

Aus dem Institut für Humangenetik
des Zentrums für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. A. Gal

**Mutationen im Ryanodinrezeptorgen (*RYR1*) bei Patienten mit
Prädisposition für Maligne Hyperthermie.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Cagri Demir

aus Varel

Hamburg 2008

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 10
2.3 Syndrome, bei denen eine Verwandtschaft mit der MH Diskutiert wird.....	Seite 11
2.4 Die Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie.....	Seite 13
2.5 Die Genetik der Malignen Hyperthermie.....	Seite 16
2.6 Therapie.....	Seite 18
2.7 Der <i>in vitro</i> Kontraktionstest (IVCT): Protokoll der EMGH.....	Seite 20
2.8 Molekularbiologische Diagnostik.....	Seite 24
3. Material und Methoden	
3.1 Chemikalien und Enzyme.....	Seite 25
3.2 Lösungen und Puffer.....	Seite 26
3.3 Verwendete Geräte.....	Seite 29
3.4 DNA-Präparation aus Blut-Leukozyten.....	Seite 30
3.5 Polymerase Kettenreaktion.....	Seite 32
3.5.1 Die Primer.....	Seite 36
3.6 PCR-Produktüberprüfung durch Gelelektrophorese.....	Seite 38
3.6.1 Herstellung der Agarosegele.....	Seite 39
3.6.2 Laden der Agarosegele.....	Seite 39
3.6.3 Durchführung der Elektrophorese.....	Seite 39
3.6.4 Färbung und Dokumentation.....	Seite 40

3.7	Analyse von DNA-Einzelstrangkonnformationspoly- morphismen in PCR-Produkten (SSCP-Elektrophorese)	Seite 40
3.7.1	Prinzipien der SSCP-Analyse.....	Seite 40
3.7.2	Herstellung der SSCP-Gele.....	Seite 42
3.7.3	Vorbereitung der Proben und Polyacrylamid- Elektrophorese.....	Seite 44
3.7.4	Fixierung, Färbung und Dokumentation des SSCP-Polyacrylamidgels.....	Seite 45
3.8	DNA-Sequenzierung.....	Seite 46
3.8.1	Die Prinzipien der nichtradioaktiven DNA-Sequenzierung.....	Seite 45
3.8.2	Reinigung der PCR-Produkte durch Fällung in Ammoniumacetat-Äthanollösung.....	Seite 47
3.8.3	Sequenzierungs-PCR.....	Seite 47
3.8.4	Ethanolpräzipitation und Sequenzierung der PCR- Produkte.....	Seite 49
3.9	Restriktionsenzymverdau.....	Seite 50
4.	Ergebnisse	
4.1	DNA-Amplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Qualitätsprüfung in der Gelelektrophorese.....	Seite 51
4.2	SSCP-Mutationsanalyse.....	Seite 55
4.3	DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte.....	Seite 57
4.4	Restriktionsenzymverdau.....	Seite 66
5.	Diskussion.....	Seite 70
6.	Zusammenfassung.....	Seite 80
7.	Literaturverzeichnis.....	Seite 81
8.	Anhang	
	Danksagung.....	Seite 95

Lebenslauf.....	Seite 96
-----------------	----------

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Kalziumstoffwechsel in der Zelle.....	Seite 14
Abb. 2.2	Strukturformel Dantrolen.....	Seite 19
Abb. 2.3	Schematischer experimenteller Versuchsaufbau Nach dem Protokoll der EMGH.....	Seite 22
Abb. 3.1	Das Prinzip der PCR.....	Seite 33
Abb 3.2	Das Prinzip der SSCP-Gelelektrophorese.....	Seite 41
Abb. 4.1	Bandenshift in der SSCP-Gelelektrophorese.....	Seite 56
Abb. 4.2	Darstellung eines Artefaktes in Exon 6.....	Seite 60
Abb. 4.3	Basensequenz von Exon 47 ohne Mutationen...	Seite 61
Abb. 4.4	Basensequenz des Polymorphismus in Exon 11	Seite 62
Abb. 4.5	Basensequenz des Polymorphismus in Exon 15..	Seite 64
Abb. 4.6	Schema der Schnittstellenanalyse von Exon 11 mit <i>Bsr</i> BI	Seite 67
Abb. 4.7	Elektrophorese der Schnittstellenanalyse von Exon 11 mit <i>Bsr</i> BI	Seite 68
Abb. 4.8	Schema der Schnittstellenanalyse von Exon 11 mit <i>Tsel</i>	Seite 68
Abb. 4.9	Elektrophorese der Schnittstellenanalyse von Exon 11 mit <i>Tsel</i>	Seite 69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1	Anzahl der Mutationen in den Exons, die in dieser Arbeit untersucht wurden wurden	Seite 59
Tabelle 4.2	Anzahl und Verteilung der bisher beschriebenen Polymorphismen, in den Exons, die in dieser Arbeit untersucht wurden	Seite 65

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CCD	Central Core Disease
cDNA	komplementäre DNA
CK	Creatinkinase
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMGH	European Malignant Hyperthermia Group
HSS	Human Stress Syndrom
IVCT	<i>in vitro</i> Kontraktionstest
MH	Maligne Hyperthermie
MHE	MH-equivocal
MHEh	MH-equivocal Halotan-suscetible
MHN	MH-negative
MHS	MH-susceptible
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure

NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PSS	Porcine (Schweine) Stress Syndrome
RYR	Ryanodinrezeptor
SDS	Sodium dodecal sulfate
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin

Annahmevermerk der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Mündliche Prüfung am 02.03.2009 erfolgreich abgelegt

Gutachter:

Vorsitz und 1. Gutachter: Prof. Dr. Surjit Singh

2. Gutachter: PD Dr. M. Fiege

3. Gutachter: PD Dr. M. Görig

1. Fragestellung

Bei der malignen Hyperthermie (MH) handelt es sich um eine seltene Erkrankung, bei der durch volatile Inhalationsanästhetika eine hypermetabole Stoffwechselentgleisung hervorgerufen wird. Ursächlich ist eine Dysregulation des intrazellulären Kalziumstoffwechsels, die häufig durch Defekte im Ryanodinrezeptorgen entsteht. In dieser Arbeit sollen an einem Kollektiv von 26 MH-Patienten molekulare Analysen in definierten Regionen des Ryanodinrezeptorgens (*RYR1*) durchgeführt werden. Die untersuchten Exons kodieren für die N-terminale Region 1 sowie für die zentrale Region 2 des *RYR1*-Gens. Hier konnten bereits zur MH prädisponierende Mutationen detektiert werden. Zusätzlich sollen 5 weitere, in der Nachbarschaft dieser Regionen lokalisierte Exons, für die zu Beginn dieser Arbeit noch keine MH-prädisponierenden Mutationen beschrieben wurden, an diesem Kollektiv sowie an weiteren 26 Patienten untersucht werden. Sämtliche 52 Patienten zeigten im *in vitro* Kontraktionstest (IVCT) pathologische Werte und wurden als MH-susceptible (MHS) gewertet. Zur molekulargenetischen Analyse soll DNA aus Blutleukozyten der Patienten gewonnen werden. Zur Mutationsanalyse der Exons des *RYR1*-Gens sollen Primer aus veröffentlichten Sequenzen generiert werden. Die mit diesen Primern synthetisierten PCR-Produkte sollen mit der Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Produkte, die in der SSCP-Analyse veränderte Bandenmuster zeigen, sollen zur Mutationsidentifikation analysiert werden. Die Exons, für die Mutationen bekannt sind, sollen parallel größtenteils sequenziert werden, um die Sensitivität der SSCP zu überprüfen. Die zusätzlich untersuchten 5 Exons sollen mittels SSCP-Analyse untersucht werden und nur diejenigen Produkte sequenziert werden, die in der SSCP ein auffälliges

Bandenmuster zeigen. Eine Bestätigung der gefundenen Mutationen mittels Schnittstellenanalyse sollte nach Möglichkeit erfolgen.

2. Einleitung

2.1 Die Maligne Hyperthermie

Bei der malignen Hyperthermie (MH) handelt es sich um eine akute Krankheit, die während oder nach Allgemeinanästhesien auftritt ausgelöst durch Inhalationsanästhetika oder depolarisierende Muskelrelaxantien und die unbehandelt schnell zum Tode des Patienten führen kann.

Das Krankheitsbild wurde erstmalig von Denborough et al. 1962 beschrieben. Die Prädisposition für maligne Hyperthermie wird autosomal dominant vererbt.

Bei Prädisposition wird das Krankheitsbild durch sogenannte Triggersubstanzen ausgelöst, zu denen nach heutigem Wissensstand lediglich die volatilen Inhalationsanästhetika (Chloroform, Äther, Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran, Desfluran) sowie depolarisierende Muskelrelaxantien wie z.B. Succinylcholin zählen (Denborough 1998). Das Vollbild der MH-Krise ist bedingt durch Kontraktion der gesamten quergestreiften Skelettmuskulatur, die zu einem ausgeprägten Hypermetabolismus der Muskelzellen und dadurch zu einem starken Anstieg der Körpertemperatur führt. Durch Einführung des Muskelrelaxans Dantrolen als Antidot und durch rechtzeitiges Erkennen der Frühzeichen der MH-Krise konnte die Letalität von über 80% auf unter 7% reduziert werden (Britt 1991).

Die Inzidenz von MH während einer Allgemeinanästhesie beträgt 1:15000 bei Kindern und 1:50000 bei Erwachsenen und manifestiert sich überwiegend während des 3. und 30. Lebensjahres. Da bei Patienten mit einer Prädisposition zur malignen Hyperthermie auch unkomplizierte Narkosen unter Einsatz der Triggersubstanzen möglich sind liegt die vermutete Prävalenz zur Prädisposition der MH in der Population bei 1:10000 (Kalow et al. 1995).

2 Einleitung

Das Schweine Stress Syndrom (PSS), das 1975 bei einigen Schweinezuchtrassen erstmalig festgestellt wurde, ist eine der MH sehr ähnliche Erkrankung. Unter Stresssituationen kommt es zur Stoffwechsellage mit Anstieg der Körpertemperatur und anschließendem Tod mit meist sofortigem Einsetzen der Totenstarre. Die Qualität des Fleisches ist deutlich reduziert. Das PSS wird im Gegensatz zur MH autosomal rezessiv vererbt.

Bei homozygoten Trägern des PSS konnte durch einen Provokationstest mit Halothan eine Krise induziert werden. Im *in vitro* Kontraktionstest mit 1% Halothan und 1% Succinylcholin konnten auch bei heterozygoten Trägern pathologische Resultate erzielt werden.

Zudem ergaben physiologische Tests, dass ein zu hoher myoplasmatischer Kalziumspiegel zu Rigidität führt. Wie bei der MH wird dieser durch einen erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum hervorgerufen. Der Nachweis, dass auf Schweinechromosomen 6 das Gen für den Ryanodinrezeptor lokalisiert ist und dass eine Mutation in diesem gekoppelt mit dem Phänotyp der MH vererbt wird, konnte 1991 erbracht werden (Fujii et al. 1991). Im menschlichen Genom findet sich diese Region auf dem Chromosom 19q13.1-q13.2 wieder (Gillard et al. 1991). Bei beiden Syndromen konnte durch Klonierung einer cDNA ein genetischer Defekt des *RYR1* als Ursache bewiesen werden. Bei Schweinen führt die Substitution c.1843C>T zu einer Ersetzung von Arginin-615 durch Cystein. Aufgrund der Tatsache, dass bei allen untersuchten PSS positiven Schweinen ($n > 450$) eine identische Mutation ursächlich war, konnte ein genetischer Test entwickelt werden und dadurch zuverlässig alle homozygoten und heterozygoten Träger der Mutation identifiziert werden. Bei einigen MH-Patienten sind unterschiedliche Mutationen in diesem Gen festgestellt worden. Aus diesem Grund befindet sich ein allgemeiner genetischer Test noch in der Entwicklung.

2.2 Die Klinik der MH

Bei MH-Patienten kommt es durch volatile Narkosegase, Succinylcholin und vor allem durch die Kombination dieser Substanzen zu einer Aktivierung der Muskelkontraktion und zu einem gesteigerten Muskeltonus. Häufig ist der Masseterspasmus das erste Symptom der Krise. Später ist nicht selten die komplette quergestreifte Skelettmuskulatur betroffen. Über Kalzium als „second messenger“ wird der Muskelzellstoffwechsel so massiv hochreguliert, dass die Kompensationsmöglichkeiten des Körpers schnell ausgeschöpft sind. Der Sauerstoffbedarf kann bis auf ein vierfaches der Norm ansteigen. Kohlendioxid, Laktat sowie Wärme, von der die Krankheit ihren Namen hat, wird durch die hypermetabole Situation vermehrt freigesetzt. Daraus resultiert ein schneller Anstieg der Körpertemperatur (bis zu 1°C pro 5 Minuten), ein starker Abfall der Sauerstoffsättigung, eine massive Erhöhung des endexpiratorischen CO₂ Drucks und eine schwere metabolische Azidose. Über Schädigung der Zellmembranen kommt es zur Hyperkaliämie, Anstieg der Kreatinkinasen (CK) und zur Myoglobinurie. Weiterhin zeigen sich häufig Arrhythmien und Tachykardien. Innerhalb weniger Stunden kann sich ein Lungenödem oder eine Koagulopathie manifestieren, nach einigen Tagen neurologische Defizite und Nierenversagen durch Rhabdomyolyse.

Ursächlich ist der durch die Triggersubstanz induzierte deutlich erhöhte Ausstrom von Kalziumionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), in dem das meiste intrazelluläre Ca²⁺ gespeichert wird, in das Myoplasma. Dieser Ausstrom findet durch Öffnung der schnellen Ca²⁺-Kanäle statt, die aufgrund ihrer hohen Affinität zu dem Pflanzenalkaloid Ryanodin „Ryanodinrezeptoren (R_{YR1})“ genannt werden. Durch die erhöhte Kalziumkonzentration im Myoplasma kommt es zur Aktivierung der Aktin- und Myosinfilamente und über diesen Mechanismus zur

2 Einleitung

Muskelkontraktion, so erklärt sich der häufig beschriebene gesteigerte Muskeltonus während einer MH-Krise.

2.3 Syndrome, bei denen eine Verwandtschaft mit der MH diskutiert wird

Es existieren einige Syndrome, bei denen eine Verwandtschaft mit der MH diskutiert wird. Zu diesen Krankheitsbildern gehören das Human Stress Syndrome (HSS), das maligne neuroleptische Syndrom und das Central Core Disease.

Das Human Stress Syndrom (HSS) ist ein sehr seltenes Krankheitsbild, bei dem MH-ähnliche Episoden beobachtet wurden, die ohne Einsatz jedweder Anästhetika auftreten. Das HSS (auch als „exercise induced rhabdomyolysis“ bezeichnet) manifestiert sich an sehr warmen Orten (z.B. im türkischen Bad oder in der Sauna) oder nach starker körperlicher Belastung, insbesondere in warmer Umgebung. Weiterhin gibt es Fallbeschreibungen von HSS als Komplikation einer infektiösen Erkrankung (Wingard 1974; Jardon 1982, Hopkins et al. 1991; Hackl et al. 1991; Jurkat-Rott et al. 2000, Wappler et al. 2001).

Die Krankheit äußert sich in Schwindel, Übelkeit und Kopfschmerzen bis hin zur Bewußtlosigkeit. Im Verlauf kommt es zu einem starken Temperaturanstieg und zum Schock. Durch Ödeme und Krämpfe der quergestreiften Skelettmuskulatur kommt es zur Rhabdomyolyse und bei weiterem Fortschreiten zum Multiorganversagen, vor allem durch den exzessiven Anfall von Myoglobin und durch eine Koagulopathie im Rahmen des Schocks.

Das maligne neuroleptische Syndrom ist eine seltene, potentiell tödlich verlaufende abnorme Reaktion auf Antipsychotika. Als möglicher Triggersubstanzen sind in erster Linie Haloperidol und Fluphenazin zu nennen, jedoch kommen Butyrophenone, Phenothiazide und Thioxanthine ebenfalls als Auslöser in Betracht. Etwa 24-72 Stunden nach Exposition

2 Einleitung

kommt es zur Muskelrigidität bis hin zur Rhabdomyolyse, zur deutlichen Hyperthermie und schließlich zur Ausbildung eines Schocks. Die genaue Ätiologie ist unbekannt, ein Zusammenhang mit ausgeprägten Dopamin-Rezeptorblockaden im Hypothalamus und in den Basalganglien wird angenommen. Therapeutisch stehen neben dem Absetzen der auslösenden Substanz supportive Maßnahmen wie Kühlung und die Behandlung des Schocks im Vordergrund, bei ausgeprägter Muskelrigidität kann die Gabe von Dantrolen sinnvoll sein (s. Kapitel 2.7). Vor dem Hintergrund des dopaminabhängigen Pathomechanismus des Syndroms wurden Dopamin-Antagonisten wie Bromocriptin, Levodopa und Amantadin mit Erfolg eingesetzt (Brownell 1988; Guerrero et al. 1988; Takagi et al. 1983).

Das Central Core Disease ist eine durch Muskelhypotonie, verzögerte motorische Entwicklung, eine symmetrische proximale Kraftlosigkeit und erhöhte CK gekennzeichnete Muskelerkrankung und wird zu den MH verwandten Syndromen gezählt (Brownell 1988; Denborough et al. 1973; Quane et al. 1994). Der Name des Syndroms nimmt Bezug auf das histologische Bild der Erkrankung. Entlang der gesamten Typ 1 Muskelfasern liegen zentrale Kerne. Hier finden sich ebenfalls die langsamen Ca^{2+} ATPase Pumpen. Die Kerne bestehen aus unstrukturierten Muskelfibrillen. Es fehlen Mitochondrien und Typ 2 Muskelfasern. Durch die Anwendung oxidativer Enzyme ist ein histochemischer Nachweis möglich.

Die zugrunde liegende Pathogenese ist eine Schädigung der Mitochondrien durch eine Überladung des Myoplasmas mit Ca^{2+} , wodurch es zu einem Abfall der metabolischen Aktivität kommt. Zusätzlich wird über kompensatorische Mechanismen eine Proliferation der Sarkoplasmatischen Retikula und der transversalen Tubuli ausgelöst. Beide Vorgänge können einen Verlust von Muskelfasern bewirken. Der Erbgang ist autosomal dominant. Nicht jedes Familienmitglied entwickelt

2 Einleitung

die Myopathie, aber alle haben scheinbar eine Prädisposition zur MH (Lenzen et al. 1993; Denborough 1998).

Ebenso wie die Maligne Hyperthermie ist das Central Core Disease (CCD) pathogenetisch mit dem *RYR1*-Gen assoziiert; einige Mutationen konnten in diesem Gen nachgewiesen werden, die sowohl bei Patienten mit MH als auch bei 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

Zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie muss zu Beginn die Funktionsweise der Skelettmuskulatur von Säugern nachvollzogen werden. Die Erregungs-Kontraktionskopplung der Muskulatur ist eine fein abgestimmte Interaktion zwischen dem spannungsabhängigen Dihydropyridinrezeptor (DHPR), dem Ryanodinrezeptor und der Ca^{2+} -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums. Das Aktionspotential des Motoneurons, das sich von der Endplattenregion über die gesamte Muskelfaser ausbreitet, ist der Beginn der Kontraktion der quergestreiften Skelettmuskulatur. Es erreicht die transversalen Tubuli, wo durch Depolarisation der Dihydropyridinrezeptor stimuliert wird. Dieser spannungsabhängige Kalziumkanal leitet das Signal auf den Ryanodinrezeptor weiter, welcher sich daraufhin öffnet und Ca^{2+} aus dem SR in das Myoplasma freisetzt. Dieser Vorgang stellt den Hauptmechanismus der Muskelkontraktion dar.

Liganden wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Calmodulin und Sphingosin modulieren die Aktivität des Ryanodinrezeptors. Weiterhin wird die Öffnungsdauer durch zelluläre Kaskaden beeinflusst, die eine Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors bewirken. Nicht zuletzt modulieren auch verschiedene Substanzen wie z.B. Koffein und Inhalationsanästhetika das Öffnungsverhalten des Ryanodinrezeptors (Coronado et al. 1994).

