entwickelt sich nach 24-72 Stunden und ist durch eine Muskelrigidität mit Anstieg der Serumkreatinkinase, einer Hyperthermie bis 42°C, schwankenden Blutdruckwerten bis hin zu einem Bewusstseinsverlust charakterisiert. Die exakte Ätiologie ist ungeklärt, scheint aber mit exzessiven Dopamin-Rezeptor Blockaden im Hypothalamus und in den Basalganglien im Zusammenhang zu stehen. Neben dem sofortigen Absetzen des Psychopharmakons nach Diagnosestellung stehen supportive Maßnahmen wie Kühlen, intravenöse Flüssigkeitsgaben, und Behandlung der kardialen, respiratorischen und renalen Komplikationen im Vordergrund. Wird eine Muskelrigidität beobachtet, ist eine Behandlung mit Dantrolen (siehe 2.7) sinnvoll. Aufgrund des dopaminergen Mechanismus des Syndroms wurden Dopamin-Antagonisten wie Bromcriptin, Levodopa, und Amantadin mit Erfolg eingesetzt (Brownell 1988; Guerrero et al. 1988; Takagi et al. 1983).

2.3.3 Central Core Disease

Das Central Core Syndrom wird bereits zu den MH verwandten Syndromen gezählt (Brownell 1988; Denborough et al. 1973; Quane et al. 1994). Diese Myopathie ist durch Muskelhypotonie, eine verzögerte motorische Entwicklung, einer proximalen, symmetrischen Kraftlosigkeit in den Extremitäten und einer CK-Anhebung im Blut charakterisiert. Der Name des Syndroms leitet sich aus

dem histologischen Bild der Erkrankung ab. Zentrale Kerne liegen entlang der gesamten Typ 1 Muskelfasern. Hier befinden sich auch die langsamen Ca^{2+} ATPase Pumpen. Die Kerne bestehen aus unstrukturierten Muskelfibrillen. Mitochondrien und Typ 2 Muskelfasern fehlen; die Anwesenheit oxidativer Enzyme macht einen histochemischen Nachweis möglich.

Pathogenetisch kommt es durch eine Überladung des Myoplasmas mit Ca^{2+} zur Schädigung der Mitochondrien. Diese wiederum führt zu einem Abfall der metabolischen Aktivität. Hinzu kommt, dass kompensatorische Mechanismen eine Proliferation der Sarkoplasmatischen Retikula und der transversalen Tubuli auslösen. Beide Prozesse können zu einem Verlust von Muskelfasern führen. Die Vererbung ist autosomal dominant. Nicht alle Familienmitglieder entwickeln die Myopathie, jedoch haben sie wohl alle eine Prädisposition zur MH (Lenzen et al.1993; Denborough 1998).

Wie die Maligne Hyperthermie ist auch das Central Core Disease (CCD) pathogenetisch mit dem *RYR1*-Gen verknüpft; es konnten einige Mutationen in diesem Gen identifiziert werden, welche sowohl bei MH Patienten als auch Patienten mit CCD nachgewiesen wurden (Zhang et al.1993, Manning et al. 1998, Barone et al.1999, Lynch et al.1999).

2.4 Die Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie

Um die Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie nachvollziehen zu können, muss zunächst die Funktionsweise der Skelettmuskulatur von Säugern betrachtet werden. Die Erregungs-Kontraktionskoppelung der Muskulatur ist eine fein regulierte Interaktion zwischen dem spannungsabhängigen Dihydropyridinrezeptor (DHPR), dem Ryanodinrezeptor und der Ca^{2+} -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums. Die Muskelkontraktion der Quergestreiften Muskulatur beginnt mit dem Aktionspotential eines Motoneurons, das sich von der Endplattenregion über die gesamte Muskelfaser ausbreitet. Es dringt in die transversalen Tubuli ein und stimuliert dort durch Depolarisation den Dihydropyridinrezeptor. Dieser spannungsabhängige Kalzium-Kanal überträgt das Signal auf den Ryanodinrezeptor, der sich

.....

daraufrin öffnet und Ca^{2+} aus dem SR ins Myoplasma entlässt. Die Aktivierung des Ryanodinrezeptors mit folgendem Ca^{2+} -Ausstrom ist der Hauptmechanismus der Muskelkontraktion.

Verschiedene Substanzen wie z.B. Koffein und Inhalationsnarkotika modellieren das Öffnungsverhalten des Ryanodinrezeptors.

Das ins Myoplasma entlassene Ca^{2+} bindet an Troponin, welches über eine Konformationsänderung des Proteins Tropomyosin zu einem Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente in der Muskelzellen führt; die Muskelfaser verkürzt sich. Solange Ca^{2+} in hohen Konzentrationen vorliegt und ATP vorhanden ist, wiederholt sich der Vorgang und der Muskel kontrahiert weiter.

Durch Zurückpumpen des Ca^{2+} in das SR normalisiert sich der myoplasmatische Ca^{2+} -Spiegel wieder. Dies führt zur Lösung der Aktin-Myosinfilamente, woraufhin sich der Muskel entspannt.

Der Dihydropyridinrezeptor (DHPR) ist ein spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal, der aus fünf Untereinheiten besteht: α_1 mit einer Masse von 175 kDa, α_2/δ mit 143/27 kDa, β mit 54 kDa und γ mit 30 kDa. Mit seinen vier Domänen, die jeweils aus sechs Loops bestehen, die die Zellmembran durchspannen, ist die α_1 -Untereinheit die größte. Sie stellt die funktionelle Einheit des DHPR dar, hat pharmakologische Bindungsstellen für Agonisten und Antagonisten, formt die Ca^{2+} -Kanalpore und repräsentiert den Spannungssensor (Catterall 1995). Die anderen Untereinheiten haben regulatorische Funktionen und helfen bei der Lokalisation des DHPR in der transtubulären Membran. Nach Membrandepolarisation kommt es zu einer Konformationsänderung des DHPR, die es einem kurzen Stück der Primärsequenz in der II-III-Loopdomäne der α_1 -Untereinheit ermöglicht, mit der korrespondierenden cytoplasmatischen Domäne des Ryanodinrezeptors zu interagieren und somit die Ca^{2+} -Ausschüttung auszulösen (Leong et al. 1998).

Der Ryanodinrezeptor repräsentiert eine Familie intrazellulärer Ca^{2+} -Kanäle. Drei Isoformen, die durch verschiedene Gene kodiert werden, wurden beschrieben (Franzini-Armstrong et al. 1997). RYR1 und RYR2 sind die Hauptformen, die in der Skelettmuskulatur und der Herzmuskulatur exprimiert werden, während RYR3 in vielen „Nichtmuskelgeweben“ vorkommen wie z. B. im Gehirn.

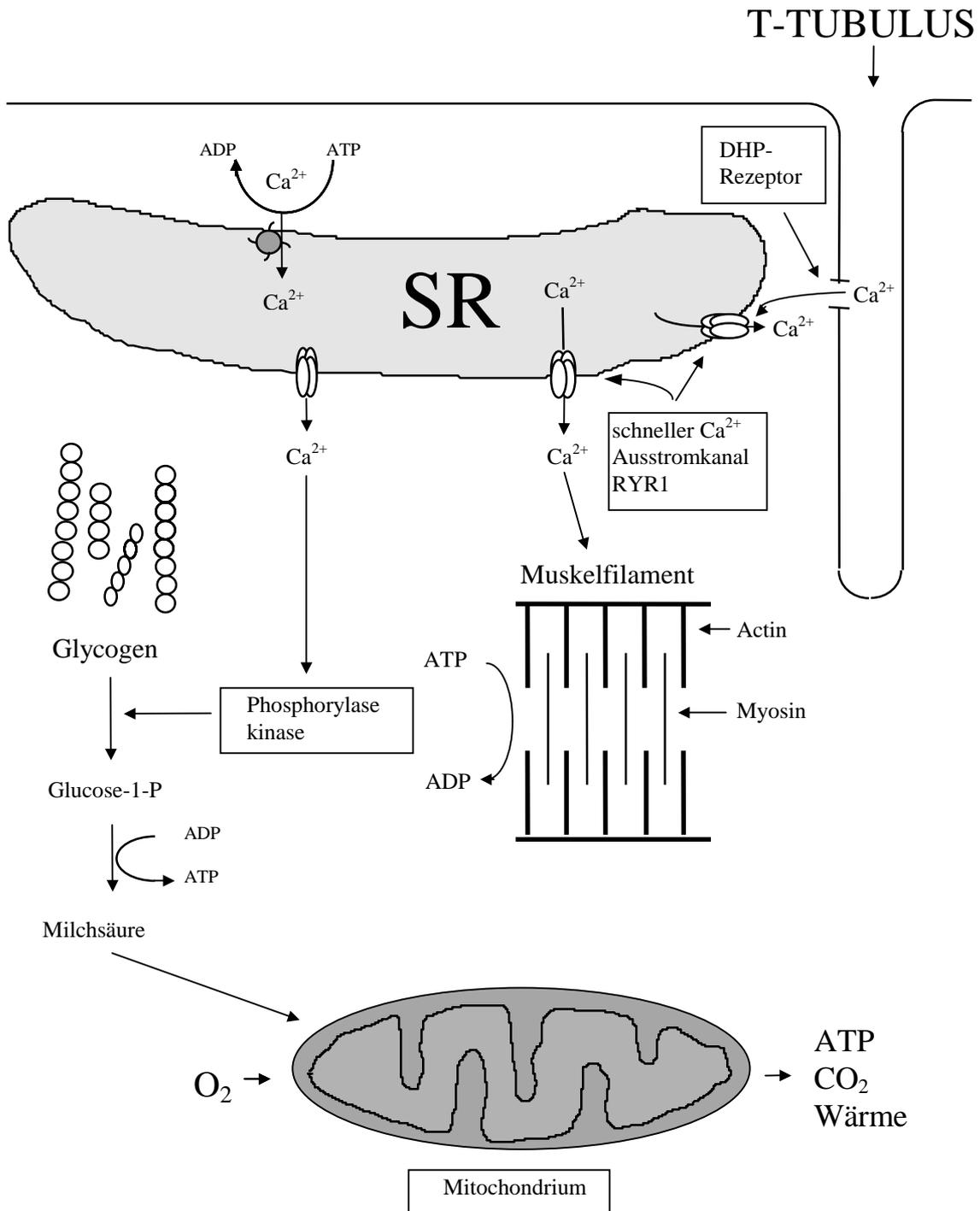


Abb. 2.1: Der zytosomatische Ca^{2+} -Spiegel reguliert die Funktion der Muskelfilamente, die Glykolyse und ATP-Neogenese im Mitochondrium. Eine Muskelrelaxation wird durch eine niedrige Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol durch aktives Hineinpumpen in das SR bewirkt. Eine Kontraktion entsteht durch den Ca^{2+} -Einstrom aus dem transversalen Tubulus durch langsame Ca^{2+} -Kanäle (DHPR), welche wiederum direkt und durch Mediatoren, wie ATP und Mg^{2+} , die Aktivierung der schnellen Ca^{2+} -Einstromkanäle, den sogenannten Ryanodine-Rezeptor (RYR1), bestehend aus vier homologen Proteinen, bewirkt. Durch den Kalziumeinstrom aus dem SR ins Zytosol wird so die Wirkung des DHPR amplifiziert.

Parallel hierzu wird die Glykolyse und die mitochondriale ATP-Synthese forciert, wobei O_2 verbraucht wird und CO_2 und Wärme entsteht. Durch nur kurze Öffnung der schnellen Ca^{2+} -Einstromkanäle (RYR1) und sofortiges Zurückpumpen in das SR entsteht so ein Regelkreislauf.

Für die Fehlregulation des Ca^{2+} -Haushaltes bei der fulminanten MH-Krise sind die Ryanodinrezeptoren der Skelettmuskulatur RYR1 verantwortlich. Diese Rezeptoren sind extrem große Proteine, welche Tetrameren aus vier identischen Untereinheiten von je 565 kDa darstellen. Mit einer Gesamtmasse von 2,3 MDa sind es die größten beschriebenen Ionenkanal-Proteine (Franzini-Armstrong et al. 1997). Der hydrophobe Teil des Rezeptors bildet eine membrandurchspannende Pore und die hydrophilen Segmente formen eine cytoplasmatische Domäne, die den Spalt zwischen dem transversalen Tubulus und dem SR überbrückt (Wagenknecht et al. 1997). Von dem C-terminalen 1/5 des RYR1-Proteins wird die Transmembrandomäne des Holorezeptors gebildet, während die N-terminalen 4/5 die cytoplasmatische Domäne darstellt. In einer durch Anästhetika ausgelösten MH-Krise kommt es zu einer raschen und nachhaltigen Ausschüttung von Kalziumionen aus dem SR ins Myoplasma (O'Sullivan et al. 2001). Dieser Effekt führt zu der beobachteten Muskelkontraktion und zu dem beschriebenen Hypermetabolismus. Die Änderung der Ca^{2+} -Homöostase der MHS-Muskelfaser resultiert aus einem Defekt im Mechanismus der Erregungs-Kontraktur-Koppelung. Als Ursache kommt deshalb eine Veränderung des RYR1-Rezeptors in Betracht. Alternativ erscheint auch eine Fehlregulation über den DHPR plausibel.

2.5 Die Genetik der Malignen Hyperthermie

In Familien, in denen häufig die MH auftritt, wurde eine autosomal dominante Vererbung ermittelt. Durch Kopplungsanalysen auf Chromosom 19 mit den polymorphen Markern D19S9, CYP2A, BCL3, pSC11 und APOC2, konnte in drei großen irischen Familien eine enge Kopplung der MH mit der Region 19q13.1 nachgewiesen werden (McCarthy et al. 1990). Hier liegt das *RYR1*-Gen. Es gelang in einigen Familien im *RYR1*-Gen des Menschen eine Mutation nachzuweisen die korrespondierend im *RYR1*-Gen des Schweins das Schweine Stress Syndrom (PSS) auslöst (Gillard et al. 1991). Es zeigte sich allerdings, dass nur ein kleiner Teil von etwa 6% der MHS-Patienten Träger dieser Mutation waren. Der überwiegende Teil der Patienten zeigte die Mutation nicht, auch wenn eine enge Kopplung mit dem *RYR1*-Gen nachgewiesen werden konnte. Durch weiterführende Untersuchungen wurden

weitere Punktmutationen im *RYR1*-Gen entdeckt, die mit dem Phänotyp segregieren. Einige dieser Mutationen konnten auch beim Central Core Disease nachgewiesen werden. Insgesamt können heute etwa in 50% der MHS-Patienten Mutationen im *RYR1*-Gen nachgewiesen werden.

Die vollständige Struktur des *RYR1*-Gens wurde 1996 durch Phillips et al. beschrieben. Das Gen für den Ryanodinrezeptor hat eine Größe von 160 kb. Es besitzt 106 Exons. Die Exons haben eine Länge von 15 bis 813 bp, die Länge der Introns liegt zwischen 85 und 16000 bp. Das Transkript wird zu einer mRNA von ca. 15 kb gespleißt und codiert 5035 Aminosäuren, die ein Protein von 565 kDa darstellen.

Erste Untersuchungen zeigten, dass die für die MH-prädisponierenden Mutationen nicht gleichmäßig auf dem Gen verteilt sind, sondern in zwei Regionen clustern. Der größte Teil der Mutationen wurde zwischen den Aminosäureresten 35-614 (MH/CCD Region 1) und im mittlerem Teil des Proteins zwischen den Aminosäuren 2163-2458 (MH/CCD Region 2) gefunden. In neueren Untersuchungen konnten auch einige Mutationen in der C-Terminalen luminalen/transmembranen Region nachgewiesen werden (Galli et al. 2002, Oyamada et al. 2002, Brown et al. 2000, Monnier et al. 2005). Diese wird nun als MH Region 3 bezeichnet. In ihr wurden auch Mutationen gefunden, die für das CCD-prädisponieren. Neuste Untersuchungen in denen das *RYR1*-Gen von MH-Patienten komplett sequenziert wurde, habe gezeigt, dass MH-prädisponierende Mutationen im *RYR1*-Gen auch außerhalb dieser „Hot-Spots“ vorkommen können (Robinson et.al. 2006).

Wie schon beschrieben, interagiert der DHPR eng mit dem Ryanodinrezeptor und beeinflusst so die Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR. Bei einigen MH-Patienten konnte eine genetische Assoziation mit den Dihydropyridinrezeptorgen gefunden werden. Die α_1 -Einheit formt die Ionenporenstruktur, bindet Ca^{2+} -Antagonisten und funktioniert als spannungsabhängiger Kalziumkanal. Das Gen für die α_1 -Einheit wurde auf Chromosom 1q32.1 lokalisiert. In einer großen französischen Familie konnte die Substitution Arg1086His in dieser Einheit nachgewiesen werden. Die Mutation ist bei Familienmitgliedern die im IVCT als MHS getestet wurden nachweisbar, bei den Familienmitgliedern, die in IVCT unauffällige Werte zeigten, war die Mutation

nicht nachweisbar. In einem Kontrollkollektiv von 100 nichtverwandten die als MHN getestet wurden, konnte die Mutation ebenfalls nicht gefunden werden. So ist davon auszugehen, dass diese Mutation ursächlich für die MH-Prädisposition der Familie ist. 50 nichtverwandte MHS-Patienten wurden auf diese Mutation hin untersucht, ohne dass diese detektiert werden konnte (Monnier et al. 1997). Eine funktionelle Analyse der Mutation zeigte ihren Einfluss auf die Muskelerregung (Weiss et al. 2004). In einem anderen Patienten konnte in der α_1 -Untereinheit ein c.4475C>A Substitution, welche zum Austausch von Alanin1492 durch Asparaginsäure führte, nachgewiesen werden (Carsana et al. 2003).

Die Gene für die Einheiten β und γ finden sich beide auf Chromosom 17q11.2-q11.24. Kopplungsstudien von Levitt und Moslehi et al. (Levitt 1992, Moslehi et al.1998), lassen in dieser Region weitere Mutationen vermuten, nachgewiesen werden konnte aber noch keine. In diesem Bereich ist auch die Untereinheit α des Natrium-Kanal-Gens lokalisiert. Zwei Punktmutationen in diesem Gen konnten als Ursache der Hyperkalämischen periodischen Paralyse (HPP) nachgewiesen werden (Koch et al.1991).

Auf dem Chromosomen 7q11.23-q21.1 liegt das Gen der Einheiten α_2/δ des Dihydropyridinrezeptors. Zumindest in einer Familie gelang es, eine Kopplung zwischen dieser Region und der MH aufzuzeigen (Illes et al.1994).

2.6 Das Schweine Stress Syndrom

Eine annähernd gleiche Erkrankung wie die MH ist das bei einigen Schweinezuchtrassen beobachtete Schweine Stress Syndrom (PSS). Es wird durch Stressfaktoren wie Absetzen von der Mutter, Kämpfen, Koitus und Schlachten ausgelöst. Die Symptome sind Kurzatmigkeit, rascher Körpertemperaturanstieg, Hautflush, Kollaps und Tod mit meist sofortigem Rigor mortis. Die Fleischqualität leidet erheblich und wird als blass, weich und exsudativ beschrieben. Im Gegensatz zur MH wird das PSS autosomal rezessiv vererbt.

Ein Provokationstest mit Halothanbeatmung zeigte, dass bei homozygoten Trägern des PSS eine Krise ausgelöst werden konnte. Ein *in vitro* Kontraktionstest mit 1% Halothan und 1% Succinylcholin simultan zeigte auch bei heterozygoten Trägern pathologische Ergebnisse.

Physiologische Untersuchungen ergaben, dass ein zu hoher Kalziumspiegel im Myoplasma der Muskelzellen zur Rigidität führt. Dieser wird wie bei der MH durch einen erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum verursacht. 1991 gelang der Nachweis, dass auf Schweinechromosomen 6 das Gen für den Ryanodinrezeptor lokalisiert ist und eine Mutation in ihm, gekoppelt mit dem Phänotyp der MH, vererbt wird (Fujii et al.1991). Diese Region findet sich in dem menschlichen Genom auf Chromosom 19q13.1-q13.2 wieder (Gillard et al.1991). Durch Klonierung einer cDNA konnte bewiesen werden, dass tatsächlich beiden Syndromen, PSS und MH ein genetischer Defekt des *RYR1* zugrunde liegt. Im Schwein führt die Substitution 1843C>T dazu, dass Arginin615 durch Cystein ersetzt wird. Da bei allen untersuchten PSS positiven Schweinen ($n > 450$) eine identische Mutation zu Grunde lag, wurde es möglich, einen genetischen Test zu entwickeln und so zuverlässig alle homozygoten und heterozygoten Träger der Mutation zu diagnostizieren.

2.7 Therapie

Die Therapie sollte schon bei den ersten Anzeichen einer MH-Krise erfolgen. Die Zufuhr der Triggersubstanzen muss sofort unterbrochen werden. Das Atemminutenvolumen wird bei hoher Frischluftzufuhr unter Kontrolle der endexpiratorischen Kohlendioxidmessung so weit gesteigert, bis Normalwerte erreicht werden. Zusätzlich sollte die Anästhesie mit Opiaten, Barbituraten, Benzodiazepinen oder Propofol vertieft werden. Reicht diese Therapie nicht aus, empfiehlt sich eine Bolusgabe von Dantrolen i.v. (2,5 mg/kg Körpergewicht), da es in der Lage ist, den weiteren Ausstrom von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum zu hemmen. Die Gabe sollte erfolgen bevor das gesamte Kalzium aus dem Pool im SR ins Myoplasma gelangt. Zusätzlich sollte die Azidose mit Natriumbikarbonat abgepuffert werden und

falls nach Dantrolengabe noch erforderlich, Arrhythmien mit Betablockern oder Lidocain behandelt werden. Außerdem besteht die Notwendigkeit einer aktiven Kühlung des Patienten durch Abdecken des Patienten, Oberflächenkühlung mit Eis und Spülungen mit Eiswasser. Durch eine forcierte Diurese sollte einem drohenden Nierenversagen durch den massiven Anfall von Myoglobin vorgebeugt werden.

Die Gabe von Dantrolen wird so lange wiederholt, bis sich die Symptome der hypermetabolen Stoffwechsellage normalisieren. Bis zu 10 mg pro Kg-Körpergewicht können hierfür nötig sein (Procter & Gamble Pharmaceuticals 1996).

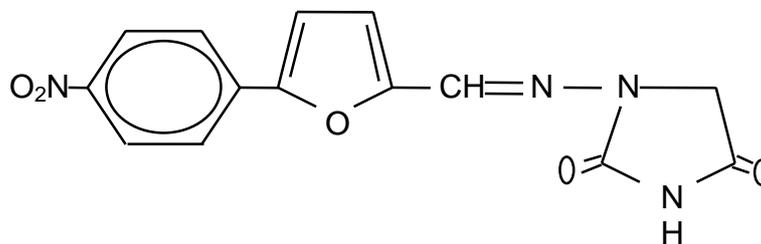


Abb. 2.2: Dantrolen

Durch Bindung an den Ryanodinrezeptor inhibiert das Dantrolen jede weitere Kalziumausschüttung. Es handelt sich um ein Hydantoin-Derivat und wurde 1967 ursprünglich zur Therapie von Muskelkrämpfen nach Schlaganfällen eingeführt (Snyder et al. 1967). Abb. 2.1 zeigt die Strukturformel von Dantrolen. 1975 wurde entdeckt, dass bei bestimmten Schweinerassen, die am Schweine Stress Syndrom leiden (PSS), fulminante Krisen durch Dantrolen beendet werden können (Harrison 1975). Seit 1979 ist Dantrolen für die intravenöse Applikation bei Patienten verfügbar. Wie bereits oben erwähnt, konnte durch die Therapie mit Dantrolen in der MH-Krise die Letalität von 80% auf unter 7% gesenkt werden.