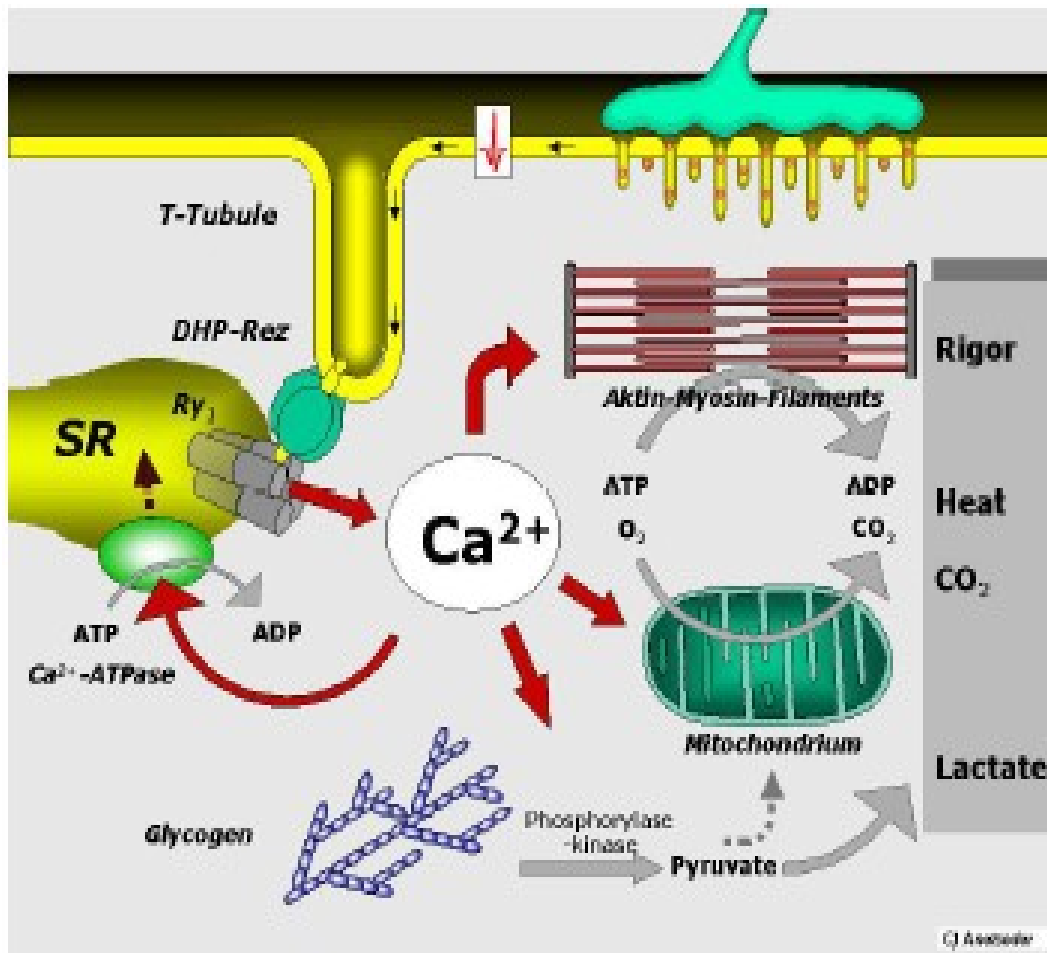


Abb. 2.1 Ca²⁺-Stoffwechsel in der Skelettmuskelzelle. Grafik nach Anetseder M und Müller CR (2003).

Das in das Myoplasma freigesetzte Ca²⁺ bindet an Troponin, welches über eine Konformationsänderung des Proteins Tropomyosin zu einem Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente führt, die Muskelfaser verkürzt sich. In Anwesenheit von ausreichend hohen Konzentrationen von Ca²⁺ und ATP wiederholt sich der Vorgang und der Muskel kontrahiert weiter. Durch Zurücktransport des Ca²⁺ in das Sarkoplasmatische Retikulum normalisiert sich der myoplasmatische Ca²⁺-Spiegel wieder. Dies führt zur Lösung der Aktin-Myosinfilamente und der Muskel relaxiert. Der Dihydropyridinrezeptor ist ein aus fünf Untereinheiten bestehender Ca²⁺-Kanal: α1 mit einer Masse von 175kDa, α2/δ mit 143/27 kDa, β mit

2 Einleitung

54 kDa und γ mit 30 kDa. Die α -Untereinheit ist mit vier Domänen, die jeweils aus sechs loops bestehen, welche die Zellmembran durchspannen, die größte Untereinheit und stellt die funktionelle Einheit des DHPR dar. Sie besitzt die pharmakologischen Bindungsstellen für Agonisten und Antagonisten, formt die Ca^{2+} -Kanalpore und stellt den Spannungssensor dar (Catterall 1995). Die übrigen Subeinheiten haben regulatorische Funktion und unterstützen die Lokalisation des DHPR in der transtubulären Membran. Nach Depolarisation der Membran findet eine Konformationsänderung des DHPR statt, die es einem kurzen Stück der Primärsequenz in der II-III Loopdomäne der $\alpha 1$ -Untereinheit gestattet, mit der korrespondierenden cytoplasmatischen Domäne des Ryanodinrezeptors zu interagieren und somit die Ca^{2+} -Ausschüttung zu bewirken (Leong et al. 1998).

Der Ryanodinrezeptor repräsentiert eine Familie intrazellulärer Ca^{2+} -Kanäle. Bisher wurden drei Isotypen, die durch verschiedene Gene kodiert werden, beschrieben (Franzini-Armstrong et al. 1997). Die Hauptformen sind *RYR1* und *RYR2*, welche in der Skelettmuskulatur und im Myokard exprimiert werden, wohingegen *RYR3* in „Nichtmuskelgewebe“ wie z.B. im Gehirn vorkommt.

Verantwortlich für die Dysregulation des Ca^{2+} -Haushaltes im Rahmen einer fulminanten MH-Krise sind die Ryanodinrezeptoren der Skelettmuskulatur *RYR1*. Hierbei handelt es sich um sehr große Proteine, welche Tetrameren aus vier gleichen Untereinheiten von jeweils 565 kDa darstellen. Mit einer Gesamtmasse von 2,3 MDa sind sie die größten beschriebenen Ionenkanalproteine (Franzini-Armstrong et al. 1997). Der hydrophobe Anteil des Rezeptors formt eine membrandurchspannende Pore und die hydrophilen Teile bilden eine cytoplasmatische Domäne, die den Spalt zwischen dem transversalen Tubulus und dem SR überbrückt (Wagenknecht et al. 1997). Die Transmembrandomäne des Holorezeptors wird vom C-terminalen 1/5 des *RYR1*-Proteins gebildet, während die N-terminalen 4/5 die cytoplasmatische Domäne formen. Bei einer durch

2 Einleitung

Anästhetika induzierten MH-Krise kommt es zu einer schnellen und andauernden Ausschüttung von Kalziumionen aus dem SR ins Myoplasma (O'Sullivan et al. 2001). Dieser Vorgang verursacht die beobachteten Muskelkontraktionen und den beschriebenen Hypermetabolismus (s. Abb. 2.1). Die Änderung in der Ca^{2+} -Homöostase der MHS-Muskelfaser resultiert aus einem Defekt im Mechanismus der Erregungs-Kontraktur-Kopplung. Daher kommen Veränderungen des *RYR1*-Rezeptors ursächlich in Betracht. Alternativ oder zusätzlich scheint auch eine Fehlregulation über den DHPR plausibel.

2.5 Die Genetik der Malignen Hyperthermie

In Familien mit gehäufter Inzidenz der MH wurde ein autosomal dominanter Erbgang festgestellt. Kopplungsanalysen auf Chromosom 19 mit den polymorphen Markern *D19S9*, *CYP2S*, *BCL3*, *pSC11* und *APOC2* konnten in drei großen irischen Familien eine enge Kopplung der MH mit der Region Chromosom 19q13.1 nachweisen (McCarthy et al. 1990), der Genlokus von *RYR1*. In einigen Kollektiven war es möglich, eine Mutation im *RYR1*-Gen nachzuweisen, die analog im *RYR1*-Gen eines Schweines das Schweine Stress Syndrom (PSS) auslöst (Gillard et al. 1991). Jedoch wurde festgestellt, dass lediglich 6% der MHS-Patienten diese Mutation zeigten und beim Großteil nicht nachzuweisen war, obwohl eine enge Kopplung mit dem *RYR1*-Gen gezeigt wurde. Weitere Untersuchungen konnten andere Punktmutationen im *RYR1*-Gen nachweisen, die mit dem Phänotyp einhergingen. Von diesen Mutationen konnte ein Teil ebenfalls beim Central Core Disease nachgewiesen werden.

Der komplette Aufbau des Ryanodinrezeptorgens wurde 1996 durch Philips et al. beschrieben. Das Gen für den Rezeptor ist 160 kb groß und besitzt 106 Exons, die eine Länge von 15 bis 813 bp haben. Die Introns haben eine Länge zwischen 85 und 16000 bp. Durch Transkription und

2 Einleitung

Spleißing entsteht eine mRNA von etwa 15 kb, die für 5035 Aminosäuren kodiert, welche wiederum ein Protein von 565 kDa bilden.

Dass die für die MH prädisponierenden Mutationen nicht gleichmäßig auf dem Gen verteilt sind, sondern in zwei Regionen clustern, konnte durch erste Untersuchungen gezeigt werden. Diese Cluster befinden sich zwischen den Aminosäureresten 35-614 (MH/CCD Region 1) und im mittleren Teil des Proteins zwischen den Aminosäuren 2163-2458 (MH/CCD Region 2). Neuere Untersuchungen zeigten ebenfalls einige Mutationen in der C-terminalen luminalen/transmembranen Region (Brown et al. 2000, Galli et al. 2002, Oyamada et al. 2002, Monnier et al. 2005), diese Region bezeichnet man als MH Region 3. In dieser Region wurden auch für das CCD prädisponierende Mutationen nachgewiesen. Durch komplette Sequenzierung des *RYR1*-Gens in neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch außerhalb der sogenannten „hot spots“ für MH prädisponierende Mutationen auftreten können (Robinson et al. 2006). Es wird behauptet, dass man heute durch solche Untersuchungen bei etwa 50% der MHS-Patienten Mutationen im *RYR1*-Gen nachweisen kann.

Der DHPR interagiert, wie bereits ausgeführt, eng mit dem Ryanodinrezeptor und moduliert auf diese Weise die Ca^{2+} - Freisetzung aus dem SR. Die $\alpha 1$ -Einheit bildet die Ionenpore, dient als Bindungsstelle für Ca^{2+} -Antagonisten und fungiert als spannungsabhängiger Kalziumkanal. Der Genlocus für die $\alpha 1$ -Einheit ist auf Chromosom 1q32.1 Eine Assoziation mit dem Dihydropyridinrezeptorgen konnte in einigen MH-Patienten nachgewiesen werden. Bei einer großen französischen Familie wurde die Substitution Arg1086His gefunden, die bei Familienmitgliedern, welche im IVCT als MHS getestet wurden, nachweisbar war, bei jenen, die unauffällige Ergebnisse im IVCT lieferten, nicht gefunden wurde.

Also kann man annehmen, dass für die MH-Prädisposition dieser Familie diese Mutation ursächlich ist. Daraufhin wurden 50 MHS-Patienten, die

2 Einleitung

nicht mit dieser Familie verwandt waren, auf diese Mutation untersucht, ohne sie nachweisen zu können (Monnier et al. 1997). Ihr Einfluss auf die Muskelexzitation konnte in Funktionsuntersuchungen gezeigt werden (Weiss et al. 2004). Bei einem weiteren Patienten konnte in der α 1-Untereinheit eine c.4475C>A Substitution, die zum Austausch von Alanin 1492 durch Asparaginsäure führte, nachgewiesen werden (Carsana et al. 2003).

Die für die β - und γ -Einheiten kodierenden Gene sind auf Chromosom 17q11.2-q11.24 lokalisiert. Von Levitt und Moslehi et al. (Levitt 1992, Moslehi et al. 1998) durchgeführte Kopplungsstudien geben Anlass zur Vermutung, dass hier weitere Mutationen vorliegen, bisher konnten jedoch keine detektiert werden. Die α -Untereinheit des Natrium-Kanal-Gens befindet sich ebenfalls in diesem Bereich. In diesem Gen konnten zwei Mutationen nachgewiesen werden, die als Ursache für die hyperkaliämische periodische Paralyse gelten (Koch et al. 1991).

Das Gen für die α 2/ δ -Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors befindet sich auf dem Chromosom 7q11.23-q21.1. In einer Familie konnte eine Kopplung zwischen dieser Region und der MH gezeigt werden (Illes et al. 1994).

2.6 Therapie

Bereits bei den ersten Anzeichen einer MH-Krise wird die Therapie eingeleitet. Die Applikation der Triggersubstanzen wird umgehend unterbrochen. Die Beatmungsparameter werden derart umgestellt, dass unter Kontrolle des endexpiratorischen Kohlendioxids das Atemminutenvolumen bei hoher Frischluftzufuhr so weit gesteigert wird, bis normale Werte erzielt werden. Additiv wird die Narkose mit Opiaten, Propofol, Barbituraten oder Benzodiazepinen vertieft. Sollte diese Behandlung nicht genügen, erfolgt eine Bolusgabe von Dantrolen i.v. (2,5

2 Einleitung

mg/kg KG), da so ein weiterer Ausstrom von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum inhibiert werden kann. Die Applikation erfolgt, bevor das gesamte Kalzium aus dem SR in das Myoplasma gelangt. Weiterhin wird die metabolische Azidose mit Natriumbikarbonat gepuffert, falls nach der Gabe von Dantrolen noch notwendig, Herzrhythmusstörungen werden mit Antiarrhythmika behandelt. Zusätzlich werden die Patienten durch Abdecken, Oberflächenkühlung mit Eis und Spülungen mit Eiswasser gekühlt. Das drohende akute Nierenversagen durch den ausgeprägten Anfall von Myoglobin wird durch forcierte Diurese verhindert.

Die Gabe von Dantrolen erfolgt repetitiv solange, bis sich die Symptome der metabolen Stoffwechselsituation normalisieren, hierzu können bis zu 10 mg pro kg Körpergewicht erforderlich sein (Procter & Gamble Pharmaceuticals 1996).

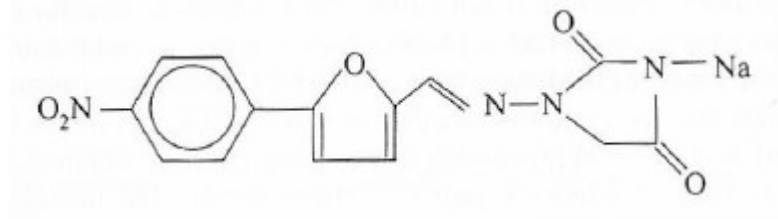


Abb. 2.2: Dantrolen

Dantrolen bindet an den Ryanodinrezeptor und hemmt so die weitere Kalziumausschüttung. Die Substanz wurde 1967 initial zur Therapie von Muskelkrämpfen nach apoplektischen Insulten eingesetzt (Snyder et al. 1967), es handelt sich um ein Hydantoinderivat. Abb. 2.2 zeigt die Strukturformel von Dantrolen. Bei bestimmten am Schweine Stress Syndrom (PSS) leidenden Schweinerassen konnte 1975 gezeigt werden, dass fulminante Episoden durch Dantrolen terminiert werden können (Harrison 1975). Dantrolen ist seit 1979 für die intravenöse Applikation bei Patienten verfügbar. Wie bereits zuvor erwähnt, konnte durch diese Therapie die Letalität der MH-Krise von 80% auf unter 7% reduziert werden.

2 Einleitung

Neben der fulminanten MH-Krise existieren auch sogenannte abortive Verlaufsformen, die nicht alle Symptome bieten und zum Teil ohne Therapie spontan sistieren (Fiege et al. 2000).

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

Der Goldstandard der präsymptomatischen Diagnostik ist zur Zeit der *in-vitro*-Kontraktions-Test (IVCT). Es handelt sich um einen physiologischen Test mit einem Muskelbiopsat. Der Test sollte an allen Personen durchgeführt werden, die eine fulminante MH-Krise überlebt haben oder bei denen es Hinweise für eine abortiv durchlaufene Krise gibt. Da die Prädisposition zur Malignen Hyperthermie autosomal dominant vererbt wird ist eine Testung aller Blutsverwandten des Anlagenträgers ebenfalls sinnvoll. Für den Test wird ein etwa 5 cm langes Bündel Muskelfaser des Probanden präpariert und in ein Organbad zwischen zwei Elektroden fixiert und elektrisch gereizt. Anschließend wird sowohl das Ausmaß der Kontraktion als auch die Grundspannung gemessen.

1970 wurde eine Hyperkontraktilität von Skelettmuskelfasern Maligner Hyperthermie prädisponierter Muskeln als Reizantwort auf Koffein und eine Kombination von Koffein und Halothan gezeigt (Kalow et al. 1970). 1971 wiesen Ellis et al. eine gesteigerte Kontraktion der Muskelbündel nach alleiniger Exposition mit Halothan nach (Ellis et al. 1971). Erst 1983 wurde durch die Europäische Maligne Hyperthermiegruppe (EMHG) ein einheitliches Protokoll zur Durchführung des IVCT zur Diagnostik der Prädisposition zur Malignen Hyperthermie festgelegt (The European Malignant Hyperpyrexia Group 1984).

Zur Durchführung wird aus dem Oberschenkel der Patienten Muskelgewebe entnommen, in carboxygenierte Ringerlösung überführt und unmittelbar ins diagnostische Labor gebracht, wo das Biopsat in mehrere Muskelbündel präpariert und jeweils eines davon in ein Organbad

2 Einleitung

mit nicht Anästhetika resorbierender Beschichtung (Teflon) überführt, wo es an einem Ende immobilisiert und an dem anderen an einen Kraftüberträger fixiert und mit 1-2 Gramm Zug vorgedehnt wird. Das Muskelbiopsat wird nach 30 Minuten Equilibrierung supramaximal durch einen elektrischen Impuls stimuliert und die Grundspannung sowie die Kontraktur des Muskels gemessen.

Das 40 x 10 x 5mm große Biopsat wird einheitlich aus dem M. vastus lateralis entnommen, der zu 40% aus Typ I-Fasern und zu 60% aus Typ II-Fasern besteht, da Differenzen zwischen Typ I- und Typ II-Fasern bezüglich der Sensitivität gegenüber Koffein beschrieben wurden.

Die Bündel werden an beiden Enden fixiert und vertikal in das Experiment-Bad eingebracht.

Der untere Pol des Muskelbündels wird immobilisiert, das obere Ende an einem Kraftträger fixiert und das Bündel durch einen supramaximalen elektrischen Impuls (Rechtecksignal) von 1ms Länge mit einer Frequenz von 0,2 Hz stimuliert. Der Kraftüberträger ist an einen Verstärker angeschlossen und die Muskelspannung und Kontraktionsspannung gemessen und registriert.

Das Bad wird bei 37°C mit Krebs-Ringer-Lösung perfundiert und mit 95% O₂ / 5% CO₂ carboxygeniert. Hierbei sind die Muskelbündel durch einen Mikromanipulator auf ihre 1,5-fache Länge gedehnt. Der Test beginnt, wenn Grundspannung und Kontraktionsspannung jeweils auf konstantem Niveau sind.

2 Einleitung

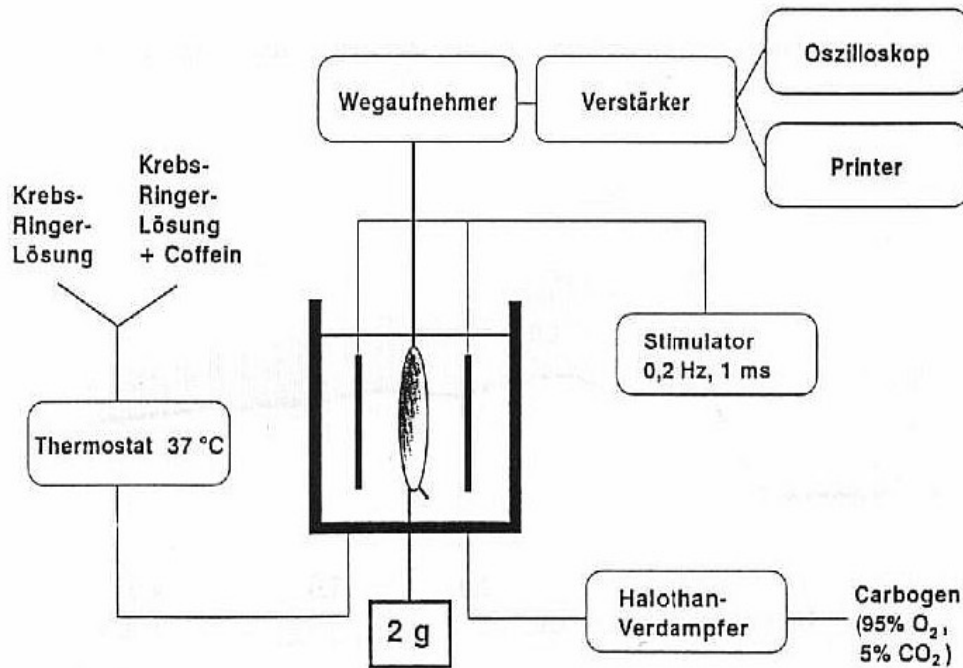


Abb. 2.3 Schematischer Aufbau des in-vitro Kontrakturtests. Aus „Informationen zur Malignen Hyperthermie“ 2000 (Baur et al.)

Für jeden Test muss ein frisches Muskelbündel verwendet werden, zwischen Entnahme des Biopsats und dem Testende sollten weniger als 5 Stunden liegen.

Das Protokoll sieht zwei Tests vor, die jeweils zweimal durchgeführt werden: den statischen Koffein-Kontraktur-Test und den statischen Halothan-Kontraktur-Test.