Die Intensität einer MH-Krise kann sehr unterschiedlich sein. Neben fulminanten Krisen gibt es auch sogenannte abortive Verlaufsformen, bei denen nicht alle Symptome auftreten und die ohne Behandlung vorübergehen (Fiege et al. 2000).

2.8 Der *in vitro* Kontraktionstest (IVCT): Protokoll der EMHG

Als goldener Standard, eine MH zuverlässig zu diagnostizieren, ohne den Patienten selbst den Triggersubstanzen auszusetzen, hat sich der *in vitro* Muskel Kontraktionstest etabliert. Der Test wurde 1984 von der „European Malignant Hyperthermia Group (EMHG)“ standardisiert (The European Malignant Hyperpyrexia Group 1984): Dem Patienten wird ein Muskelbiopsat, ca. 40 x 10 x 5 mm groß, aus dem Musculus vastus lateralis (Oberschenkel) entnommen. Ein zusätzliches Stück wird excidiert, um histologisch eine Muskelerkrankung auszuschließen. Im Labor wird aus dem Muskelbiopsat, welches für den Kontrakturtest vorgesehen ist, eine Muskelfaser präpariert und jeweils eine auf einem vorher geeichten Rahmen befestigt und mit 1-2 Gramm Zug vorgedehnt. Diese Vorrichtung wird anschließend in einem nicht Anästhetika resorbierenden Gefäß (Teflon) mit Ringerlösung geflutet. Nach ca. 30 minütiger Equilibrierung kann nun die Kontraktionsfähigkeit des Biopsats durch elektrische Stimulation überprüft werden. Das Protokoll sieht zwei Tests vor, die jeweils zweimal durchgeführt werden: Bei den statischen Koffein-Kontraktur-Test wird Koffein kumulativ dem Bad hinzugegeben. Die nächste Dosis wird dem Bad hinzugegeben, wenn die maximale Grundspannung erreicht ist oder nach 3 Minuten, wenn keine Erhöhung der Grundspannung erfolgt. Ein Anstieg der Grundspannung um 2 mN oder mehr pro Dosiserhöhung wird als abnorme Kontraktion gewertet. Die Koffeinkonzentration von 32 mmol dient als Positivkontrolle und soll die ausreichende Kontraktionsfähigkeit der Muskelfaser aufzeigen.

Bei dem statischen Halothan Kontraktur Test wird Halothan dem Testbad kumulativ zugesetzt. Die nächste Dosis erfolgt wiederum, wenn der maximale Anstieg der Grundspannung erreicht ist oder nach 3 Minuten, wenn keine Erhöhung der Grundspannung erfolgt. Ein Anstieg der Grundspannung um 2 mN wird als pathologisch erhöhte Kontraktion gewertet. Ein vereinfachter Versuchsaufbau ist in Abb. 2.2 dargestellt. Zeigen die Ergebnisse der ersten beiden Tests erhöhte Kontraktionswerte, gilt der Patient als positiv (MHS), ist nur ein Testergebnis pathologisch, führt dies zur Diagnose MHE (equivocal). Diese Personen werden aus Sicherheitsgründen klinisch wie MH-

Prädisponierte behandelt. Sind beide negativ, ist der Patient nicht gefährdet (MHN).

Mit derselben Versuchsanordnung wurden ebenfalls Tests mit Ryanodininkubation durchgeführt. Es zeigte sich, dass nach einer Bolusgabe Ryanodins MH-Positive deutlich schneller mit einer Kontraktion beginnen. Die Zeit verkürzte sich häufig auf ein Bruchteil der Werte Nichtpositiver (Lenzen et al.1993, Wappler et al.1993). Auf diese Weise konnten vorher nicht eindeutig zuzuordnende Patienten (MHE) als MHS oder MHN diagnostiziert werden. Dieser Test wird jedoch zur Zeit nicht routinemäßig durchgeführt.

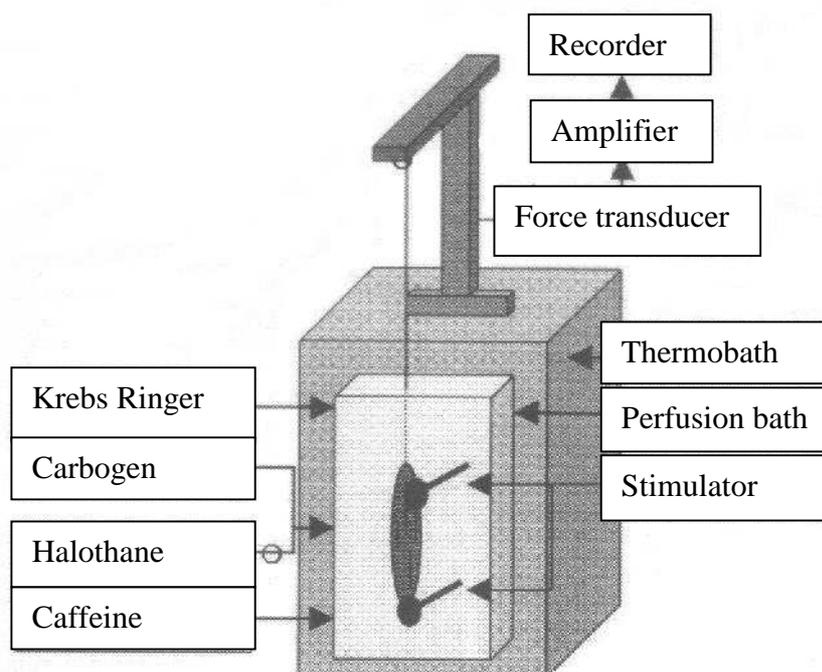


Abb.2.3: Vereinfachter experimenteller Versuchsaufbau nach dem Protokoll der EMHG. In der Mitte ein 100 bis 200 mg schweres Muskelbündel, welches supramaximal stimuliert wird und mit einer kontinuierlich isometrischen Kontraktion reagiert. In das Bad wird dann Koffein oder Halothan gegeben und die Kontraktionsstärke aufgezeichnet. (Hartung et al. 2000)

2.9 Molekularbiologische Diagnostik

Nachdem der Nachweis der homozygoten Punktmutation c.1843C>T im *RYR1*-Gen, die mit dem PSS-Phänotyp gekoppelt ist, in verschiedenen Schweinerassen gelang, wurde rasch ein molekulargenetischer Test entwickelt, mit denen die Prädisposition im Schwein nachgewiesen werden konnte.

Die Hoffnung, einen nichtinvasiven genetischen Tests in der MH-Routinediagnostik für den Menschen zu etablieren, wurde enttäuscht. Es stellte sich heraus, dass im Gegensatz zu den Schweinen, wo nur eine Mutation die PSS-Prädisposition determiniert, die genetische Vielfalt beim Menschen mit der die MH-Prädisposition vererbt wird, groß ist.

In großen Familien, bei denen eine bekannte Prädisposition zur MH durch eine Mutation im Ryanodinrezeptorgen auf Chromosomen 19q13.1-q13.2 klar nachgewiesen werden konnte, ist heute die molekularbiologische Diagnostik möglich und sinnvoll. Ist erst einmal die MH auslösende Mutation in einer Familie nachgewiesen, kann bei Familienmitgliedern auf den aufwendigen und schmerzhaften *in vitro* Kontraktionstest verzichtet werden. Untersuchungen haben ergeben, dass die molekulare Mutationsnachweise gut mit den Ergebnissen des IVCT korrelieren (Robinson et al. 2001). Die Spezifität der molekularen Methode scheint dem IVCT überlegen zu sein. Muskelfasern von MHS-Patienten können -zum Beispiel durch Austrocknung nach Präparation- geschädigt werden und unter Versuchsbedingungen nicht mehr die erforderliche Kontraktion zeigen, so dass das Testergebnis falsch negativ ausfällt.

Bisher durchgeführte Studien zur Korrelation des Genotyp zum Schweregrad des Phänotyps haben keine einheitlichen Ergebnisse geliefert (Fiege et al. 2002, Robinson et al. 2002, Robinson et.al. 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien, organische Lösungsmittel und Farbstoffe, deren Herkunft nicht gesondert erwähnt wird, stammen von den Firmen *Boehringer Mannheim*, *Sigma*, *Gibco BRL* oder *Merck*. Der Reinheitsgrad war jeweils zur Analyse. Agarose wurde von der Firma *Gibco BRL* bezogen.

In dieser Arbeit wurde mit drei Taq-Polymerasen gearbeitet:

- HotStar® Taq DNA Polymerase (Master mix) der Firma Qiagen
- Platinum® Taq DNA Polymerase (PCR-Supremix) der Firma Invitrogen
- Taq-Polymerase der Firma Gibco BRL, Life Technologies

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

3.2 Lösungen und Puffer

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der Lösungen, Puffer und Medien angegeben, die häufig verwendet wurden. Für die Herstellung wurde entionisiertes Wasser verwendet.

Blutlysepuffer:

NH ₄ Cl	8,3g (155 mM)
KHCO ₃	1g (10 mM)
Na ₂ EDTA	0,034 g (0,5 M)

auf pH 7,4 einstellen

SE-Puffer (Sodium EDTA):

NaCl	4,3 g (75 mM)
EDTA	8,41 g (25 mM)

Auffüllen mit Aqua dest. ad. 1 L
auf pH 8,0 einstellen

SDS 20% Stammlösung:

SDS	20 g
Aqua dest.	100 ml

Chloropan:

Phenol	200 ml
TE (pH 8.0)	50 ml
Chloroform	250 ml
Hydroxychinolin	250 ml

Chloroform-Isoamylalkohol:

Chloroform	24 Teile
Isoamylalkohol	1 Teil

TE-Puffer (nach Singh)

Tris-Cl	10 mM
EDTA	0,1 mM
auf pH 8,0 eingestellt	

TBE-Puffer (1 x):

Tris-(hydroxyaminomethan)	54 g
Na-Borat	27 g
EDTA	3,7 g
Auffüllen mit Aqua dest. ad	5 L
auf pH 8,0 einstellen	

EDTA-Stammlösung

EDTA 0,5 M

Auf pH 8,0 einstellen

Acrylamid-Stammlösung (30%):

Acrylamid 28,5 %

N,N'-Methylenbisacrylamid 1,5 %

Lösung lichtgeschützt bei 4°C lagern.

Ethidiumbromid-Färbelösung:

TBE-Puffer 40 ml

Aqua dest. 40 ml

Ethidiumbromid 0,5 µg/ml

Die Lösung ist zwei Tage verwendbar und sollte dann entsorgt werden.

Formamid-Ladepuffer:

Formamid 10 ml

EDTA-Stammlösung 0,2 ml

Xylencyanol 10 mg

Bromphenolblau 10 mg

Ladepuffer (10 x) für Agarose-Gele:

Ficoll 1,5 g

Bromphenolblau 25 µg

Xylencyanol 25 µg

Auffüllen mit Aqua dest. ad 10 ml

Lösungen für Silbernitratfärbung:

Fixierer:

- Ethanol	10%
-----------	-----

HNO ₃ -Lösung:	1%.
---------------------------	-----

AgNO₃-Lösung:

- AgNO ₃	2,01 g
---------------------	--------

- Aqua dest. ad	1 L
-----------------	-----

Entwickler:

- Na ₂ CO ₃	59,3 g
-----------------------------------	--------

- Formaldehyde	1080 µL
----------------	---------

- Aqua dest. ad	3 L
-----------------	-----

Stopplösung:

- Essigsäure	10 %
--------------	------

3.3 Verwendete Geräte

PCR-Geräte:

PCR- Express der Firma Hybaid

Omnigen der Firma Hybaid

Gene Amp PCR Systems 2400 der Firma Perkin Elmer

Zentrifugen:

Eppendorf Laborzentrifuge 5415

Hettich Zentrifuge Rotana S

Cleanbench:

Cleanbench der Firma Bleyemehl ASW-UP 2000

SSCP-Kammer:

Elektrophoresekammer von Gibco BRL, Life Technologies, Modell S2

Power Supply ECPS 2000/300

Agarosegelelektrophoresekammer:

Kammer von Gibco BRL, Life Technologies

Power Supply von Gibco BRL, Life Technologies

Thermoblock:

Dri-Block BB-1 der Firma Techne

Sequenziergerät:

ABI-PRISM-DNA-ANALYSER 310 und 377

3.4 Patienten und Blut

Das zur Isolation von genomischer DNA benötigte Blut der 10 Malignen Hyperthermie- und 8 Human Stress Syndrom Patienten sowie von 25 Kontrollpersonen wurde von der Klinik für Anästhesie des Universitätskrankenhaus Eppendorf, Direktor Prof. Dr. Schulte am Esch zu Verfügung gestellt. In der Klinik wurde bei den Patienten der IVCT durchgeführt. Alle zeigten pathologische Werte für Koffein und Halothan und wurden als MHS eingestuft. Das Blut dreier im IVCT als MHE getesteten Brüder der Patienten wurde ebenfalls zu Verfügung gestellt und soll untersucht werden, wenn in ihren Verwandten ein Mutation gefunden wird.

Es wurde den Patienten ca. 10 ml venöses Blut abgenommen. Hierzu wurden Na-EDTA-Röhrchen der Firma Sarstedt verwendet. Die Blutproben wurden bei -20°C gelagert.

3.5 DNA- Präparation aus Blut-Leukozyten

Zur Präparation nach unserem Laborprotokoll sind folgende Schritte nötig:

Hämolyse

Zunächst werden 10 ml Blut mit 30 ml Blutlysepuffer gut gemischt, 15 Minuten auf Eis gestellt und wiederholt geschüttelt. Hierbei kommt es durch den niedrigen osmotischen Druck des Blutlysepuffers und der niedrigen Temperatur zum Platzen der Erythrozyten, die Leukozyten überstehen diese Prozedur unbeschadet. Danach wird die Lösung 20 Minuten bei ca. 3000 rpm zentrifugiert. Die Leukozyten bilden nun ein Pellet am Boden des Tubes, so dass der Überstand vorsichtig abgegossen und verworfen werden kann.

Proteindigestion

Das Pellet wird nun mit 10 ml SE-Puffer gemischt. Anschließend werden Proteinase K (10 µL Stammlösung 10 mg/ml) und SDS (für 10 ml 500 µL 20%iges SDS, Endkonzentration 1%) hinzugegeben. Diese Lösung muß dann entweder bei Raumtemperatur über Nacht oder alternativ bei 37°C für 4 – 6 Stunden geschüttelt werden. Hierbei werden die Zell- und Kernmembranen der Leukozyten zerstört, so dass sich anschließend die DNA in freier Lösung befindet. Außerdem werden durch diesen Schritt die Nukleasen irreversibel inaktiviert und so eine Digestion der DNA verhindert.

Deproteinisation

Es wird nun 10 ml Chloroform in die Lösung gegeben und die Emulsion gut geschüttelt. Hierbei lösen sich die Proteine aus den zerfallenen Leukozyten in dem Chloroform. Die DNA befindet sich weiterhin im wässrigen Medium. Durch Zentrifugieren mit 3000 rpm für 10 Minuten werden die Phasen voneinander getrennt. Sollte zwischen den zwei Phasen noch eine Interphase aus Proteinen sichtbar sein, kann der wässrige Überstand erneut mit Chloroform gewaschen werden. Der wässrige Überstand wird vorsichtig abpipettiert und mit einem Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol gemischt. Anschließend wird die Emulsion wiederum bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der

wässrige Überstand abpipettiert. Durch diesen Schritt wird die Lösung weiter aufgereinigt, so dass sich im Überstand neben der DNA nur noch geringe Proteinreste in Lösung befinden.

DNA Ausfällung

Zu dem Überstand wird LiCl (1/12,5 des Volumens, Endkonzentration 0,4 M, Stammlösung 5 M) gegeben. Anschließend werden zwei Volumenanteile 96%iges Ethanol hinzugefügt und die Phasen vorsichtig gemischt. Die DNA fällt jetzt aus und wird als dünne Schlieren in der Lösung sichtbar. Durch behutsame Schwenk- und Rollbewegungen wickelt sich die DNA ineinander, so dass ein Knäuel entsteht. Dieses kann nun mechanisch mittels einer Kanüle aus der Lösung entnommen werden. Die DNA wird mehrfach kurz in 70%igem Ethanol gewaschen, um die Salze zu entfernen, anschließend getrocknet und in 500 µL TE n. Singh über Nacht gelöst und im Kühlschrank gelagert.

DNA Ausfällung mit NaCl

Eine vereinfachte Methode zur DNA-Isolierung aus Vollblut ist durch den Einsatz einer hochmolaren NaCl Lösung möglich (Miller et al. 1987). Dieses Verfahren wurde für die DNA-Präparation des Kontrollkollektivs verwendet. Die Hämolyse und Proteindigestion erfolgt zunächst wie oben beschrieben. Eine Deproteinisation ist dann aber nicht nötig, somit entfällt ein Waschschrift mit Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol. Die DNA Ausfällung wird mit 10 ml 5M NaCl Lösung durchgeführt. Die weniger gut lösliche DNA wird so aus der Lösung gedrängt und fällt aus. Dieser vereinfachte Schritt erspart nicht nur einen Arbeitsgang, sondern macht den Einsatz von toxischem Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol überflüssig. Das Entnehmen der DNA geschieht in der oben beschriebenen Methode.

3.5.1 DNA-Molekülgrößenbestimmung mittels analytischer Gelelektrophorese

Durch die Präparation und Lagerung ist die DNA chemischen, physikalischen und enzymatischen (überwiegend durch Nukleasen) Zersetzungsprozessen

ausgesetzt. Bevor die DNA zur weiteren Analyse verwandt werden kann, ist eine Molekülgrößenbestimmung nötig, um sicherzustellen, dass die einzelnen DNA-Fragmente in ausreichender Größe und Menge vorhanden sind, um aussagekräftige Ergebnisse zu produzieren.

Die DNA wird in einem 0.5 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem parallel mitlaufenden Längenstandard (λ -Phagen-DNA geschnitten mit Hind III) verglichen. Molekülgrößen von mehr als 50 kbp. wurden als ausreichende Qualität akzeptiert.

3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR kann ein ausgewähltes Stück eines DNA-Moleküls sehr wirksam vermehrt werden. Dabei kann es sich um jedes beliebige Stück eines beliebigen DNA-Moleküls handeln, vorausgesetzt, es sind die Sequenzen beider Enden des zu replizierenden Stückes bekannt. Um die DNA mit der PCR vermehren zu können, werden zwei kurze Oligonukleotide mit der komplementären Nukleotidsequenz dieser beiden Enden benötigt. Die Oligonukleotide hybridisieren an den beschriebenen Stellen mit den DNA-Einzelsträngen, nachdem diese durch Erhitzen aufgetrennt wurden. Da dies der Ansatzpunkt für die Polymerasen ist und von dieser Stelle die Polymerisierungsreaktion beginnt, werden diese Oligonukleotide als "Primer" bezeichnet. Polymerasen besitzen die Eigenschaft, freie Nukleotide, die sich im Ansatz befinden und sich an die komplementären Basen der DNA-Einzelstränge anlagern, miteinander zu verbinden. So entsteht ein neuer Doppelstrang. Zunächst war eine PCR eine sehr zeitaufwendige Methode, da durch das notwendige Erhitzen des Ansatzes zu Beginn jedes Zyklus die Polymerase inaktiviert wurde und deshalb immer wieder nach der Hybridisierung der freien Basen mit dem Einzelstrang erneut hinzugegeben werden musste. Die DNA-Polymerase des *Thermus aquaticus*, ein Organismus der in heißen Quellen lebt, ist hitzestabil und machte die PCR sehr viel einfacher. Sie übersteht das Erhitzen unbeschadet, erneutes Pipettieren ist nun

nicht mehr nötig. Diesem Umstand verdankt die Methode ihre heutige starke Verbreitung (Brown,1993).

Beim ersten Erhitzen des Reaktionsansatzes ist es möglich, dass es zu Fehlhybridisierungen der Primer kommt, wenn die Probe noch nicht vollständig erwärmt ist und so unspezifische Produkte synthetisiert werden. Die Gefahr unspezifischer Nebenprodukte wird minimiert, indem die Taq-Polymerase erst nach Erhitzung und somit vollständiger Aufspaltung der DNA in Einzelstränge hinzupipettiert wird. Dieses Vorgehen wird als Hot-Start-PCR bezeichnet und wurde in dieser Arbeit mit der Taq-Polymerase der Firma Gibco BRL durchgeführt. Für eine PCR benötigt ein Ansatz folgende Komponenten:

- PCR-Puffer 10 x	10	µl
- BSA (Bovines Serum Albumin) 10 mg/ml	1	µl
- Primerpaar (F und R) 10 pmol	je 1	µl
- Alle vier Nukleotide (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) 200 µM	je 1	µl
- Steriles Aqua dest.	84,5	µl
- Probanden-DNA 1µg/ml	1	µl
nach dem ersten Erhitzen auf 95°C		
- Taq Polymerase Gibco BRL1U/µL	0,5	µl

Die einzelnen Reagenzien wurden kurz herunterzentrifugiert und mit einem Tropfen Nähmaschinenöl gegen Verdunstung geschützt. Nach dem ersten Erhitzen auf 95°C für drei Minuten wurde die Taq-Polymerase hinzupipettiert. Es folgten 35 Zyklen nach immer dem gleichen Schema. Die Proben wurden auf 95 °C für 60 Sekunden erwärmt. Hierdurch wurden die DNA-Doppelstränge aufgespalten. Durch ein Abkühlen der Probe auf 60°C für 45 Sekunden wurde es den Primern und den Nukleotiden ermöglicht, sich an die komplementären Basen der DNA-Einzelstränge anzulagern. Durch ein Erwärmen auf 72 C für 120 Sekunden startete die Taq-Polymerase, beginnend von den Primer-DNA-Hybriden, mit der Verknüpfung der Nukleotide. Es entstand eine exakte komplementäre Abschrift der DNA. Mit dem erneuten Erhitzen auf 95 °C für 60 Sekunden begann ein neuer Zyklus. Da nun auch die neu synthetisierten DNA-Produkte als Matrize dienten, entstand im zweiten Zyklus die doppelte Menge

DNA, jeder weitere Zyklus ließ die Ausbeute exponentiell ansteigen. Üblich sind 30-40 Zyklen, darüber hinaus lässt die Qualität des Produktes merklich nach. Zu bemerken ist, dass die optimalen Reaktionsbedingungen, insbesondere die Annealingtemperatur (Bildung des DNA-Primer Hybrids), individuell von Primer zu Primer variiert. Zu hohe Temperaturen verhindern eine effektive Hybridbildung, zu niedrige Temperaturen führen zu Hybriden in nicht vollständig komplementären DNA Abschnitten und somit zu ungewollten Nebenprodukten. Vor Beginn der eigentlichen PCR sollten deshalb die optimalen Reaktionsbedingungen empirisch ermittelt werden. Am Ende der PCR-Reaktion sollte die Qualität und Quantität des Produkts im Agarosegel überprüft werden (siehe hierzu 3.7). Die PCR wurde mit dem Thermozykler "Hybaid" von Omni Gene durchgeführt.

Eine komfortable Variante war die Verwendung einer antikörperinaktivierten Polymerase. Durch das Erhitzen des Reaktionsansatzes wurde ein inaktivierender Antikörper zerstört und die Polymerase erst zu einem Zeitpunkt aktiv, wenn die DNA schon vollständig in Einzelstränge aufgespalten war. Für diese Methode wurde in dieser Arbeit bei einem Teil der Proben der "HotStar Taq Master Mix" von Qiagen verwendet. Dieser enthielt neben einer antikörperinaktivierten Polymerase auch Nukleotide, Puffer und BSA, so dass der vereinfachte Ansatz folgende Komponenten benötigte:

- Primerpaar (F und R)	je 0,5	µl
- HotStar Taq Master Mix	12,5	µl
- Steriles Aqua dest.	11	µl
- Probanden-DNA	0,5	µl

Im Thermozykler wurde der Ansatz zu Beginn der Reaktion für 18 Minuten auf 95°C erhitzt. Der inaktivierende Antikörper wurde hierdurch zerstört und die "HotStar" Taq Polymerase aktiviert. Die Reaktion war gestartet.