Nachdem Grundspannung und Kontraktionsspannung auf einem konstanten Level angelangt sind wird beim statischen Koffein-Kontrakturtest die Perfusion mit Krebs-Ringer-Lösung gestoppt und Koffein kumulativ dem Bad zugeführt, so dass im Bad Konzentrationen von 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 und 32 mmol Koffein erreicht werden. Die nächste Dosis wird dem Bad zugegeben, wenn die maximale Grundspannung erreicht ist, oder nach 3 Minuten, wenn sich die Grundspannung nicht mehr steigert. Bei einer Konzentration von 23 mmol Koffein sollte durch

2 Einleitung

eine Grundspannung von 50 mN eine ausreichende Viabilität des Muskelbündels nachgewiesen werden. Ein Ansteigen der Muskelspannung von mehr als 2 mN wird als abnormale Kontraktion gewertet.

Nachdem Grundspannung und Kontraktionsspannung auf einem konstanten Niveau angelangt wird beim statischen Halothan-Kontraktur-Test dem Testbad Halothan in Konzentrationen von 0.11, 0.22 und 0.44 mmol zugeführt, was 0.5, 1.0 und 2.0 % v/v entspricht.

Die nächste Dosis wird dem Bad hinzugegeben, wenn die maximale Grundspannung erreicht ist, oder nach 3 Minuten, wenn sich die Grundspannung nicht mehr steigert.

Ein Ansteigen der Muskelspannung um mehr als 2 mN wird als abnormale Kontraktion gewertet.

Der Test ist nur gültig, wenn die Kontrakturspannung mindestens 10 mN beträgt und eine minimale Grundspannung von 50 mN bei 32 mmol Koffein erreicht wird.

MHS wird diagnostiziert, wenn der Anstieg der Grundspannung größer gleich 2 mN über der niedrigsten gemessenen Grundspannung ist bei Kaffeinkonzentrationen von 2 mmol oder weniger bzw. Halothankonzentrationen von 0.44 mmol (2 Vol%). Eine abnormale Kontraktion entweder nur durch Koffein oder nur durch Halothan entspricht der Diagnose einer MHE. Aus Sicherheitsgründen werden diese Personen klinisch wie MH-prädisponierte Patienten behandelt.

Wird bei beiden Tests ein negatives Ergebnis erzielt, besteht keine Gefahr für den Patienten (MHN).

Unter Verwendung des gleichen Protokolls wurden gleichfalls Versuche mit Ryanodininkubation durchgeführt. Heraus kam, dass MH-positive Patienten nach einer Bolusgabe Ryanodin deutlich schneller mit einer Kontraktion beginnen. Häufig betrug diese Zeit einen Bruchteil der Werte nicht-positiver Probanden (Lenzen et al. 1993, Wappler et al. 1993). Mit dieser Zusatzinformation konnten initial nicht eindeutig zuzuordnende

2 Einleitung

Patienten (MHE) als MHS oder MHN eingruppiert werden. Jedoch hat dieses Verfahren aktuell keinen routinemäßigen Einsatz in der Diagnosestellung.

2.8 Molekularbiologische Diagnostik

Nachdem im *RYR1*-Gen bestimmter Schweinerasse mit PSS die Punktmutation c.1843C>T nachgewiesen werden konnte, konnte ein molekulargenetischer Test entwickelt werden, mit dessen Hilfe die Prädisposition bei Schweinen gezeigt werden konnte.

Jedoch wurde, entgegen anfänglicher Hoffnung, festgestellt, dass die Installation eines solchen nicht-invasiven Tests in der Routinediagnostik bei Menschen nicht möglich ist. Der Grund hierfür ist, dass die genetische Variabilität, mit der die Prädisposition zur MH vererbt wird, bei Menschen sehr groß ist im Gegensatz zu den Schweinen, wo lediglich eine Punktmutation die PSS-Prädisposition festlegt.

Die molekularbiologische Diagnostik ist heute möglich und findet unter anderem bei großen Familien Einsatz, bei denen eine bekannte Prädisposition zur MH durch eine Mutation im *RYR1*-Gen auf Chromosom 19q13.1-q13.2 eindeutig gezeigt werden konnte. Sobald man in einer Familie die MH-verursachende Mutation nachgewiesen hat, kann man bei den Verwandten auf den schmerzhaften und invasiveren *in vitro*-Kontraktionstest verzichten. In Studien konnte eine gute Korrelation der molekularen Mutationsnachweise mit den Resultaten des IVCT gezeigt werden (Robinson et al. 2000). Die molekulare Analyse weist scheinbar eine höhere Spezifität als der IVCT auf. Beispielsweise können Fasern des Muskelbiopsats nach der Präparation durch Austrocknung geschädigt werden und so im Versuch nicht mehr die erforderliche Kontraktion erbringen, wodurch das Ergebnis eventuell falsch negativ würde.

3 Material und Methoden

In bisher durchgeführten Studien konnten keine einheitlichen Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation des Genotyps mit der Ausprägung des Phänotyps gezeigt werden (Fiege et al. 2002, Robinson et al. 2002, Robinson et al. 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien, Farbstoffe und Lösungsmittel stammen, wenn nicht explizit erwähnt, von den Firmen Merck, Boehringer Mannheim, Sigma und Gibco BRL. Der Reinheitsgrad der Chemikalien war jeweils zur Analyse. Agarose wurde von der Firma Gibco BRL bezogen.

Im Rahmen der Arbeit wurde mit drei unterschiedlichen Taq-Polymerasen gearbeitet.

- Taq-Polymerase der Firma Gibco BRL., Life Technologies
- Platinum® Taq DNA Polymerase (PCR Supermix) der Firma Gibco BRL., Life Technologies
- HotStar Taq DNA Polymerase (Master Mix) der Firma Quiagen

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

3.2 Lösungen und Puffer

Nachfolgend angegeben sind die Zusammensetzungen der häufig angewandten Lösungen, Puffer und Medien. Für die Herstellung wurde entionisiertes Wasser benutzt.

Blutlysepuffer:

NH ₄ Cl	8,3g (155 mM)
KHCO ₃	1g (10 mM)
Na ₂ EDTA	0,034g (0,5 M)
auf pH 7,4 einstellen	

SE-Puffer (Sodium-EDTA):

NaCl	4,3g (75mM)
Na ₂ EDTA	8,41g (25mM)

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

SDS-Stammlösung:

SDS (Natriumdodecylsulfat)	20g
Aqua dest.	100 ml

Chloropan:

Phenol	200 ml
TE (pH 8,0)	50 ml
Chloroform	250 ml
Hydroxychinolin	250 ml

3 Material und Methoden

Chloroform-Isomylalkohol:

Chloroform	24 Teile
Isomylalkohol	1 Teil

TE-Puffer (nach Singh):

Tris/HCl	10 mM
EDTA	0,1 mM
pH auf 8,0 einstellen	

TBE-Puffer (1x):

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

EDTA-Stammlösung:

EDTA	0,5 M
Auf pH 8,0 einstellen	

Acrylamid-Stammlösung (30%):

Acrylamid	28,5%
N,N´ Methylenebisacrylamid	1,5%
Anmerkung: Lösung lichtgeschützt bei +4°C lagern	

Ethidiumbromid-Färbelösung:

TBE-Puffer	40 ml
Aqua dest.	40 ml
Ethidiumbromid	0,5 µg/ml

Anmerkung: Die Lösung sollte nach 2 Tagen Gebrauch entsorgt werden

3 Material und Methoden

Formamid-Ladepuffer:

Formamid	10 ml
EDTA-Stammlösung	0,2 ml
Xylencyanol	10 mg
Bromphenolblau	10 mg

Ladepuffer (10x) für Agarosegele:

Ficoll	2,5 mg
Bromphenolblau	25,0 mg
Xylencyanol	25,0 mg
Auffüllen mit Aqua dest. ad	10 ml

Lösungen für Silbernitratfärbungen:

Fixierer:

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

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

AgNO₃-Lösung:

- AgNO ₃	2,01 g
aqua dest. ad	1 L

Entwickler:

- Na ₂ CO ₃	59,2 g
- Formaldehyd	1080 µg
- aqua dest. ad	3 L

Stopplösung:

- Essigsäure	10%
--------------	-----

3.3 Verwendete Geräte

PCR-Geräte:

PCR-Express der Firma Hybaid

Omnigene der Firma Hybaid

Hybaid GmbH

Rischerstrasse 12

69123 Heidelberg

Zentrifugen:

Eppendorf Laborzentrifuge: Centrifuge 5415

Hettich Zentrifuge: Hettich Rotana/S

Cleanbench:

Cleanbench der Firma Bleimehl, Typ ASW-UP 2000

SSCP-Kammer:

SSCP-Kammer der Firma Gibco, BRL Life Technologies, Modell 2

Electrophoresis constant Power Supply, ECPS 2000/300

Agarosegelelektrophoresekammer:

Elektrophoresekammer der Firma Gibco BRL, Life Technologies

Electrophoresis Power Supply der Firma Gibco BRL, Life Technologies

Heizbadschüttler:

Heizbadschüttler Typ 1083 der Gesellschaft für Labortechnik mbH

3 Material und Methoden

Thermoblock:

Thermoblock Dri-Block BB-1 der Firma Techne

Sequenziergerät:

ABI-PRISM-DNA-ANALYSER 310 und 377

Das zur Isolation genomischer DNA benötigte Blut der 52 Patienten wurde von der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf; Direktor Prof. Dr. Schulte am Esch, zur Verfügung gestellt. Bei sämtlichen Patienten wurde ein IVCT durchgeführt, der für Halothan und Koffein pathologische Resultate erbrachte, so dass die Patienten als MHS eingestuft wurden.

Den Patienten wurde ca. 10 ml venöses Blut entnommen. Hierzu wurden Na⁺-EDTA-Röhrchen der Firma Sarstedt verwendet.

Die Blutproben wurden entweder unverzüglich verarbeitet, für wenige Tage bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt oder für einen längeren Zeitraum bei – 20°C gelagert.

3.4 DNA-Isolierung aus Blutleukozyten

Bei 52 Patienten, die genotypisiert werden sollten, wurde DNA aus Blutproben nach folgendem Protokoll isoliert.

Hämolyse

Hierzu wurden 10 ml venöses Blut aus den Na-EDTA-Röhrchen in ein Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Blut nach Zugabe von 30 ml Lyse-Puffer und unter mehrfachem kräftigen Schütteln für 10 min auf Eis inkubiert, wo durch den geringen osmotischen Druck des Blutlysepuffers und der niedrigen Temperatur die Erythrozyten platzen aber die Leukozyten unbeschadet überstehen. Die Proben wurden

3 Material und Methoden

anschliessend 7 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgegossen.

Proteindigestion

Dann ist das Pellet mit den Leukozytenzellkernen in 5 ml SE-Puffer resuspendiert worden, es wurden 500 µl SDS-Lösung (10%) und 50 µl Proteinase K zugefügt und das Gemisch bei 37 °C für vier bis sechs Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Durch diesen Prozess werden die Membranen der Zelle und des Kerns zerstört. Auf diese Weise befindet sich die DNA in freier Lösung und die Nukleasen werden irreversibel inaktiviert, wodurch eine Digestion der DNA verhindert wird.

DNA-Ausfällung mit NaCl

Durch Einsatz von hochmolarer Kochsalzlösung ist eine Isolierung von DNA aus Vollblut möglich (Miller et al. 1987). Demnach erfolgte eine abermalige Zugabe von 5 ml SE-Puffer. Es wurden 1,6 ml gesättigte NaCl-Lösung (6M) hinzugegeben und das Gemisch kräftig geschüttelt, anschließend wurde 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Dann wurde die DNA mit der 2,5-fachen Volumenmenge Ethanol 95% gefällt, mit einer sterilen Nadel herausgeholt und in 70% Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die DNA in einem autoklavierten Eppendorf-Tube über Nacht getrocknet und in 500 bis 1000 µl TE-Puffer nach Singh gelöst und im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt.

3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR wurde erstmals 1985 von Saki et al. beschrieben. Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht die Amplifizierung von DNA-Sequenzen, wenn die Sequenzen der Enden des zu vervielfachenden

3 Material und Methoden

DNA-Stückes bekannt sind. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der spezifischen Bindung strangspezifischer komplementärer Oligonukleotidprimer-Paare, welche die zu amplifizierende Zielregion der DNA flankieren, nachdem diese durch Erhitzen aufgetrennt wurde. Durch Polymerasen, die freie Nukleotide, welche sich im Gemisch befinden und sich an die komplementären Basen der DNA-Einzelstränge anlagern, miteinander verbinden entsteht ein neuer Doppelstrang. In den Anfängen war eine PCR sehr zeitintensiv, da das erforderliche Erhitzen die Polymerase inaktivierte und diese daher stets nach der Hybridisierung der freien Basen mit dem Einzelstrang hinzugegeben werden mussten. Durch die Einführung von thermostabilen Polymerasen aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* konnte die PCR automatisiert werden (Brown 1993).

Die PCR verläuft in drei Schritten, welche wiederum in diversen Zyklen durchlaufen werden: Denaturierungsschritt, Annealingschritt und Elongationsschritt. Die Denaturierung erfolgt bei 94 °C, dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wird die Temperatur auf 55-65 °C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im massiven Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf 72 °C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht, wobei der Primer verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Die Taq-Polymerase verlängert den Primer in 5'→3' Richtung durch Polymerisation von dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate), wobei das Prinzip der komplementären Basenpaarung eingehalten wird.

3 Material und Methoden

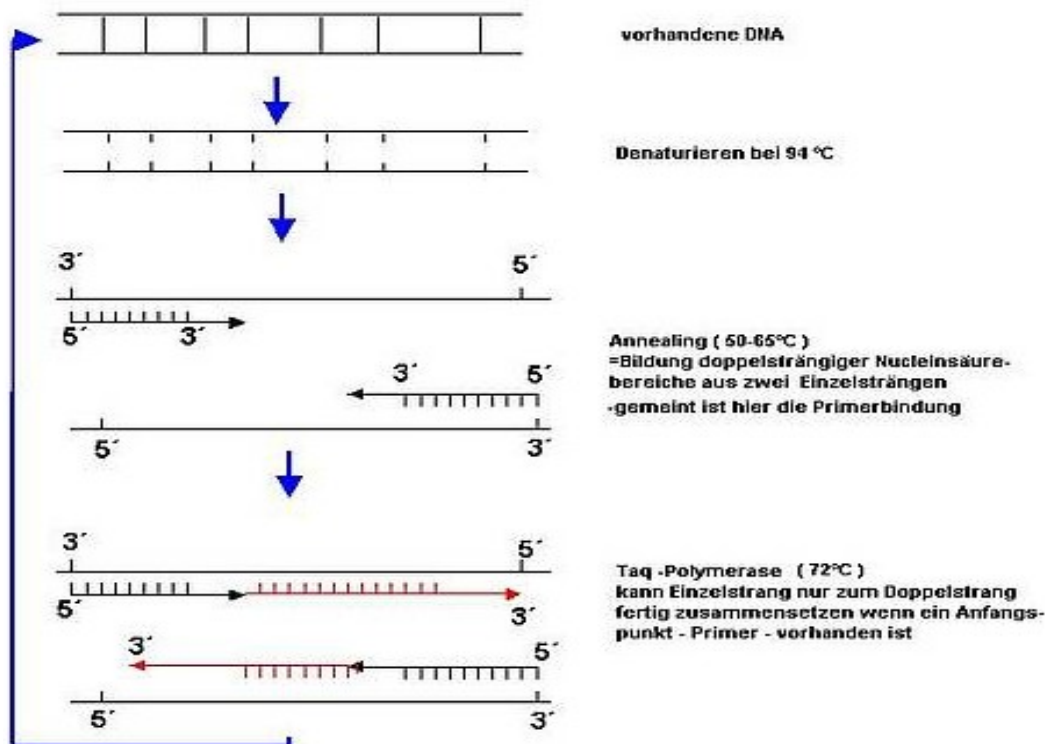


Abb. 3.1 Schema der Schritte der PCR. Aus "Bioron The Enzyme Company. Kleine Einführung in die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)"

Durch das vielfache durchlaufen dieser Zyklen wird die entsprechende DNA-Sequenz vervielfacht. Theoretisch kommt es zu einer Amplifikation um den Faktor 2^n , wobei n die Zahl der durchlaufenen Zyklen darstellt. Der Modus des exponentiellen Zuwachses ist aber in der Praxis limitiert. Eine Amplifikation findet nur so lange statt, wie ausreichende Mengen an Nucleotiden und Primern vorhanden sind. Wenn die Konzentration an Amplifikationsprodukten zunimmt, kommt es häufiger vor, dass diese untereinander anstatt mit den Primern hybridisieren. Daher nimmt die Vermehrungsrate je Zyklus gegen Ende der PCR stark ab. In der Praxis kommt es bei einer Zyklenzahl von 30-40 zu einer Amplifikation um den Faktor 10^6 bis 10^7 . Die Reaktionsbedingungen beeinflussen als weitere

3 Material und Methoden

Faktoren, wie oft die Ziel-DNA amplifiziert wird. So führt beispielsweise eine Erniedrigung der Temperatur für das Annealing dazu, dass die Primer zunehmend auch unspezifisch an die Template-DNA binden. Zwar dissoziiert ein Teil dieser Bindungen, wenn die Temperatur für den Elongationsschritt wieder erhöht wird, dennoch führt eine zu niedrig gewählte Annealing-Temperatur zu einer Zunahme unerwünschter unspezifischer Produkte, die die Effizienz der PCR vermindern. Die Annealing-Temperatur ist jeweils abhängig von der Sequenz der Primer, die verwendet werden. Das Auftreten unspezifischer Nebenprodukte kann minimiert werden, wenn die Taq-Polymerase erst nach Erhitzung und vollständiger Auftrennung der DNA in Einzelstränge hinzugegeben wird. Diese Methode wird Hot-Start-PCR genannt und wurde in dieser Arbeit mit taq-Polymerase der Firma Gibco BRL durchgeführt. Für eine PCR waren pro Ansatz folgende Komponenten notwendig:

- 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 1 µg/ml	1	µl
nach dem ersten Erhitzen auf 95°C		
- Taq-Polymerase Gibco BRL 1 U/µl	0,5	µl

Das Gemisch wurde kurz herunterzentrifugiert und mit einem Tropfen Nähmaschinenöl vor Verdunstung geschützt. Die Taq-Polymerase wurde nach dem ersten Erhitzen auf 95°C für drei Minuten hinzugefügt.

Einfacher in der Anwendung war Benutzung war der Einsatz einer durch Antikörper inaktivierten Polymerase. Dieser Antikörper wurde durch das Erhitzen des Ansatzes zerstört und die Polymerase dadurch erst aktiv, wenn die DNA bereits vollständig in Einzelstränge aufgespalten war. In

3 Material und Methoden

dieser Arbeit wurde für einen Teil der Proben für diese Methode der „HotStar Taq Master Mix“ von Qiagen benutzt, der neben der antikörperinaktivierten Polymerase ebenfalls Nukleotide, Puffer und BSA enthielt, so dass für diesen Ansatz folgende Komponenten erforderlich waren:

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

Der Ansatz wurde im Thermozykler zu Beginn für 18 Minuten auf 95°C erhitzt, wodurch der inaktivierende Antikörper zerstört wurde und die Taq-Polymerase aktiv werden konnte, um die Reaktion zu starten.

Für einige Primer waren trotz Variation der Reaktionsbedingungen keine adäquaten Produkte aquirierbar. Für diese Fälle konnten mit dem Platinum®-PCR Supermix unter folgendem Ansatz gute Produkte erarbeitet werden:

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

In Kapitel 4.1 ist erwähnt, für welche Produkte der Platinum®-PCR Supermix zum Einsatz kam. Die jeweils optimalen Bedingungen der eigentlichen PCR wurden zuvor empirisch ermittelt, die PCR wurde mit dem Thermozykler „Hybaid“ der Firma Omni Gene durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.5.1 Die Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer wurden anhand der veröffentlichten Sequenzen für den Ryanodinrezeptor ausgesucht (Philips et al. 1996) und über die Firma MWG-Biotech-GmbH bezogen.