Für einige Primer konnten trotz Variation der Reaktionsbedingungen mit beiden Taq-Polymerasen keine oder keine zufriedenstellenden Produkte erzeugt werden. In einem Fall entstanden Nebenprodukte, in einem anderen war die Reaktion instabil, so dass immer nur einige Ansätze ein Produkt erzeugten. In

diesen Fällen konnte mit der Platinum®-PCR Supermix gute Produkte erzeugt werden. Der Ansatz war wie folgt:

- Primerpaar (F und R)	je	0,5	μl
- Platinum®-PCR Supermix		22,5	μl
- Steriles Aqua dest.		1	μl
- Probanden-DNA		0,5	μl

Im Kapitel 4.1 ist beschrieben, bei welchen Primerpaaren der Platinum®-PCR Supermix verwendet wurde.

3.6.1 Die Primer

Die für die Amplifikation der einzelnen DNA-Abschnitte des *RYS1*-Gens benötigten Primer wurden aus der Basensequenz der NCBI-Genbank abgeleitet. Sie lauten wie folgt:

Exon 2:	Primer F	5´ CTG CAG TAT TTG TGG TAT CC 3´
	Primer R	5´ CAA GAT TCT CTG CCC CTT CAG 3´
		Produktgröße 240 bp
Exon 6	Primer F	5´ GCA TCC TGG GAA GCC ATC ATC 3´
	Primer R	5´ CAT GGT GAG AAG ATG GGG AC 3´
		Produktgröße 237 bp
Exon 8/9	Primer F	5´ CCC ATT GAC CAA CTT CCC TTG 3´
	Primer R	5´ CTT TTC TGT CCT CCC AGC CTG 3´
		Produktgröße 401 bp
Exon 11	Primer F	5´ GGC TCC CCT GCT AAA CAC ACA G 3´
	Primer R	5´ CCT TGA CCT CCT GGA CTC AAG 3´
		Produktgröße 289 bp
Exon 14/15	Primer F	5´ GGA ATT CGT GAA TCC AAG AA 3´
	Primer R	5´ AGG TGA AGC GGC CAT GCC CAT C 3´
		erwartete Produktgröße 459 bp
Exon 14	Primer F	wie Primer 14/15 F
	Primer R	5´ AAG AGG TGT CAG ATC CAA TA 3´
		Produktgröße 289 bp

Exon 15	Primer F	5' ACC CAG ATC CCA GTC CTA TT 3'
	Primer R	wie Primer 14/15 R
		erwartete Produktgröße 206 bp
	Primer F2	5' GCC GAG TCC TGG AAA GAG ATT 3'
	Primer R	wie Primer 14/15 R
		erwartete Produktgröße 289 bp
		tatsächliche Produktgröße 286 bp
Exon 17	Primer F	5' CCC TCC CTG GGT TCT TCT GTA GAT 3'
	Primer R	5' TCT GGG TGT GGA GTC TCT AAG TCA 3'
		Produktgröße 282 bp
Exon 39	Primer F	5' TGG TGC TCC AAG CCT TGC ATT GTC 3'
	Primer R	5' CAA AGT AAG GGG AAG GGC GGT GTC 3'
		Produktgröße 336 bp
Exon 40	Primer F	5' GGT CAA GAA TGC CAA CGC TGT CA 3'
	Primer R	5' AGC TCC CCA GCA CCT GCC TG 3'
		Produktgröße 235 bp
Exon 45	Primer F	5' TGC CTC CCC AAC CCA CCC ACC TTC 3'
	Primer R	5' TGC CTG CCC TCC CTT CCC ATC CTG 3'
		Produktgröße 183 bp
Exon 46	Primer F	5' TGC CCC TCT CCC TCC CTC TAC TCC 3'
	Primer R	5' AGC ATC ACT CCT TCG CCA AGT TCC 3'
		Produktgröße 185 bp

Die Primer wurden durch die Firma MWG-Biotech GmbH bezogen.

3.7 PCR-Produkt-Molekülgrößenbestimmung mittels Gelelektrophorese

Wie schon erwähnt, ist es durch die PCR möglich, durch fortlaufende Vervielfältigung hohe Konzentrationen eines DNA-Abschnittes zu erhalten. Im optimalen Falle geschieht dies exponentiell. Da diese Reaktion von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist (ausreichende Konzentration aller Reagenzien, optimale Annealingtemperatur usw.), muss jedes Produkt auf seine Qualität geprüft werden. Hierzu eignet sich die Agarosegelelektrophorese.

3.7.1 Herstellung der Agarosegele

Für die Auftrennung von PCR-Produkten eignen sich 2%ige Agarosegele. Zur Herstellung wurde 2 g Agarose auf 100 ml TBE-Puffer in eine Laborflasche gegeben und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Nach Abkühlung der Agaroselösung auf 60-70°C wurden ca. 60 ml in einen Gelträger gegossen, in den vorher ein Kunststoffkamm zur Ausformung der Geltaschen eingesteckt wurde. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt, so dass das Gel vollständig in 1 x TBE-Pufferlösung lag.

3.7.2 Laden der Agarosegele

Die Probenansätze je 5 µL PCR-Produkt und 0,5 µL Stop Puffer, wurden vorsichtig in die Gelslots pipettiert. Durch den Stop-Puffer, der ein hohes spezifisches Gewicht besaß, wurden die Produkte in den Taschen gehalten und an ihrer Diffusion in den Puffer gehindert. Zusätzlich zu den Proben wurde in eine Tasche der Längenstandard ϕ -X-DNA (0.5 µL ϕ -X-RF/HaeIII DNA, 0,5 µL Stop Puffer, 5 µL Aqua dest.) gegeben, um so die Größen der PCR-Produkte bestimmen zu können. Die Banden des Längenstandards hatten folgende Molekulargrößen (in Basenpaaren (bp)): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 234, 194, 118, 72.

3.7.3 Durchführung der Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte mit 80 Volt Gleichspannung über 60 Minuten. Die DNA wanderte im elektrischen Feld vom negativen zum positiven Pol. Abhängig von ihrer Molekülgröße bewegten sich die PCR-Produkte mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel, so dass ihre Größe anhand des mitlaufenden Längenstandards bestimmt werden konnte.

3.7.4 Färbung und Dokumentation

Die Färbung der Gele erfolgte in Ethidiumbromidlösung für ca. 5-10 Minuten. Anschließend folgte eine Entfärbung (Aqua dest. / 1 x TBE je 40 ml) für ca. 5 Minuten, beides auf einem Schüttler .

Bei einer guten Qualität der PCR-Produkte waren diese auf einem UV-Leuchttisch mit einer Wellenlänge von 302 nm als deutliche, scharf gegen die Umgebung abgegrenzte Banden sichtbar (siehe Abb. 4.1). Zur Dokumentation wurde ein computergestütztes Geldokumentationssystem benutzt, mit dem die Gele fotografiert und die Bilder von den Gelen ausgedruckt wurden.

Da mit dieser Methode eine Aussage über die Länge der DNA-Fragmente gemacht werden kann, eignete sie sich auch zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, welche durch Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden und so ihre Länge verändern. Das Hinzukommen oder der Wegfall von Schnittstellen konnte so nachgewiesen werden (siehe hierzu Abb. 4.7-10).

3.8 Untersuchung von DNA-Einzelstrangkonnformationspolymorphismen in PCR-Produkten (SSCP-Elektrophorese)

3.8.1 Prinzipien der SSCP-Analyse

Mit einer SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) Analyse ist es möglich, einige hundert Basenpaare lange DNA-Fragmente, welche zuvor durch eine PCR vervielfältigt wurden, auf Mutationen und Polymorphismen zu untersuchen. Größe, Ladung und Struktur eines Moleküls sind für die Laufeigenschaften in einer Gelelektrophorese maßgeblich. In nicht denaturierenden Bedingungen faltet sich ein DNA-Einzelstrang durch Interaktionen zwischen den Nukleotidbasen zu einer typischen Struktur, welche die Laufeigenschaft im Gel mitbestimmt. Schon eine Basensubstitution kann die gefaltete Struktur des Moleküls entscheidend verändern, so dass sich das Laufverhalten im Gel deutlich von der nichtmutierten Probe unterscheidet. Hierdurch ist es möglich, aus einem mehrere hundert Basenpaare langen DNA-Fragment eine einzelne Basensubstitution darzustellen. Für die SSCP-Analyse werden die Proben zunächst thermisch denaturiert, damit sie in Einzelsträngen vorliegen, um diese dann unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Gel aufzutrennen. Für die Suche nach Punktmutationen sind besonders DNA-Fragmente mit einer Länge bis zu 400 bp geeignet, längere Fragmente können mit einer Restriktionsendonuklease in kleinere Fragmente zerlegt werden.

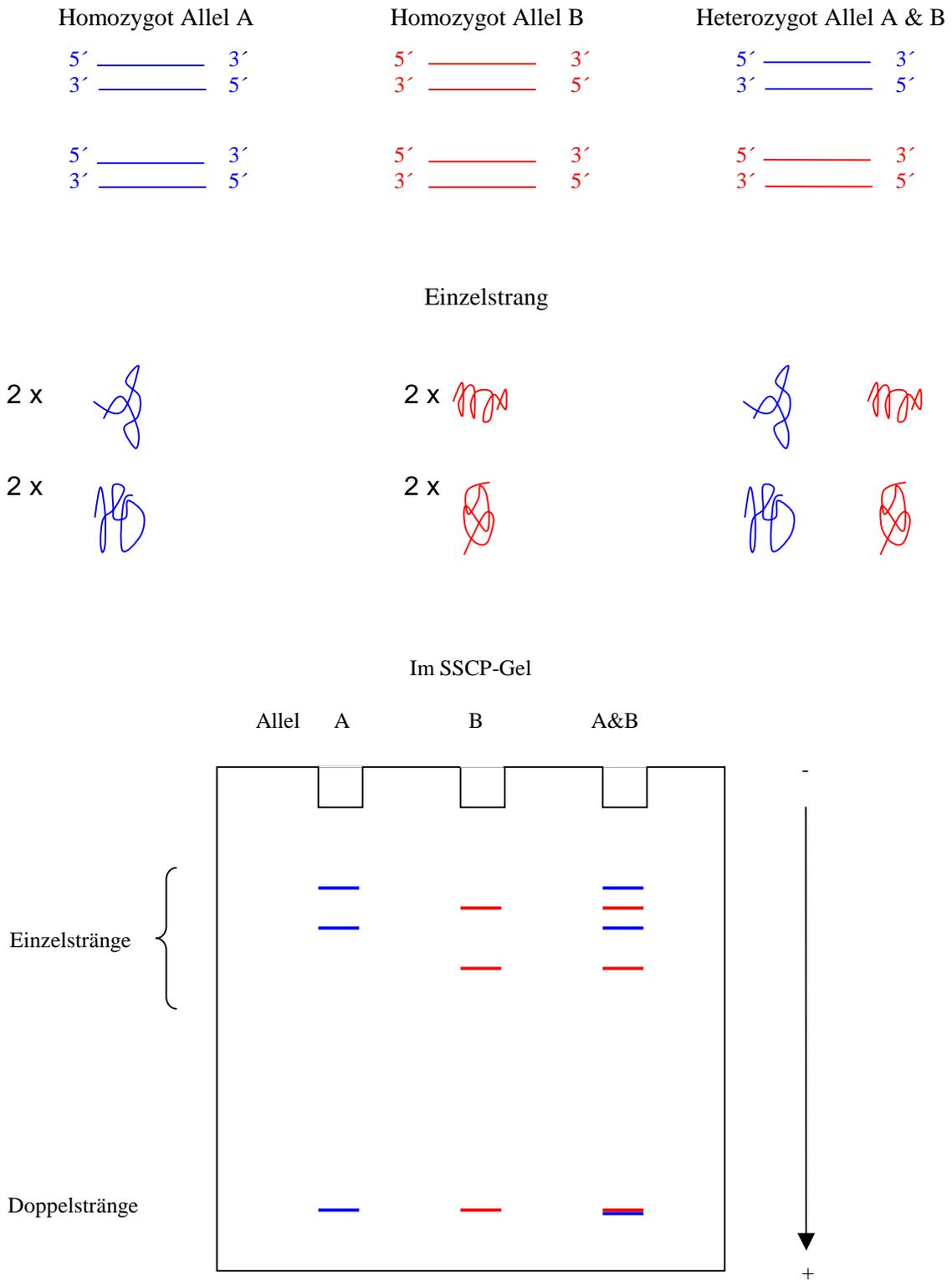


Abb. 3.1: Das Prinzip der SSCP-Gelelektrophorese

3.8.2 Herstellung der SSCP-Gele

Für die Analyse wurden 8% Polyacrylamidgele verwendet. Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, wurden die Analysen einmal mit und einmal ohne 10% Glycerolzusatz durchgeführt. Die Gele und der Elektrophoresepuffer enthielten 1 x TBE. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht. Zum Gießen der Gele wurde eine kleinere Glasplatte (335 x 400 x 5 mm) so auf eine größere (335 x 415 x 5 mm) gelegt, dass diese an den Unterkanten bündig miteinander abschlossen. Zuvor wurden auf die untere Glasplatte zwei 0,5 mm dicke und 1 cm breite Kunststoffstreifen, sogenannte Spacer, gelegt, so dass ein Zwischenraum von 0,5 mm zwischen den Glasplatten entstand. Die zwei Spacer lagen links und rechts an den Längsseiten zwischen den Glasplatten und begrenzten so den Raum für das Gel. Die Glasplatten wurden mit Klammern miteinander fixiert. Der Spalt an den Unterkanten der Glasplatten wurde mit einem Klebeband verschlossen. Hiernach wurde die Polyacrylamidlösung hergestellt. Hautkontakt war hierbei unbedingt durch den Gebrauch von Handschuhen zu vermeiden, da Polyacrylamid (PAA) neurotoxisch wirkt und über die Haut aufgenommen werden kann. Folgende Polyacrylamidlösungen wurden für die verschiedenen SSCP-Gele verwendet:

SSCP-Gel (8 % Polyacrylamid, 1 % TBE)

TBE 5x	24 ml
30 % PAA	32 ml
Aqua. dest.	63 ml
10 % APS	1 ml
TEMED	50 µl

SSCP-Gel (8% Polyacrylamid, 10 % Glycerol, 1 % TBE)

TBE 5x	24 ml
30 % PAA	32 ml
Aqua. dest.	51 ml
Glycerol	12 ml
10 % APS	1 ml
TEMED	50 µl

Das Gießen des Gels musste unmittelbar nach der Herstellung der Lösung erfolgen, da N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Radikal die Polymerisation startet. Ammoniumpersulfat (APS) diente als Katalysator der Reaktion. Das Gießen sollte blasenfrei zwischen die Glasplatten erfolgen. Hierbei zeigte sich, ob die Glasplatten vor dem Zusammenbau ausreichend gereinigt und entfettet wurden, weil Verunreinigungen auf den Glasplatten das blasenfreie Gelgießen stark behindern. Anschließend wurde ein 0,5 mm dicker Kamm in den oberen Spalt der Glasplatten geschoben, um nach Auspolymerisation des Gels Taschen für die Proben zu erhalten. Nach ca. 30 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen und das Gel konnte verwendet werden. Der Kamm wurde vorsichtig herausgezogen und das Gel mit den Glasplatten in die Elektrophoreseeinheit eingespannt. Hierbei war das Gel vertikal angeordnet und die kleinere Glasplatte der oberen Pufferkammer zugewandt. Beide Pufferkammern wurden mit 1 x TBE geflutet. Hierbei war zu beachten, dass an der Unterkante des Gels zwischen den Glasplatten keine Luftblasen verblieben. Die Geltaschen an der Oberseite des Gels wurden gründlich mit einer mit TBE gefüllten Spritze gespült, um Gelreste und nichtpolymerisiertes Acrylamid aus den Taschen zu waschen. Die Vorbereitung des Gels schloss mit einem Vorlauf von 20 Minuten bei 5 Watt ab, um mögliche Verunreinigungen aus dem Gel zu beseitigen.

3.8.3 Probenvorbereitung und Polyacrylamidelektrophorese

5 µL PCR-Produkt und 7 µL Formamid-Ladepuffer wurden in ein Eppendorf-Tube pipettiert und anschließend für 10 Minuten im Wärmeblock bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben zügig auf Eis gelegt, um ein erneutes Hybridisieren der DNA zu verhindern. Dennoch lässt sich eine Rehybridisierung nur teilweise verhindern, so dass sich in jedem SSCP-Gel auch die doppelsträngige DNA darstellt. Diese liegt, da sie schneller durchs Gel wandert als die Einzelstränge, in Laufrichtung vor den Einzelsträngen. Anschließend wurden die auf Eis stehenden Proben vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Es wurde eine Leistung von 5 Watt angelegt und die Proben im Gel für 15-20 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Durch zwei

Farbstoffe im Formamidpuffer konnte gut abgeschätzt werden, wie weit die Proben im Gel gewandert waren.

Nach dem Abschluss der Elektrophorese wurden die Glasscheiben mit dem Gel aus der Elektrophoreseapparatur genommen, nachdem der Puffer aus den Pufferkammern entleert worden war. Die Scheiben wurden vorsichtig voneinander gelöst und das Gel in eine Fixierwanne überführt.

3.8.4 Fixierung, Färbung und Dokumentation des SSCP-Polyacrylamidgels

In dieser Arbeit wurde die Silberfärbungsmethode zur Darstellung der DNA-Banden im Polyacrylamidgel benutzt. Zur Fixierung der Proben im Polyacrylamidgel wurde das Gel bei Zimmertemperatur 10 Minuten im 10% Ethanolbad (30 ml Ethanol absolut und 270 ml Aqua dest.) vorsichtig auf dem Schüttler geschwenkt, die Flüssigkeit mit der Vakuumpumpe abgesogen und anschließend 300 ml einer 1% HNO₃ Lösung in die Färbeschale mit dem Gel gegeben. Das Gel wurde zwei Minuten auf dem Schüttler inkubiert, die Lösung wiederum abgesogen und verworfen.

Es erfolgte ein zweimaliges Waschen des Gels in je 300 ml Aqua dest.

Das Gel wurde in die „Silberbadschale“ gelegt und für 30 Minuten im Silberbad inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit durch den Kohlefilter gegeben, in einem Kanister gesammelt und dann durch einen Fachbetrieb entsorgt.

Es erfolgte erneut ein zweimaliges Waschen mit Aqua dest.

Zur Entwicklung wurde das Gel in die Entwicklungsschale überführt und 300 ml Entwicklerlösung hinzugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation wurde die Entwicklerlösung erneuert und das Gel so lange inkubiert, bis eine optimale Färbung erreicht war. Diese war nach etwa 20-25 Minuten Gesamtinkubation in der Entwicklerlösung zu erwarten. Die Entwicklerlösung wurde ebenfalls durch Kohle gefiltert, in einem Kanister gesammelt und dann durch einen Fachbetrieb entsorgt.

Durch 2-3 minütige Inkubation mit 10% Essigsäure (30 ml Essig in 270 ml Aqua dest) wurde die Reaktion abgestoppt, die Flüssigkeit wurde wiederum abgesogen und das Gel in eine Folie geschweißt und beschriftet.

Die Gele wurden auf einem Leuchttisch fotografiert und im Kühlraum bei 4°C bei Dunkelheit gelagert.

3.9 DNA-Sequenzierung

3.9.1 Das Prinzip der DNA-Sequenzierung

Durch die DNA-Sequenzierung wird die Basenreihenfolge in der DNA bestimmt. Verwendet wurde hierfür nicht die genomische DNA, sondern ein PCR-Produkt von dem Abschnitt, welches sequenziert werden sollte. In der folgenden Reaktion konnte hierdurch eine deutlich größere Ausbeute erzielt werden, da der betreffende Abschnitt in zahlreichen Kopien vorlag und die Ausbeute hiervon abhing.

Durch Erhitzen auf 96°C wurde das PCR-Produkt in Einzelstränge aufgespalten. Es folgte eine Hybridisierung mit einem Primer durch Abkühlen auf 60°C. Hierfür konnte ein Primer des Primerpaares verwendet werden, welcher schon für die Synthetisierung des PCR-Produkts Verwendung fand. Durch den Einsatz nur eines Primers wurde auch nur ein Strang der PCR-DNA amplifiziert.

Zusätzlich zu den Desoxynukleotiden fanden auch Didesoxynukleotide (ddATP, ddTTP, ddGTP, und ddCTP) Verwendung. Didesoxynukleotide sind Nukleotidanaloga und führen, wenn sie in den DNA-Strang eingefügt werden, zum Kettenabbruch, da die 3'-OH-Gruppe fehlt, an die das nächste Nukleotid gebunden werden könnte. So entstehen in der Sequenzierungs-PCR unterschiedlich lange Ketten, welche alle mit einem Didesoxynukleotid enden. Das PCR-Produkt wird auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Bei der BigDye Terminator Sequenzierung, die in dieser Arbeit verwendet wurde, sind die vier unterschiedlichen Didesoxynucleotide mit jeweils einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Der Counter registriert die Reihenfolge der Fluoreszenzsignale und kann so aus dem Farbcode im Gel die Nukleotidsequenz ableiten. Diese Methode bedeutet eine große Erleichterung gegenüber älteren Verfahren mit nicht fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Hierbei mussten vier Sequenzierungsreaktionen mit p32 markierten Nukleotiden mit jeweils einem Didesoxynucleotid durchgeführt werden. Die Produkte wurden dann in nebeneinanderliegenden Spuren im Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet.

3.9.2 Reinigung der PCR-Produkte durch Fällung in Ammoniumacetat – Äthanollösung

Bevor die PCR-Produkte durch die Sequenzierungs-PCR amplifiziert werden konnten, mussten sie zunächst aufgereinigt werden. Hierzu wurden 20µL des PCR-Produkts, 120µL 100% Ethanol und 20µL Ammoniumacetat 4 Molar in ein autoklaviertes Eppendorf-Tube pipettiert und anschließend für 15 Minuten mit 13.000 UpM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und dann wurden 200µL 70% Ethanol zum Waschen hinzugegeben.

Es erfolgte erneut eine Zentrifugierung für 10 Minuten bei 13.000 UpM. Der Überstand wurde dann vorsichtig mit der Pipette abgenommen und verworfen, die Probe wurde im Tube bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde sie in 30µL Elutionspuffer (TE 0,1 mM, pH 8,0) gelöst, und bei 4°C gelagert.

3.9.3 Sequenzierungs-PCR

Es wurde ein Kit der Firma Applied Biosystems (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycles Sequencing Ready Reacting Kit) mit Ampli Taq-Polymerase, Big Dye benutzt.

Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Gesamtansatz von 10 µL :

- Big Dye Ready Reaction Mix	2	µL
- PCR-Produkt	5	µL
- Primer 2 pmol	0,5	µL
- Aqua dest.	2,5	µL

Die Sequenzierung-PCR der Proben wurde mit dem DNA-Sequenzer "Perkin Elmer Gene Amp PCR Systems 2400" durchgeführt.

Folgendes Programm wurde verwendet:

96°C	60	Sec	einmalig zu Beginn der Reaktion
96°C	25	Sec	} 25 Zyklen
50°C	5	Sec	
60°C	4	Minuten	
Abkühlen der Proben auf 4°C			einmalig zum Abschluss der Reaktion

3.9.4 Ethanol-Präzipitation und Sequenzierung der Produkte

Die Sequenzierungsprodukte wurden durch Ethanol-Präzipitation von überschüssigen Terminatoren und Primern gereinigt. In ein 1,5 ml Mikrozentrifugentube wurde 1 μ L Natriumacetat (3 M, pH 4,6), 29 μ L Ethanol 100% und 20 μ L PCR-Sequenzierungsprodukt pipettiert, gut geschüttelt und für 10 min auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten in der Eppendorfzentrifuge mit 13.000 UpM zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes ohne Berührung des durchsichtigen Pellets, dessen Lage durch festgelegte Position der Eppendorf-Tubes in der Zentrifuge bekannt war, wurde die Probe mit 200 μ L Ethanol 70% gewaschen und erneut für 20 Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgehoben und das Pellet luftgetrocknet. Das getrocknete PCR-Produkt wurde mit 20 μ L Template mixture (Applied Biosystems) aufgenommen. Die gelösten Proben wurden für 2 Minuten auf 90°C erhitzt, danach auf Eis gestellt und anschließend mit dem Applied Biosystems Sequenziergerät 310 bzw. 377 analysiert. Ein Laser der Wellenlänge 488 nm regte die Fluoreszenzfarbstoffe im Gel an. Das Emissionslicht der Farbstoffe wurde über einen Spektrographen in Spektralfarben zerlegt und diese mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Mit Hilfe eines Computers und einer Auswertesoftware wurden die Sequenz erstellt und dokumentiert.

3.10 Restriktionsenzymverdau

Durch Restriktionsenzyme ist es möglich, DNA gezielt an definierten Positionen zu zerschneiden. Die Schnittpositionen sind durch enzymespezifische Sequenzen von ca. fünf Basenpaaren festgelegt und für nahezu jedes Restriktionsenzym unterschiedlich. Liegt eine Mutation in einer DNA-Sequenz die durch ein Enzym erkannt wird, ist es möglich, diese durch den DNA-Verdau zu untersuchen, da durch die Veränderung eine vorhandene Schnittstelle verloren geht oder aber neu hinzu kommt. Somit können Veränderungen in kleinen definierten Abschnitten der Basensequenz detektiert werden, ohne diesen Abschnitt zu sequenzieren. Dies ist weniger aufwendig und bietet sich an, wenn nur einzelne Basensubstitutionen in einem PCR-Produkt untersucht werden sollen.

Zunächst erfolgte eine Amplifikation der DNA durch die PCR. Hiernach wurde das PCR-Produkt geschnitten und in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht begutachtet und mit Hilfe des computergestützten Bilddokumentationssystems fotografiert. Entsteht eine Schnittstelle durch eine Mutation, zeigt der Wildtyp nur eine Bande auf Höhe des ungeschnittenen PCR-Produkts. Ein homozygoter Mutationsträger würde zwei Banden in der Höhe der beiden Schnittfragmente aufzeigen. Ein heterozygoter hingegen drei Banden auf Höhe des ungeschnittenen PCR-Produkts und der beiden Schnittfragmente, weil nur ein Allel geschnitten wurde. Aus Praktikabilitätsgründen ist darauf zu achten, dass neben der zu beurteilenden Schnittstelle nicht zahlreiche weitere Schnittstellen im PCR-Produkt vorliegen, da sonst zahlreiche DNA-Fragmente entstehen und diese die Beurteilung erschweren. Idealerweise gibt es neben der zu beurteilenden Schnittstelle keine weiteren Schnittstellen.

In dieser Arbeit sind fünf Restriktionsendonukleasen verwendet worden, die von "New England Biolabs" bezogen wurden. Die Reaktionsansätze für jedes Enzym sind der Tabelle 3.1 aufgeführt. Es wurde jeweils der empfohlene Reaktionspuffer verwendet, der mit dem Enzym mitgeliefert wurde. Die Inkubation erfolgte für alle Enzyme für 12 Stunden bei 37°C.

	<i>NcoI</i> 10 U/ μ L	<i>BspHI</i> 10 U/ μ L	<i>RsaII</i> 10 U/ μ L	<i>BsrBI</i> 10 U/ μ L	<i>HgaI</i> 2 U/ μ L
<i>Reaktionspuffer</i>	2,5	2,5	2,5	2	2
<i>Enzym</i>	2	2	2	1,5	2
<i>PCR-Produkt</i>	10	10	10	10	10
<i>Aqua dest.</i>	10,5	10,5	10,5	6,5	6
<i>Gesamtansatz</i>	25	25	25	20	20

Tab. 3.1: Reaktionsansätze für den Restriktionsenzymverdau. Mengenangaben in μ L

3.11.1 Spektrophotometrie

Mit dieser Methode wird die optische Dichte (OD) einer definierten Verdünnung der zu bestimmenden DNA-Lösung mit einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte von 1,0 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Qualität der präparierten DNA kann bestimmt werden, indem der Quotient OD 260 nm/OD 280nm gebildet wird. Ein Wert von 1,8 bis 2,0 spricht für eine gut aufgereinigte DNA ohne Proteinrückstände.

3.11.2 DNA-Konzentrationsabschätzung mittels eines DNA-Standards

Die DNA-Konzentration kann auch bestimmt werden, indem die Probe zusammen mit einer Verdünnungsreihe DNA bekannter Konzentration auf einem Agarosegel aufgetragen wird.

Durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der Probe mit der Verdünnungsreihe kann die Konzentration abgeschätzt werden.

Eine interessante Variante dieser Methode ist die Verwendung eines Längenmarkers, da hier die Fragmentlänge und die gesamt aufgetragene DNA-Menge bekannt ist. Die Bandenintensitäten können mit der Probe verglichen und die Menge abgeschätzt werden.

4 Ergebnisse

4.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Qualitätskontrolle durch die Gelelektrophorese

Die genetische Untersuchung der Patienten in dieser Arbeit sollte auf zwei Regionen des *RYR1*-Gens auf Chromosom 19q13.1-q13.2 beschränkt bleiben, in denen schon für die MH prädisponierende Mutationen gefunden wurden und somit die Mutationssuche besonders erfolgsversprechend erschien (siehe Kap 2.6). Es sollte als erste Region die Exons 2,6,8,9,11,14,15,17 und als zweite die Exons 39,40,45,46 des Gens analysiert werden. Die Sequenz des Gens inklusive der flankierenden Introns waren bekannt (Phillips et al.1996) und in der NCBI-Gendatenbank verfügbar, so dass aus ihr korrespondierende ca. 21 bp lange Oligonucleotide abgeleitet werden können, um sie als Primer zu nutzen. Dies geschah für jedes Exon sowohl in der 5´-3´als auch in der 3´-5´Richtung in ausreichendem Abstand zum Exon. Es entstand so ein Primerpaar, welches sich in der Annealing-Phase der PCR jeweils auf dem DNA-Vorwärtsstrang vor und auf dem DNA-Rückwärtsstrang hinter dem zu amplifizierenden Exon anlagerte. In der PCR wurden so zwei miteinander korrespondierende DNA-Einzelstränge synthetisiert, welche das zu untersuchende Exon abbildeten. Vor und hinter dem Exon wurde zusätzlich auch immer noch ein mehr oder minder großer Abschnitt der flankierenden Introns mitsynthetisiert.

Nach Beendigung der PCR wurden 5 µL des PCR-Produkts im 2%igem Agarosegel getestet. Hierbei wurde überprüft, ob in der PCR das gewünschte DNA-Fragment in ausreichender Menge synthetisiert wurde und ob es unerwünschte Nebenprodukte gab.

Ein gutes Ergebnis zeigte sich durch eine scharf von der Umgebung abgegrenzte Bande auf dem Gel, die der zu erwartenden Größe des DNA-Produkts entsprach. Diese konnte durch den verwendeten Längenstandard ϕ X 174 RF/Hae III ermittelt werden. Die mit dem selben Primerpaar erzeugten DNA-Fragmente sollten hierbei stets die gleiche Länge haben. Eine zu schwache Bande als Hinweis für eine geringe DNA-Synthese erforderte eine

Optimierung der PCR-Bedingung. Dies wurde häufig schon durch eine Herabsetzung der Annealingtemperatur erreicht, weil hierdurch die Anlagerung des Primers an die korrespondierende DNA erleichtert wurde.

Traten neben der erwünschten Hauptbande weitere, in der Regel schwächere Banden auf, war dies ein Zeichen für unerwünschte Nebenprodukte. Da diese die Ergebnisse verfälschen können, sollten sie möglichst vermieden werden. Sie entstehen zumeist, wenn sich Basensequenzen in anderen DNA-Abschnitten nur minimal von der korrespondierenden Primersequenz unterscheiden. Eine zu niedrig gewählte Annealingtemperatur kann zur Hybridisierung der Primer an diese DNA-Abschnitte führen. Durch stringenter Reaktionsbedingungen kann dies meist vermieden werden. Eine Anhebung der Annealingtemperatur führt in der Regel dazu, dass der Primer sich nur noch an die vollständig korrespondierenden DNA-Sequenz anlagert. Allerdings verringert sich hierbei häufig auch die Ausbeute des Hauptprodukts.

Wurde bei einem Primerpaar auch bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen überhaupt kein PCR-Produkt erhalten, deutete dies auf eine ungünstige Magnesiumkonzentration im Ansatz oder einen fehlerhaften Primer hin. Neben einem Ablesefehler beim Primerdesign und einer fehlerhaften Synthese des Oligonukleotids kam auch eine fehlerhafte Vorlage der Basensequenz als mögliche Ursache für den Misserfolg in Frage.

Die PCR wurde mit drei verschiedenen Taq-Polymerasen durchgeführt. Der Großteil aller Exons wurde mit der HotStar® Taq-DNA-Polymerase der Firma Qiagen amplifiziert, die als Hotstar-Mastermix bereits fertig zur Verwendung mit MgCl₂, dNTP's und PCR-Puffer gemischt war. Folgendes Thermozyklerprogramm wurde verwendet:

95°C	18	Minuten	einmalig zu Beginn der Reaktion
95°C	60	Sec	} 35 Zyklen
60°C	45	Sec	
72°C	120	Sec	
72°C	5	Minuten	einmalig zum Abschluss der Reaktion

Für die Exons 8, 9, 17, 39 konnten mit dem Programm gute Produkte synthetisiert werden, so dass die Reaktionsbedingungen nicht weiter angepasst werden mussten. Die Exons 8 und 9 sind mit 94 bp und 75 bp recht klein, zwischen ihnen liegt ein Intron mit 129 bp. Es konnten deshalb beide Exons zusammen in einem PCR-Produkt synthetisiert werden. Bei den Primern der Exons 2, 6, 11, 14, 15, 40, 45, 46 mussten die Reaktionsbedingungen angepasst werden. Es zeigte sich, dass die Variation der $MgCl_2$ -Konzentration keinen großen Einfluss auf die Produktsynthese hatte. Offenbar sind die verwendeten Polymerasen bereits so optimiert, dass sie bei 1,5 mM $MgCl_2$ die größte Effizienz besitzen. Die besten Resultate konnten über eine Anpassung der Annealingtemperatur erreicht werden. Für die Exons 6 und 46 erwies sich eine Annealingtemperatur von 58°C als optimal, für das Exon 45 musste die Annealingtemperatur auf 63°C gesteigert werden.

Für einige Exons konnte jedoch mit dem Taq-Mastermix von Qiagen keine befriedigenden PCR-Produkte erzeugt werden, so dass der Platinum-Mastermix von Gibco oder die Taq-Polymerase von Gibco verwendet wurde. Hierbei wurde die Dauer des initialen Schritts der PCR, wie im Kapitel 3 beschrieben, an die Taq-Polymerase angepasst. Die PCR mit dem Exon 11 erzeugte mit dem Qiagen-Mastermix einige Nebenbanden, die auch bei einer Steigerung der Annealingtemperatur auf 64°C noch vorhanden waren. Die Verwendung des Platinum-Mastermix und eine Annealintemperatur von 64°C verringerte die Synthese der Nebenprodukte so, dass diese die nachfolgenden Analysen nicht negativ beeinflussten. Die PCR des Exons 40 erbrachte mit dem Platinum-Mastermix und einer Annealingtemperatur von 63°C die besten Ergebnisse. Die Synthese des Exons 2 gelang mit der Taq-Polymerase von Gibco bei 56°C. Unter wärmeren Bedingungen waren die Primer des Exons 2 offenbar nicht in der Lage, Hybride mit der DNA zu bilden.

Es war vorgesehen, die Exons 14/15 gemeinsam zu synthetisieren. Die Längen der Exons von 136 bp bzw. 96 bp sind kurz, und zusammen mit dem Intron von 83 bp ergibt sich eine Gesamtlänge von 315bp. Die Primer 14F und 15R wurden so gewählt, dass sich eine Produktlänge von 459 bp ergab. Die Synthese gelang weder mit der Taq-Mastermix von Qiagen noch mit der Taq-

Polymerase von Gibco, obwohl diverse Reaktionsbedingungen ausgetestet wurden und eine Produktgröße von 459bp als unproblematisch gilt.

In einem zweiten Schritt wurde deshalb eine getrennte Synthese der Exons angestrebt und hierfür im Intron 14 zwei Sequenzen für die Primer 14R und 15F ausgewählt. Die PCR des Exons 14 erbrachte mit dem Primerpaar 14F/14R unter Standardbedingungen mit dem Quiagen-Mastermix und 60°C Annealintemperatur gute Ergebnisse.

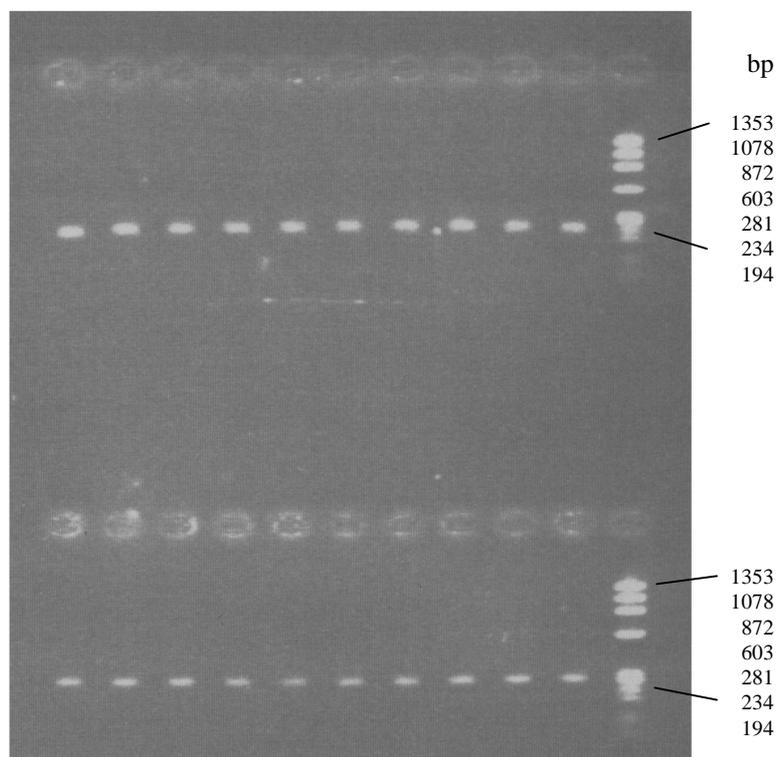


Abb. 4.1: In der oberen Zeile des Gels sind zehn PCR-Produkte des Exons 6 mit einer Größe von 237 bp und in der unteren Zeile PCR-Produkte des Exons 14 mit einer Größe von 289 bp aufgetragen. Die Produktgrößen korrelieren sehr gut mit den Banden des Längenmarkers, welcher rechts auf das Agarosegel aufgetragen wurde.

Das Exon 15 war mit dem Primerpaar 15F/15R nicht zu vervielfältigen. Die spätere Sequenzierung des Exons 14 mit einem Teil des Introns 14 zeigte hierfür die Ursache, da der Primer 15F innerhalb des PCR-Produkts des Primerpaares 14F/R lag. Ein Fehler in der publizierten Sequenz der NCBI-Gendatenbank im Intron 14 genau an der Stelle, an welcher der Primer 15F

hybridisieren sollte, verhinderte dies (Weiteres hierzu im Kapitel 4.3. und Abbildung 4.5).

Ein zweiter Primer 15F2 erbrachte dann den erwünschten Erfolg. Es gelang eine Synthese des Exons 15 bei einer Annealingtemperatur von 58° mit der Platinum[®]-Polymerase von BRL. Mit dem Taq-Mastermix von Quiagen und der Hotstar-Polymerase gelang die Synthese nicht. Eine Synthese beider Exons in einem PCR-Produkt mit der Platinum[®]-Polymerase von BRL wurde im Nachhinein nicht mehr versucht.

Schließlich gelang es, bei allen Exons, die untersucht werden sollten, gute bzw. befriedigende PCR-Produkte zu synthetisieren, um diese in den nachfolgenden Analysen weiter zu charakterisieren.

4.2 SSCP-Mutationsanalyse

Wie im Kapitel 3 beschrieben, wurden die denaturierten PCR-Produkte der Exons 2, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 17, 39, 40, 45, 46 unter unterschiedlichen Laufbedingungen untersucht. Hierfür wurden 8%ige Polyacrylamidgele mit 10%igem Glycerolzusatz und ohne Glycerolzusatz mit 1%igem TBE-Puffer verwendet. Der Lauf erfolgte bei Raumtemperatur. Es zeigte sich, dass das Gießen der Gele nicht immer einfach gelang. Schon kleinste Unreinheiten, insbesondere Fette auf der Innerseite der Glasplatte, führten leicht zur Blasenbildung im Gel, so dass ein sehr gründliches Reinigen der Glasplatten und einige Übung beim Pipettieren des Acrylamid zwischen die Glasplatten notwendig war, um befriedigende Gele herzustellen. Besonders wichtig war es, die denaturierten Proben nach dem Erhitzen auf 95° im Eis abzuschrecken, um zu verhindern, dass die Einzelstränge wieder mit dem komplementären DNA-Strängen hybridisieren. Nur so lagen sie für die Analyse in Einzelstrangkongformation vor. Auch die Färbeprozedur der 1mm dünnen Gele erforderte Geschick, wenn diese als ganzes erhalten bleiben sollten. Besonders die 10%igen Glycerolgele neigten beim Färben zum Aufquellen und wurden weich.

Bei der SSCP-Mutationsanalyse der Exons 14, 17 und 40 konnten vom Wildtyp abweichende Wanderungsmuster der Banden nachgewiesen werden. Hierbei

zeigten sich die Shifts der Banden im Exon 17 und 40 am Besten in 1%igen TBE-Gelen (8% PAA) ohne Glycerol, die über Nacht bei 4 Watt Leistung aufgetrennt wurden. Das veränderte Bandenmuster im Exon 14 konnte hingegen ausschließlich auf 1 %igen TBE-Gelen (8 % PAA) mit 10% Glycerol nachgewiesen werden. Um die Sensitivität der Methode weiter zu erhöhen, wurden bei einigen Exons, die ein unauffälliges Laufverhalten unter den genannten Bedingungen zeigten, der Lauf im 8% Polyacrylamidgel ohne Glycerol bei 4°C im Kühlraum wiederholt. Unter gekühlten Bedingungen konnten keine zusätzlichen Informationen gewonnen werden. Ein Bandenshift in den Proben des Exons 39 zeigte sich unter keiner der Laufbedingungen, obwohl in einer der Proben später eine Mutation nachgewiesen werden konnte.

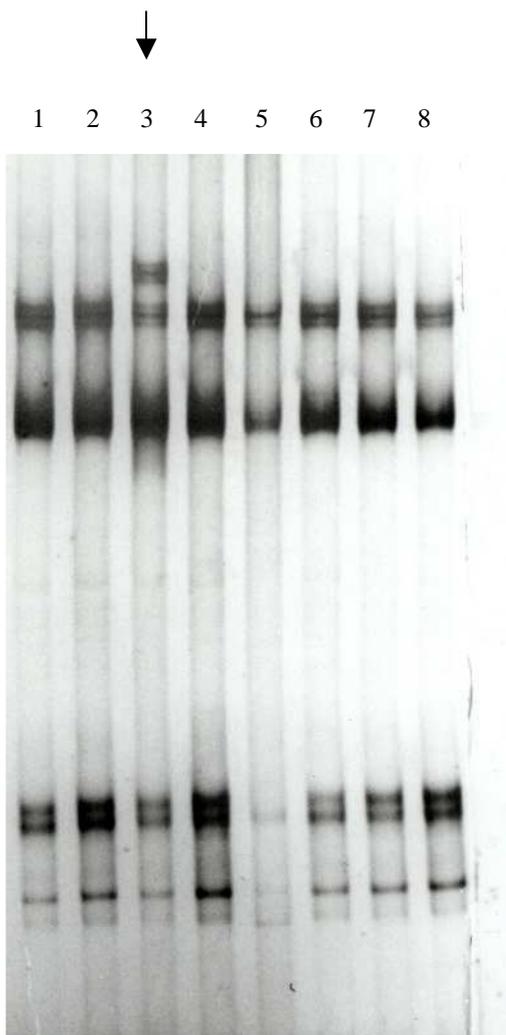


Abb.4.2 SSCP-Gel von Exon 40, mit 1 % TBE ohne Glycerol. Deutlich zu sehen ist der Bandenshift in der dritten Spur.



Abb.4.3 SSCP-Gel von Exon 14, mit 1 % TBE und 10% Glycerol; In der linken Spur lässt sich eine zusätzliche Bande nachweisen

4.3 DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte

Nach der Analyse in der SSCP-Gelelektrophorese sollten die PCR-Produkte sequenziert werden. Durch die Entschlüsselung der Nukleotidsequenz der Patienten-DNA kann diese direkt mit der publizierten NCBI-Genbank verglichen werden. Veränderungen in deren Sequenz lassen sich so aufspüren. Zunächst wurden die Proben analysiert, welche in der SSCP-Gelelektrophorese ein auffälliges Bandenmuster zeigten. Als nächster Schritt wurden dann auch alle übrigen Patientenproben und der überwiegende Teil der Kontrollen auf ihre Nukleotidsequenz hin untersucht. Für die SSCP-Gelelektrophorese mit 5-10% Glycerol wird eine Sensitivität von 99% bzw. 89% für 100-300 bp bzw. 300-450 bp angegeben. Deutlich niedriger liegt die Sensitivität ohne Glycerol, so dass möglicherweise Abweichungen in der DNA mit dieser Methode nicht erfasst werden (Hayashi 1991). Durch eine zusätzliche Sequenzierung sollen auch diese selektiert werden.

Abweichungen der Patienten-DNA von den Genbankdaten müssen ihrer Bedeutung nach unterschieden werden: Missense Mutationen führen zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz. Dies wird, durch Restriktionen oder Deletionen, bei denen ein Abschnitt der DNA fehlt, durch Insertionen, bei denen ein zusätzlicher DNA-Abschnitt in die DNA integriert wird und durch Punktmutationen, bei denen ein Nukleotid durch ein anderes ersetzt wird, verursacht. Stille Mutationen haben meistens keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Zwar wird ein Nukleotid in einem Codon durch ein anderes substituiert, die codierte Aminosäure bleibt jedoch die gleiche. 64 (4^3) unterschiedliche Basentriplets codieren lediglich 21 unterschiedliche Aminosäuren. Dies führt zu Mehrfachbelegung, so dass häufig die dritte Position eines Codons für die Aminosäuresequenz unbedeutend ist. So codieren z.B. CCU, CCC, CCA, CCG die Aminosäure Prolin. Analog gilt dies auch für Leucin, Valinin, Serin, Threonin, Alanin, Arginin und Glycin. Allerdings können stille Mutationen Bedeutung im RNA-Splicing haben, wenn durch sie neue Splicingstellen entstehen und so die Aminosäuresequenz des Proteins verändert wird. Soll diese Möglichkeit ausgeschlossen werden, muss die RNA mittels cDNA-Sequenzierung untersucht werden. Das gleichzeitige Vorkommen von verschiedenen Allelen an einem Locus wird als Polymorphismus

bezeichnet, wenn das Vorkommen nicht allein der Mutationsrate entspricht. Häufig treten diese dort auf, wo eine Nukleotidsubstitution zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führt und diese somit keinen Selektionsdruck unterliegen. Außerdem kann sich ein Polymorphismus entwickeln, wenn die genetische Varianz unter bestimmten Lebensumständen einen Vorteil gegenüber den nicht mutierten besitzt. Ein Beispiel hierfür ist die bessere Malariaresistenz bei Menschen mit Sichelzellenanämie.