Die Sequenzen sind unten aufgeführt:

Exon 2:	Primer F	5' CTG CAG TAT TTG TGG TAT CC3'
	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 12	Primer F	5' TAG ACA GAC GTC TTG GGC AT-3'
	Primer R	5' GAA AGA GGC CAA GTG TAT GG-3'
		Produktgröße 266 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 C3'
		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'

3 Material und Methoden

	Primer R	wie Primer 14/15 R
		Erwartete Produktgröße 289 bp
		Tatsächliche Produktgröße 286 bp
Exon 16	Primer F	5' CTT CAC CTC TCA TTC TGG G-3'
	Primer R	5' GAG TGA GCA GAG TTC TTG A-3'
		Produktgröße 250 bp
Exon 17	Primer F	5' CCC TCC CTG GGT TCT TCT GTA GAT3'
	Primer R	5'TCT GGG TGT GGA GTC TCT AAG TCA3'
		Produktgröße 282 bp
Exon 19	Primer F	5' TTC TGT GGG ACC TGT GAC GTC T-3'
	Primer R	5' TCA GTC CTA GGT CTG AGG ACT-3'
		Produktgröße 288 bp
Exon 37	Primer F	5' TGG GAT CTC AGA CCC TCA TT-3'
	Primer R	5' TCG AGA GAG AAG TAG CAT GG-3'
		Produktgröße 201 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 GTC3'
		Produktgröße 336 bp
Exon 40	Primer F	5' ACG CTG TCA CAG TGG TGG CTA 3'
	Primer R	5' ÁGC TCC CCA GCA CCT GCC TG 3'
		Produktgröße 235 bp
Exon 45	Primer F	5'TGC ATG AGG CGT TCA AAG CGG CTG3'
	Primer R	5'TGC ATG AGG CGT TCA AAG CGG CTG3'
		Produktgröße 183 bp
Exon 46	Primer F	5'TGC CCC TCT CCC TCC CTC TAC TCC3'
	Primer R	5'AGC ATC ACT CCT TCG CCAAGT TCC 3'
		Produktgröße 185 bp
Exon 47	Primer F	5' AAC TTG GCG AAG GAG TGA TG-3'
	Primer R	5' ATC TCC TGT CCC TCT GTG GAA-3'
		Produktgröße 299 bp
Exon 102	Primer F	5' CCT TGG CTG GTA CTC AGT GAA T 3'

3 Material und Methoden

Primer R 5' ATC CTG GGC CTG CAT TCT TAG 3'
Produktgröße 250 bp

Die Länge der Primer lag zwischen 18 und 24 Nukleotiden. Die Hybridisierungsstellen für die Primer lagen in den Intronbereichen vor und hinter dem jeweiligen Exon. Bei der Wahl der Primer wurde beachtet, dass sie einen GC-Anteil von 40-60% und nicht mehr als 4 gleiche Basenpaare in Folge aufwiesen. Letzteres diente der Vermeidung von Fehlhybridisierungen und Framshifts. Darüberhinaus sollten die Primer keine internen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln (hairpins) bilden, was die Wahrscheinlichkeit des Annealings reduziert hätte. Weiterhin durften die Primer nicht untereinander hybridisieren und sollten eine möglichst geringe Komplementarität ihrer 3'-Enden vorweisen.

3.6 PCR-Produktüberprüfung durch Gelelektrophorese

Durch die PCR ist es, wie bereits zuvor aufgeführt, möglich, durch kontinuierliche Amplifikation hohe Konzentrationen eines bestimmten DNA-Abschnittes zu erhalten, im Idealfall findet dies exponentiell statt. Die Produkte müssen jedoch jeweils auf ihre Qualität geprüft werden, da die Reaktion von vielen Faktoren abhängt (optimale Annealingtemperatur, ausreichende Konzentration der Reagenzien etc.). Zu dieser Prüfung ist die Agarosegelelektrophorese geeignet.

3.6.1 Herstellung der Agarosegele

Abhängig von der Art der aufzutrennenden DNA werden Agarosegele verschiedener Konzentration verwendet. Zum Auftrennen genomischer DNA bzw. ihrer Schnittprodukte wird eine 0,8%ige Konzentration gewählt, für Plasmid-DNA werden gängigerweise 1,2%ige Agarosegele verwendet.

3 Material und Methoden

Zur Auftrennung von PCR-Produkten eignen sich Gele mit einer Agarosekonzentration von 2%. Zur Auftrennung der PCR-Produkte der untersuchten Exons wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurden 2g Agarose in 100 ml TBE-Puffer in eine Laborflasche gegeben und in einer Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt. Nach Abkühlung der Agaroselösung auf 60-70° C wurde die gelöste Agarose in einen Gelträger gegossen, in den ein Kunststoffkamm zur Ausformung der Geltaschen eingebracht wurde. Die Anzahl der Geltaschen konnte durch die Wahl des Kunststoffkammes variiert werden. Der Kamm wurde nach vollständiger Aushärtung des Gels vorsichtig entfernt und das Gel in eine mit 1xTBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht, wobei das Gel komplett vom Puffer bedeckt sein musste.

3.6.2 Laden der Agarosegele

5 µl der zu trennenden DNA-Proben wurden mit 0,5 µl Ladepuffer vermischt, das Gemisch anschließend vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Durch das hohe spezifische Gewicht des Ladepuffers wurden die aufgetragenen Produkte in den Taschen gehalten und an der Diffusion in den Puffer gehindert.

3.6.3 Durchführung der Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt durch Anlegen einer Gleichstromspannung von 80-100 V. Die DNA wandert im elektrischen Feld vom negativen zum positiven Pol. Je nach Größe des PCR-Produktes unterscheidet sich dessen Wanderungsgeschwindigkeit, was zur Auftrennung führt.

3.6.4 Färbung und Dokumentation der Agarosegele

Zur Detektion der DNA wurden die Agarosegele nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt. Hierzu wurde das Gel bei Raumtemperatur für

3 Material und Methoden

15 Minuten in der Ethidiumbromidlösung geschüttelt und anschliessend für 5 Minuten entfärbt. Dies geschah in der Entfärbelösung (40 ml TBE, 40 ml aqua dest.). Die Beurteilung der Gele erfolgte auf einer UV-Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 302 nm. Zur Dokumentation wurde ein computergestütztes Auswertungssystem verwendet, mit dem Bilder der Gele ausgedruckt werden konnten.

Mit diesem Verfahren war es auch möglich, Aussagen über die Länge der DNA-Fragmente zu machen, so dass es sich auch zur Auftrennung von Produkten eignete, die durch Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden und sich dadurch in der Länge veränderten (siehe auch Abb. 4.7-10).

3.7 Analyse von DNA-Einzelstrangkonnformationspolymorphismen in PCR-Produkten (SSCP-Gel-Elektrophorese, Single Strand Conformation Polymorphism)

3.7.1 Prinzipien der SSCP-Analyse:

Die elektrophoretische Mobilität von Partikeln in einem Gel ist abhängig von ihrer Ladung, Größe und Struktur. Unter nicht-denaturierenden Bedingungen nimmt einzelsträngige DNA durch intramolekulare Interaktionen eine gefaltete Struktur ein, deren Konformation aus der Basensequenz resultiert. Änderungen dieser Sequenz führen über Konformationsänderung zu einer veränderten Mobilität in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Durch diese veränderte Mobilität kommt es zu einem veränderten Bandenmuster. Für die SSCP-Analyse werden DNA-Proben zunächst thermisch denaturiert, so dass sie einzelsträngig vorliegen, um dann in einem nicht-denaturierenden Gel elektrophoretisch aufgetrennt zu werden. Für die Suche nach Punktmutationen durch die SSCP-Analyse sind besonders DNA-Fragmente mit einer Länge bis zu 400 Basenpaaren geeignet. So können bei Verwendung von DNA-

3 Material und Methoden

Fragmenten von 400 bp 80% aller Punktmutationen durch die SSCP-Analyse detektiert werden, für DNA-Fragmente von 200 bp wird die Rate mit über 90% beziffert (Hayashi et al. 1992).

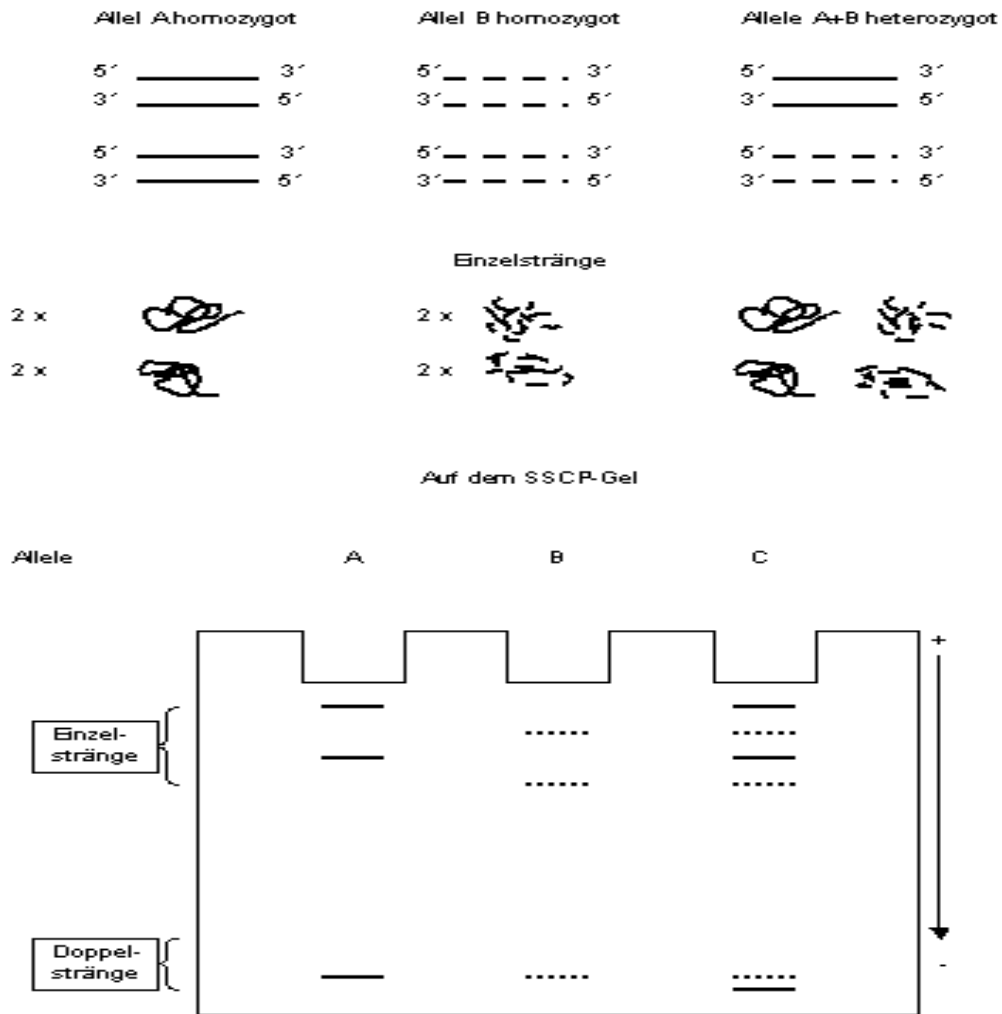


Abb. 3.2 Das Prinzip der SSCP-Gelelektrophorese

Größere DNA-Fragmente können nach Zerlegung durch Restriktionsendonukleasen einer SSCP-Analyse unterzogen werden oder die entsprechende Sequenz in Form mehrer überlappender Unterfragmente mittels PCR amplifiziert und durch SSCP analysiert.

3 Material und Methoden

Um die Banden sichtbar zu machen existieren mehrere Methoden. Radioaktiv markierte Primer oder Nukleotide mit anschließender Autoradiographie kommen ebenso zur Verwendung wie fluoreszenzmarkierte Primer. Die einfachste Möglichkeit besteht in der Färbung der Gele mit Silbernitrat. Diese Methode wurde in dieser Arbeit angewandt.

3.7.2 Herstellung der SSCP-Gele

Für die SSCP-Analyse wurden verschiedene Polyacrylamidgele verwendet. In allen Fällen handelte es sich um 8%ige Polyacrylamidgele. Zur Erhöhung der Sensitivität wurden die Untersuchungen zum einen mit 6% Glycerol in dem Gel und zum anderen ohne Glycerol durchgeführt.

Die Gele ohne Glycerol enthielten 1% TBE und wurden über Nacht gefahren. Die Gele mit Glycerol wurden zum Teil ebenfalls mit 1% TBE gegossen, die Elektrophorese erfolgte über Nacht. Zum Gießen der Gele wurden zunächst Glasplatten mit den Maßen 335 x 400 x 5 mm und 335 x 415 x 5 mm intensiv mit Detergenz gereinigt und anschließend mit Ethanol 94% poliert um die Entstehung von Luftblasen beim späteren Gießen zu verhindern. Die beiden Glasplatten wurden so aufeinander gelegt, dass die größere Glasplatte unten lag, somit die obere Platte also überragte. Die Glasplatten wurden durch 1 cm breite und 0,5 mm dicke Kunststoffstreifen, sogenannte Spacer, die an den Längsseiten zwischen den Platten lagen, voneinander getrennt. Am Rand wurden die beiden Glasplatten durch Klammern aneinander fixiert. Nach Vorbereitung der Glasplatten wurde die Polyacrylamidlösung hergestellt. Bei der Herstellung waren zwingend Handschuhe zu tragen, da das nicht polymerisierte Polyacrylamid (PAA) neurotoxisch wirkt und über die Haut resorbiert werden kann.

Folgende Polyacrylamidlösungen wurden für die SSCP-Gele verwendet:

3 Material und Methoden

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, 6% Glycerol, 1% TBE)

TBE 5x	24 ml
30% PAA	32 ml
aqua dest.	56 ml
Glycerol	7 ml
10% APS	1 ml
TEMED	50 µl

Die Zugabe von TEMED und APOS erfolgte unmittelbar vor dem Gießen des Gels. N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) initiiert als Radikal die Polymerisation des Polyacrylamidgels. Ammoniumpersulfat (APS) dient als Katalysator der Reaktion. Nach dem Anmischen der Polyacrylamidlösung wurde diese blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen, wobei die Lösung durch Kapillarkräfte zwischen die Platten gesogen wird. Nach blasenfreiem Giessen wurde anschließend ein 0,5mm Kunststoffkamm mit 32 Zähnen, die der Ausformung der Geltaschen dienten, in den oberen Spalt zwischen beiden Platten geschoben, wo die untere Platte die obere überragte. Der Kamm wurde ebenfalls mit Klammern fixiert. Das Gel war nach ca. 30 Minuten auspolymerisiert und konnte verwendet werden. Nach Polymerisation des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in eine Vertikal-Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Beide Pufferkammern wurden mit 1x TBE-Puffer gefüllt. Bei den 0,5% TBE-Gelen wurde 0,5x TBE verwendet. Am unteren Gelrand durften keine Luftblasen zurückbleiben.

3 Material und Methoden

Die Geltaschen wurden zweimal mit einer 50 ml Spritze und einer Kanüle mit TBE-Puffer gespült, um Gelreste und nicht polymerisiertes Acrylamid aus den Taschen zu entfernen.

Um eventuell vorhandene Verunreinigungen aus dem Gel zu entfernen, wurde ein Vorlauf von 20 Minuten bei 5 Watt Leistung durchgeführt.

3.7.3 Vorbereitung der Proben und Polyacrylamidelektrophorese

Zur Vorbereitung der Proben wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 7 µl Ladepuffer in ein Eppendorftube pipettiert und anschliessend für 10 Minuten bei 95 °C in einen Thermoblock gestellt, um die DNA zu denaturieren. Im Anschluss wurden die Proben 1 Minute auf Eis gelegt, um erneutes Hybridisieren der DNA zu verhindern, da das Vorhandensein von einzelsträngiger DNA Voraussetzung für die SSCP-Methode war. Anschließend wurden die Proben zügig aufgetragen und die Spannung und Stromstärke des Netzgerätes so eingestellt, dass 5 Watt Leistung erbracht wurden. Die Gele benötigten dann einen Lauf von 15 bis 20 Stunden. Durch verschiedene Farbstoffe im Formamidpuffer, die unterschiedlich im Gel wanderten, konnte gut abgeschätzt werden, wie weit die einzelsträngige und die noch doppelsträngige DNA im Gel gewandert war.

War das Gel lange genug gelaufen wurden die Glasplatten aus der Apparatur entnommen, die Spacer zwischen den Platten entfernt und die obere Platte vorsichtig entfernt, ohne das Gel zu beschädigen.

3.7.4 Fixierung, Färbung und Dokumentation des SSCP-Polyacrylamidgels

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Silberfärbungsmethode zur Darstellung der DNA-Banden im Polyacrylamidgel angewandt. Zum Fixieren wurde das Gel dann für 10 Minuten in ein Waschtablett mit 10%igem Ethanol überführt (270 ml aqua dest. und 30 ml Ethanol absolut). Anschließend wurde das Tablett auf einen Schüttler unter den

3 Material und Methoden

Abzug gestellt und die Ethanollösung mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. 300 ml 1% HNO₃ wurden auf das Gel gegeben und 3 Minuten geschüttelt. Danach wurde die HNO₃-Lösung abgesaugt und 2 mal mit aqua dest. jeweils 2 Minuten gewaschen.

Dann wurde das Gel unter Schütteln 30 Minuten mit einer Silbernitratlösung (2,0 g/l) gefärbt, die Silbernitratlösung anschließend abgesaugt und erneut 2 mal für 2 Minuten mit aqua dest. gewaschen.

Zum Entwickeln wurden 200 ml Entwicklerlösung auf das Gel gegeben und sofort wieder abgesaugt, um übriggebliebenes freies Silbernitrat zu entfernen. Der anschließend erneut zugegebene Entwickler wurde erst nach 10-20 Minuten entfernt, wenn die Banden gut sichtbar waren. Die Reaktion wurde mit 10% Essigsäure gestoppt, das Gel mit aqua dest. gewaschen und dann in eine Kunststoffolie eingeschweißt. Die Gele wurden dann auf einem Durchleuchtetisch fotografiert und bis dahin dunkel bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

3.8 DNA-Sequenzierung

3.8.1 Die Prinzipien der nichtradioaktiven DNA-Sequenzierung

Mit der DNA-Sequenzierung wird die Basenabfolge der DNA ermittelt. Hierzu wurde nicht die genomische DNA, sondern ein PCR-Produkt des Abschnittes, welcher zu sequenziert werden sollte. Mit den folgenden Reaktionen konnten somit deutlich größere Ausbeuten erzielt werden, da der entsprechende Abschnitt in vielen Kopien vorlag.

Durch Erhitzen auf 96°C wurde die DNA des PCR-Produktes in Einzelstränge gespalten. Durch Abkühlen auf 60°C erfolgte eine Hybridisierung mit einem Primer, hierbei konnte ein Primer des bereits für die Synthetisierung des PCR-Produkts benutzten Primerpaars benutzt werden. Da nur ein Primer Anwendung fand, wurde nur ein Strang der PCR-DNA amplifiziert.

3 Material und Methoden

Neben den Desoxynukleotiden waren im Ansatz ebenfalls 2'-3'-Didesoxynukleotide enthalten (ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP), welche Nukleotidanaloga sind. Die Elongation des Primers wird abgebrochen, wenn ein 2'-3'-Didesoxynukleotid integriert wird, da in diesem Fall die 3'-OH-Gruppe fehlt, an die das nächste Nukleotid angehängt werden könnte. Der Einbau eines 2'-3'-Didesoxynukleotids erfolgt nach den Gesetzen der Statistik. Auf diese Weise erhält man einen Satz von Fragmenten unterschiedlicher Länge die jeweils mit einem Didesoxynukleotid enden. Diese Fragmente unterschiedlicher Länge lassen sich in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach ihrer Länge basenpaargenau auftrennen. Das Gel muss denaturierend sein, da die einzelsträngige DNA Sekundärstrukturen ausbildet, die die Laufgeschwindigkeit im Gel beeinflussen (ein Effekt, den man sich bei der SSCP-Analyse zu Nutzen macht). Eine saubere Auftrennung nach Größe wäre dann nicht mehr möglich. Bei der BigDye Terminator Sequenzierung sind die Didesoxynukleotide mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Da jedes der vier ddNTP mit einem unterschiedlichen Farbstoff markiert ist, kann die Sequenzierungsreaktion in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden und bei der späteren Auftrennung im Polyacrylamidgel wird nur eine Spur pro Sequenz benötigt.

3.8.2 Reinigung der PCR-Produkte durch Fällung in Ammoniumacetat - Äthanollösung

Um die PCR-Produkte für die Sequenzierungs-Reaktion einsetzen zu können mussten diese zuvor aufgereinigt werden.

Das komplette PCR-Produkt (20 µl) wurde gemeinsam mit 120 µl 100%igem Ethanol und 20 µl Ammoniumacetat (3M) in ein autoklaviertes Eppendorf-Tube pipettiert und für 15 Minuten bei 13.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 10 Minuten bei 13.000 U/min und

3 Material und Methoden

Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals entfernt und verworfen und die Proben getrocknet. Am folgenden Tag wurden die Proben in 20 µl Elutionspuffer (TE-Puffer 0,1 mM, pH 8,0) gelöst und bei 4° C im Kühlraum gelagert.

3.8.3 Sequenzierungs-PCR

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

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 Sequenzierungs PCR erfolgte in dem Gerät PCR-Express der Firma Hybaid.

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

Anschließend wurden die Sequenzierungsprodukte aufgereinigt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein neues Protokoll angewandt, welche die Durchführung der Sequenzierungs-PCR ohne vorherige Reinigung der

3 Material und Methoden

ursprünglichen PCR-Produkte gestattet. Dazu wurde zunächst folgender Ansatz von 7 μL Gesamtvolumen gemischt:

- PCR-Produkt (nicht gereinigt) 0,5 μL
- ExoSAP 0,5 μL
- aqua dest. 6 μL

Anschließend wurde dieser Ansatz mit folgendem Protokoll denaturiert

80°C	15	Min
37°C	15	Min
10°C	am Ende der Reaktion	

Von diesem denaturierten Produkt wurde die Hälfte, also 3,5 μL , für den Ansatz der Sequenzierungs-PCR verwendet. Dieses Gemisch enthielt in einem Gesamtvolumen von 12 μL :

- denaturiertes PCR-Produkt 3,5 μL
- Big Dye Ready Reaction Mix 1 μL
- Puffer 900 4 μL
- Primer 2 pmol 1 μL
- aqua dest. 2,5 μL

Die Sequenzierungsreaktion wurde unter folgendem Protokoll durchgeführt:

96°C	60 Sec	einmalig zu Beginn der Reaktion
96°C	25 Sec	} 29 Zyklen
50°C	5 Sec	
60°C	4 Minuten	

Abkühlen der Proben auf 4°C einmalig zum Abschluss der Reaktion

3 Material und Methoden

Von diesem Produkt wurde dann die gesamte Menge für die Ethanolpräzipitation verwendet.

3.8.4 Ethanol-Präzipitation und Sequenzierung der Produkte

Die Sequenzierungsprodukte wurden durch Ethanol-Präzipitation von überschüssigen Terminatoren und Primern gereinigt. Zur Aufreinigung der Sequenzierungs-Produkte wurde das gesamte Sequenzierungsprodukt (je nach Protokoll 10 µL oder 12 µL), 90 µl aqua dest., 10 µl Natriumacetat (3M, pH 4,6) und 250 µl 100%iger Ethanol in ein autoklaviertes 1,5 ml Mikrozentrifugentube (Eppendorftube) pipettiert und vermischt. Anschließend wurde 20 Minuten bei 13.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, ohne das durchsichtige Pellet zu berühren, dessen Position im Eppendorf-Tube festgelegt war, und verworfen. Anschließend wurde 250 µl 70%iger Ethanol zugefügt und weitere 5 Minuten bei 13.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig entfernt und verworfen und die Pellets luftgetrocknet und anschließend bei -80° C gelagert. Das getrocknete Produkt wurde mit 20 µL Template mixture (Applied Biosystems) aufgenommen. Die gelösten Proben für 2 Minuten auf 90° C erhitzt, danach auf Eis gestellt und dann mit dem Applied Biosystems Sequenziergerät 310 bzw. 377 ausgewertet. Bei der Detektion der aufgetrennten Fragmente im Polyacrylamidgel mit dem ABI-PRISM-DNA-ANALYZER wird der fluoreszenzmarkierte Terminator des Fragments mit einem Laser (Wellenlänge 488 nm) angeregt und das Emissionslicht, welches von den Fluoreszenzfarbstoffen ausgesendet wird, über ein Gitter, einen sogenannten Spektrographen, in seine Spektralfarben zerlegt. Anschließend erfolgt eine simultane Detektion der Spektralfarben mit Hilfe des hochauflösenden Pixelfelds einer CCD-Kamera. Über einen Computer und die entsprechende Auswertungssoftware werden die erhobenen Daten erfasst.

3.9 Restriktionsenzymverdau

Mit Restriktionsenzymen kann man DNA gezielt an definierten Positionen zerschneiden. Diese Schnittpositionen werden durch enzymespezifische Sequenzen von etwa fünf Basenpaaren festgelegt und sind für annähernd jedes Restriktionsenzym verschieden. Wenn eine Mutation in einer DNA-Sequenz lokalisiert ist, die durch ein Enzym erkannt wird, kann man diese durch den DNA-Verdau untersuchen, da durch die Veränderung eine vorhandene Schnittstelle wegfällt oder eine neue hinzukommt. Auf diese Weise ist es möglich, Veränderungen in kleinen definierten Abschnitten der Basensequenz ohne Sequenzierung zu detektieren. Diese Methode ist weniger arbeitsintensiv und kann angewandt werden, wenn lediglich einzelne Basensubstitutionen in einem PCR-Produkt analysiert werden sollen. Zuerst wurde die DNA mit einer PCR vervielfältigt. Dann wurde das PCR-Produkt geschnitten und in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht ausgewertet und mit Hilfe des computergestützten Bilddokumentationssystems abfotografiert. Wenn durch eine Mutation eine Schnittstelle entsteht, zeigt der Wildtyp nur eine Bande in Höhe des ungeschnittenen PCR-Produkts. Ein homozygoter Mutationsträger würde zwei Banden in Höhe der beiden Schnittfragmente bieten, ein heterozygoter im Gegensatz drei Banden auf Höhe des ungeschnittenen PCR-Produkts und der beiden Schnittfragmente, da lediglich ein Allel geschnitten wurde. Aus Gründen der Praktikabilität sollte darauf geachtet werden, dass neben der zu beurteilenden Schnittstelle nicht viele zusätzliche im PCR-Produkt existieren, da in diesem Fall zahlreiche DNA-Fragmente entstünden, die die Auswertung erschweren würden. Im Idealfall existiert neben der zu beurteilenden Schnittstelle keine weitere. In dieser Arbeit sind zwei Restriktionsendonukleasen angewendet worden, die von „new England Biolabs“ bezogen wurden. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 3.1 aufgeführt. Es wurde der mit den Enzymen mitgelieferte

4 Ergebnisse

empfohlene Reaktionspuffer verwendet. Die Inkubation erfolgte für 12 Stunden bei 65°C bzw. 37°C.

4 Ergebnisse

4.1 DNA-Amplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Qualitätsprüfung in der Gelelektrophorese

Die genetische Analyse wurde in dieser Arbeit in zwei Regionen des *RYR1* Gens der Patienten auf dem Chromosom 19q13.1-q13.2 durchgeführt. In beiden Regionen wurden zum einen Exons untersucht, in denen bereits für die MH prädisponierende Mutationen nachgewiesen wurden (siehe Kap. 2.6), zum anderen wurden in der ersten Region benachbarte Exons analysiert, für die zu Beginn dieser Arbeit keine Mutationen beschrieben wurden, die allerdings in früheren Arbeiten noch nicht untersucht wurden. Die Sequenz der Exons des Gens sowie der flankierenden Introns war bekannt (Phillips et al. 1996) und konnte über die NCBI-Gendatenbank abgerufen werden. So konnten ca. 21 bp lange Oligonukleotide abgeleitet werden, die als Primer verwendet wurden. Für jedes Exon erfolgte dies in 5'-3' und in 3'-5' Richtung mit genügend Distanz zum Exon. Auf diese Weise wurden Primerpaare hergestellt, die in der Annealing-Phase der PCR jeweils auf dem Vorwärtsstrang der DNA vor und auf dem Rückwärtsstrang der DNA hinter dem zu vervielfältigenden Exon anlagerten. So wurden in der PCR zwei korrespondierende DNA-Einzelstränge synthetisiert, die das zu analysierende Exon repräsentierten.

Sobald die PCR beendet war, wurden 5 µL des PCR-Produktes in 2%igem Agarosegel geprüft, ob in der Reaktion das entsprechende DNA-Fragment

4 Ergebnisse

in genügender Menge amplifiziert wurde und ob nicht gewünschte Nebenprodukte vorlagen.

Ein gutes Ergebnis lag dann vor, wenn auf dem Gel eine sich klar von der Umgebung abhebende Bande vorlag, die der zu erwartenden Größe des DNA-Produktes entsprach. Dabei sollten die mit demselben Primerpaar synthetisierten Produkte die gleiche Länge aufweisen. Eine schwache Bande als Korrelat für eine ungenügende Synthese machte eine Optimierung der Reaktionsbedingungen erforderlich. Häufig konnte dies durch Reduzierung der Annealingtemperatur erzielt werden, wodurch die Anlagerung der Primer an die entsprechende Region auf der DNA erleichtert wurde.

Lagen neben der gewollten Hauptbande zusätzliche, meist schwächere Banden auf, galt dies als Hinweis für Nebenprodukte, die möglichst zu vermeiden waren, da sie zur Verfälschung der Ergebnisse führen können. Sie bilden sich meist dann aus, wenn Basensequenzen in anderen DNA-Abschnitten sich nur geringgradig von der korrespondierenden Primersequenz unterscheiden. Ist die Annealingtemperatur zu niedrig, kann es zu Hybridisierung der Primer in diesen DNA-Bereichen kommen. Durch Anhebung der Annealingtemperatur kann man in der Regel erreichen, dass sich die Primer ausschließlich an die vollständig entsprechende DNA-Sequenz anlagern. Jedoch reduziert sich durch diese Maßnahme häufig die Gesamtausbeute des eigentlichen Produktes.

Konnten bei einigen Primerpaaren auch durch verschiedene Reaktionsbedingungen keine PCR-Produkte hergestellt werden, war dies ein Hinweis auf eine suboptimale Magnesiumkonzentration im Ansatz oder auf fehlerhafte Primer. Außerdem mussten neben Ablesefehlern beim Design der Primer und einer inkorrekten Synthese des Oligonukleotids auch eine fehlerbehaftete Vorlage der Basenabfolge als potentielle Ursache in betracht gezogen werden.

Bei der PCR wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Taq-Polymerasen verwendet, wobei die meisten Exons mit der HotStar® Taq-DNA-

4 Ergebnisse

Polymerase der Firma Quiagen amplifiziert wurden, die als Hotstar-Mastermix fertig mit MgCl₂, dNTPs und PCR-Puffer gemischt verfügbar war. Das folgende Thermozyklerprogramm wurde benutzt:

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

Die Exons 8, 9, 17 und 39 konnten mit diesem Protokoll in zufriedenstellender Qualität amplifiziert werden, ohne die Reaktionsbedingungen zu modifizieren. Da die Exons 8 und 9 mit 94 bp bzw. 75 bp relativ klein sind und zwischen ihnen ein Intron mit 129 bp liegt, konnten diese beiden Exons in einem PCR-Produkt synthetisiert werden. Die Reaktionsbedingungen mußten bei den Primern der Exons 14, 15, 40, 45 und 46 angepasst werden. Wie sich herausstellte, hatte die Veränderung der MgCl₂-Konzentration keinen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse da offensichtlich die benutzten Polymerasen bei 1,5 mM MgCl₂ die optimale Wirksamkeit aufweisen. Über eine Veränderung der Annealingtemperatur konnten die Resultate verbessert werden. Exon 46 wurde bei einer Annealingtemperatur von 58°C am besten amplifiziert, für Exon 45 wurden die besten Ergebnisse bei einer Annealingtemperatur von 63°C erzielt.

Nicht alle Exons konnten mit dem Taq-Mastermix der Firma Quiagen mit gutem Resultat amplifiziert werden. Für diese Exons wurde der Platinum-Mastermix von Gibco oder die Taq-Polymerase von Gibco benutzt. Wie in Kapitel 3 ausgeführt wurde die Dauer des initialen Schritts der PCR an die verwendete Taq-Polymerase angepasst. Für Exon 40 wurden mit dem Platinum-Mastermix und einer Annealingtemperatur von 63°C die besten Resultate erzeugt.

4 Ergebnisse

Planmäßig sollten die Exons 14 und 15 gemeinsam amplifiziert werden. Mit 136 bp und 96 bp Länge sind beide Exons relativ kurz. Mit 83 bp Länge des dazwischen gelegenen Introns ergibt sich eine Gesamtlänge des Produkts von 315 bp. Es ergab sich mit den ausgesuchten Primern 14F und 15R eine Produktlänge von 459 bp. Die Synthese gelang lediglich zu Beginn bei wenigen DNA-Proben mit dem Taq-Mastermix von Quiagen. Bei dem Großteil der Proben konnten weder mit dem Taq-Mastermix von Quiagen noch mit der Taq-Polymerase von Gibco unter verschiedenen Reaktionsbedingungen zufriedenstellende Produkte generiert werden.

Daher wurde folgend eine getrennte Synthese der Exons geplant und im Intron 14 zwei Sequenzen für die Herstellung der Primer 14R und 15F ausgesucht. Exon 14 konnte unter Standardbedingungen mit dem Primerpaar 14F/14R mit dem Quiagen-Mastermix bei 60°C gut amplifiziert werden.

Für Exon 15 gelang mit dem Primerpaar 15F/15R initial keine Synthese. Im sequenzierten Produkt von Exon 14 konnte die Ursache dafür ausgemacht werden. Der Primer 15F lag innerhalb des PCR-Produktes des Primerpaares 14F/14R. An der Stelle, an der der Primer 15F hybridisieren sollte lag zu Beginn dieser Arbeit ein Fehler in der publizierten Sequenz der NCBI-Datenbank vor, so daß keine Hybridisierung möglich war. Dieser Fehler wurde mittlerweile in der NCBI-Datenbank behoben (Weiteres im Kapitel 4.3).

Mit dem neu synthetisierten Primer 15F2 gelang dann die Synthese mit der Platinum®-Polymerase von BRL bei einer Annealingtemperatur von 58°C. Der Taq-Mastermix von Quiagen und die Hotstar-Polymerase erbrachten keine guten Resultate.

Letztlich konnten alle zu untersuchenden Exons mit zufriedenstellendem Ergebnis amplifiziert werden, so daß eine weitere Analyse möglich war.

4.2 SSCP-Mutationsanalyse

Die zuvor denaturierten PCR-Produkte der Exons 2, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 17, 39, 40, 45, 46 und 102 sowie der Exons 12, 16, 19, 37 und 47 wurden wie in Kapitel 3 ausgeführt unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Zu diesem Zweck wurden 8%ige Polyacrylamidgele mit und ohne Zusatz mit 10%igem Glycerol in 1%igem TBE-Puffer unter Raumtemperatur und zum Teil im Kühlraum benutzt. Dabei gestaltete sich das Gießen der Gele zuweilen schwierig, da schon kleinere Verunreinigungen, vor allem Fette auf der Innenseite der Glasplatten, zu Blasenbildung im Gel führten, so dass die Glasplatten gründlich entfettet werden mussten und eine gewisse Routine beim Gießen der Gele vonnöten war, um gute Ergebnisse zu erzielen. Die zuvor bei 95°C denaturierten Proben mussten dabei obligat auf Eis abgeschreckt werden, damit die entstandenen Einzelstränge nicht erneut mit den komplementären DNA-Strängen hybridisieren, damit sie für die Analyse in Einzelstrangkongformation vorlagen. Das Färben der 1mm dünne Gele musste genauso vorsichtig erfolgen, um diese als Ganzes zu erhalten, insbesondere die Gele mit 10%igem Glycerol quollen beim Färben zum Teil auf und wurden weich.

Die SSCP-Mutationsanalyse von Exon 11 zeigte vom Unterschiede im Wanderungsmuster der Banden (s. auch Abb. 4.1). Es zeigte sich, dass die shifts der Banden am Besten in 1%igen TBE-Gelen (8% PAA) ohne Zusatz von Glycerol und unter einer Laufzeit von etwa 15 Stunden bei 4 Watt Leistung aufgetrennt wurden. Für Exon 14 und 15 gelang es zunächst für einige Produkte, unter Standardbedingungen gute Ergebnisse zu erzielen, wenn diese beiden Exons gemeinsam amplifiziert wurden. Im Verlauf dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse auch unter verschiedenen Laufbedingungen nicht reproduziert werden, so dass beide Exons zunächst einzeln amplifiziert und später durch Sequenzierung analysiert wurden.

4 Ergebnisse



Abb. 4.1: SSCP-Gel von Exon 11 mit 1% TBE ohne Glycerol. In den Spuren 5 und 7 sind deutlich die Bandenshifts zu erkennen.

Die SSCP-Gelelektrophorese der Exons 12, 16, 19, 37 und 47 gelang problemlos. Deutliche Bandenshifts konnten nicht nachgewiesen werden, so dass selbst gering auffällige Proben großzügig sequenziert wurden und auch von unauffälligen Proben wurden von jedem Exon einige exemplarisch sequenziert.

4.3 DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte

4 Ergebnisse

Die Produkte, die in der SSCP-Analyse Auffälligkeiten im Laufverhalten ihrer Banden zeigten sollten im Verlauf durch Sequenzierung weiter analysiert werden. Auf diese Weise konnte die Nukleotidsequenz der Patienten unmittelbar mit der veröffentlichten Datenbank der NCBI verglichen werden, so dass Abweichungen der Sequenz nachweisbar gemacht werden konnten. Die Sensitivität für die SSCP-Gelelektrophorese mit 5-10%igem Glycerol wird für Produkte von 100-300 bp mit etwa 99% bzw. für 300-450 bp mit 89% angegeben. Ohne Glycerol liegt dieser Wert deutlich niedriger. Es besteht somit die Möglichkeit, dass Veränderungen in der DNA durch dieses Verfahren nicht aufgedeckt werden (Hayashi 1991). Exemplarisch wurden einige Proben, die ohne Glycerol durch SSCP-Mutationsanalyse untersucht wurden und keine Auffälligkeiten zeigten, ebenfalls sequenziert.

Veränderungen der Patienten-DNA im Vergleich zur Gendatenbank haben unterschiedliche Bedeutungen und müssen demzufolge differenziert werden. Missense Mutationen bewirken eine Veränderung der Aminosäuresequenz. Ursache sind Deletionen, bei denen ein Teil der DNA fehlt, Insertionen, bei denen ein zusätzlicher Abschnitt in den DNA-Strang integriert wird und durch Punktmutationen, bei denen ein Nukleotid durch ein anderes ersetzt wird. In der Regel haben stille Mutationen keinen Effekt auf die Aminosäuresequenz, da zwar ein Nukleotid eines Codons durch ein anderes ersetzt wird, es jedoch zu keiner Änderung der vom Exon kodierten Aminosäure kommt. Stille Mutationen können jedoch einen Effekt auf das RNA-Spleißen haben, wenn neue Spleißingstellen entstehen und so die Aminosäuresequenz des Proteins verändert wird. Um diese Möglichkeit auszuschließen, müsste RNA mittels cDNA-Sequenzierung untersucht werden. Zu Beginn dieser Arbeit war die Gewinnung von RNA lediglich durch Muskelbiopsien möglich, so dass im Rahmen dieser Arbeit keine RNA-Analysen erfolgten. Kommen verschiedene Allele an einem Locus simultan vor, nennt man dies

4 Ergebnisse

Polymorphismus, wenn die Häufigkeit nicht der Rate an Mutationen entspricht. Polymorphismen treten häufig dort auf, wo die Substitution eines Nukleotids keine Änderung der Aminosäuresequenz bewirkt, also keinem Selektionsdruck unterliegt. Ein Polymorphismus kann sich entwickeln, wenn die genetische Varianz unter bestimmten Umständen einen Vorteil gegenüber denen ohne Mutation aufweist. Zunächst wurden die Patientenproben in einer Richtung, meist vorwärts (5'-3') sequenziert. Wurden Auffälligkeiten detektiert, erfolgte zur Bestätigung die Sequenzierung des komplementären Stranges, welcher dann zunächst durch eine erneute PCR hergestellt werden musste. Auf diese Weise sollten Synthesefehler in der PCR, die eine Mutation vortäuschen könnten, ausgeschlossen werden.

Wie bereits zuvor erwähnt, wurden bisher in 51 Exons des *RYR1*-Gens Mutationen entdeckt, die eine Prädisposition für die Maligne Hyperthermie hervorrufen können (Robinson et al. 2006). In der Tabelle 4.1 sind die in dieser Arbeit untersuchten Exons des *RYR1*-Gens aufgelistet. In der rechten Spalte ist die Anzahl an Mutationen dargestellt, die bisher in dem jeweiligen Exon detektiert werden konnten und die zur MH führen können. In Klammer dahinter ist der prozentuale Anteil an allen bisher detektierten, zur MH prädisponierenden Mutationen angegeben.

Bei der Analyse einiger Proben bestimmter Exons fielen in der vorwärts gerichteten Sequenzierung Veränderungen auf, die einer Mutation hätten entsprechen können. Diese Proben wurden dann rückwärts sequenziert, um eine eventuelle Basensubstitution zu bestätigen bzw. auszuschließen. In dieser Arbeit konnten in zwei Exons Polymorphismen detektiert werden, die weiter unten in diesem Kapitel ausführlicher dargestellt werden. In allen anderen Fällen, bei denen bei der vorwärts gerichteten Sequenzierung Veränderungen auffielen, konnten keine Basensubstitution bestätigt werden. Die reversen Sequenzierungen zeigten eine regelrechte Basenabfolge.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit auf Mutationen untersuchte Exons und prozentualer Anteil im Verhältnis zur Basenpaarzahl aller Exons des <i>RYR1</i> -Gens	Anzahl bisher beschriebener, zur MH prädisponierender Mutationen und prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der bisher entdeckten Mutationen
2 (0,8%)	3 (2,13%)
6 (0,75%)	10 (7,1%)
8 (0,64%)	3 (2,13%)
9 (0,5%)	1 (0,71%)
11 (1,1%)	4 (2,83%)
12 (0,80%)	4 (2,83%)
14 (0,9%)	2 (1,42%)
15 (0,64%)	4 (2,83%)
16 (0,79%)	0 (0%)
17 (0,88%)	2 (1,42%)
19 (1,28%)	0 (0%)
37 (0,74%)	0 (0%)
39 (1,81%)	6 (4,25%)
40 (0,76%)	6 (4,25%)
45 (0,66%)	7 (4,96%)
46 (0,8%)	7 (4,96%)
47 (1,12%)	4 (2,83%)
102 (1,03%)	3 (2,13%)

Tab. 4.1: In der linken Spalte sind die in dieser Arbeit untersuchten Exons aufgelistet, in Klammern dahinter der prozentuale Anteil der Basenpaare des Exons zur Gesamtzahl der für Aminosäuren codierenden Basenpaare des Gens. Die rechte Spalte zeigt die Anzahl der bisher in den jeweiligen Exons gefundenen, zur MH prädisponierenden Mutationen. In Klammern der prozentuale Anteil zur Gesamtzahl der für MH prädisponierenden Mutationen im Ryanodinrezeptorgen (141). Robinson et al. 2006.

Exemplarisch soll ein Exon demonstriert werden, wo bei entsprechenden Veränderungen auf diese Weise verfahren wurde.