Alle Patientenproben wurden zunächst in einer Richtung sequenziert, zumeist vorwärts (5´-3´). Fand sich hierbei eine Auffälligkeit, wurde zur Bestätigung auch die Nukleotidsequenz des komplementären Strangs bestimmt, welcher zuvor durch eine erneute PCR erzeugt wurde. Durch die Synthese eines neuen PCR-Produktes sollten Synthesefehler in der PCR, welche eine Mutation vortäuschen könnten, ausgeschlossen werden. Wurde bei einem Patienten eine abweichende Basensequenz festgestellt, wurde das Exon auch in der Kontrollgruppe mit fünfundzwanzig Gesunden untersucht, um eine Assoziation mit dem Krankheitsbild zu testen.

Die zehn MH-Patienten trugen die Probennummern 1 bis 10; drei als MHE getestete Brüder der MH-Patienten 2, 5 und 8 die Probennummern 11, 12 und 13. Die acht HSS-Patienten wurden mit den Probennummern 21 bis 28 bezeichnet.

Die Sequenzierung im Exon 11 zeigte eine Mutation an der Position 1077 (c.1077C>T). Cytosin wurde in neun Fällen heterozygot und in zwei Fällen homozygot durch Thymin ersetzt. 32 Fälle zeigten den Wildtyp. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. In der Kontrollgruppe wurden nicht alle Proben sequenziert, sondern teilweise durch Restriktionsenzymverdau analysiert (siehe 4.4). Das Vorkommen der Mutation in den Gruppen war in Anbetracht der Kollektivgröße in etwa gleich. Die Position 1077 des Gens kodiert die dritte Position des Codons 359 für Alanin. Durch die Substitution von C durch T an dieser Position kommt es zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz, da nur die ersten beiden Basen Guanin und Cytosin die Aminosäure Adenin codieren. Die dritte Position kann beliebig mit einer der vier Nukleotide besetzt werden. Somit handelt es sich um eine stille Mutation.

Bei der Sequenzierung des Exons 14 wurden auch die letzten 40 Basen des Introns 13 entschlüsselt. Es zeigte sich der Polymorphismus IVS13–23T>C. Sechzehn Proben zeigten Thymin, zehn Proben waren heterozygote Träger des Polymorphismus und wiederum sechzehn zeigten homozygot Cytosin. In einem Patienten (5) fand sich im Exon 14 eine bisher nicht beschriebene heterozygote Punktmutation an der Position 1453. Es wird ein Adenin durch Guanin substituiert (c.1453A>G). Durch diese Veränderung an der erste Position des Codons 485 wird Methionin durch Valin (p.Met485Val) ersetzt. Die Sequenzierung dieser Mutation ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Der als MHE getestete Bruder (12) des Patienten 5 trägt diese Mutation nicht.

Bei der Sequenzierung des Exons 14 zeigte sich, dass die Sequenz im Intron 14, welche zum Teil noch im amplifizierten PCR-Produkt liegt, von der veröffentlichten Sequenz der NCBI-Gendatenbank abweicht. Sechs publizierte Nukleotide finden sich in keiner der sequenzierten Proben. Die Basensequenz 5´-ACCCAG-3´ wird an der Position IVS14+38-43 beschrieben. Außerdem sind sechs Nukleotide weiter in 3´Richtung (IVS14+49) in allen sequenzierten Proben nicht drei Cytosinbasen, wie in den NCBI-Gendatenbank publiziert, sondern vier in Folge angeordnet (siehe Abb.4.5). Da der verwendete Primer 15F auf Basis der veröffentlichten Genbankdaten ausgewählt wurde und dieser genau in der Region hybridisieren sollte, welche von der abweichenden Basensequenz betroffen war, ist der Misserfolg mit dem Primer 15F gut nachvollziehbar. Es kann bei acht von zwanzig Basenpaaren zu keiner homologen Paarbildung des Primers 15F mit der DNA kommen. Eine Hybridbildung zwischen Primer und DNA wird so unmöglich. Im Intron 14 liegen außerdem noch zwei zusätzliche Cytosin zwischen den Basen IVS14+10/11 und IVS14+23/24. Die Gesamtlänge des Exons verkürzt sich deshalb nur um drei Basen auf 80 bp. Da sämtliche Abweichungen im Intron 14 in allen sequenzierten Proben zu finden waren, handelt es sich nicht um Mutationen, sondern um einen Fehler in der publizierten Sequenz der NCBI-Gendatenbank.

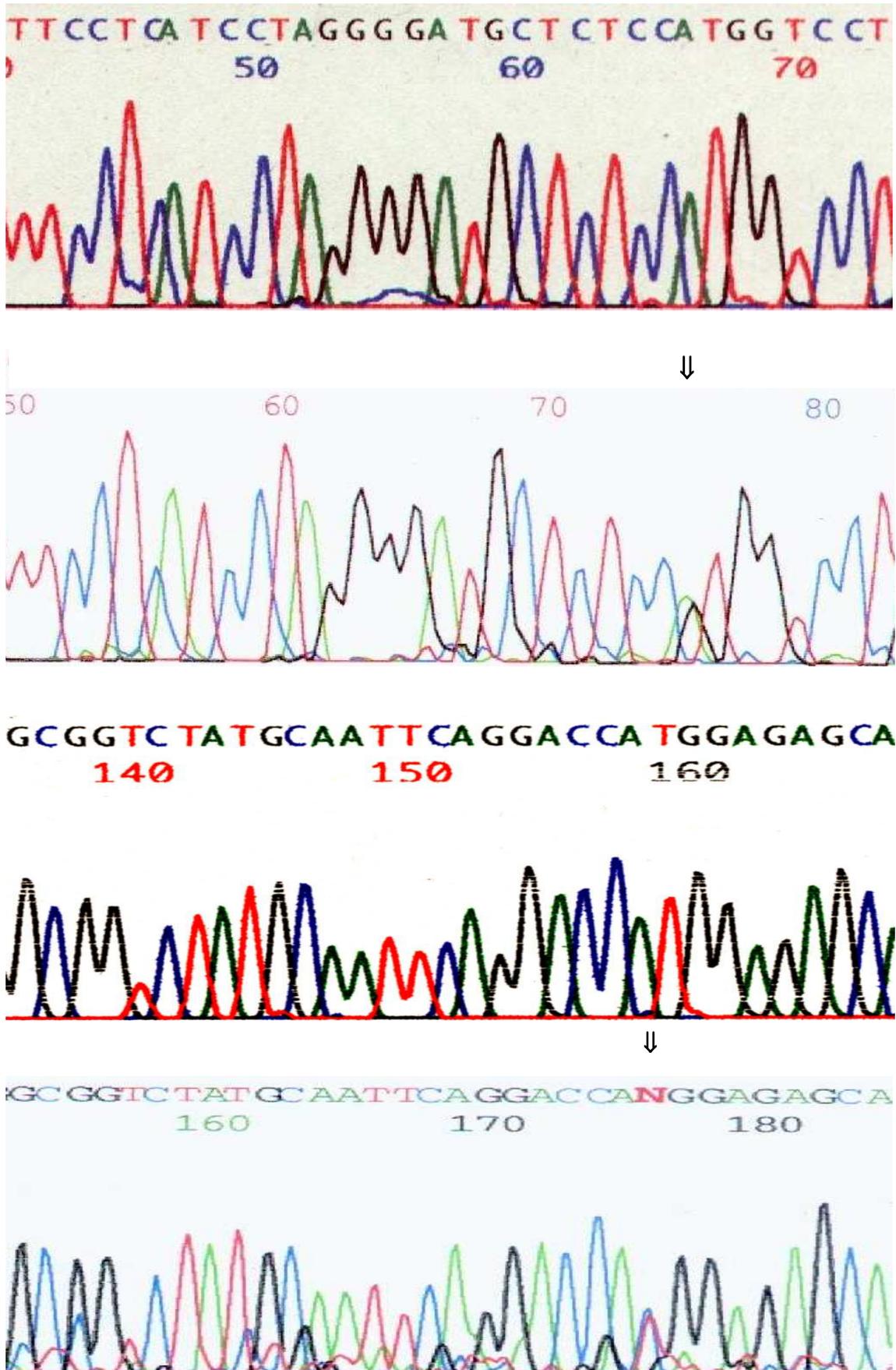


Abb. 4.4: Exon 14: Oben ist eine nichtmutierte Sequenz dargestellt, in der Abbildung darunter ist deutlich die heterozygote Mutation c.1453A>G (Pfeil) zu erkennen. Die dritte Abbildung zeigt die reverse, nichtmutierte Sequenzierung des Exons 14, ganz unten ist die mutierte reverse Sequenz des Patienten 5, die die Mutation bestätigt, abgebildet.

Intron 14

5'-ACCCAGATCCCAGTCCTATT-3' Primersequenz 15F
 5'CACCCCAGATCCCAGATCCCAGTCCTATTGG 3' NCBI-Sequenz

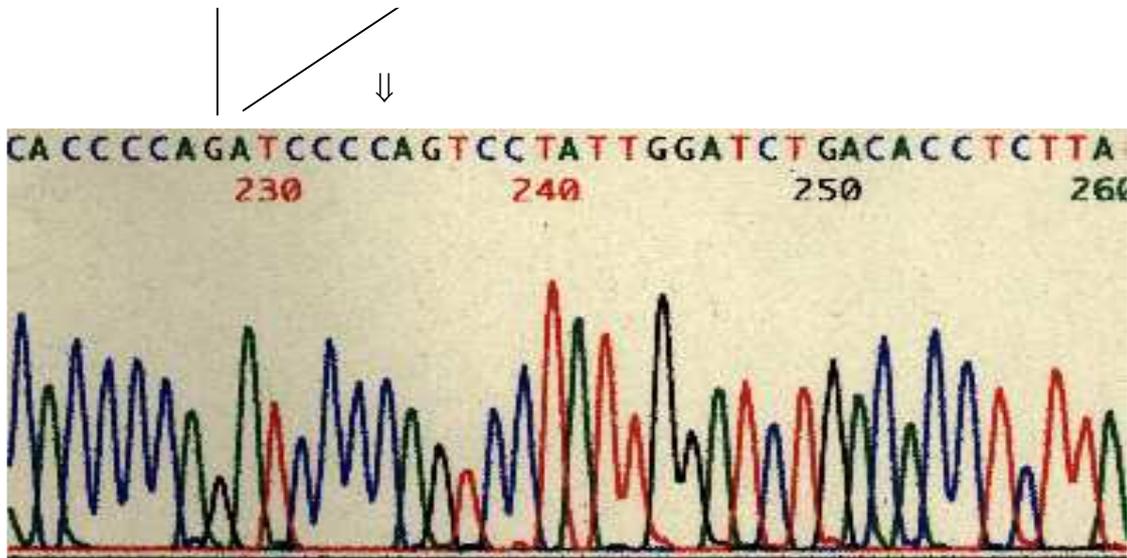


Abb 4.5: Sequenz aller getesteten Proben im Intron 14. Oben Primersequenz und Gendatenbanksequenz

Einen Polymorphismus konnte im Exon 15 detektiert werden. An der Position 1668 des Ryanodinrezeptorgens kommt es zur Substitution eines Guanins durch Adenosin (c.1668G>A). Dieser Polymorphismus ist schon bekannt (Keating et al. 1997). Ein zweiter, bisher nicht beschriebener Polymorphismus liegt an Position 29 des Introns 15 wo ein Guanin durch Cytosin ersetzt (IVS15+29G>C) wird. Interessanterweise geschied dies in allen untersuchten Proben immer parallel zum Polymorphismus c.1668G>A. Eine Änderung der Aminosäuresequenz ergibt sich für die Substitution c.1668G>A nicht. Wieder ist die dritte Base eines Codons (Codon 556) betroffen. UCG und UCA codieren beide Serin. Auch in diesem Fall bleibt die Substitution still. Den Wildtyp zeigten nur fünf Proben, zweiundzwanzig sind heterozygote Träger des Polymorphismus und sechzehn waren homozygot mutiert.

Im Intron 16 findet sich bei allen Proben an Position IVS16-8 nicht, wie in der NCBI-Gendatenbank publiziert ein Guanin, sondern ein Cytosin (IVS16-8G>C). Hier handelt es sich, da alle Proben in diesem Nukleotid identisch sind, um einen Fehler der Gendatenbank.

In einem MH-Patienten (3) konnte die Mutation c.1840C>T im Exon 17 detektiert werden. Diese Mutation konnte bereits bei zahlreichen MH-Patienten anderer Arbeitsgruppen nachgewiesen werden. Durch die Substitution c.1840C>T wird Arginin an Position 614 durch Cystein (p.Arg614Cys) ersetzt.

Eine bisher nicht publizierte Mutation im Exon 39 konnte in einem MH-Patienten (8) nachgewiesen werden. An Position 6385 des *RYR1*-Gens wird ein Guanin durch Adenosin ersetzt (c.6385G>A). Das Codon 2129 des Wildtyps mit der Sequenz GAC verändert sich durch die Substitution an erster Position zu AAC. Hierdurch wird Aspartat durch Asparagin substituiert. Ebenfalls untersucht wurde der als MHE diagnostizierte Bruder (13) des MH-Patienten (8). Dieser zeigte die Mutation im Exon 39 nicht. Neben den sechs schon bekannten Mutationen im Exon 39 des *RYR1*-Gens (Manning et al. 1998, Rueffert et al. 2001, Tammaro et al. 2003, Fortunato et al. 2000) ist dies die siebte nachgewiesene Mutation bei MH-Patienten in diesem Exon. Die Sequenzierung ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

Eine weitere, bisher nicht beschriebene Mutation im Exon 40 eines Stress Syndrom Patienten (23) konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Am Position 6556 des *RYR1*-Gens wird ein Adenin durch Guanin ersetzt (c.6556A>G). Hierdurch wird die Wildtypsequenz ATG des Codon 2186 zu GTG verändert. Durch die Substitution des ersten Nukleotids wird nicht mehr Methionin, sondern Valin codiert. Somit entsteht die Mutation p.Met2186Val (Siehe hierzu auch Abbildung 4.9).

Somit konnten in beiden Patientengruppen insgesamt vier missens Mutationen im *RYR1*-Gen nachgewiesen werden drei im MH-Kollektiv und eine im Stress Syndrom-Kollektiv.

Die drei Mutationen c.1453A>G, c.6385G>A und c.6556A>G sind bisher nicht beschrieben worden und stellen deshalb neue Mutationen im *RYR1*-Gen dar. In der Kontrollgruppe ließen sich keine der in Tabelle 4.1 aufgelisteten Mutationen nachweisen.

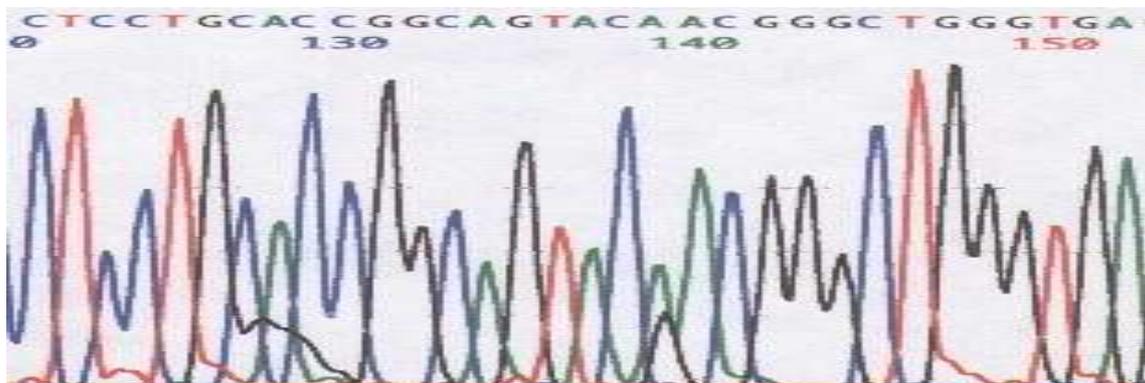
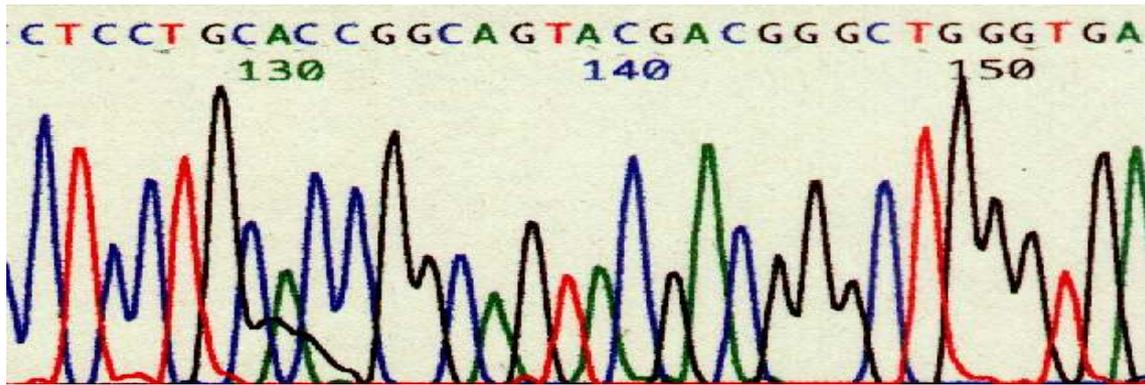


Abb. 4.6.a: Pat. Nr. 8 Im Exon 39 ist deutlich die Heterozygotie an Position 6385 (Pfeil) zu erkennen. Hier wurde in einem Allel Guanin durch Adenosin ersetzt. Darüber zum Vergleich eine unauffällige Sequenz.

AGCTCACCAGCCCGTCTACTGCCGGTGCA GG
 150 160 170

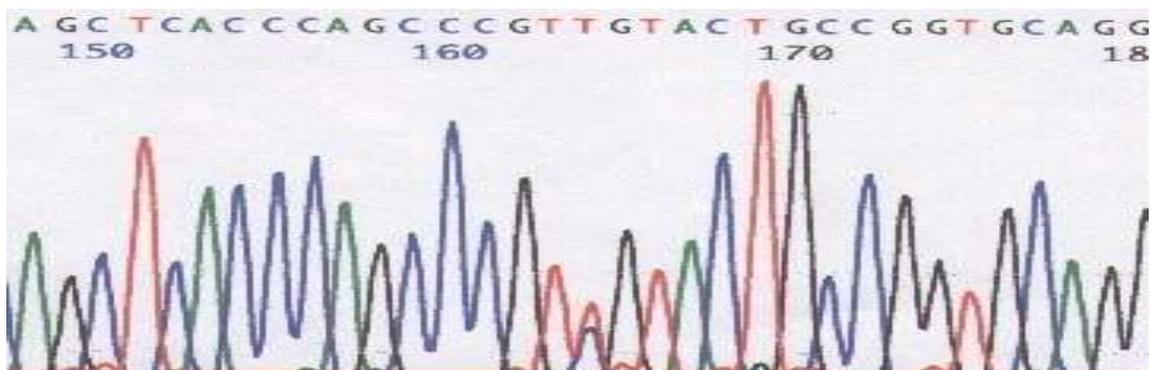
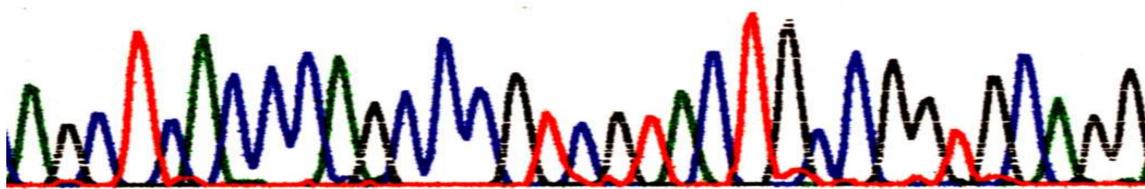


Abb. 4.6.b: Pat. Nr. 8 Im Exon 39 ist auch in der reversen Kontrolle deutlich die Heterozygotie an Position 6385 (Pfeil) zu erkennen. Hier wurde auf einem Allel komplementär Cytosin durch Thymin ersetzt. Die Heterozygotie in Abb 4.6.a und 4.6.b wurde von der Auswertesoftware nicht erkannt.

Mutationen im *RYR1*-Gen die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden

Mutation	Aminosäureänderung	Exon	MH-Patienten n: 10	HSS-Patienten n: 8	Kontrollen n:25
c.1453A>G*	p.Met485Val	14	1	0	0
c.1840C>T	p.Arg614Cys	17	1	0	0
c.6385G>A*	p.Asp2129Asn	39	1	0	0
c.6556A>G*	p.Met2186Val	40	0	1	0

Tabelle 4.1: * in dieser Arbeit neu beschriebene Mutationen

In dem untersuchten Kollektiv konnte neben dem bekannten Polymorphismus im Exon 15 ein bisher nicht beschriebener Polymorphismus Intron 15 nachgewiesen werden. Ein weiterer Polymorphismus im Exon 11 ist bereits bekannt, wurde aber bisher um zwei Positionen verschoben beschrieben.

Polymorphismen im *RYR1*-Gen, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden

Polymorphismen	Aminosäure- änderung	Exon	Allele	MH- Patienten n: 10	HSS- Patienten n: 8	Kontrollen n:25 [♦]
c.1077C>T	(keine) p.Ala359	11	homozygot C heterozygot CT homozygot T	6 3 1	6 2 0	20 4 1
c.1668G>A	(keine) p.Ser556	15	homozygot G heterozygot GA homozygot A	2 6 2	0 4 4	3 12 10
IVS15+29G>C*	entfällt		homozygot G heterozygot GC homozygot C	2 6 2	0 4 4	3 12 10
IVS13-23T>C*	entfällt		homozygot T heterozygot TC homozygot C	1 5 4	2 3 2	13 2 10

Tabelle 4.2: * in dieser Arbeit neu beschriebene Polymorphismen

- ♦ einige Kontrollen wurden durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen untersucht (siehe 4.4)

4.4 Restriktionsenzymverdau

Für die drei neu gefundenen Mutationen c.1453A>G, c.6385G>A und c.6556A>G und die Polymorphismen c.1077C>T, c.1668G>A und IVS13-23T>C wurde mit dem Programm "Mapdraw-DNS-Star" der Firma Lasergene eine theoretische Schnittstellenanalyse durchgeführt. Hierbei wird die originale und die mutierte Nukleotidsequenz in das Programm eingegeben. Das Programm errechnet potentielle Schnittstellen mit 478 bekannten Restriktionsendonukleasen. Ein Enzym, welches nur eine der beiden Sequenzen schneidet, eignet sich theoretisch zum DNA-Verdau durch ein Restriktionsenzym. Allerdings sind viele Endonukleasen noch nicht kommerziell zu beziehen, so dass sich in der Praxis nicht immer ein passendes Enzym finden lässt.

Im Exon 14 befindet sich eine Schnittstelle für das Enzym *NcoI*. Es zerteilt das 289bp lange PCR-Produkt in einen 198bp und in einen 91bp langen Abschnitt. Diese Schnittstelle geht durch die Mutation c.1453A>G verloren. Weitere Schnittstellen gibt es für dieses Enzym auf dem Exon nicht. Das PCR-Produkt des Wildtyps wird somit durch die Endonuklease einmalig geschnitten und kann so in der Agarosegelelektrophorese von der Mutante unterschieden werden, da diese bei einem homozygotem Träger nicht und bei einem heterozygotem Träger nur zu 50% geschnitten wird. Folglich bietet diese Endonuklease gute theoretische Voraussetzungen zur Schnittstellenanalyse der Mutation c.1453A>G.