Abb. 4.2 zeigt einen Abschnitt von Exon 6, der in der forward Sequenzierung an Position 602 eine Auffälligkeit aufweist. Hier liegt normalerweise die Base Guanin vor. Auf der Abbildung ist die entsprechende schwarze Ausschlag gut erkennbar, wird jedoch von einem Artefakt überlagert, so dass das Sequenziergerät hier eine Veränderung erkennt. Der untere Teil des Bildes zeigt die entsprechende reverse Sequenzierung dieses Abschnittes. An entsprechender Position liegt die

4 Ergebnisse

komplementäre Base Cytosin vor. Hier kann somit eine Veränderung der Basensequenz ausgeschlossen werden.

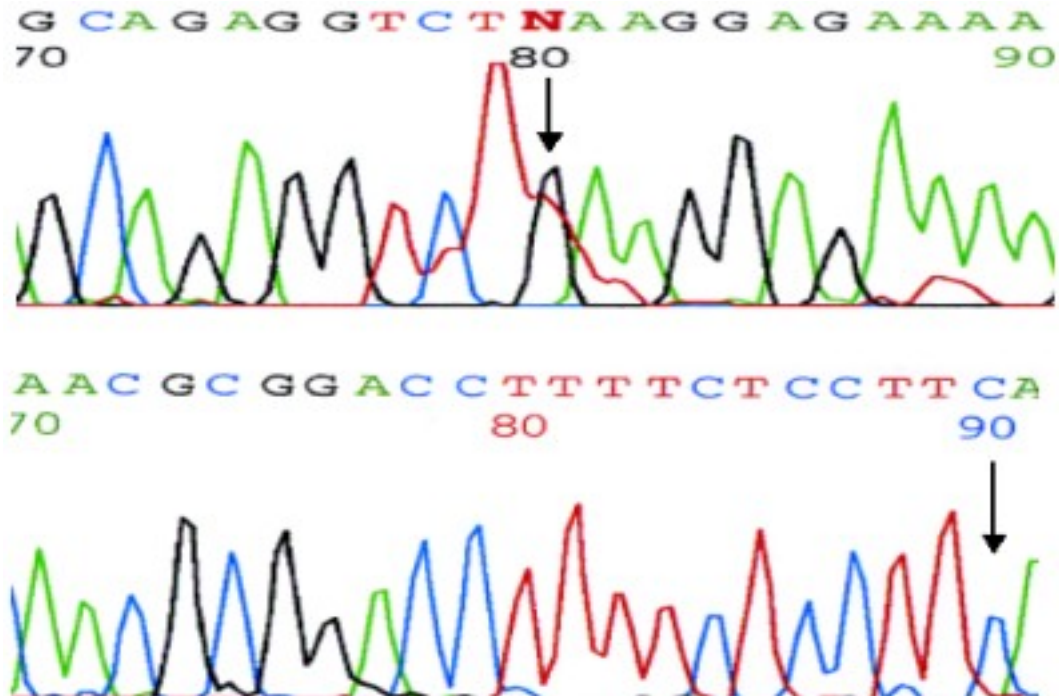


Abb 4.2: Dargestellt ist ein Ausschnitt von Exon 6. Normalerweise liegt an Position 602 die Base Guanin vor. In der forward Sequenzierung (obere Reihe) wurde vom Gerät eine Auffälligkeit detektiert (schwarzer Pfeil). Die reverse Sequenzierung zeigt in der unteren Reihe an der entsprechenden Position die zu Guanin komplementäre Base Cytosin. Somit handelt es sich in der forward Sequenzierung um ein Artefakt.

In Abb. 4.3 sieht man die Basensequenz von Ex 47, eines der Exons, die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht eingehend untersucht waren. Die schwarzen Striche markieren Anfang und Ende des Exons. Die Basenabfolge zeigt keine Veränderungen. Dieses Produkt wurde bei den SSCP-Analysen der weiteren Produkte von Exon 47 zum Vergleich mit auf die Gele aufgetragen.

4 Ergebnisse

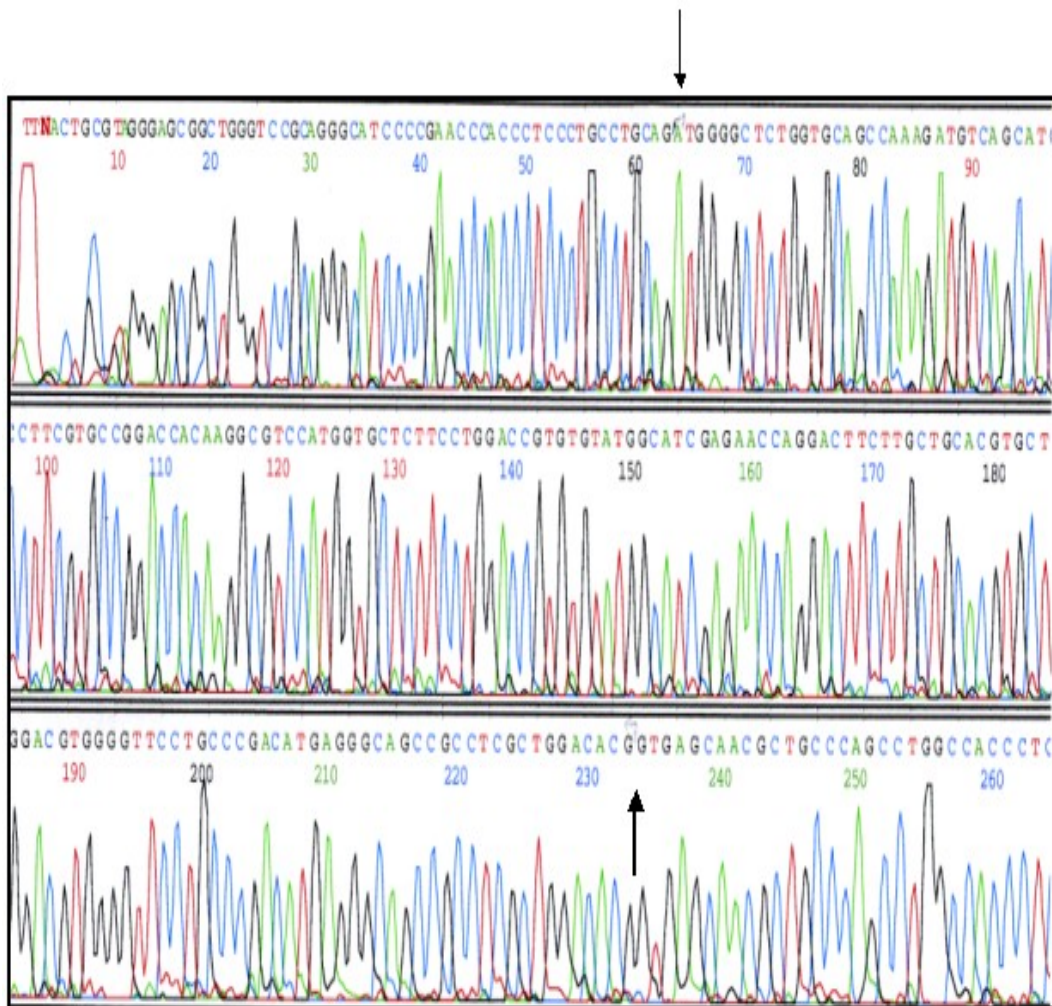


Abb. 4.3 Darstellung der Basensequenz von Exon 47 ohne Veränderungen. Die schwarzen Striche markieren Anfang und Ende des Exons. Artefakte liegen nicht vor.

In Exon 11 zeigte die Sequenzierung eine Mutation an der Position 1077 (c.1077C>T). Cytosin wurde in zwei Fällen heterozygot und in einem Fall homozygot durch Thymin replaziert (s. Abb. 4.4). 23 Fälle wiesen die häufige Variante auf. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.3 aufgelistet. In der Arbeitsgruppe im Institut lagen sequenzierte Proben von Exon 11 aus einer gesunden Population vor, die als Kontrollgruppe verwendet wurden. An Position 1077 kodiert die dritte Stelle des codons 359 für die Aminosäure Alanin, die Substitution von C durch T führt hier zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz, da nur die ersten beiden Basen Guanin und Cytosin für die Aminosäure Alanin kodieren und die dritte

4 Ergebnisse

Position beliebig mit einer der vier Nukleotide besetzt werden kann. Es handelt sich also um eine stille Mutation.

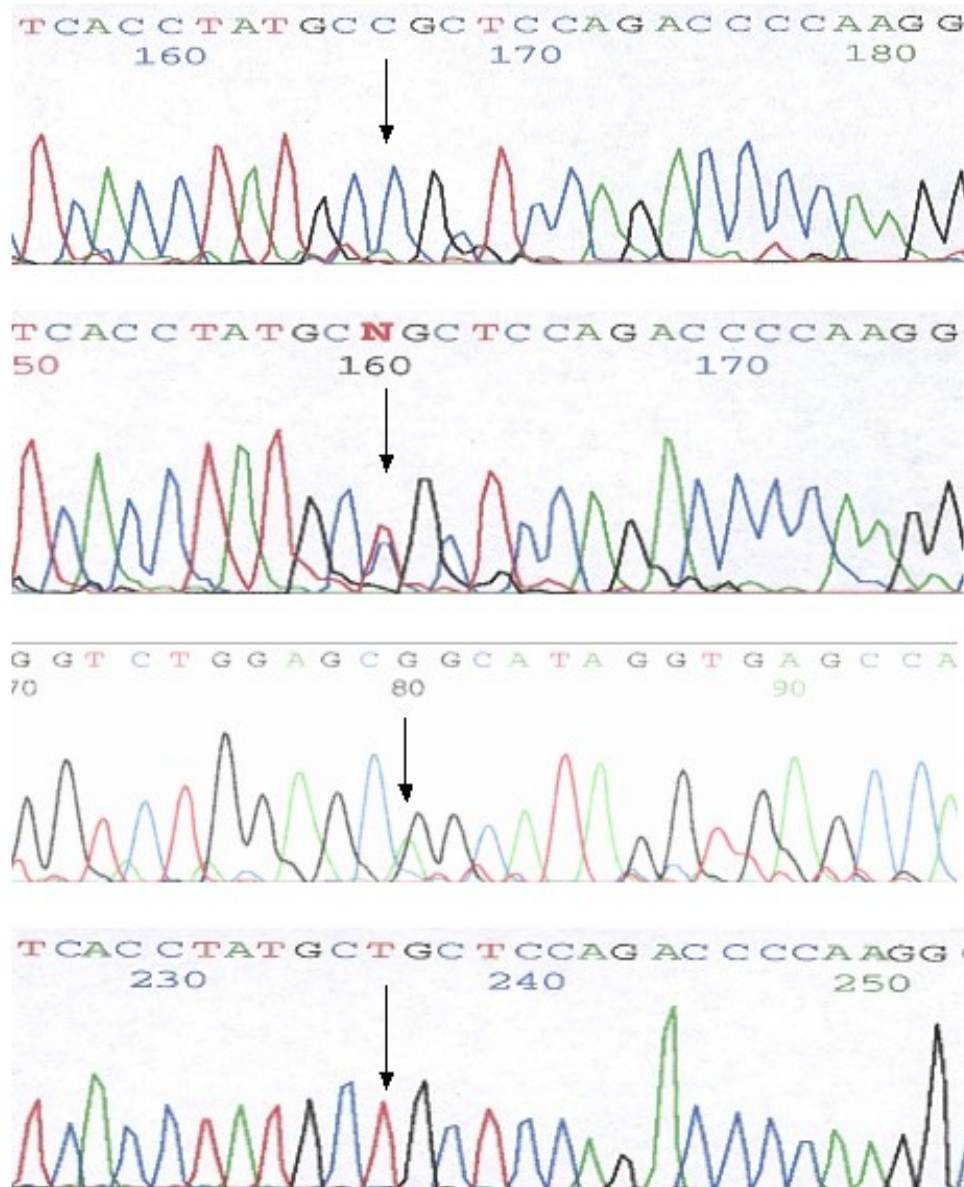


Abb. 4.4 Oben ist die häufige Variante von Exon 11 dargestellt. In der zweiten Zeile die heterozygote Mutation in Exon 11, an Position 1077 wurde Cytosin durch Thymin ersetzt (Pfeil). In der dritten Zeile sieht man diese heterozygote Mutation in der reversen Sequenzierung. Unten das homozygote T-Allel.

Während der Sequenzierung von Exon 14 fiel auf, dass die Sequenz im Intron 14, die teilweise noch im amplifizierten PCR-Produkt lag,

4 Ergebnisse

Abweichungen von der publizierten Sequenz der NCBI-Datenbank aufwies. Sechs veröffentlichte Nukleotide konnten in keiner der sequenzierten Proben nachgewiesen werden. Die Sequenz 5'-ACCCAG-3' wird an Position IVS14+38-43 beschrieben. Zudem zeigen sich sechs Nukleotide weiter in 3'-Richtung in sämtlichen Proben 4 Cytosinbasen in Folge statt drei, wie in der NCBI-Datenbank veröffentlicht. Weil der initial verwendete Primer 15F auf der Grundlage der zu dem Zeitpunkt über die Genbank veröffentlichten Basensequenz ausgewählt und hergestellt wurde, jedoch in eben jener Region hybridisieren sollte, die von der aberranten Basensequenz betroffen war, konnte die Malfunktion des Primers 15F gut erklärt werden. Bei acht von zwanzig Basenpaaren konnte keine homologe Paarbildung des Primers 15F mit der DNA erfolgen, wodurch eine Hybridbildung zwischen dem Primer und der DNA unmöglich wird. Intron 14 weist außerdem zwei zusätzliche Cytosinbasen zwischen den Positionen IVS14+10/11 und IVS14+23/24 auf. Dadurch wird die Gesamtlänge des Exons lediglich um 3 Basen auf 80 bp verkürzt. Da alle beschriebenen Abweichungen im Intron 14 in sämtlichen sequenzierten Proben nachweisbar waren, handelt es sich in diesem Fall um einen Fehler in der von der NCBI-Datenbank veröffentlichten Sequenz und nicht um eine Mutation. In der Zwischenzeit wurde die NCBI-Datenbank diesbezüglich korrigiert.

Im Exon 15 gelang die Detektion eines Polymorphismus. Es kommt an Position 1668 zur Substitution von Guanin durch Adenosin (c.1668G>A). Der Polymorphismus ist bereits bekannt (Keating et al. 1997). Dabei ergibt sich keine Änderung der Aminosäuresequenz für die Substitution c.1668G>A, da erneut die dritte Base des Codons betroffen ist und sowohl UCG als auch UCA jeweils für Serin kodieren. Somit handelt es sich auch hier um eine stille Mutation. Der Wildtyp war nur in zwei Proben nachweisbar (s. Abb. 4.5). Bei 23 Patienten handelt es sich um homozygote, bei einem um heterozygote Träger dieser Mutation (s. auch Tab. 4.3).

4 Ergebnisse

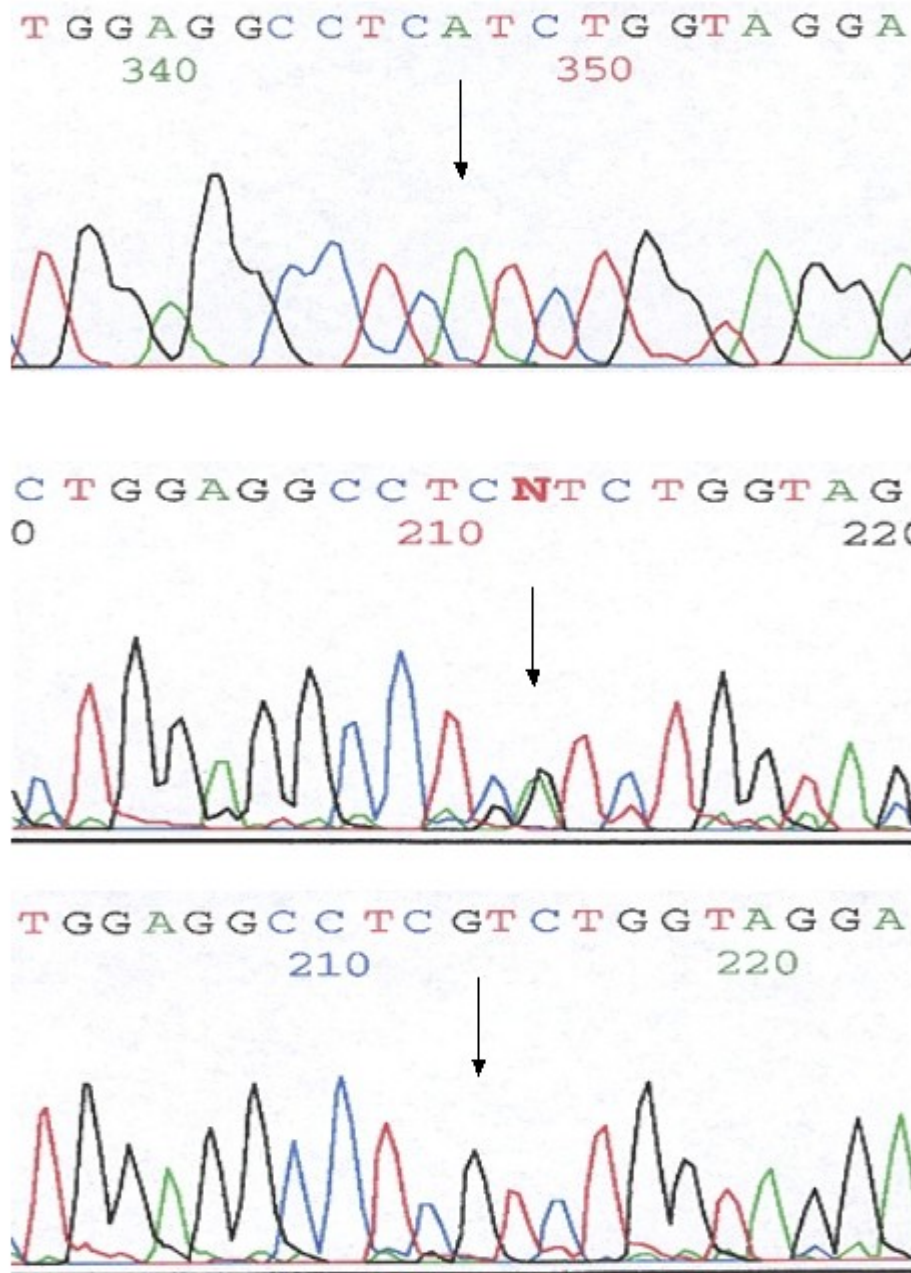


Abb. 4.5: Oben Darstellung des homozygoten Polymorphismus in Exon 15. An Position 1668 wird Guanin durch Adenosin ersetzt. In der Mitte die heterozygote Form und unten die häufigere Variante.

4 Ergebnisse

Untersuchte Exons	Bekannte Polymorphismen	Prozentuale Verteilung der genotypischen Formen
2	0	-
6	c.473C>T	90,25/0,25/9,5
8	0	-
9	0	-
11	c.1014A>C c.1077C>T	Sehr selten 72,25/2,25/25,5
12	c.1218C>T	99/0/1
14	0	-
15	c.1668A>G	49/9/42
16	0	-
17	c.1878T>G	90,25/0,25/9,5
19	c.2268T>C	49/9/42
37	c.6039A>G	81/1/18
39	0	-
40	0	-
45	c.7260C>T	90,25/0,25/9,5
46	0	-
47	c.7500G>T c.7527G>A c.7584C>T	82,8/0,8/16,4 81/1/18 Sehr selten
102	0	-

Tab. 4.2 In der linken Spalte die in dieser Arbeit auf Mutationen untersuchten Exons. Die mittlere Spalte führt die jeweiligen Polymorphismen auf. Die rechte Spalte zeigt die prozentualen Verteilungen der genetischen Formen (häufige Variante homozygot, seltenere Variante homozygot, heterozygote Form). Robinson et al. 2006

In der Tabelle 4.2 sind die in dieser Arbeit untersuchten Exons aufgeführt. Die mittlere Spalte der Tabelle zeigt die bisher in der Literatur detektierten Polymorphismen in diesen Exons. In der rechten Spalte sieht die prozentuale Verteilung der genetischen Varianten, zuerst die homozygote häufige Variante, anschließend die homozygote seltenere Form und zuletzt der heterozygote Typ. Es fällt auf, dass in den meisten Fällen die häufige Variante deutlich überwiegt. Daher ist es erklärbar, dass in den Arbeiten mit geringen Patientenzahlen wie in dieser Arbeit zum Teil keine Polymorphismen detektiert werden.

4 Ergebnisse

In keiner der analysierten Proben sämtlicher Patienten gelang der Nachweis einer MH-prädisponierenden Mutation, dabei konnten weder bisher bekannte noch neue, noch nicht nachgewiesene Mutationen detektiert werden. Auch in den Exons 12, 16, 19, 37 und 47, die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht auf Mutationen untersucht wurden, wurden keine Änderungen detektiert.

Polymorphismen	Aminosäure-änderungen	Exon	Allele	MH-Patienten:26	Kontrollen n:25*
c.1077C>T	(Keine)p.Ala359	11	Homozygot C	23	20
			Heterozygot CT	2	4
			Homozygot T	1	1
c.1668G>A	(keine) p.Ser556	15	Homozygot G	2	3
			Heterozygot GA	1	12
			Homozygot A	23	10

Tab. 4.3 Polymorphismen in Exon 11 und 15 und deren Verteilung in der untersuchten Population

* die Kontrollgruppen lagen aus vorherigen Arbeiten im Institut vor.

4.4 Restriktionsenzymverdau

Für die beiden Polymorphismen c.1077C>T in Exon 11 und c.1668G>A in Exon 15 erfolgte eine theoretische Schnittstellenanalyse durch das Programm „Mapdraw-Star“ der Firma Lasergene. Dabei werden die ursprüngliche Sequenz und die der mutierten Exons in das Programm eingegeben und anschließend über das Programm potentielle Schnittstellen mit den 478 bisher bekannten Restriktionsendonukleasen errechnet. Wenn ein Enzym lediglich eine der beiden Sequenzen schneidet, ist es in der Regel zur Schnittstellenanalyse geeignet, wobei einschränkend hinzuzufügen ist, dass viele Endonukleasen kommerziell noch nicht zu beziehen sind und in der Praxis so das geeignete Enzym nicht immer verfügbar ist.

4 Ergebnisse

In Exon 11 existiert eine Schnittstelle für das Enzym *TseI* und für das Enzym *BsrBI*. Der Polymorphismus c.1077C>T in Exon 11 bewirkt, dass für das Enzym *BsrBI* eine Schnittstelle verloren geht. Da für dieses Enzym keine weiteren Schnittstellen vorliegen, werden durch den DNA-Verdau aus dem 289 bp langen PCR-Produkt ein 179 bp und ein 110 bp langes Fragment generiert, wenn an Position 1077 Cytosin vorliegt, wie Abbildung 4.6 schematisch zeigt.

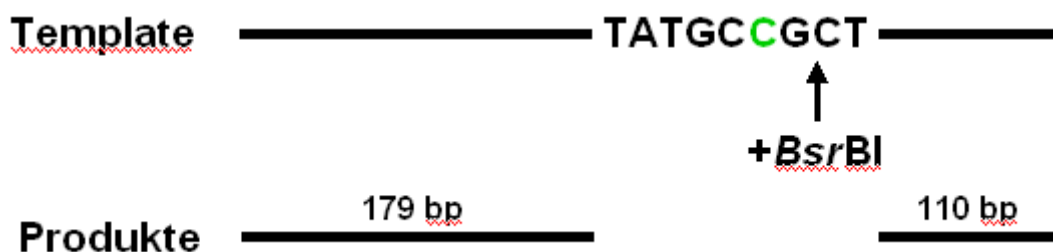


Abb. 4.6: Schema der Schnittstellenanalyse von Exon 11 mit *BsrBI*. Wenn an Position 1077 Cytosin (grün) vorliegt, wie im Falle der häufigeren Variante, wird das Produkt von der Restriktionsendonuklease in zwei Produkte gespalten. Beim Polymorphismus c.1077C>T geht diese Schnittstelle verloren.

Die Analyse mit dem Enzym gelang gut. Abbildung 4.7 zeigt analysierte Proben von Exon 11 auf dem Agarosegel. In Spur 1 ist die häufigere Variante dargestellt, der durch die Endonuklease in 2 Stücke geschnitten wird. In der zweiten Spur sieht man die homozygote Variante des T-Allels, für die die Schnittstelle verloren geht. Die Spuren 3-6 zeigen die heterozygote Form des Polymorphismus.

4 Ergebnisse

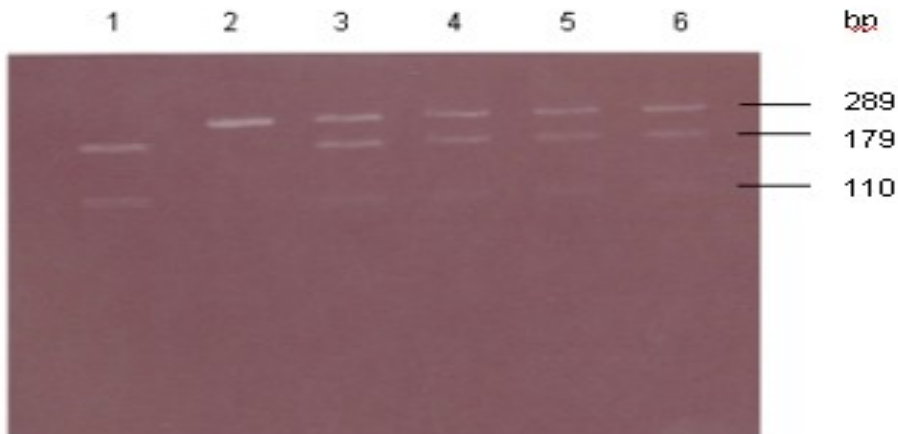
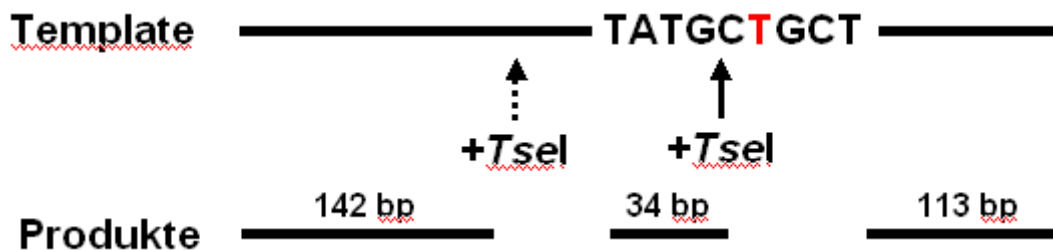


Abb. 4.7 : Schnittstellenanalyse von Exon 11 mit der Endonuklease *BsrBI*. In der ersten Spur sieht man die häufigere Variante, die in zwei Stücke geschnitten wird. In Spur 2 ist die homozygote Variante des Polymorphismus zu sehen, für die die Schnittstelle verloren geht. In Spur 3-6 sind heterozygote Formen des Polymorphismus aufgetragen.

Für das Enzym *TseI* liegt auf Exon 11 eine Schnittstelle vor, wenn an Position 1077 Cytosin vorliegt. Das PCR-Produkt wird dann beim DNA-Verdau in zwei Fragmente geschnitten (142 und 147 bp). Die Abbildung 4.8 zeigt, dass durch den Polymorphismus in Exon 11 für diese Endonuklease eine weitere Schnittstelle geschaffen wird, so dass dann drei Fragmente (142, 34 und 113 bp) vorliegen, wenn an Position 1077 Cytosin durch Thymin substituiert wird.



4 Ergebnisse

Auch diese Analyse konnte problemlos durchgeführt werden. In Abbildung 4.9 sind sechs analysierte Proben dargestellt. Zusätzlich ist auf dem Agarosegel ein PCR-Produkt aufgetragen, welches nicht mit der Endonuklease inkubiert wurde und sich an Position 1 zeigt. Auf Position 2 befindet sich die häufige Variante, bei der für diese Endonuklease eine Schnittstelle vorliegt. In den Spuren 3-6 wurden Proben der Patienten mit dem Polymorphismus aufgetragen, hier zeigt sich deutlich durch die dritte Bande, dass eine zusätzliche Schnittstelle hinzugekommen ist.

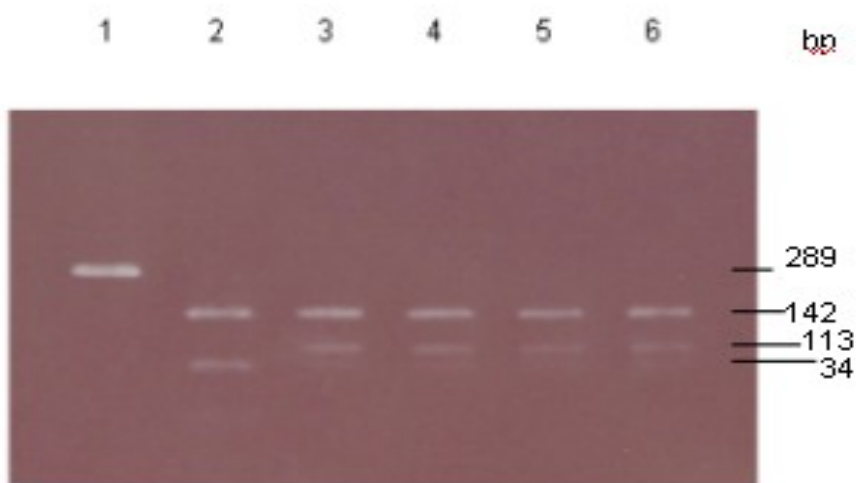


Abb. 4.9: Schnittstellenanalyse von Exon 11 mit der Endonuklease *TseI*. An Position 1 ist eine nicht mit der Endonuklease inkubierte Probe zu sehen. In Spur 2 die häufige Variante, für die eine Schnittstelle existiert. In den Spuren 3-6 Patienten mit Polymorphismus, hier ist eine zusätzliche Schnittstelle entstanden.

Für die Mutation c.1668G>A in Exon 15 konnte in der theoretischen Schnittstellenanalyse keines der 478 Enzyme als geeignet für eine Schnittstellenanalyse befunden werden. Aus diesem Grund wurden alle Proben von Exon 15 sequenziert.

5 Diskussion

In dem Ryanodinrezeptorgen auf Chromosom 19 sind viele Mutationen entdeckt worden, die eine Prädisposition für Maligne Hyperthermie bewirken. In den meisten Fällen sind diese Mutationen mit ähnlichen Methoden nachgewiesen worden. Zunächst wurden von den entsprechenden Exons PCR-Produkte hergestellt um diese dann mit der SSCP-Gelelektrophorese zu untersuchen. In aktuelleren Publikationen wurde die denaturierende Hochdruck-Flüssigchromatographie (Denaturing High Performance Liquid Chromatographie / DHPLC) als alternatives Verfahren angewandt. Fielen bei diesen Untersuchungen Auffälligkeiten auf, wurden die Produkte sequenziert, um die Veränderung in der Basenabfolge zu zeigen. Auch in dieser Arbeit wurde so vorgegangen. Dabei erfolgte der Fokus auf die Exons im N-terminalen und zentralen Bereich des Ryanodinrezeptorgens, wo in der Vergangenheit viele Mutationen nachgewiesen werden konnten und die aus diesem Grund als „hot spots“ bezeichnet werden. In dieser Arbeit wurden aus Kostengründen lediglich 5 zusätzliche Exons untersucht, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen „hot spots“ lokalisiert waren. Mit der SSCP-Gelelektrophorese kann eine große Zahl von Proben verhältnismäßig schnell gescreent werden und erscheint so geeignet, ein großes Patientenkollektiv genetisch zu analysieren. Dabei existieren jedoch einige Nachteile: ein zur Analyse verwertbares Bandenmuster entsteht nur dann, wenn Bedingungen geschaffen werden, unter denen die Faltung der mutierten DNA-Einzelstränge Unterschiede zur Faltung der nicht mutierten aufweist. Durch die dadurch unterschiedlichen Laufeigenschaften wird das Bandenmuster aussagekräftig. Genetische Varianten können also leicht übersehen werden, wenn diese Bedingungen für eine Konformationsänderung der mutierten DNA gegenüber der nicht mutierten Probe nicht generiert werden können. Da sich teilweise nur ein Bereich des PCR-Produkts unter bestimmten Bedingungen optimal faltet,

5 Diskussion

müssen einige Proben mehrmals unter verschiedenen Konditionen untersucht werden, wenn man die Probe in der gesamten Länge analysieren will. Dadurch wird der Arbeits- und Zeitaufwand deutlich gesteigert und der zuvor beschriebene Zeitvorteil des Verfahrens gegenüber anderen Methoden, insbesondere der Sequenzierung, muss relativiert werden. Selbst unter Verwendung unterschiedlicher Versuchsansätze können genetische Veränderungen nicht immer zuverlässig detektiert werden. Eine Sensitivität von 99% bzw. 89% für Produkte von 100-300 bp bzw. 300-450 bp Länge wird für die SSCP-Gelelektrophorese angegeben (Hayashi 1991). Solch eine hohe Sensitivität ließ sich in dieser Arbeit nicht nachweisen. Da die Methode von vielen Faktoren abhängig ist und zahlreiche Störelemente Einfluß nehmen können scheint auch unter besten Bedingungen eine Sensitivität von 99% nicht realistisch. Eine veränderte Basensequenz macht in der SSCP-Gelelektrophorese durch ein verändertes Bandenmuster auf sich aufmerksam, jedoch können keine Angaben zu der Art der Veränderung gemacht werden, so dass auffällige Proben sequenziert werden müssen. Polymorphismen können ebenfalls zu Unterschieden im Laufverhalten führen und es scheint, als sei die SSCP-Gelelektrophorese gut geeignet für Mutationsanalysen, bei denen die optimalen Reaktionsbedingungen bereits feststehen und Polymorphismen nicht gehäuft vorkommen. Zum Screening von DNA-Abschnitten auf bisher nicht bekannte Mutationen scheint das Verfahren lediglich eingeschränkt geeignet. Die Wahrscheinlichkeit, dass Mutationen übersehen werden, ist nicht gering, da die optimalen Laufbedingungen zunächst herausgefunden werden müssen. Repetitive Läufe unter verschiedenen Konditionen können die Sensitivität erhöhen, jedoch erhöht sich der Arbeitsaufwand und eine gewisse Unsicherheit bleibt bestehen, da Basensubstitutionen, die keine Änderung der Einzelstrangkongformation verursachen, durch dieses Verfahren nicht aufgedeckt werden. Eine mögliche Alternative stellt die DHPLC dar, da aufwendige Schritte der SSCP-Gelelektrophorese

5 Diskussion

entfallen, jedoch ist wiederum ein höherer apparativer und technischer Aufwand notwendig.

In dieser Arbeit konnte durch die SSCP-Gelelektrophorese eine Mutation in Exon 11 detektiert werden. Dieser bereits bekannte Polymorphismus c.1077 C>T ließ sich also sowohl auf den SSCP-Gelen als auch in der Sequenzierung nachweisen. Der Polymorphismus c.1668G>A in Exon 15 ließ sich auf den SSCP-Gelen nicht nachweisen.

In dieser Arbeit konnten weder durch SSCP-Gelelektrophorese noch durch die Sequenzierung Mutationen detektiert werden, die eine Substitution von Aminosäuren zur Folge hatten. Dies gelang weder in den vornehmlich sequenzierten sogenannten „hot spots“ der Exons 2, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 17, 39, 40, 45, 46 und 102 noch in den überwiegend durch die SSCP-Gelelektrophorese untersuchten Exons 12, 16, 19, 37 und 47, für die zu Beginn dieser Arbeit noch keine Mutationen beschrieben wurden, die eine Prädisposition für Maligne Hyperthermie bewirken. In der Zwischenzeit wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen das komplette Gen analysiert und sequenziert.

Bisher sind 144 Punktmutationen in dem *RYR1*-Gen veröffentlicht worden, die als aktuelle Übersicht in der Arbeit von Robinson et al. (2006) dargestellt sind. 141 von diesen 144 Mutationen sind mit der Malignen Hyperthermie assoziiert, jedoch kann dieselbe Mutation auch andere Erkrankungen wie zum Beispiel das CCD hervorrufen. In den 18 Exons, die in dieser Arbeit untersucht wurden, konnten bislang 66 krankheitsrelevante Mutationen identifiziert werden. Dabei ist die Verteilung der Mutationen auf die einzelnen Exons äußerst inhomogen. In Tabelle 4.2 ist erkennbar, dass pro Exon meist nur wenige Mutationen vorliegen. Dies ist eine mögliche Erklärung, warum in dieser Arbeit keine MH-prädisponierenden Mutationen detektiert wurden.

Der membrane/luminale Bereich des *RYR1*-Rezeptors, der funktionell besonders wichtig ist, wird durch zwei Regionen des Gens, dem N-terminalen (MH1) und dem zentralen Teil (MH2) determiniert (Keating et

5 Diskussion

al. 1994, Phillips et al. 1994, Quane et al. 1994, Lynch et al. 1997, Barone et al. 1999). Somit ist gut erklärt, weshalb Mutationen in diesem Abschnitt wesentlichen Einfluss auf den Kalziumstoffwechsel in den Muskelzellen nehmen. Der Abschnitt am N-terminalen Ende reicht von Exon zwei bis 17, der zweite, zentrale Teil von Exon 39 bis 46. Wie bereits zuvor erwähnt, konnten für diese Bereiche keine Mutationen nachgewiesen werden. Als Erklärung kommen prinzipiell mehrere Gründe in Frage. Zum einen könnten Mutationen in denjenigen Proben, die durch SSCP-Gelelektrophorese untersucht wurden, übersehen worden sein, wenn sie keine Änderung in der Einzelstrangkongformation verursachten. Weiterhin ist es möglich, dass die für die MH prädisponierenden Mutationen wesentlich einfacher auf mRNA-Ebene detektierbar waren. Zu Beginn dieser Arbeit war die Gewinnung und anschließende Untersuchung der mRNA lediglich durch Muskelbiopsien möglich, so dass hier keine mRNA untersucht wurde. Mittlerweile zeigen neuere Untersuchungen, dass es möglich ist, mRNA des *RYR1* aus Leukozyten zu isolieren und in cDNA umzuschreiben (Kraev et al. 2003). Durch dieses Verfahren wird das Spektrum der diagnostischen Möglichkeiten erweitert, da einerseits durch die Untersuchung der cDNA Spleißingvarianten detektiert werden und zum anderen die cDNA effizienter auf Mutationen untersucht werden kann, da sämtliche Exons hintereinander in Reihe angeordnet sind, damit also nicht für jedes einzelne Exon eine separate PCR erfolgen muss. Jedoch ist das *RYR1*-Gen so groß, dass nicht die komplette cDNA auf einmal untersucht werden kann. Dies kann durch die Synthese von acht überlappenden PCR-Produkten erreicht werden. Mit diesem Verfahren konnte eine Mutation (Arg328Trp) in der cDNA gezeigt werden (Loke et al. 2003). Die Polymorphismen, die in dieser Arbeit detektiert wurden (c.1077C>T, c.1668G>A) stehen wohl nicht in Zusammenhang mit dem Krankheitsbild Maligne Hyperthermie, zumal sie auch in Kontrollgruppen Nichterkrankter nachzuweisen sind. In einigen anderen Exons, die in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurden, sind ebenfalls Polymorphismen bekannt. Wie

5 Diskussion

jedoch zuvor erwähnt ist die Verteilung meist so deutlich in Richtung der häufigen Variante ausgebildet, dass verständlich ist, warum in Untersuchungen mit kleinen Patientenzahlen keine Polymorphismen detektiert werden (s. Tab. 4.2).

Eine weitere Ursache könnte sein, dass die Mutationen in den untersuchten Patienten in anderen Exons liegen. Durch die immense Größe des *RYR1*-Gens war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, sämtliche Exons des Gens zu untersuchen.

Es wird von Yamamoto et al. postuliert, dass die N-terminale und die zentrale Region des *RYR1*-Rezeptors funktionell eine Einheit bilden und wie ein Reisverschluss fungieren, der den geschlossenen Zustand des Kalziumkanals stabilisiert. Änderungen der Aminosäuresequenz destabilisieren so den Schließmechanismus. Zur Verifizierung dieser Hypothese synthetisierte diese Arbeitsgruppe Proteine mit korrespondierenden Sequenzen zu der N-terminalen (Leu590-Cys609) und der zentralen Region (Leu2442-Pro2477), die er DR1 und DR2 nannte. Diese synthetischen Proteine lagern an den gesunden *RYR1* an und blockieren den Schließmechanismus des Kalziumkanals, so dass der *RYR1* gesunder Muskelzellen eine Pathophysiologie eines mutierten *RYR1* aufwies (Yamamoto et al. 2000).

Gemeinsam durch Yamamoto und Kobayashi et al. konnte später gezeigt werden, dass spezifische Antikörper ebenfalls dazu fähig sind, den Schließmechanismus des *RYR1*-Rezeptors zu blockieren und dadurch eine wie bei der MH beobachtete Pathophysiologie hervorrufen (Kobayashi et al. 2004).

Zusätzlich scheint die C-terminale Region (MH3) des Ryanodinrezeptors ein weiterer „hot spot“ zu sein. Hier wird der funktionelle Verknüpfungspunkt mit dem Dihydropyridinrezeptor determiniert, wodurch sich neue Aspekte eröffnen. In dieser Region konnten bei Patienten mit Central Core Disease zahlreiche Mutationen nachgewiesen werden (s. 2.3).

5 Diskussion

Die theoretische Schnittstellenanalyse durch die Software DNA-Star zeigt, dass prinzipiell für viele Mutationen geeignete Endonukleasen für eine Schnittstellenanalyse auffindbar sind. Jedoch sind einige Endonukleasen kommerziell noch nicht zu beziehen, aber durch die voraussichtliche Ausweitung des Angebots an Endonukleasen wird diese Einschränkung vermutlich in der Zukunft fallen.

Die Schnittstellenanalyse zur Bestätigung der Mutation c.1077C>T gelang problemlos. Jedoch ist die DNA-Sequenzierung gegenüber dem DNA-Verdau überlegen, da weitere Mutationen bei MH-Patienten vorliegen können, die beim screening durch DNA-Verdau nicht erfasst würden. Für den Polymorphismus c. 1668G>A ist zum Beispiel zur Zeit keine Schnittstellenanalyse möglich.