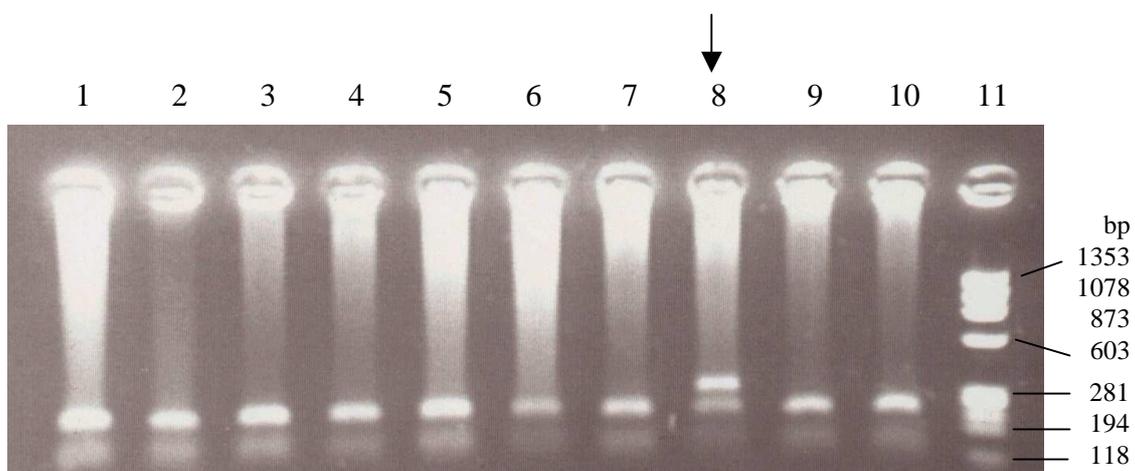


Abb. 4.7: Schnittstellenanalyse mit der Endonuklease *NcoI* im Exon 14. In Spur 8 findet sich neben den beiden Banden der Schnittfragmente noch eine zusätzliche Bande des ungeschnittenen PCR-Produkts mit einer Größe von 289 bp. In der Probe konnte die Mutation c.1453A>G bestätigt werden.

Die PCR Produkte des Exons 14 wurden nach Herstellerangaben mit der Endonuklease *NcoI* inkubiert. Es zeigte sich in der anschließenden Gelelektrophorese im 2%igen Agarosegel nach 45-minütiger Auftrennung bei 100 Volt eine Doppelbande auf Höhe der Schnittfragmente mit einer Länge von 198 und 91 bp. Die Probe 5 in Spur 8 zeigte eine zusätzliche Bande oberhalb der beiden Schnittfragmente auf Höhe des ungeschnittenen PCR Produkts mit einer Länge von 289 bp. Somit konnte die Mutation c.1453A>G durch den DNA-Verdau mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* verifiziert werden.

Die Mutation c.1840C>T auf Exon 17 kann durch die Endonuklease *RsaI* getestet werden. Das 282 bp lange nichtmutierte PCR-Produkt mit der Endonuklease *RsaI* in zwei Fragmente mit einer Länge von 95 bp und 87 bp geschnitten. Durch die Mutation c.1840C>T geht diese Schnittstelle verloren, so dass bei homozygoten Trägern der Mutation das PCR-Produkt nicht geschnitten wird.

Die PCR Produkte des Exons 17 wurden nach Herstellerangaben mit *RsaI* inkubiert und dann in einem Agarosegel aufgetrennt. Die PCR-Produkte der Spur 2,3,5-8 zeigten Doppelbanden und somit einen kompletten Schnitt durch die Endonuklease. Die mutierte Probe in Spur 4 wurde nur teilweise geschnitten und zeigte drei Banden: Eine Bande mit einer Länge von 87 bp, eine weitere mit einer Größe von 95 bp und eine dritte auf Höhe des ungeschnittenen PCR-Produkts mit 282 bp. Zum Vergleich wurde in der linken

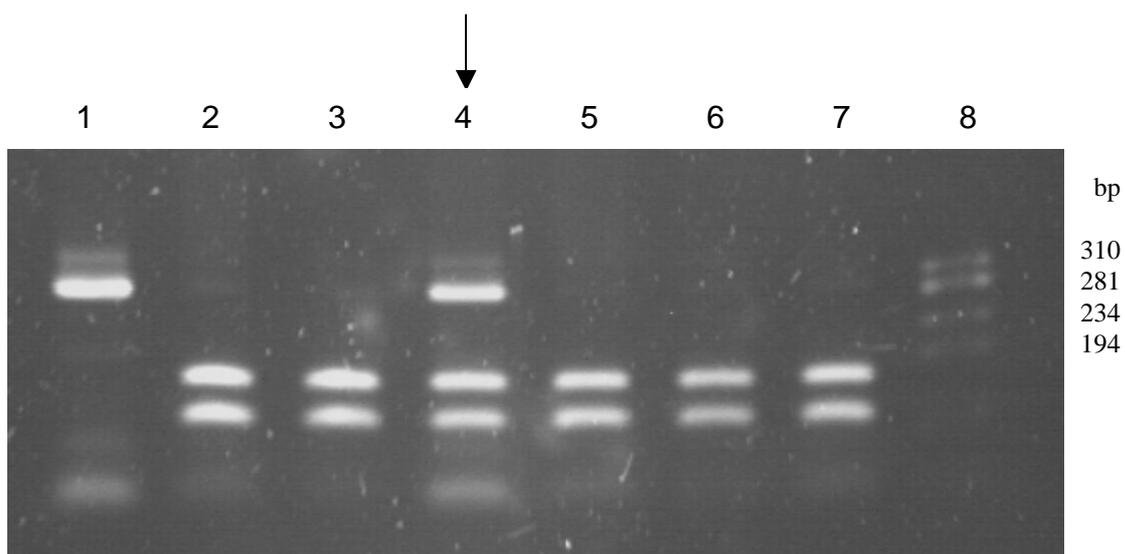


Abb. 4.8: Schnittstellenanalyse mit der Endonuklease *RsaI* im Exon 17. In der vierten Spur kann neben den beiden Schnittfragmenten auch noch ungeschnittenes PCR-Produkt dargestellt werden. Die Proben der Spur 2,3,5-7 wurden vollständig geschnitten. Links ein ungeschnittenes PCR-Produkt mit einer Länge von 290 bp zum Größenvergleich.

Spur des Gels ein ungeschnittenes PCR-Produkt des Exons 17 aufgetragen (Abbildung 4.8). Die Mutation c.1840C>T konnte so durch den DNA-Verdau bestätigt werden.

Durch die Mutation c.6385G>A auf Exon 39 geht eine Schnittstelle der Endonuklease *M.SssI* verloren, Hierfür kommt eine Schnittstelle für das Enzym *TatI* hinzu. Leider waren beide Enzyme nicht zu beziehen, so dass diese Mutation nicht mit Hilfe von Restriktionsenzymen zu untersuchen war.

Im Exon 40 befindet sich eine Schnittstelle für das Enzym *BspHI*, welches das 235bp lange PCR-Produkt in einen 141bp und in einen 94bp langen Abschnitt zertrennt. Durch die Mutation c.6556A>G auf diesem Exon kommt es zum Verlust dieser Schnittstelle. Eine weitere Schnittstelle dieses Enzyms gibt es auf dem Exon nicht. Somit bietet das Enzym *BspHI* gute Voraussetzungen für eine Schnittstellenanalyse. Bei den Proben 21, 22 und 24-28 des Exons 40 zeigten sich auf dem Agarosegel zwei Banden, welche die zwei Schnittfragmente mit einer Länge von 141bp und 94bp abbilden. Bei der Probe 23 findet sich wiederum eine zusätzliche Bande auf der Höhe des ungeschnittenen PCR-Produkts von 235bp. Somit konnte die heterozygote Mutation c.6556A>G im Exon 40 bestätigt werden.

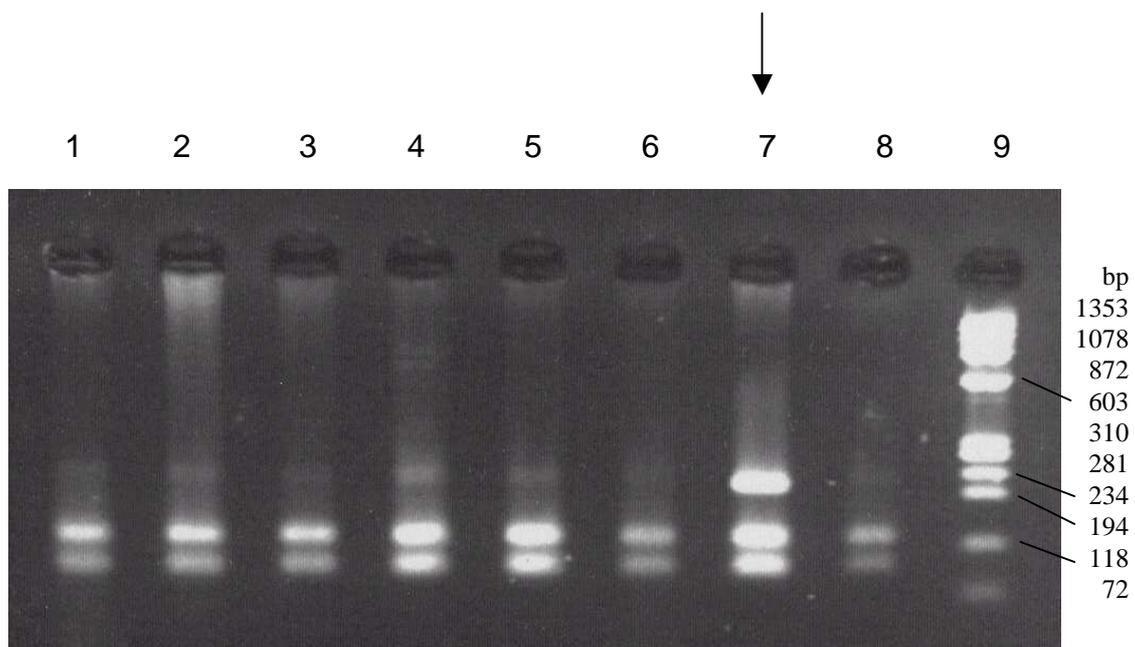


Abb.4.9: Restriktionsenzymverdau mit *BspHI* von Exon 40. In der Spur 8 ist deutlich eine zusätzliche Bande des ungeschnittenen PCR-Produkts mit einer Länge von 235 bp zu sehen. Die Schnittfragmente haben eine Länge von 141 und 94 bp.

Durch den Polymorphismus c.1077C>T im Exon 11 geht eine Schnittstelle für die Endonuklease *BsrBI* verloren. Da weitere Schnittstellen nicht vorliegen, entsteht beim DNA-Verdau durch das Enzym aus dem 289bp langen PCR-Produkt ein 179bp und ein 110bp langes Fragment wenn Cytosin an Position 7710 vorliegt. Die Schnittstellenanalyse gelang problemlos und wurde bei 12 Kontrollen durchgeführt, um Kosten gegenüber der aufwendigeren Sequenzierung zu sparen. Abbildung 4.10 zeigt sechs analysierte Proben von Exon 11 auf dem Agarosegel. Es sind neben vier vollständig geschnittenen Proben in Spur 2,4,5,6, eine ungeschnittene Probe in Spur 1 und eine zu Hälfte geschnittene Probe in Spur 3 zu erkennen. In Spur 8 wurde ein PCR-Produkt, das nicht mit der Endonuklease inkubiert wurde, als Größenvergleich aufgetragen. Von den 12 Proben konnten in zehn Proben homozygot Cytosin, in einer Probe homozygot Thymin und in einer Probe heterozygot Cytosin/Thymin nachgewiesen werden.

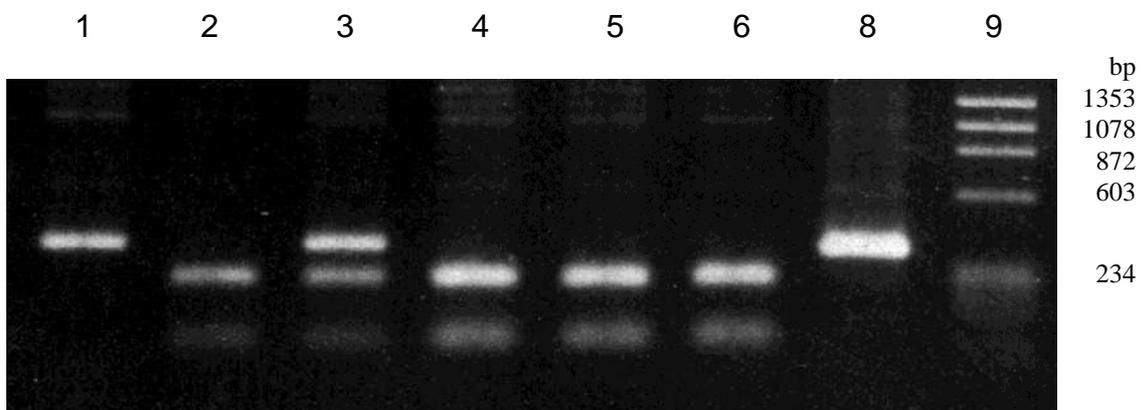


Abb.4.10: Restriktionsenzymverdau mit *BsrBI* von Exon 11. In der Spur 1 und 3 ist deutlich eine Bande auf Höhe des ungeschnittenen PCR-Produkts, das in Spur 8 als Größenvergleich aufgetragen wurde, zu sehen.

Die Schnittstellenanalyse mit "Mapdraw-DNS-Star" für die Mutation IVS13-23T>C ergab vier geeignete Enzyme: *Tsp45I*, *MaeIII*, *BsaHI* und *HgaI*. Alle Enzyme gewinnen durch die Basensubstitution eine Schnittstelle hinzu, weitere Schnittstellen gibt es nicht. Die Analyse wurde mit der Endonuklease *HgaI* durchgeführt. Durch die Endonuklease entsteht aus dem 289bp langen PCR-

Produkt ein 225 bp langes und ein 64 bp langes DNA-Fragment. Untersucht wurden 12 Kontrollen. Von ihnen zeigte nur eine homozygot Thymin, zwei waren heterozygot und neun zeigten homozygot Cytosin.

Alle 478 Restriktionsendonukleasen erwiesen sich in der theoretischen Schnittstellenanalyse für die Mutation c.1668G>A als ungeeignet, da durch die Mutation weder eine Schnittstelle verloren geht, noch entsteht. Aus diesem Grund wurden das Exon 15 aller Proben und Kontrollen sequenziert.

5 Diskussion

Zahlreiche Mutationen, welche zur Prädisposition der Malignen Hyperthermie führen, wurden im Ryanodinrezeptorgen auf Chromosom 19 beschrieben. Das methodische Vorgehen mit dem diese entdeckt wurden, war in den meisten Fällen sehr ähnlich. Von den Exons des Gens wurden PCR-Produkte synthetisiert und diese zunächst in der SSCP-Gelelektrophorese untersucht. Als alternative Methode hierzu wurde in neueren Publikationen auch die denaturierende Hochdruck-Flüssigchromatographie (Denaturing High Performance Liquid Chromatography / DHPLC) eingesetzt (Yeh et al. 2005). Waren hierbei Auffälligkeiten festzustellen, wurden die Produkte sequenziert, um die Veränderungen in der Basensequenz zu entschlüsseln. Dieses zweistufige Vorgehen wurde auch in dieser Arbeit angewandt. Hierbei wurde die Untersuchung auf die Exons des N-terminalen und zentralen Teils des Ryanodinrezeptorgens konzentriert, welche sich in der Vergangenheit als "Hot Spots" des Gens erwiesen. In der SSCP-Gelelektrophorese kann eine relativ große Probenzahl relativ rasch gescreent werden. Somit erscheint diese Methode ideal, um ein umfangreicheres Patientenkollektiv genetisch zu untersuchen. Sie weist jedoch einige Nachteile auf: Nur wenn Bedingungen gefunden werden, unter denen sich die Faltung der DNA-Einzelstränge der mutierten von den nichtmutierten Proben im Polyacrylamidgel unterscheiden, entsteht durch die dann unterschiedlichen Laufeigenschaften ein aussagekräftiges Bandenmuster. Werden die Bedingungen für eine Konformationsänderung der mutierten Probe gegenüber der nicht mutierten nicht gefunden, können genetische Varianzen leicht übersehen werden. Es kommt vor, dass sich unter bestimmten Konditionen jeweils nur ein Abschnitt des PCR-Produkts optimal faltet, so dass dieselben Proben mehrmals unter variierten Bedingungen in der SSCP-Gelelektrophorese untersucht werden müssen, wenn die Probe in voller Länge auf Mutationen untersucht werden soll. Dies erhöht den Aufwand erheblich und relativiert den Zeitvorteil gegenüber anderen Methoden, insbesondere der direkten DNA-Sequenzierung. Auch mit varianten Versuchsansätzen gelingt es nicht immer vollständig, genetische Veränderungen aufzudecken. Für die SSCP-Gelelektrophorese wird eine

.....
Sensitivität von 99% bzw. 89% für 100-300 bp. bzw. 300-450 bp. angegeben (Hayashi 1991). Eine derart hohe Sensitivität ließ sich in den Läufen dieser Arbeit nicht nachweisen. Aufgrund der zahlreichen möglichen Störfaktoren der Methode erscheint eine Sensitivität von 99% auch unter optimalen, standardisierten Bedingungen kaum erreichbar. In der SSCP-Gelelektrophorese weist ein verändertes Bandenmuster auf eine veränderte Basensequenz. Rückschlüsse über die Art der Veränderung können jedoch nicht gezogen werden, so dass zur Charakterisierung in einem zweiten Schritt auffällige Proben sequenziert werden müssen. Auch Polymorphismen können durch ihre unterschiedlichen Basensequenzen zu divergenten Bandenmuster führen. Die SSCP-Gelelektrophorese ist für Mutationsanalysen, bei denen die Versuchsbedingungen bereits etabliert sind und Polymorphismen selten vorkommen, besonders geeignet. Sollen jedoch DNA-Abschnitte gescreent werden, um bisher nicht bekannte Mutationen aufzudecken, eignet sich diese Methode nur eingeschränkt. Die Möglichkeit Basensequenzveränderungen zu übersehen ist groß, da die erforderlichen Laufbedingungen im Gel nicht bekannt sind. Durch eine oder mehrere Wiederholungen der Läufe unter anderen Bedingungen, wie zum Beispiel im Kühlraum oder mit Glycerolzusatz im Polyacrylamidgel, kann die Sensitivität der Methode verbessert werden. Ein Unsicherheitsfaktor verbleibt jedoch. Führt eine Basensubstitution zu keiner Veränderung der Einzelstrangkongformation, entziehen sie sich vollständig einer Detektion im Gel. Die DHPLC bietet hier möglicherweise eine gute Alternative, weil sich die Analyse automatisieren lässt und sowohl das aufwendige Gelelektrophorese, als auch die Färbeprozedur entfällt. Allerdings erfordert diese Methode eine wesentlich aufwendigere technische Apparatur.

In dieser Arbeit konnten die Mutationen c.1453A>G im Exon 14, c.1840C>T im Exon 17 und c.6556A>G im Exon 40 durch die SSCP-Gelelektrophorese gefunden werden. Der beschriebene Polymorphismus c.1077C>T im Exon 11 konnte sowohl auf den SSCP-Gelen, als auch in der Sequenzierung beobachtet werden. Die Mutation c.6385G>A im Exon 39 konnte unter den verwendeten Laufbedingungen in der SSCP-Gelelektrophorese nicht nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die Polymorphismen im Intron 13, Exon 15 und Intron 15.

.....

Durch die Sequenzierung der Patienten konnten insgesamt vier Punktmutationen detektiert werden, welche eine Aminosäuresubstitution zur Folge hatte. Drei waren MH-Patienten und einer Stress Syndrom Patient. Hiervon zeigten drei in der SSCP-Gelelektrophorese ein auffälliges Bandenmuster. Die Mutation im Exon 39 war nur durch Sequenzierung zu detektieren. Somit zeigt in dieser Arbeit die SSCP-Gelelektrophorese gegenüber der direkten DNA-Sequenzierung eine Sensitivität von 75%, wenn nur die missens Mutationen berücksichtigt werden. Werden die Polymorphismen in die Kalkulation miteinbezogen, verringert sich die Sensitivität bei einem erkannten und drei nicht erkannten Polymorphismen auf 50%.

Insgesamt sind bisher 144 Punktmutationen des *RYR1*-Gens publiziert. Eine aktuelle Übersicht der Mutationen ist in der Arbeit von Robinson et al. (2006) dargestellt. In zwei Regionen, dem N-terminalen (MH1) und dem zentralen Teil (MH2) des Gens wird der transmembrane/luminale Abschnitt des *RYR1*-Rezeptors determiniert (Keating et al.1994, Phillips et al.1994, Quane et al.1994, Lynch et al.1997, Barone et al.1999). Ihm kommt somit funktionell eine besondere Bedeutung zu. Es ist gut nachzuvollziehen, dass Mutationen in diesem Abschnitt erheblichen Einfluss auf die Kalziumhomöostase in den Muskelzellen haben. Der erste Abschnitt am N-terminalen Ende reicht von Exon zwei bis 17. In dieser Arbeit konnte mit der Substitution c.1453A>G im Exon 14 eines MH-Patienten eine Mutation in dem ersten Abschnitt des *RYR1*-Gens nachgewiesen werden. Außerdem gelang es, bei einem MH-Patienten die Substitution c.1840C>T im Exon 17 nachzuweisen.

Der zweite, zentrale Abschnitt des Gens reicht von Exon 39 bis 46. Auch in diesem Abschnitt des *RYR1*-Gens gelang in dieser Arbeit der Nachweis von zwei Substitutionen, die Mutation c.6385G>A im Exon 39 bei einem MH-Patienten und die Mutation c.6556A>G im Exon 40 bei einem HSS-Patienten. Neuere Untersuchungen zeigen, dass es möglich ist, mRNA des *RYR1* aus Leukozyten zu isolieren und in cDNA umzuschreiben (Kraev et al. 2003). Dies eröffnet diagnostisch weitere Möglichkeiten. Zum einen können durch die Untersuchung der cDNA Splicingvarianten aufgedeckt werden, zum anderen kann die cDNA effizienter auf Mutationen untersucht werden als die genomische DNA, da die Exons alle hintereinander angeordnet sind und so nicht für jedes Exon eine separate PCR durchgeführt werden muss. Allerdings

.....
ist es durch die Größe des *RYR1*-Gens nicht möglich, die gesamte cDNA auf einmal zu untersuchen. Durch die Synthese von acht überlappenden PCR-Produkten kann dieses Ziel erreicht werden. Eine Mutation (Arg328Trp) konnte mit dieser Methode auf cDNA-Ebene nachgewiesen werden (Loke et al. 2003). Die in dieser Arbeit beobachteten Polymorphismen c.1077C>T, IVSM13–23T>C, c.1668G>A und IVSM15+29G>C stehen in keinem Zusammenhang mit den untersuchten Krankheitsbildern. In der Kontrollgruppe Nichterkrankter ließen sich diese ebenfalls nachweisen. Für Kopplungsanalysen in diesem Bereich sind sie allerdings gut geeignet.