Die Verteilung der unterschiedlichen Mutationen ist innerhalb von Europa, vor allem aber im Vergleich zu Nordamerika sehr verschieden. In Deutschland überwiegt mit 9% die Mutation c.1840C>T, in der Schweiz ist die Substitution c.6502G>A am Häufigsten (8%), kommt jedoch im übrigen europäischen Raum kaum vor. Etwa in 6% der irischen, englischen und französischen Familien kommt die Mutation c.1021G>A vor (Manning et al. 1998), die wiederum in Nordamerika sehr selten auftritt (Brandt et al. 1999), ebenso wie die Mutationen c.1840C>T und c.6502G>A. Die häufigste Mutation in Nordamerika stellt mit 5,5% c.7300G>A dar, welche auch in Europa in 4-7% der MH-Familien vorkommt. Die nordamerikanische Population scheint alles in allem hinsichtlich der Mutationen im *RYS1*-Gen heterogener zu sein, was sich möglicherweise durch die grundsätzlich größere Heterogenität der amerikanischen Bevölkerung erklären lässt (Sambuughin et al. 2001).

In einer dänischen Population konnten die Verteilungsmuster anderer Länder nicht verifiziert werden (Fagerlund et al. 1994), so dass postuliert werden kann, dass zumindest für einige bestimmte Mutationen das Vorkommen nur regional benannt werden kann. Es ist nicht abschließend geklärt, ob 44 im Jahr 2002 bekannte Mutationen in der Tat 70% aller MH-

5 Diskussion

Fälle verursachen (Rueffert et al. 2002). Nach Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit scheint dies zumindest fraglich. Eine Arbeit mit einem großen Patientenkollektiv von 124 Nichtverwandten wies nur in 23% eine der bekannten Mutationen nach (Sei et al. 2004).

Weitere Analysen konnten zeigen, dass bei Ausschluss einer Assoziation zum *RYR1*-Gen häufig eine Kopplung mit Chromosom 1q vorhanden ist, wo das Gen *CACNL1A3* an Position 1q32.1 lokalisiert ist, welches für die α 1-Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors kodiert (Robinson et al. 2000). Diese Untereinheit bildet die Loop II-III Domäne dieses Rezeptors, welcher mit dem *RYR1* interagiert und auf diese Weise direkt in den Kalziumstoffwechsel der Zelle eingreift. In einer französischen Familie wurde in dieser Einheit die Mutation p.Arg1086His nachgewiesen, die bei allen MHS eingestuft Familienmitgliedern gefunden wurde, jedoch nicht bei den als MHN getesteten (Monnier et al. 1997). In einem weiteren MHS Kollektiv, welches aus nicht verwandten Patienten bestand, konnte diese Mutation nicht gefunden werden, so dass vermutet werden kann, dass es sich um eine seltene Ursache der MH zu handeln scheint. Der Dihydropyridinrezeptor wird aus den fünf Untereinheiten α 1, α 2, β , γ und δ gebildet. Die Gene *CACNLB* und *CACNLG* sind beide in der Region 17q11.2-q24 lokalisiert und kodieren für die β - und γ -Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors. Hier wird nach Ergebnissen von Kopplungsanalysen ein weiterer MH-Lokus angenommen, allerdings konnte hier bisher noch keine Mutation detektiert werden (Levitt et al. 1992, Moslehi et al. 1998). Die Einheiten α 2 und δ werden von Genen auf dem Chromosom 7q11.2-q24 kodiert, wo in einer Familie eine Kopplung zwischen dieser Region und der MH gezeigt werden konnte (Illes et al. 1994).

Die Regionen 3q und 5p weisen ebenfalls eine Kopplung mit der MH auf, das Risiko für die MH wird durch Allele in dieser Region erhöht, jedoch sind sie nicht obligat für eine Prädisposition zur MH und können diese wohl auch nicht alleine auslösen (Robinson et al. 2000). Hier müssen

5 Diskussion

noch konkrete Gene identifiziert werden, die mit der MH assoziiert sein können, bzw. die direkt oder indirekt die intrazelluläre Kalziumhomöostase beeinflussen.

Die Ergebnisse der Kopplungsanalysen zeigen die Komplexität der Genetik der MH. Unterschiedliche Genprodukte determinieren und variieren abhängig von der Expression die Anfälligkeit für die Erkrankung. Weiterhin kommen neben den genetischen Faktoren auch die konstitutionelle Verfassung und Umwelteinflüsse wie z.B. starker körperlicher oder psychischer Stress oder die Umgebungstemperatur zum Tragen. Eine Vorbehandlung mit Neuroleptika wird ebenfalls als ein Faktor diskutiert, der das Auftreten einer MH begünstigt. Das Maligne neuroleptische Syndrom, für das eine Verwandtschaft mit der MH diskutiert wird, wird durch Neuroleptika ausgelöst (Ward et al. 1986, Brownell 1988, Guerrero et al. 1988). Insbesondere Faktoren, die den Kalziumspiegel im Myozyten erhöhen, gelten als begünstigend für eine MH-Krise. Hierzu zählen z.B. körperliche Belastung, da durch die kontinuierliche Muskelaktivität zur Filamentstimulation Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird und aus dem Myoplasma nicht vollständig resorbiert wird. Durch diese Vielzahl von Faktoren kann möglicherweise erklärt werden, weshalb Patienten mit MH einige Anästhesien komplikationslos durchlaufen und bei anderen Narkosen klinisch auffällig werden.

Da die MH eine so große Heterogenität aufweist, konnten die Erwartungen, dass der IVCT evtl. durch nicht-invasive Verfahren ersetzt wird, nicht erfüllt werden. Auch wenn bei einer Sensitivität von 99% ein Prozent, möglicherweise mit letalen Folgen, als falsch negativ diagnostiziert und bei einer Spezifität von 93,6% etwa sechs Prozent falsch positiv eingruppiert werden, bleibt der IVCT in der Diagnostik der MH unverzichtbar und gilt als „Goldstandard“ der MH-Diagnostik, kann aber durch zusätzliche molekulargenetische Untersuchungen ergänzt werden (Rueffert et al. 2000). Die „European Malignant Hyperthermia

5 Diskussion

Group“ brachte einen Leitfaden zur genetischen Analyse von MH-Patienten heraus (Urwyler et al. 2000). Der MH-Patient wird initial auf bekannte Mutationen untersucht. Falls bei dieser Analyse Mutationen detektiert werden, kann die Untersuchung auf die Blutsverwandten ausgeweitet werden, die dann ebenfalls auf dieses Merkmal untersucht werden. Für das *RYR1*-Gen einigte man sich auf 15 Mutationen, die in mehreren Familien nachgewiesen wurden und bei denen durch Untersuchung des mutierten Gens in Zellkulturen die Zuteilung als kausale Mutation gesichert ist (Censier et al. 1998, Tong et al. 1997, Treves et al. 1994, Lynch et al. 1999, Otsu et al. 1994). Falls bei den Blutsverwandten die gleiche Mutation wie beim Erkrankten gefunden wird, gelten diese als MHS, in diesem Fall kann auf den IVCT verzichtet werden.

Wird keine Mutation detektiert, wird obligat der IVCT durchgeführt, da Genotyp und Phänotyp der MH nicht immer übereinstimmen (Deufel et al. 1995, Adeokun et al. 1997), was auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt wird. Ohne IVCT bestünde bei diesem Kollektiv die Gefahr, dass sie fälschlicherweise als MHN eingestuft werden, diese Diagnose muss durch den IVCT bestätigt werden.

Jedoch gilt die molekulargenetische Analyse insbesondere für Angehörige von MHS-Patienten als Verbesserung, da in den Fällen, in denen durch molekulargenetische Untersuchung eine Mutation detektiert wurde, auf die invasive Untersuchung mit dem IVCT verzichtet werden kann.

In der Therapie der MH wurden entscheidende Verbesserungen erreicht. Initial war die Behandlung durch Eiswasserspülungen, Beatmung mit 100% O₂ und Weglassen der Triggersubstanzen bzw. Austausch des Narkosesystems begrenzt. Erst durch die Einführung von Dantrolen, welches heute in jedem OP als Notfallmedikament zur Verfügung steht, konnte die Behandlung entscheidend verbessert werden. Durch die frühzeitige Gabe kann die weitere Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum in die Zelle verhindert und so die Pathophysiologie kausal durchbrochen werden. Hat sich das SR

5 Diskussion

überwiegend entleert, wird kein positiver therapeutischer Effekt erzielt. Zwar konnte die Mortalität durch die Einführung von Dantrolen entscheidend gesenkt werden, jedoch kommt der Erkennung möglicherweise gefährdeter Patienten durch die Prämedikation weiterhin große Bedeutung zu. In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls gezielt nach Symptomen assoziierter Syndrome wie z.B. dem Human Stress Syndrom oder bestimmter Muskelerkrankungen gefragt werden, um Risikopatienten bereits vor Beginn der Narkose zu identifizieren und weiterer Diagnostik zuzuführen. Wird MHS festgestellt, kann durch die Narkoseführung ohne Triggersubstanzen ein Eingriff ohne diesbezüglich erhöhtes Risiko erfolgen.

Das Verständnis hinsichtlich Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie der MH ist in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen. Dadurch gelang es, ein komplexes Syndrom zunehmend transparenter zu machen, viele Faktoren bleiben jedoch noch unverstanden. Zusätzliche Gene, bei denen durch Mutationen MH-Prädisposition entstehen können, sind erst zum Teil identifiziert. Je mehr dieser unbekanntes Gene erkannt werden, desto besser und vollständiger wird die Diagnostik der MH, jedoch bleibt es fraglich, ob der invasive IVCT vollständig durch molekulargenetische Analysen ersetzt werden kann. Insbesondere da die große Zahl von beeinflussenden Co-Faktoren vielfältig in den Pathomechanismus eingegriffen wird.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden insgesamt 52 MH-Patienten, die alle im „*in vitro* Kontrakturtest“ pathologische Werte zeigten, molekulargenetisch auf Mutationen untersucht. Bei 26 Patienten wurden 13 als “hot spots“ bekannte Exons (Exon 2, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 17, 39, 40, 45, 46 und 102) und fünf bisher nicht untersuchte weitere Exons (Exon 12, 16, 19, 37 und 47) durch PCR amplifiziert und dann untersucht. Die Analyse dieser 5 Exons wurde bei weiteren 26 Patienten zusätzlich durchgeführt. Hierzu wurde bei allen Patienten aus Blutleukozyten genomische DNA isoliert. Die Untersuchung erfolgte bei den „hot spots“ vornehmlich durch Sequenzierung und zu einem geringen Teil durch SSCP-Gelelektrophorese, die anderen fünf Exons wurden überwiegend durch die SSCP-Gelelektrophorese untersucht und dann sequenziert, wenn dort Auffälligkeiten vorlagen.

Der Nachweis einer neuen oder bereits bekannten krankheitsrelevanten Mutation gelang bei keiner der untersuchten Proben. In zwei Exons konnten bereits bekannte Polymorphismen, c.1077C>T sowie c.1668G>A, identifiziert werden, einer der beiden Polymorphismen wurde durch eine Schnittstellenanalyse durch zwei Restriktionsendonukleasen bestätigt.

Die Resultate dieser Arbeit konnten zwar keinen Nachweis neuer Mutationen erbringen, allerdings wird dadurch die heterogene Komplexität der Malignen Hyperthermie unterstützt und bekräftigt die Tatsache, dass viele zum Teil noch nicht identifizierte Faktoren die Prädisposition zur MH und deren Ausmaß determinieren. Daher gilt zur Zeit der invasive IVCT als Standard der MH-Diagnostik und kann noch nicht vollständig durch molekulargenetische Untersuchungen ersetzt werden.

7. Literatur

Adeokun AM, West SP, Ellis FR, Halsall PJ, Hopkins PM, Foroughmand, AM, Illes 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

Anteseder M, Müller CR (2003) MH in der Intensivmedizin. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 40/4:324-335

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: 115-118

Baur C, Felleiter P, Fricker R, Hartung E, Olthoff D, Scholz J, Urwyler A, Wappler F (2000) Informationen zur Malignen Hyperthermie. Verein zur Förderung und Fortbildung der Anästhesiologie, Intensiv-, Schmerz- und Notfalltherapie e.V.:14-18, 2000

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 Genet* 8: 2055-2062

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

7 Literatur

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 AKW (1998) Malignant Hyperthermia: Relationship to other diseases. *Br J Anaesth* 60: 303-308

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 function of voltage-gated ion channels. *Ann Rev Biochem* 64: 493-532

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 overexpression of recombinant wild-type and Arg163Cys mutated ryanodine receptors. *J Clin Invest* 101: 1233-1242

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 anaesthesia- induced malignant hyperthermia in an *RYR1* knock-in mouse. *FASEB J* article 10. 1096/fj.05-4497fje. Published online

7 Literatur

Coronado R, Morrisette J, Sukhareva M, Vaughan DM (1994) Structure and function of the ryanodine receptors. *Am J Physiol* 266:C1485-1504

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 Anaesth* 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, Dennet X, Anderson R (1973) Central Core Disease and Hyperpyrexia. *Br Med J* 272-273

Denborough MA (1998) Malignant Hyperthermia. *Lancet* 353: 1131-6

Deufel T, Sudbrak R, Feist Y, Rübsam B, Du Chense I, Schäfer KL, Roewe N, Grimm T, Lehmann-Horn F, Hartung EJ, Müller CR (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* 56: 1334-1342

Ellis FR, Harriman DG, Keaney NP, Kyei-Mensah K, Tyrrell JH (1971) Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br J Anaesth*. 1971 Jul;43(7):721-2

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

7 Literatur

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, pp356-65

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. *Anaesthesiology*. 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: 699-729

Fuji 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

7 Literatur

Gillard EF, Otsu K, Fujii J, Khanna VK, DeLeon S, Derdemezi J, Britt BA, Duff CL, Worton RG, MacLennan DH (1991) A substitution of cysteine to for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* 11: 751-755

Gillard EF, Otsu K, Fujii J, Khanna VK, DeLeon S, Derdemezi J, Britt BA, Duff CL, Worton RG, MacLennan DH (1992) Polymorphisms and deduced amino acid substitutions in the coding sequence of the ryanodine receptor (*RYR1*) gene in individuals with malignant hyperthermia. *Genomics* 13: 1247-1254

Gillard EF, Otsu K, Fuji 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: 62-65

Hartung E, Anetseder M (2000) The standard In-Vitro Contracture Test. In: *Malignant Hyperthermia* (Schulte am Esch J, Scholz J, Wappler F (Eds.)) pp251-261. Pabst Science Publishers; Lengerich, Berlin, Riga, Rom, Wien, Zagreb

7 Literatur

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 reelevated myopathies in exertional heat stroke and malignant hyperthermia. *Lancet* 338/8781:1491-2

Iles DE, Lehmann-Horn F, Schere SW, Tsui LC, Olde WD, Suijkerbuijk RF, Heytens L, Mikala G, Schwartz A, Ellis FR, Steward AD, deufel T, Wieringa B (1994) Localization of the gene encoding the alpha-2/delta-subunits of the L-type voltage dependant calcium channel to chromosome 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia susceptible families. *Hum Mol Genet* 3: 969-975

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, Britt BA, Terreau ME, Haist C (1970) Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. *Lancet*. 1970 Oct 31;2(7679):895-8

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

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

7 Literatur

novel *RYR1* mutation in four malignant hyperthermia pedigrees. *Hum Mol Genet* 3/10:1855-8

Keating KE, Giblin L, Lynch PJ, Quane 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 hypokalaemic periodic paralysis to chromosome 17q. *J Med Genet* 28/9:583-6

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

Lenzen C, Roewer N, Wappler F, Scholz J, Kahl J, Blank M, Rumberger E, Schulte am Esch J (1993) Accelerated contractures 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 aminoacid 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: 7791-7794

7 Literatur

Levitt RC, Olckers A, Meyers S, Fletcher JE, Rosenberg H, Isaacs H, Merers DA (1992) Evidence for the localization of a malignant hyperthermia susceptibility locus (MHS2) to human chromosome 17q. *Genomics*. 1992 Nov;14(3):562-6.

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. *Anaesthesiology* 99/2:297-302

Lynch PJ, Tong J, Lehane M, Mallet A, Giblin L, Heffron JJ, Vaughan P, Zafra G, MacLennan DH, McCarthy TV (1999) A mutation in the transmembrane/luminal domain of the ryanodine receptor is associated with abnormal calcium release channel function and severe central core disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4164-4169

MacLennan DH, Duff C, Zorzato F, Fuji J, Philips M, Korneluk RG, Frodis W, Britt BA, Worton RG (1990) Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* 343/6258-61

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, Ording 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, Müller CR, McCarthy TV (1998) Identification of novel

7 Literatur

mutations in the ryanodine receptor gene (*RYR1*) in malignant hyperthermia: genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 62: 599-609

McCarthy TV, Healy JMS, Heffron JJA, Lehane M, Deufel T, Lehmann-Horn F, Farall M, Johnson K (1990) Localisation of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature* 343: 562-564

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 11/16(3):1215

Monnier N, Procaccio V, Steiglitz P, Lunardi J (1997) Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha-1 subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage dependant calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 60: 1316-1325

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 Genet* 78/1:21-7

7 Literatur

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 Arg615Cys 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, Hanaoka K, Endo M, Iino M (2002) Novel mutations in C-terminal channel region of the ryanodine receptor in malignant hyperthermia patients. *Jpn J Pharmacol*. 2002 Feb;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 (*RYR1*) gene is associated with malignant hyperthermia. *Hum Mol Genet* 3/12:2181-6

Phillips MS, Fujii J, Khanna VK, DeLeon S, Yokobata K, De Jong PJ, MacLennan DH (1996) The structural Organisation of the Human skeletal Muscle Ryanodine Receptor (*RYR1*) Gene. *Genomics* 34: 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

7 Literatur

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 associated with 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, Quinell 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

7 Literatur

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 N, 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 three hot spots in the type I ryanodine receptor gene. Anesthesiology 101/4:824-30

Snyder HR jr., Davis CB, Bickerton RK, Haliday RP (1967) 1-[(5-Arylfurylidene)amino] hydantoines. A new class of muscle relaxants. J Med Chem 10: 807-810

Takagi A, Sunohara N, Ishihara T, Nonaka I, Sugita H (1983) Malignant hyperthermia and related neuromuscular diseases: caffeine contracture of the skinned muscle fibres. 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 gene (*RYR1*) 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

7 Literatur

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 mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J Biol Chem* 272/42:26332-9

Treves S, Larini F, Menegazzi P, Steinberg TH, Koval M, Vilsen B, Andersen JP, Zorzato F (1994) Alteration of intracellular calcium transients in COS-7 cells transfected with the cDNA encoding skeletal-muscle ryanodine receptor carrying a mutation associated with malignant hyperthermia. *Biochem J* 301:661-665

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, Rademacher M (1997) Ryanodine receptors: structure and macromolecular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 7: 258-265

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

7 Literatur

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) Functional 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 mutation (Y522C). *Anesth Analg* 101/5:1401-6

Zhang Y, Chen HS, Khanna VK, De Leon S, Phillips MS, Schappert K, Britt BA, Browell AK, MacLennan DH (1993) A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with the central core disease. *Nat Genet.* 1993 Sep;5(1):46-50

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

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. A. Gal, geschäftsführender Direktor des Instituts für Humangenetik, dafür bedanken, dass ich in seinem Institut diese Arbeit durchführen durfte.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Surjit Singh für die hervorragende Betreuung und seine Geduld.

Außerdem bedanke ich bei allen weiteren Mitarbeitern im Institut für Humangenetik für die freundliche Hilfsbereitschaft.

Und schließlich bedanke ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, die einen sehr großen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit hatten und mir durch ihre Unterstützung all dies ermöglicht haben.

Lebenslauf

PERSONALIEN

- Name: Cagri Demir
- Geburtstag: 20. Oktober 1975
- Geburtsort: Varel
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geschlecht: männlich
- Familienstand: ledig
- Adresse: Sillemstraße 64
20257 Hamburg
Deutschland
- Telephon: +49-40-28515241
- e-mail: CDemir@gmx.de

SCHULISCHE AUSBILDUNG

- 06/1994
- Allgemeine Hochschulreife, Abitur
- Lothar-Meyer-Gymnasium Varel
- Note: 2,2

DERZEITIGE POSITION

- Assistenzarzt
08/2008
Universitäres Herzzentrum Hamburg,
Kardiologie
Direktor: Prof. Dr. med. T. Meinertz

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

<u>Datum</u>	<u>Institution</u>
<ul style="list-style-type: none">• Studium der Humanmedizin 04/1995-06/2002	Universität Hamburg Note: 1,83
<ul style="list-style-type: none">• Arzt im Praktikum 07/2002-01/2004	Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf, Kardiologie Direktor: Prof. Dr. T. Meinertz
<ul style="list-style-type: none">▪ Assistenzarzt 01/2004-Gegenwart	Universitäres Herzzentrum, Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf, Kardiologie Direktor: Prof. Dr. T. Meinertz

Hamburg, den 27. August 2008

Cagri Demir

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werks 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 bemüht habe.

Unterschrift