Alle Proben der Patienten und der Kontrollgruppe zeigten im Intron 14 übereinstimmend eine abweichende Basensequenz gegenüber den NCBI-Genbankdaten. Gleiches gilt für eine Base im Intron 16. Es ist davon auszugehen, dass nicht eine Veränderung der DNA-Sequenz vorliegt, sondern ein Fehler der NCBI-Genbankdaten, welche durch diese Arbeit korrigiert werden können. Ein Zusammenhang zu den untersuchten Krankheitsbildern gibt es nicht.

Vermutlich liegen noch weitere Mutationen in den MH1 und MH2 Regionen, die den MHS-Status produzieren. Yamamoto et al. postulieren, dass die N-terminale und zentrale Region des *RYR1*-Rezeptors eine funktionelle Einheit bilden. Sie wirken wie ein Reißverschluss und stabilisieren so den geschlossenen Zustand des Kalziumkanals. Veränderungen der Aminosäuresequenz führen deshalb zu einer Destabilisierung des Schließmechanismus. Um diese Hypothese zu verifizieren, synthetisierte er Proteine mit korrespondierenden Sequenzen zu der N-terminalen (Leu590-Cys609) und zentralen Region (Leu2442-Pro2477) und nannte sie DR1 und DP4. Er konnte zeigen, dass sich diese synthetischen Proteine an den gesunden *RYR1* anlagern und so den Schließmechanismus des Kalziumkanals blockieren. Der *RYR1* gesunder Muskelzellen hatte anschließend eine Pathophysiologie wie ein mutierter *RYR1* (Yamamoto et al. 2000). Später gelang Yamamoto zusammen mit Kobayashi et al. der Nachweis, dass auch spezifische Antikörper gegen die N-terminale oder zentrale Region des *RYR1* in der Lage sind, den Schließmechanismus des *RYR1*-Rezeptors zu blockieren und so eine Pathophysiologie hervorzurufen, wie er bei der MH beobachtet wird (Kobayashi et al. 2004).

Die C-terminale Region (MH3) des *RYR1*-Gens scheint sich zu einem dritten "Hot Spot" zu entwickeln. Die Region determiniert den funktionellen Verknüpfungspunkt mit dem Dihydropyridinrezeptor. Hieraus ergeben sich interessante neue Gesichtspunkte. Im Central Core Disease (siehe 2.3.3) konnten in dieser Region schon zahlreiche Mutationen nachgewiesen werden. Der DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen ist eine schnelle und kostengünstige Methode, mit der sich kurze, ausgewählte DNA-Abschnitte untersuchen lassen. Die Methode eignet sich insbesondere dann, wenn ein Patientenkollektiv auf eine bereits bekannte Mutationen gescreent werden soll. Die Voraussetzung ist, dass die zu untersuchende Mutation in einer spezifischen Schnittsequenz einer Endonuklease liegt oder durch die Mutation eine Schnittsequenz für eine Endonuklease entsteht. Von Vorteil ist es, wenn die nichtmutierte Sequenz geschnitten wird und in der Mutante die Schnittstelle verloren geht. Die Wahrscheinlichkeit, falsch negative Proben zu erzeugen, ist relativ gering, da ein negatives Ergebnis auf dem aktiven Schnittprozess beruht und außerdem gleichzeitig die Aktivität des Enzyms geprüft wird. Damit ist eine hohe Sensitivität der Methode zu erwarten. Wird die Probe nicht geschnitten, deutet dies auf den Verlust einer Schnittstelle hin. Allerdings ist es auch möglich, dass der Restriktionsschnitt aufgrund falscher Reaktionsbedingungen oder einer fehlenden Aktivität des Enzyms nicht erfolgt. Auf diese Weise können falsch positive Ergebnisse entstehen. Außerdem ist es notwendig, dass das Enzym auch unter suboptimalen Reaktionsbedingungen spezifisch für die Schnittsequenz bleibt und nicht bei Substratmangel auch eine leicht abweichende Sequenz toleriert. Die Analyse der Mutation c.6556A>G mit der Endonuklease *BspHI* hat gezeigt, dass dies in der Praxis vorkommt. Idealerweise besitzt das PCR-Produkt möglichst wenig Schnittstellen für das Enzym, weil die Auswertung auf dem Agarosegel durch die Banden zusätzlicher Schnittfragmente unübersichtlicher wird. Zur Evaluierung der Methode empfiehlt es sich, die Ergebnisse mit einem Bestätigungstest, z.B. durch die DNA-Sequenzierung, abzusichern. Zeigt sich hierbei eine gute Übereinstimmung zwischen dem Verdau durch ein Restriktionsenzym und der Sequenzierung und werden Positiv- und Negativkontrollen bei der Untersuchung mitgeführt, kann die Methode als Routinediagnostik auch ohne Sequenzierung verwendet werden. Wie oben erwähnt, ist es auch möglich, auf

.....

Mutationen zu screenen, wenn durch die Mutation eine spezifische Schnittstelle entsteht. Allerdings ist es notwendig, dass die Substitution immer durch dasselbe Nukleotid erfolgt, da alle anderen Nukleotidsubstitutionen keine Restriktionssequenz für die Endonuklease ergeben und die Mutation dann nicht erkannt wird. Ein falsch negatives Ergebnis wäre die Folge. Tatsächlich konnte schon an drei Positionen eine Basensubstitution durch jeweils zwei unterschiedliche Nukleotide (c.522A>C bzw. c.522A>G; c.1021G>A bzw. c.1021G>C und c.6617C>T bzw. c.6617C>G) nachgewiesen werden (Yeh et al. 2005, Tong et al. 1997, Monnier et al. 2005). Eine der beiden Substitutionen würde bei dem Verdau durch ein Restriktionsschnitzenzym, welches nur eine der Mutanten schneidet, übersehen.

Die theoretische Schnittstellenanalyse mit der Software DNS-Star hat gezeigt, dass es in den meisten Fällen möglich ist, eine geeignete Endonuklease für die Schnittstellenanalyse zu finden. Es kommt allerdings vor, dass geeignete Endonukleasen, noch nicht kommerziell zu beziehen sind. Das Angebot an Schnitzenzymen wird sich voraussichtlich weiter vergrößern, so dass diese Einschränkung an Bedeutung verliert. Hierdurch wird es auch vermehrt möglich sein, auf Enzyme auszuweichen, die nicht die Mutante schneiden.

Der DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen zur Bestätigung der Mutationen c.1840C>T, c.1453A>G, c.1077C>T und IVS13-23T>C war unproblematisch und zuverlässig. Da in den beschriebenen Exons neben denen in dieser Arbeit gefundenen Mutationen weitere bei MH-Patienten bekannt sind und vermutlich auch noch weitere bisher nicht bekannte existieren, ist die DNA-Sequenzierung der Restriktionsschnittanalyse überlegen. Durch eine Sequenzierung des Exons können sämtliche Mutationen erfasst werden und neben bekannten auch bisher unbekannt Mutationen detektiert werden.

Interessanterweise ist die Frequenz der verschiedenen Mutationen in der Bevölkerung innerhalb von Europa, aber auch gerade im Vergleich zu Nordamerika, sehr heterogen. Die Mutation c.1021G>A kommt jeweils in etwa 6% der irischen, englischen und französischen Familien vor (Manning et al. 1998), ist jedoch in Nordeuropa sehr selten (Brandt et al. 1999), während in Deutschland die Mutation c.1840C>T mit 9% die häufigste Mutation darstellt. Die Substitution c.6502G>A kommt häufig in der Schweiz vor (8%). Im übrigen

.....
europäischen Raum ist sie sehr selten. In Nordamerika kommen die Mutationen c.1021G>A, c.1840C>T und c.6502G>A nur sehr selten vor. Die in Nordamerika häufigste Mutation c.7300G>A mit einer 5,5%igen Häufigkeit kommt auch in 4-7% der europäischen MH-Familien vor. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die nordamerikanische Population in Bezug auf die verschiedenen *RYR1* Mutationen heterogener ist (allelische Heterogenität) als die europäische. Dies erklärt sich möglicherweise durch die hohe Heterogenität der amerikanischen Bevölkerung als solche (Sambuughin et al. 2001).

In einem dänischen MH-Patientenkollektiv konnten die Häufigkeitsverteilungen anderer Länder nicht bestätigt werden (Fagerlund et al. 1994). Zumindest für einige Mutationen kann das Vorkommen wohl nur regional angegeben werden. Ein Addieren aller Prozentangaben führt dann zu überhöhten Ergebnissen und sollte deshalb nicht unkritisch vorgenommen werden. Möglicherweise ist hierdurch auch der häufig genannte Wert von über 50% der MHS-Patienten entstanden, die Mutationen im Gen für den Ryanodinrezeptor haben sollen. Ob 44 im Jahre 2002 bekannte Mutationen tatsächlich 70% der MH-Fälle verursachen (Rueffert et al. 2002), ist fraglich. In einem größeren Patientenkollektiv von 124 Nichtverwandten konnten in nur 23% der Patienten eine der bekannten Mutationen nachgewiesen werden (Sei et al. 2004). Die Daten von Sei et al. stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der in vier von 18 Patienten (22%) eine Mutation im *RYR1*-Gen nachgewiesen wurde, welche eine Aminosäuresubstitution zur Folge hat.

Auch wenn die Maligne Hyperthermie und das Human Stress Syndrom durch unterschiedliche Trigger ausgelöst werden, weisen Symptomatik, klinischer Verlauf, ein vergleichbares Muster pathologischer Laborwerte und die Behandlungsmöglichkeit durch Dantrolen auf eine enge pathognomonische Verwandtschaft hin. Diese Auffälligkeit wurde schon mehrfach durch unterschiedliche Autoren beobachtet und wiederholt publiziert (Wingard 1974, Hopkins et al. 1991, Hackl et al. 1991, Jurkat-Rott et al. 2000). Untersuchungen, die diese Verwandtschaft belegen, blieben jedoch lange Zeit aus. Diese sind aufgrund der niedrigen Inzidenz des Human Stress Syndroms schwierig durchzuführen. Muskelkontraktionsuntersuchungen mit dem *in vitro* Kontraktionstest erbrachten erste konkrete Hinweise, die diese These bestätigen: Alle acht in dieser Arbeit untersuchten HSS-Patienten zeigten in

.....
dem vorab durchgeführten IVCT eine pathologische Sensibilität gegenüber Halothan und Coffein, wie sie für die MH bekannt ist. Es ist zumindest naheliegend anzunehmen, dass diese Empfindlichkeit der HSS-Patienten auch *in vivo* besteht. Da in der MH viele Mutationen im *RYR1*-Gen als Ursache für die Erkrankung ausgemacht werden konnten, erschien es sinnvoll, auch die HSS-Patienten auf diese Mutationen hin zu untersuchen. In ersten molekulargenetischen Untersuchungen an HSS-Patienten mit positiven IVCT konnten tatsächlich Mutationen nachgewiesen werden, wie sie für die MH bekannt sind (Wappler et al. 2001, Davis et al. 2002). In dieser Arbeit wurden deshalb neben den zehn MH-Patienten auch acht HSS-Patienten molekulargenetisch untersucht. Tatsächlich gelang es bei einem von acht untersuchten Patienten, eine Punktmutation im *RYR1*-Gen zu detektieren. Somit gelang erneut der Nachweis von einer Mutationen im *RYR1*-Gen von einem Patienten mit dem Human Stress Syndrom. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf die Genese des Human Stress Syndroms und ihre Verwandtschaft zur Malignen Hyperthermie. Da jeweils nur die Patienten und nicht deren Familien untersucht wurden, kann die Mutation als Ursache des HSS nicht bewiesen werden, jedoch erscheint dies in Anbetracht der übrigen Aspekte als recht wahrscheinlich. Sollte in weiteren Untersuchungen der Nachweis gelingen, dass in Familien immer nur der Mutationsträger erkrankt und lassen sich diese Untersuchungsergebnisse auf größere Patientenkollektive übertragen, sind Mutationen im *RYR1*-Gen auch als Ursache des HSS anzunehmen. Erste Untersuchungen in „knock in“ Mäusen untermauern diese These. Homozygote Mäuse mit einer generierten c.1565A>C Mutation im *RYR1*- Gen sterben schon als Embryo oder kurz nach der Geburt. Heterozygote Mäuse entwickeln sowohl nach Isofuran-Inhalation als auch durch Hitze-Stress die typischen Symptome einer Malignen Hyperthermie (Chelu et al. 2005). Im Menschen ist eine Assoziation dieser Mutation mit der MH bekannt.

Das *RYR1*-Gen ist über verschiedene Spezies hinweg stark konserviert. In der NCBI-Gendatenbank liegt neben dem humanem *RYR1*-Gen die Sequenzen des *RYR1*-Gens vom Kaninchen, Schwein, Ochsenfrosch und Schwertfisch vor. Die Proteinlängen variieren lediglich von 5036 Aminosäuren beim Schwein, über 5038 beim Kaninchen und Ochsenfrosch und 5039 bei der humanen

.....
Variante bis zu 5082 Aminosäuren beim Schwertfisch. Dies überrascht zunächst, da die Symptome der MH nur unter Narkose auftreten und Träger von Mutationen unter normalen Lebensbedingungen keinen unmittelbaren Nachteil haben. Eine Verwandtschaft der MH mit dem HSS bedeutet jedoch, dass Mutationsträger auch unter physiologischen Bedingungen gegenüber ihren Artgenossen benachteiligt sind und so einem Selektionsdruck unterliegen.

Kopplungsuntersuchungen haben gezeigt, dass neben dem *RYR1*-Gen weitere Regionen die Anfälligkeit für die MH determinieren (Robinson et al. 2000). Auffällig ist besonders, dass beim Ausschluss einer Assoziation zum *RYR1*-Gen häufig eine Kopplung mit dem Chromosomen 1q nachzuweisen ist. Hier konnte das Gen *CACNL1A3* an Position 1q32.1 als Kandidatengen lokalisiert werden. Es kodiert die α_1 Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors, welche die LoopII-III Domäne des Rezeptors formt. Diese interagiert direkt mit dem *RYR1* und beeinflusst so die intrazelluläre Kalziumregulation. In einer großen französischen Familie konnte die Mutation p.Arg1086His in dieser Einheit nachgewiesen werden, welche bei allen MHS Familienmitgliedern vorhanden war, bei den als MHN getesteten Familienmitgliedern jedoch nicht (Monnier et al. 1997). In 50 nichtverwandten MHS-Patienten konnte diese Mutation nicht nachgewiesen werden. Es scheint sich um eine seltene Ursache der MH zu handeln. Der Dihydropyridinrezeptor setzt sich aus den fünf Untereinheiten α_1 , α_2 , β , γ und δ zusammen. Die Gene *CACNLB* und *CACNLG* kodieren die β und γ Einheiten des Dihydropyridinrezeptors und finden sich beide in der Region 17q11.2-q24. Kopplungsstudien lassen hier einen weiteren MH-Lokus vermuten (Levitt et al.1992, Moslehi et al.1998). Eine Mutation, die die MH auslöst, konnte bisher aber noch nicht nachgewiesen werden. Auf den Chromosomen 7q11.23-q21.1 liegen die Gene der Einheiten α_2 und δ des Dihydropyridinrezeptors. Zumindest in einer Familie gelang es, eine Kopplung zwischen dieser Region und der MH nachzuweisen (Illes et al.1994).

Ebenfalls nachgewiesen wurde eine Kopplung der MH mit der Region 3q und 5p. Allele in diesen Regionen scheinen das Risiko für die MH zu erhöhen. Zwingend notwendig für eine Prädisposition zur MH sind sie aber wohl nicht. Auch können sie alleine vermutlich keine MH auslösen (Robinson et al. 2000). Konkrete Gene, welche in diesen Regionen liegen, konnten noch nicht mit der MH in Verbindung gebracht werden. Zu erwarten sind aber auch hier

.....
Genprodukte, die direkt oder indirekt den Kalziumstoffwechsel der Zelle beeinflussen.

Durch die Kopplungsanalysen wird deutlich, dass die Genetik der MH im Vergleich zum Schweine Stress Syndrom nicht nur innerhalb des Ryanodinrezeptors erheblich komplexer ist. Offenbar beeinflussen unterschiedliche Genprodukte die Anfälligkeit für eine MH-Krise und ändern, abhängig von ihrer Expression, die Anfälligkeit für sie. Neben den genetischen Faktoren der MH haben offenbar auch einige konstitutionelle Faktoren und unmittelbare Umwelteinflüsse eine erhebliche Bedeutung, wie zum Beispiel starke körperliche Belastung, psychischer Stress oder eine hohe Umgebungstemperatur. Auch eine Vormedikation z.B. durch Neuroleptika könnte möglicherweise die Manifestation einer MH-Krise erleichtern. Neuroleptika gelten als Auslöser des Malignen-Neuroleptischen-Syndroms, welches ebenfalls mit der MH in Verbindung gebracht wird (Ward et al. 1986, Brownell 1988, Guerrero et al. 1988). Es kommen insbesondere solche Faktoren als begünstigend für eine MH-Krise in Betracht, die physiologischerweise einen erhöhten myoplasmatischen Kalziumspiegel mit sich bringen und auf diese Weise das Erreichen eines Kalziumschwellenwertes in der Zelle erleichtern. Dies wird z.B. durch andauernde Muskelstimulation bei starker körperlicher Belastung erreicht, da zur Muskelfilamentstimulation Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum ausgeschüttet wird und die Kalziumrückresorption aus dem Myoplasma ins SR dies nicht vollständig kompensieren kann. Durch diese zahlreichen Faktoren lässt sich möglicherweise auch das Phänomen erklären, warum MH-Patienten einige Anästhesien komplikationslos überstehen und später, bei einer erneuten Narkose, plötzlich eine MH-Krise entwickeln.

Durch die ausgeprägte Heterogenität der MH, wurden die anfänglich großen Hoffnungen, den IVCT rasch durch nichtinvasive Diagnostik ersetzen zu können, enttäuscht. Genetische Veränderungen außerhalb *RYR1*-Gens komplizieren das Vorhaben zusätzlich, so dass der IVCT der "goldene Standard" bleibt. In der Diagnostik der MH ist der IVCT deshalb weiterhin unverzichtbar. Auch wenn mit ihm, mit einer Sensitivität von 99% ein Prozent als falsch negativ diagnostiziert wird, was für den Patienten fatale Folgen haben kann, und einer Spezifität von 93.6% immerhin ca. sechs Prozent falsch positiv

.....
diagnostiziert werden, bleibt der IVCT Grundpfeiler der MH-Diagnostik. Zusätzliche molekulargenetische Untersuchungen können diesen aber zunehmend ergänzen (Rueffert et al. 2000). Die "European Malignant Hyperthermia Group" formulierte einen Leitfaden zur genetischen Untersuchung von MH-Patienten (Urwyler et al. 2001). Robinson spricht in diesem Zusammenhang von einem Durchbruch der MH-Diagnostik (Robinson et al. 2001). Zunächst wird der MH-Patient auf bekannte Mutationen untersucht. Führt die Suche zum Erfolg, kann die Untersuchung auf die (Bluts)-Verwandtschaft des Patienten ausgedehnt werden. Sie wird dann ebenfalls auf dieses Merkmal hin untersucht. Im *RYR1*-Gen hat man sich hierbei zunächst auf 15 Mutationen beschränkt, welche zumeist in mehreren Familien nachgewiesen werden können und als kausale Mutationen durch Untersuchung des mutierten Gens in der Zellkultur bekannt sind (Censier et al. 1998, Tong et al. 1997, Treves et al. 1994, Lynch et al. 1999, Otsu et al. 1994). Wird bei den Blutsverwandten ebenfalls die Mutation des Erkrankten festgestellt, gelten diese als MHS. Auf den IVCT kann dann verzichtet werden.

Wird das Merkmal nicht gefunden, muss der IVCT im Anschluss an die molekulare Diagnostik durchgeführt werden. Genotyp und Phänotyp der MH stimmen nicht immer überein (Deufel et al. 1995, Adekun et al. 1997) und so besteht ohne den IVCT bei diesen Patienten die Möglichkeit, falsch negative Diagnosen zu stellen. Die Diagnose MHN muss deshalb mit dem IVCT abgesichert werden.

Gerade für Angehörige von MHS-Patienten stellt die molekulargenetische Untersuchung dennoch eine deutliche Verbesserung der Diagnostik dar, weil bei allen molekulargenetisch positiv Getesteten der IVCT unterbleiben kann.

Auch die Therapie der MH konnte entscheidend verbessert werden. Zunächst waren die therapeutischen Möglichkeiten sehr eingeschränkt. Nach dem Einsetzen der Symptomatik wurde die Anästhesie -soweit möglich- abgebrochen, bzw. auf nicht volatile Anästhetika umgestellt. Der Patient wurde mit reinem Sauerstoff beatmet und -bis hin zu Eiswasserspülungen in der Bauchhöhle- gekühlt. Der therapeutische Durchbruch gelang mit der Einführung des Dantrolens, welches heute als Notfallmedikament in jedem OP vorgehalten wird. Durch frühzeitige Applikation des Medikaments kann eine übermäßige Ausschüttung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum in das

.....

Myoplasma verhindert werden. Durch rasches Handeln ist es möglich, die Pathophysiologie kausal zu durchbrechen. Wird das Medikament hingegen erst gegeben, wenn sich das SR weitgehend geleert hat, gibt es keinen positiven therapeutischen Effekt mehr, da es dann ohnehin keinen nennenswerten Kalziumausstrom mehr aus dem SR ins Myoplasma gibt. Die Mortalität konnte durch dieses Medikament erheblich gesenkt werden. Dennoch ist es weiterhin wichtig, prädisponierte Patienten vor einer geplanten Anästhesie zu erkennen, um diese erst gar nicht in Gefahr zu bringen. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sollte in der Anamneseerhebung auch gezielt nach Symptomen des Human Stress Syndroms gefragt werden, um Risikopatienten herauszufiltern und einer weiteren Diagnostik zuzuführen. Sind diese tatsächlich MHS, stehen ihnen gute Narkosealternativen mit nicht volatilen Anästhetika zu Verfügung, so dass auch diese Patienten ohne erhöhtes Risiko anästhesiert werden können.

In dem letzten Jahrzehnt konnten entscheidende Fortschritte im Verständnis der Diagnostik und der Therapie der Malignen Hyperthermie erreicht werden. Somit wird ein Krankheitsbild, welches lange Zeit nur schlecht verstanden wurde und für welches es therapeutisch nur sehr begrenzte Möglichkeiten gab, zunehmend transparenter. Dennoch bleiben wichtige Faktoren bis zum heutigen Tag ungeklärt bzw. unbefriedigend gelöst. Weitere Gene, in denen Mutationen zu einer MH führen können, konnten erst teilweise identifiziert werden. Gelingt es, diese zu identifizieren, könnte die Diagnostik weiter entscheidend verbessert werden. Vielleicht wird es so langfristig doch möglich sein, auf den invasiven und aufwendigen IVCT zu verzichten.

Ferner gibt es noch eine große Unsicherheit bezüglich der bereits erwähnten Cofaktoren, die erheblichen Einfluss auf die Entwicklung einer Krise haben. Da Patienten aber auch ohne das Vorliegen der bekannten Faktoren eine Krise entwickeln können, gibt es wohl noch weitere bisher unbekannte.

Auch wenn es noch offene Fragen zu klären gilt, erscheinen die Zukunftsaussichten vielversprechend, die Diagnostik und Therapie weiter entscheidend zu verbessern. Dazu kann diese Arbeit einen Beitrag leisten.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zehn Maligne Hyperthermie (MH) Patienten und acht Human Stress Syndrom (HSS) Patienten, die alle im „*in vitro* Kontrakturtest“ (IVCT) pathologische Werte zeigten, molekulargenetisch untersucht. Drei als MHE getestete Brüder der Patienten sollten zusätzlich untersucht werden, wenn in ihren Verwandten der Nachweis einer Mutation gelang. Hierzu wurde von den 18 Patienten und von 25 nichtverwandten Kontrollpersonen genomische DNA isoliert und 12 ausgewählte Exons des Ryanodinrezeptorgens mittels PCR amplifiziert. In der SSCP-Elektrophorese konnte neben der schon in anderen MH-Patienten nachgewiesene Mutation c.1840C>T (p.Arg614Cys) und c.1077C>T (p.Ala359Ala) zwei weitere, bisher unbekannte, c.1453A>G (p.Met485Val), und c.6556A>G (p.Met2186Val) detektiert und mittels Sequenzierung identifiziert werden.

Außerdem wurden, um keine Mutation zu übersehen und die Sensitivität der SSCP-Elektrophorese zu überprüfen, auch alle übrigen PCR-Produkte der 12 Exons sequenziert. Hierbei konnten zwei weitere Mutationen, c.1668G>A (p.Ser556) und c.6385G>A (p.Asp2129Asn) nachgewiesen werden. Die stillen Mutationen c.1077C>T (p.Ala359) und c.1668G>A (p.Ser556) erwiesen sich, da auch in Kontrollpersonen nachzuweisen, als Polymorphismen. Ferner konnte gezeigt werden, dass in der NCBI-Gendatenbank eine fehlerhafte Sequenz des Introns 14 vorliegt. Drei in dieser Arbeit gefundene Mutationen und ein Polymorphismus konnten durch den Verdau mit einem Restriktionsenzym bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen mit 3 neuen Mutationen die ausgesprochene Heterogenität der MH, die in bisherigen Untersuchungen festgestellt wurde. Die Tatsache, dass auch in HSS-Patienten Mutationen im Ryanodinrezeptor nachgewiesen werden konnten, untermauert die Vermutung, dass es eine enge Verwandtschaft beider Syndrome gibt. Der invasive IVCT bleibt aufgrund der Heterogenität der „goldene Standard“ und kann zur Zeit noch nicht durch molekulargenetische Diagnostik abgelöst werden.

7. Literatur

Adeokun AM, West SP, Ellis FR, Halsall PJ, Hopkins PM, Foroughmand AM, Iles DE, Robinson RL, Stewart AD, Curran JL (1997) The G1021A substitution in the *RYR1* gene does not cosegregate with malignant hyperthermia susceptibility in a British pedigree, *Am J Hum Genet* 60/4:833-41

Ali SZ, Taguchi A, Rosenberg H (2003) Malignant hyperthermia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 17/4:519-533

Barone V, Massa O, Intravaia E, Bracco A, Di Martino A, Tegazzin V, Cozzolino S, Sorrentino V (1999) Mutation screening of the *RYR1* gene and identification of two novel mutations in Italian malignant hyperthermia families. *J Med Genet* 36/2:115-8

Brandt A, Schleithoff L, Jurkat-Rott K, Klingler W, Baur C, Lehmann-Horn F (1999) Screening of the ryanodine receptor gene in 105 malignant hyperthermia families: novel mutations and concordance with the in-vitro contracture test. *Hum Mol Genetics* 8:2055-62

Britt BA (1991) Malignant hyperthermia-a review. In: Schonbaum E, Lomax P (eds). *Thermoregulation: Pathology, Pharmacology and Therapy*. Pergamon Press Inc., New York, pp 179-292

Brown RL, Pollock AN, Couchman KG, Hodges M, Hutchinson DO, Waaka R, Lynch P, McCarthy TV, Stowell KM (2000) A novel ryanodine receptor mutation and genotype-phenotype correlation in a large malignant hyperthermia New Zealand Maori pedigree. *Hum Mol Genet* 9/10:1515-1524

Brown TA (1993) *Gentechnologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford

Brownell AK (1988) Malignant hyperthermia: relationship to other diseases. *Br J Anaesth* 60/3:303-8

Carsana A, Fortunato G, De Sarno C, Brancadoro V, Salvatore F (2003) Identification of new polymorphisms in the *CACNA1S* gene. *Clin Chem Lab Med* 41/1:20-2

Catterall WA (1995) Structure and funktion of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 83/3:43-42

Censier K, Urwyler A, Zorzato F, Treves S (1998) Intracellular calcium homeostasis in human primary muscle cells from malignant hyperthermia-susceptible and normal individuals. Effect of over-expression of recombinant wild-type and Arg163Cys mutated ryanodine receptors. *J Clin Invest* 101/6:1233-42

Chelu MG, Goonasekera SA, Durham WJ, Tang W, Lueck JD, Riehl J, Pessah IN, Zhang P, Bhattacharjee MB, Dirksen RT, Hamilton SL (Nov. 2005) Heat- and anesthesia-induced malignant hyperthermia in an *RYR1* knock-in mouse. FASEB J article 10.1096/fj.05-4497fje. Published online.

Davis M, Brown R, Dickson A, Horton H, James D, Laing N, Marston R, Norgate M, Perlman D, Pollock N, Stowell K (2002) Malignant hyperthermia associated with exercise-induced rhabdomyolysis or congenital abnormalities and a novel *RYR1* mutation in New Zealand and Australian pedigrees. Br J Anaest 88/4:508-15

Denborough MA, Forster JF, Lovell RR, Maplestone PA, Villiers JD (1962) Anaesthetic death in a family. Br J Anaesth 34:395-6

Denborough MA, Dennett X, Anderson AM (1973) Central-core disease and malignant hyperpyrexia. Br Med J 1/5848:272-3

Denborough MA (1998) Malignant hyperthermia. Lancet 352/9134:1131-6

Deufel T, Sudbrak R, Feist Y, Rubsam B, Du Chesne I, Schafer KL, Roewer N, Grimm T, Lehmann-Horn F, Hartung EJ, et al. (1995) Discordance, in a malignant hyperthermia pedigree, between in vitro contracture-test phenotypes and haplotypes for the MHS1 region on chromosome 19q12-13.2 comprising the C1840T transition in the *RYR1* gene. Am J Hum Genet 57/2:520

Fagerlund T, Ording H, Bendixen D, Berg K (1994) Search for three known mutations in the *RYR1* gene in 48 Danish families with malignant hyperthermia. Clin Genet 46/6:401-4

Fiege M, von Richthofen V, Weisshorn R, Wappler F (2000) Malignant Hyperthermia: Case Reports. In: Schulte am Esch J, Scholz J, Wappler F (Eds) Malignant hyperthermia. Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin, Riga, Rom, Wien, Zagreb, pp 356-65

Fiege M, Wappler F, Weisshorn R, Ulrich Gerbershagen M, Steinfath M, Schulte Am Esch J. (2002) Results of contracture tests with halothane, caffeine, and ryanodine depend on different malignant hyperthermia-associated ryanodine receptor gene mutations. Anesthesiology. 97/2:345-50

Fortunato G, Berruti R, Brancadoro V, Fattore M, Salvatore F, Carsana A, 2000. Identification of a novel mutation in the ryanodine receptor gene (*RYR1*) in a malignant hyperthermia Italian family. Eur J Hum Genet 8/2:149-152

Franzini-Armstrong C, Protasi F (1997) Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. Physiol Rev 77/3:699-729

Fujii J., Otsu (1991) Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 253/5018:448-51

.....
Galli L, Orrico A, Cozzolino S, Pietrini V, Tegazzin V, Sorrentino V (2002) Mutation in the *RYR1* gene in Italian patients at risk for malignant hyperthermia: evidence for a cluster of novel mutations in the C-terminal region. *Cell Calcium* 32/3:143-151

Gillard EF, Otsu K, Fujii J, Khanna VK, de Leon S, Deremezi J, Britt BA, Duff CL, Worton RG, MacLennan GH (1991) A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* 11/3:751-5

Guerrero RM, Shifrar KA (1988) Diagnosis and treatment of neuroleptic malignant syndrome. *Clin Pharm* 7/9:697-701

Hackl W, Winkler M, Mauritz W, Sporn P, Steinbereithner K, (1991) Muscle biopsy for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility in two patients with severe exercise-induced myolysis, *Br J Anaesth* 66/1:138-40

Harrison GG (1975) Control of malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br J Anesth* 47/1:62-5

Hartung E, Anetseder M (2000) The Standard In-Vitro Contracture Test. In: Schulte am Esch J, Scholz J, Wappler F (Eds) *Malignant Hyperthermia*. Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin, Rom, Wien, Zagreb, pp 251-61

Hayashi K (1991), PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutation in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1/1:34-8

Hopkins PM, Ellis FR, Halsall PJ (1991) Evidence for related myopathies in exertional heat stroke and malignant hyperthermia. *Lancet* 338/8781:1491-2

Illes DE, Lehmann-Horn F, Scherer SW, Tsui LC, Olde Weghuis D, Suijkerbuijk RF, Heytens L, Mikala G, Schwartz A, Ellis FR, et al (1994) Localization of the gene encoding the $\alpha_2\delta$ - subunits of L-type voltage-dependent calcium channel to chromosome 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia susceptible families. *Hum Mol Genet* 3/6:969-75

Jardon OM (1982) Physiologic Stress, heat stroke, malignant hyperthermia - a perspective. *Mil Med* 147/1:8-14

Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F (2000) Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia, *Muscle Nerve* 23/1:4-17

Kalow W, Grand DM (1995) Pharmacogenetics. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 7th edition, McGraw-Hill Inc., New York, pp 293-326

Keating KE, Quane KA, Manning BM, Lehane M, Hartung E, Censier K, Urwyler A, Klausnitzer M, Muller CR, Heffron JJ, et al (1994) Detection of a novel *RYR1* mutation in four malignant hyperthermia pedigrees. *Hum Mol Genet* 3/10:1855-8

Keating KE, Giblin L, Lynch PJ, Ouane KA, Lehane M, Heffron JJ, McCarthy TV (1997) Detection of a novel mutation in the ryanodine receptor gene in an Irish malignant hyperthermia pedigree: correlation of the IVCT response with the affected and unaffected haplotypes. *J Med Genet* 34/4:291-6

Kobayashi S, Yamamoto T, Parness J, Ikemoto N (2004) Antibody probe study of Ca^{2+} channel regulation by interdomain interaction within the ryanodine receptor. *Biochem J* 380/Pt2:561-9

Koch MC, Ricker K, Otto M, Grimm T, Hoffmann EP, Rudel R, Bender K, Zoll B, Harper PS, Lehmann-Horn F (1991) Confirmation of linkage of hyperkalaemic periodic paralysis to chromosome 17q. *J Med Genet* 28/7:583-6

Kraev N, Loke JC, Kraev A, MacLennan DH (2003) Protocol for the sequence analysis of ryanodine receptor subtype 1 gene transcripts from human leukocytes. *Anesthesiology* 99/2:289-96

Lenzen C, Roewer N, Wappler F, Scholz J, Kahl J, Blank M, Rumberger E, Schulte am Esch J (1993) Accelerated arrhythmias after administration of ryanodine to skeletal muscle of malignant hyperthermia susceptible patients. *Br J Anaesth* 71/2:242-6

Leong P, MacLennan DH (1998) A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* 273/14:7791-4

Levitt RC (1992) Prospects for the diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility using molecular genetic approaches. *Anesthesiology* 76/6:1039-48

Loke JC, Kraev N, Sharma P, Du G, Patel L, Kraev A, MacLennan DH (2003) Detection of a novel ryanodine receptor subtype 1 mutation (R238W) in a malignant hyperthermia family by sequencing of a leukocyte transcript. *Anesthesiology* 99/2:297-302

Lynch PJ, Krivosic-Horber R, Reyford H, Monnier N, Quane K, Adnet P, Haudecour G, Krivosic I, McCarthy T, Lunardi J (1997) Identification of heterozygous and homozygous individuals with the novel *RYR1* mutation Cys35Arg in a large kindred. *Anesthesiology* 86/3:620-6

Lynch PJ, Tong J, Lehane M, Mallet A, Giblin L, Heffron JJ, Vaughan P, Zafra G, MacLennan GH, McCarthy TV (1999) A mutation in the transmembrane/luminal domain of the ryanodine receptor is associated with abnormal Ca^{2+} release channel function and severe central core disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96/7:4164-9

- MacLennan DH, Duff C, Zorzato F, Fujii J, Philips M, Korneluk RG, Frodis W, Britt BA, Worton RG (1990) Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* 343/6258:559-61
- Manning BM, Quane KA, Lynch PJ, Urwyler A, Tegazzin V, Krivosic-Horber R, Censier K, Comi G, Adnet P, Wolz W, Lunardi J, Muller CR, McCarthy TV (1998) Novel mutations at a CpG dinucleotide in the ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *Hum Mutat* 11/1:45-50
- Manning BM, Quane KA, Orduíng H, Urwyler A, Tegazzin V, Lehane M, O'Halloran J, Hartung E, Giblin LM, Lynch PJ, Vaughan P, Censier K, Bendixen D, Comi G, Heytens L, Monsieurs K, Fagerlund T, Wolz W, Heffron JJ, Muller CR, McCarthy TV (1998) Identification of novel mutations in the ryanodine-receptor gene (*RYR1*) in malignant hyperthermia: genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 62/3:599-609
- McCarthy TV, Healy JM, Heffron JJ, Lehane M, Deufel T, Lehmann-Horn F, Farrall M, Johnson K (1990) Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature* 343/6258:562-4
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 11/16(3):1215
- Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, Lunardi J (1997) Malignant hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the α 1-subunit of the human dihydropyridine sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 60/6:1316-25
- Monnier N, Kozak-Ribbens G, Krivosic-Horber R, Nivoche Y, Qi D, Kraev N, Loke J, Sharma P, Tegazzin V, Figarella-Pranger D, Romero N, Mezin P, Bendahan D, Payen JF, Depret T, MacLennan DH, Lunardi J (2005) Correlations between genotype and pharmacological, histological, functional and clinical phenotypes in malignant hyperthermia susceptibility. *Hum Mutat* 26/5:413-25
- Moslehi R, Langlois S, Yam I, Friedmann JM (1998) Linkage of malignant hyperthermia and hyperkalemic periodic paralysis to the adult skeletal muscle sodium channel (*SCN4A*) gene in a large pedigree. *Am J Med Genet* 76/1:21-7
- O'Sullivan GH, McIntosh JM, Heffron JJ (2001) Abnormal uptake and release of Ca^{2+} ions from human malignant hyperthermia-susceptible sarcoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol* 61/12:1479-85
- Otsu K, Nishida K, Kimura Y, Kuzuya T, Hori M, Kamada T, Tada M (1994) The point mutation Arg615 Cys in the Ca^{2+} release channel of skeletal sarcoplasmic reticulum is responsible for hypersensitivity to caffeine and halothane in malignant hyperthermia. *J Biol Chem* 269/13:9413-5

- Oyamada H, Oguchi K, Saitoh N, Yamazawa T, Hirose K, Kawana Y, Wakatsuki K, Oguchi K, Tagami M, Haaoka K, Endo M, Lino M (2002) Novel mutations in C-terminal channel region of the ryanodin receptor in malignant hyperthermia patients. *Jpn J Pharmacol* 88/2:159-66
- Phillips MS, Khanna VK, De Leon S, Frodis W, Britt BA, MacLennan BA (1994) The substitution of Arg for Gly²⁴³³ in the human skeletal muscle ryanodine receptor is associated with malignant hyperthermia. *Hum Mol Genet* 3/12:2181-6
- Phillips MS, Fujii J, Khanna VK, De Leon S, Yokobata K, de Jong PJ, MacLennan DH (1996) The structural organization of the skeletal muscle ryanodine receptor (*RYR1*) gene. *Genomics* 34/1:24-41
- Procter & Gamble Pharmaceuticals-Germany GmbH (1996) Gebrauchs- und Fachinformation "Dantrolen i.v."
- Quane KA, Keating KE, Manning BM, Healy JM, Monsieurs K, Heffron JJ, Lehane M, Heytens L, Krivosic-Horber R, Adnet P, et al (1994) Detection of a novel common mutation in the ryanodine receptor gene in malignant hyperthermia: implications for diagnosis and heterogeneity studies. *Hum Mol Genet* 3/3:471-6
- Quane KA, Keating KE, Healy JM, Manning BM, Krivosic-Horber R, Krivosic I, Monnier N, Lunardi J, McCarthy TV (1994) Mutation screening of the *RYR1* gene in malignant hyperthermia: detection of a novel Tyr to Ser mutation in a pedigree with associated central cores. *Genomics* 23/1:236-9
- Robinson RL, Curran JL, Ellis FR, Halsall PJ, Hall WJ, Hopkins PM, Iles DE, West SP, Shaw MA (2000) Multiple interacting gene products may influence susceptibility to malignant hyperthermia. *Ann Hum Genet* 64/Pt4:307-20
- Robinson RL, Hopkins PM (2001) A breakthrough in the genetic diagnosis of malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 86/2:166-8
- Robinson RL, Brooks C, Brown SL, Ellis FR, Halsall PJ, Quinnell RJ, Shaw MA, Hopkins PM (2002) *RYR1* mutations causing central core disease are associated with more severe malignant hyperthermia in vitro contracture test phenotypes. *Hum Mutat.* 20/2:88-97
- Robinson RL, Carpenter D, Shaw MA, Halsall J, Hopkins PM (2006) Mutations in *RYR1* in Malignant Hyperthermia and Central core Disease. *Hum Mutat* 27/10,977-989
- Rueffert H, Olthoff D, Deutrich C (2000) In-vitro-Kontrakturtest und Gentypisierung in der Maligne Hyperthermie-Diagnostik. Ein Beispiel für die sinnvolle Ergänzung beider Methoden. *Anaesthesist* 49:113-120
- Rueffert H, Kraus H, Olthoff D, Deutrich C, Froster UG (2001) Identification of novel mutation in the ryanodine receptor gene (*RYR1*) in patients with malignant hyperthermia. *Hum Mutat* 17/3:238

Rueffert H, Olthoff D, Deutrich C, Meinecke CD, Froster UG (2002) Mutation screening in the ryanodine receptor 1 gene novel mutations. *Acta Anaesthesiol Scand* 46/6:692-8

Sambuughin N, Sei Y, Gallagher KL, Wyre HW, Madsen D, Nelson TE, Fletcher JE, Rosenberg H, Muldoon SM, (2001) North American malignant hyperthermia population: screening of the ryanodine receptor gene and identification of novel mutations. *Anesthesiology* 95/3:594-9

Sei Y, Sambuughin NN, Davis EJ, Sachs D, Cuenca PB, Brandom BW, Tautz T, Rosenberg H, Nelson TE, Muldoon SM (2004) Malignant hyperthermia in North America: genetic screening of the tree hot spots in the type I ryanodine receptor gene. *Anesthesiology* 101/4:824-30

Snyder HR jr, Davis CS, Bickerton RK, Halliday RP (1967) 1-[(5-Arylfurylidene)amino]hydantoines. A new class of muscle relaxants. *J Med Chem* 10/5:807-10

Takagi A, Sunohara N, Ishihara T, Nonaka I, Sugita H (1983) Malignant hyperthermia and related neuromuscular diseases: caffeine contracture of the skinned muscle fibers. *Muscle Nerve* 6/7:510-4

Tamaro A, Bracco A, Cozzolino S, Esposito M, Di Martino A, Savoia G, Zeuli L, Piluso G, Aurino S, Nigro V (2003) Scanning for mutations of the ryanodine receptor (*RYR1*) gene by denaturing HPLC: detection of three novel malignant hyperthermia alleles. *Clin Chem* 49/5:761-8

The European Malignant Hyperthermia Group (1984) A Protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anaesth* 56/11:1267-9

Tong J, Oyamanda H, Demaurex N, Grinstein S, McCarthy TV, MacLennan DH (1997) Caffeine and halotane sensitivity of intracellular Ca^{2+} release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J Biol Chem* 272/42:26332-9

Treves S, Larini F, Menegazzi P, Steinberger TH, Koval M, Vilsen B, Anderson JP, Zorzato F (1994) Alteration of cellular Ca^{2+} transients in COS-7 cells transfected with the cDNA encoding skeletal-muscle ryanodine receptor carrying a mutation associated with malignant hyperthermia. *Biochem J* 301/Pt3:661-5

Urwyler A, Deufel T, McCarthy TV, West S, European Malignant Hyperthermia Group (2001) Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 86/2:283-7

Wagenknecht T, Radermacher M (1997) Ryanodine receptors: structure and macromolecular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 7/2:258-65

Wappler F, Roewer N, Lenzen C, Scholz J, Steinfath M, Rumberger R, Schulte am Esch J (1993) Hochreines ryanodin zur In-vitro-Diagnostik der malignen Hyperthermie. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 28/7:427-31

Wappler F, Fiege M, Steinfath M, Agarwal K, Scholz J, Singh S, Matschke J, Schulte am Esch J (2001) Evidence for susceptibility to malignant hyperthermia in patients with exercise-induced rhabdomyolysis. *Anesthesiology* 94/1:95-100

Ward A, Chauffman MO, Sorkin EM (1986) Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. In: *Drugs* 32/2:130-168

Weiss RG, O'Connell KM, Flucher BE, Allen PD, Grabner M, Direksen RT (2004) Funktional analysis of the R1086H malignant hyperthermia mutation in the DHPR reveals an unexpected influence of the III-IV loop on skeletal muscle EC coupling. *Am J Physiol Cell Physiol* 287/4:C1094-102

Wingard DW (1974) Letter: Malignant hyperthermia: A human stress syndrome? *Lancet* 2/7894:1450-1

Yamamoto T, El-Hayek R, Ikemoto N (2000) Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in Ca²⁺ channel regulation. *J Biol Chem* 275/16:11618-25

Yeh HM, Tsai MC, Su YN, Shen RC, Hwang JJ, Sun WZ, Lei LP (2005) Denaturing high performance liquid chromatography screening of ryanodine receptor type 1 gene in patients with malignant hyperthermia in Taiwan and identification of a novel matation (Y522C). *Anesth Analg* 101/5:1401-6

Internetressource: NCBI-Homepage www.ncbi.nlm.nih.gov

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Gal, geschäftsführender Direktor des Instituts für Humangenetik, dafür, dass ich in seinem Institut diese interessante Fragestellung bearbeiten durfte. Außerdem bedanke ich mich für seine konstruktive Hilfe.

Insbesondere bedanke ich mich an dieser Stelle herzlich bei Herrn Prof. Dr. Surjit Singh für die kompetente Betreuung vor Ort und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Mein Dank gilt ebenfalls allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, dass sie mir das Studium ermöglicht haben.

 Lebenslauf

Name: Thorsten Krieger, geb. 24.03.69 in Hamburg
 Deutsche Staatsangehörigkeit, ledig

Adresse: Mühlenkamp 10, 22303 Hamburg

Assistenzarzt:
 Seit 5.01 Institut für Immunologie, UKE
 Direktor Prof. Dr. B. Fleischer
 Leitung des Diagnostiklabors
 Qualitätsbeauftragter des Instituts
 bis 4.04 halbtags, danach ganztags

1.01 - 4.04 Zentrallabor des AK Harburg
 Ltd. Arzt Prof. Dr. N. Dahlmann

8.98 - 12.00 Klinikum Nord / Heidberg
 Innere Medizin II, Ltd. Arzt Dr. P. Müller

Arzt im Praktikum (Zivildienst)
 2.97-7.98 Klinikum Nord / Heidberg
 Innere Medizin II

Praktisches Jahr

6.96-8.96 UK-Eppendorf, Psychosomatik
 2.96-6.96 UK-Padua / Italien, Chirurgie
 10.95-2.96 AK-Ochsenzoll, Innere Medizin

Ausbildung

4.90-11.96 Universität Hamburg, Medizin
 8.93-9.93 Universita Italiana per Stranieri, Perugia /
 Italien, Italienisch

7.89-9.89 Italiana per Stranieri, Siena / Italien
 7.82-6.89 Lohmühlengymnasium, Hamburg

Examina

1998 Approbation zum Arzt
 1996 III. Staatsexamen
 1995 II. Staatsexamen Medizin
 1994 I. Staatsexamen Medizin
 1993 Physikum
 1989 Abitur

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift