

**Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. Höhn**

**Mutationscreening im Ryanodinrezeptor 1 bei Patienten mit  
maligner Hyperthermie**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Andrea Hoßfeld  
aus Würzburg**

**Würzburg, Juni 2005**

**Referent:** Prof. Dr. C.R. Müller-Reible  
**Koreferent:** Priv.-Doz.. Dr. M. Anetseder  
**Dekan:** Prof. Dr. G. Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung:** 20.01.2006

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Geschichte der MH.....	1
1.2 Klinik der MH.....	4
1.2.1 Fulminante MH.....	4
1.2.2 Abortive MH.....	5
1.2.3 Masseterspasmus .....	6
1.2.4 Der Larach Score.....	6
1.3 Die Therapie der MH.....	6
1.3.1 Dantrolen.....	8
1.4 Inzidenz der MH.....	9
1.5 Diagnostik der MH.....	9
1.5.1 Der in-vitro-Kontrakturtest (IVCT).....	9
1.5.2 Experimentelle Ansätze zur nicht-invasiven Diagnostik.....	10
1.6 Assoziierte Erkrankungen .....	11
1.6.1 Central Core Disease (CCD).....	11
1.6.2 Malignes Neuroleptikasyndrom (MNS).....	12
1.6.3 Porcine Stress Syndrome (PSS).....	12
1.7 Muskelphysiologie.....	13
1.8 Der Ryanodinrezeptor 1 (RYR1).....	17
1.9 Der Dihydropyridinrezeptor (DHPR).....	19
1.10 Pathophysiologie der MH.....	20
1.11 Genetik der MH.....	22
1.11.1 Das Ryanodinrezeptor-Gen (MHS-1).....	22
1.11.2 Andere Gene und Loci für MH.....	23
<b>2 Ziel dieser Arbeit</b> .....	<b>25</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1 Material.....	26
3.1.1 Chemikalien und Enzyme.....	26
3.1.2 Geräte.....	26
3.1.3 Sonstige Materialien.....	27

3.1.4 Untersuchungsmaterial.....	27
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	27
3.2.1.1 Grundlagen.....	27
3.2.1.2 Primer und PCR- Bedingungen.....	29
3.2.2 Agarosegelelektrophorese.....	29
3.2.3 Sequenzierung von PCR- Produkten.....	30
3.2.3.1 Verdau mit dem Pre- Sequenzing- Kit.....	30
3.2.3.2 Sequenzierung mit dem Quick Start Kit.....	31
3.2.3.3 Prinzip der automatischen Sequenzierung.....	32
3.2.4 Single- stranded conformation polymorphism (SSCP).....	32
3.2.4.1 Grundlagen.....	32
3.2.4.2 SSCP- Gele.....	33
3.2.4.3 Probenvorbereitung.....	34
3.2.4.4 Vorbereitung zur Auswertung.....	35
3.2.5 Restriktionsenzymverdau.....	35
3.2.5.1 Grundlagen.....	35
3.2.5.2 Anwendung.....	35
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
4.1 Gefundene Mutationen im RYR1 .....	37
4.1.1 Mutation G6377A (R2126Q).....	37
4.1.2 Mutation C6487T (R2163C).....	39
4.1.3 Mutation G6488A (R2163H).....	39
4.1.4 Mutation G6502A (V2168M).....	40
4.1.5 Mutation C6617T (T2206M).....	41
4.1.6 Mutation C6617G (T2206R).....	48
4.1.7 Mutation G7282A (A2428T).....	49
4.1.8 Mutation G7300A (G2434R).....	50
4.1.9 Mutation G7361A (R2454H).....	53
4.1.10 Mutation C7372T (R2458C).....	54
4.2 Polymorphismus C7260T.....	55
4.3 Zusammenfassung.....	56
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>58</b>

5.1 Vergleich der Mutationshäufigkeiten.....	58
5.2 Mutation G6377A.....	60
5.3 Übereinstimmung der Mutationsdaten mit den Ergebnissen des IVCT.....	60
5.4 Methodenvergleich.....	61
5.4.1 Sicherheit und Genauigkeit.....	61
5.4.2 Zeitaufwand.....	63
5.4.3 Kosten.....	64
5.5 Ausblick.....	64
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>

## **1 Einleitung**

Die maligne Hyperthermie (MH) ist eine hypermetabole Störung des Skelettmuskels, die bei betroffenen Patienten während der Anästhesie mit volatilen Inhalationsanästhetika oder depolarisierenden Muskelrelaxanzien auftritt und unbehandelt zum Tode führen kann.

### **1.1 Geschichte der MH**

Anästhesiologische Zwischenfälle wie Hyperthermie sind schon von Beginn des Einsatzes von Narkosetechniken an bekannt. Erste Berichte darüber finden sich aus der Zeit um die Jahrhundertwende. Chirurgen der New York Academy of Medicine diskutierten im November 1900 das Problem des Hitzschlags als postoperative Komplikation (4). Als Hauptursache vermuteten sie die Hitze im Operationssaal und schlugen demzufolge eine Kühlung des Raumes mit Ventilatoren und aktives Kühlen des Patienten im Falle erhöhter Körpertemperatur vor. Sie hatten auch eine Suppression der Urinproduktion bei einigen Patienten beobachtet und konnten so eine Nephritis als Todesursache bei diesen Patienten nicht ausschließen. Leider erbrachte die post mortem durchgeführte pathologische Untersuchung keine wegweisenden Erkenntnisse. Die Befunde glichen denen an Hitzschlag verstorbener Patienten. A.F. Guedel brachte in seinem Lehrbuch über Inhalationsanästhesie 1937 die beobachteten Hyperthermien mit dem verwendeten Anästhetikum Diethylether in Zusammenhang (6). G.E. Burford beschrieb 1940 perioperativ auftretende Hyperpyrexie mit der immer wieder auftretenden Trias Hyperthermie, Tachykardie und Tachypnoe (2). Er vermutete die Ursache in der langen Dauer der Ethernarkose, konnte aber eine Beteiligung des sympathoadrenergen Systems nicht ausschließen.

Eine familiäre Häufung des Syndroms und damit den ersten Hinweis auf eine genetische Komponente der MH erkannten die australischen Anästhesisten M. Denborough und R.R. Lovell (3). Sie beschrieben den Fall eines 21-jährigen Mannes, der sich wegen

einer Unterschenkelfraktur einem operativen Eingriff unterziehen musste. Er sah der Narkose besonders ängstlich entgegen, da schon zehn Verwandte während einer solchen verstorben waren. Da all jene Ether erhalten hatten, beschloss man, die Anästhesie bei dem jungen Mann mit Halothan, einem damals noch recht neuen Narkotikum durchzuführen. Doch schon zehn Minuten nach Anästhesiebeginn entwickelte der Patient Fieber, Tachykardie, Kreislaufinstabilität und Zyanose. Die Anästhesie wurde abgebrochen und der Patient mit Eis gekühlt. Nach kurzem postoperativen Koma erholte der junge Mann sich völlig. In weiteren klinischen und laborchemischen Tests wurden keine Besonderheiten gefunden. Allein die Familienanalyse wies auf eine bis dahin noch nicht beschriebene, dominant vererbte Stoffwechsellanomalie hin. Nur ein Jahr später unterzog sich derselbe Patient erneut einer Operation wegen eines im Ureter eingeklemmten Steines. Angesichts seiner Vorgeschichte wurde der Eingriff in spinaler Anästhesie durchgeführt, was der Patient gut tolerierte.

Diese Fallbeschreibung traf auf großes Interesse seitens der Anästhesisten, und in den folgenden Jahren wurden viele Artikel über ähnliche Fälle und Familien veröffentlicht.

Ein Tiermodell für die MH fand L.W. Hall 1966 im Schwein (5). Er beobachtete, dass britische „landrace“-Schweine nach der Gabe von Suxamethoniumchlorid Symptome der MH entwickelten und starben. Dasselbe gilt für die Gabe von Halothan, wie G.G. Harrison 1969 entdeckte (1). Von mehreren Arbeitsgruppen wurden Messungen des Calciumstromes unter Einfluss der Triggersubstanzen im Muskel von betroffenen Tieren und Patienten vorgenommen (37,38,8). Dabei wurde eine erhöhte Calciumfreisetzung bei extrasarkoplasmatisch ausreichend vorhandenem Calcium festgestellt. J.R. Mickelson entdeckte 1988, dass dafür ein Defekt im sarkoplasmatischen Calciumkanal, auch Ryanodinrezeptor (RYR1) genannt, verantwortlich ist (7).

Auch auf genetischer Ebene wurden erste richtungsweisende Entdeckungen beim Schwein gemacht. Der sogenannte Halothan-sensitive Locus wurde durch zwei Arbeitsgruppen in der Nähe des Glucose-6-Phosphat-Isomerase-Gens und des H-Blutgruppen-Antigens auf Chromosom 6 lokalisiert (9,10). Im menschlichen Genom konnte das GPI-Gen auf Chromosom 19q12-13.2 ausgemacht werden (11). In diesem Bereich wies T.V. McCarthy 1989 erstmals auch einen MH-Locus nach (12). Zur gleichen Zeit kartierte D.H. MacLennan auf 19q13.1 das Gen für den Ryanodinrezeptor (13). Damit war das

bis heute wichtigste Kandidatengen für die MH gefunden. Durch Kopplungsanalysen wurde herausgefunden, dass etwa 50% der MH-Familien eine Kopplung zu Chromosom 19 und dem Gen für den RYR1 aufweisen (39). Durch weitere Analysen konnte in wenigen Familien eine Kopplung zu Chromosom 17q und damit zu den Genen für den Dihydropyridinrezeptor sowie für die  $\alpha$ -Untereinheit des Natriumkanals nachgewiesen werden (14,15). Diese Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass die MH eine heterogene Genetik aufweist. Bis heute werden weitere Genloci beschrieben.

Die Identifikation des RYR1 als Kandidatengen für die MH führte zu paralleler Mutationensuche bei Mensch und Schwein. Die erste Mutation, ein Basenaustausch eines C durch ein T an der Stelle 1843, durch den Arginin 615 durch Cystein (Arg615Cys) ersetzt wird, wurde durch K. Otsu et al. 1991 beim MH-Schwein gefunden (16). Daraufhin wurde auch in MH-Familien eine äquivalente Mutation entdeckt, Arg614Cys (17). Sie wurde später weltweit bei etwa 5% der betroffenen Familien diagnostiziert. Um die Ursächlichkeit der Mutation zu beweisen, wurden biochemische Studien an kultivierten Zellen durchgeführt (18). Bei den mutationstragenden Zellen wurden durch Zugabe von Triggersubstanzen Defekte in der Sensitivität beim Öffnen und Schließen des Calciumkanals beobachtet. Dasselbe konnte auch für weitere beim Menschen beschriebene Mutationen des RYR1 nachgewiesen werden (18).

Bedingt durch die Heterogenität kann die genetische Untersuchung nicht der primären Diagnostik der MH dienen. Einem Patienten, bei dem während der Anästhesie der Verdacht auf eine MH entstanden ist, wird deshalb ein in-vitro-Kontrakturtest gemäß dem Protokoll der Europäischen MH Gruppe (EMHG) empfohlen. Die EMHG wurde 1983 gegründet, um ein einheitliches Testverfahren für alle europäischen MH-Testzentren zu etablieren. Das standardisierte Verfahren beruht auf Untersuchungen von W. Kalow und B.A. Britt sowie F.R. Ellis, die entdeckt hatten, dass Muskelbündel von MH-Patienten bei niedrigen Konzentrationen von Koffein beziehungsweise Halothan bereits Kontraktionen zeigten, solche gesunder Probanden dagegen nicht (19,20). Auf der Basis dieser Experimente wurde der standardisierte in-vitro-Kontrakturtest (IVCT) durch die EMHG entwickelt.

Ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der MH ist die Einführung des Medikamentes Dantrolen als Sofortmaßnahme bei klinischem MH-Verdacht. Die Wirksamkeit von Dantrolen bei MH wurde 1975 im Schweinmodell erstmals festgestellt. Die Einführung in die Klinik erfolgte 1980. Dadurch konnte die Mortalität der MH von 70-80 % auf unter 10 % gesenkt werden (28).

## **1.2 Klinik der MH**

Das klinische Bild der MH ist bestimmt durch den vom Skelettmuskel ausgehenden Hypermetabolismus, ausgelöst durch exzessive Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die Diagnose wird während der Operation anhand der Überwachungsparameter gestellt. Besonders hilfreich sind zu diesem Zweck die Kapnometrie und die Blutgasanalyse. Erste Symptome können sofort nach Beginn der Anästhesie, während oder auch nach dem Eingriff auftreten. Auch ist es möglich, dass ein zuvor schon komplikationslos anästhesierter Patient bei einer weiteren Operation eine MH entwickelt. Wodurch dies bedingt ist, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Dies gilt auch für die unterschiedlich starke Ausprägung der MH. Es werden drei Verlaufsformen unterschieden (34):

### *1.2.1 Fulminante MH*

Die fulminante MH ist die schwerwiegendste Verlaufsform. Sie entwickelt sich rasch unter eindeutigem klinischen Bild. Für die Diagnosestellung müssen drei der folgenden Symptome vorhanden sein:

- Generalisierter Rigor
- Hyperkapnie
- Metabolische sowie respiratorische Azidose
- Kardiale Symptome wie Tachykardie und Arrhythmien
- Hyperthermie

Das erhöhte myoplasmatische Calcium verursacht Kontraktionen des *M. masseter* und aller anderen Skelettmuskeln mit dem klinischen Bild des generalisierten Rigors und sti-

muliert Glycogenolyse sowie Zellmetabolismus mit den Folgen Wärmeproduktion und Laktatanstieg. Systemische Veränderungen wie endexpiratorisch erhöhtes CO<sub>2</sub>, metabolische Azidose und Abfall der Sauerstoffsättigung folgen aus dem wegen ATP-Gewinnung erhöhten Sauerstoffbedarf des Muskels. Ein frühes aber unspezifisches Zeichen ist die Sinustachykardie. Durch den extrem erhöhten Sauerstoffbedarf des Skelettmuskels kommt es auch bei ausreichender intravasaler Oxygenierung zu zellulärer Hypoxie, erkennbar an der Zyanose des Patienten. Auf den Verbrauch der muskulären Energiereserven und die Störung der zellulären Homöostase folgt Rhabdomyolyse mit der Folge des Anstiegs von Kalium, Kreatinkinase (CK) und Myoglobin im Serum. Dies wiederum führt zu weiteren Komplikationen wie kardialen Arrhythmien, ausgelöst durch das erhöhte Serumkalium, und myoglobinurischem Nierenversagen. Die durch den Hypermetabolismus bedingte sympathoadrenerge Überstimulation führt im Verlauf zuerst zu Tachykardie mit Zunahme des myokardialen Sauerstoffbedarfs und später zusammen mit Hypoxie und Azidose zu Kreislaufdepression mit Tachyarrhythmie, Blutdruckabfall und myokardialer Ischämie. Verstärkt durch die Hyperkaliämie endet der Verlauf im Herz-Kreislaufversagen. Als weiteres Spätsymptom gilt die Hyperthermie mit rasantem Temperaturanstieg von jeweils 1°C in 15 Minuten. Sekundäre Folgen sind außerdem disseminierte intravasale Gerinnung und Hirnödem.

### *1.2.2 Abortive MH*

Viel häufiger sind die schwer zu diagnostizierenden abortiven Verläufe. Hier findet sich ein nur mäßiger Hypermetabolismus. Die Ausbildung aller oben genannten Symptome in milderer Form ist möglich. Einzelne Symptome wie Tachykardie, mäßige metabolische Azidose, geringe Hyperkapnie oder postoperative Myoglobinurie können auftreten und zur Verdachtsdiagnose MH führen. Ein abortiver Verlauf kann bei Nichtbeachtung der ersten Symptome aber auch rasch exazerbieren und in eine fulminante Form übergehen.

### *1.2.3 Masseterspasmus*

Der Masseterspasmus, eine anhaltende starke Kontraktur der Kaumuskeln, kann das einzige Zeichen einer MH sein. Die Hälfte der Patienten, die mit einem Masseterspasmus auffallen, werden im IVCT als MH-sensitive (MHS) diagnostiziert.

Bei der Applikation von Succinylcholin ist ein Tonusanstieg im *M. masseter* nicht unüblich. Die Unterscheidung zwischen kurzen Muskelfaszikulationen und einem wahren Masseterspasmus ist nicht leicht und nur mit Hilfe von Tonusmessungen eindeutig zu bewerkstelligen. Bei Kindern ist die Inzidenz des Masseterspasmus nach Succinylcholin besonders hoch (1:100). Diese Zahl lässt erahnen, wie schwer es ist, aus der großen Zahl der Patienten mit Masseterspasmus diejenigen herauszufiltern, bei denen ein begründeter Verdacht auf MH vorliegt.

### *1.2.4 Der Larach Score*

Zur retrospektiven Beurteilung einer MH anhand physiologischer Parameter wie  $\text{paCO}_2$  oder BE kann beispielsweise der Larach-Score herangezogen werden. Hierbei werden die Parameter kardiale Symptome wie Tachykardie oder Arrhythmie, Azidose, Hyperkapnie, Fieber und Muskelrigidität beurteilt und für jedes vorhandenes Symptom ein Punkt vergeben, so dass man anhand der Endsumme eine Abschätzung der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer MH vornehmen kann. Bei der Stellung der Diagnose sollte er allerdings nicht angewandt werden, da der Ausprägungsgrad der Symptome interindividuell stark schwanken kann und auch ein Patient, der die festgelegte Schwelle zur Pathologie noch nicht überschritten hat, schon unter einer MH leiden kann. Die Anwendung eines solchen Scores kann die Einleitung der Therapie zu Ungunsten des Patienten verzögern (22).

## **1.3 Die Therapie der MH**

Bei MH-Verdacht muss sofort eine Therapie eingeleitet werden. Die Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin hat für diesen Fall Leitlinien erarbeitet (40). Die Exposition mit Triggersubstanzen muss unverzüglich unterbrochen werden.

Zur Sicherheit wird auch der Narkoseverdampfer entfernt. Der Patient wird mit 100% Sauerstoff mit 10 l/min ventiliert. Bei generalisiertem Rigor können höhere inspiratorische Drücke nötig werden. Durch die Erhöhung des Atemminutenvolumens soll das durch den Hypermetabolismus entstehende CO<sub>2</sub> aus dem Blut entfernt werden. Die Narkose wird mit Opiaten und Sedativa aufrechterhalten, eine Muskelrelaxierung erfolgt mit nicht-depolarisierenden Relaxantien.

Entscheidend ist die schnellstmögliche Applikation von Dantrolen. Initial wird dem Patienten ein Bolus von 2,5 mg/kg Körpergewicht intravenös verabreicht. Bis zum Sistieren der hypermetabolen Symptome muss diese Applikation in 5-minütigen Abständen wiederholt werden. Dieser Primärtherapie folgt eine intravenöse Dauertherapie mit 10 mg Dantrolen/kg KG über 24 Stunden.

Daneben kommt noch die symptomatische Behandlung zum Einsatz. Die Azidose wird mit Natriumhydrogencarbonat ausgeglichen. Eine Überkompensierung ist nicht wünschenswert, da eine Alkalose die Sauerstoffbindungskurve negativ beeinflusst. Um einem Nierenversagen vorzubeugen, muss für eine forcierte Diurese gesorgt werden. Dazu eignen sich Diuretika wie Furosemid oder Mannitol. Gleichzeitig wird dem Patienten ausreichend Flüssigkeit infundiert. Dies ist auch deshalb nötig, weil Hypovolämie durch Flüssigkeitsverlust in zerstörte Muskeln ein mortalitätssteigernder Faktor ist.  $\beta$ -Blocker oder Lidocain kommen bei Bedarf bei Arrhythmien zum Einsatz. Calciumantagonisten sind kontraindiziert wegen ihrer Wechselwirkungen mit Dantrolen. Schwere Hyperkaliämie sollte mit Insulin und Glucose bekämpft werden. Zum Senken der Körperkerntemperatur wird der Patient gekühlt. Alle Infusionsflüssigkeiten sollten eiskalt sein. Weitere effiziente Kühlung erfolgt durch Spülung offener Körperhöhlen (Abdomen oder Thorax). Bei einer Körpertemperatur von 38°C wird der Kühlvorgang gestoppt. Hypothermie kann ein erneutes Aufflammen der MH verursachen. Ist der Patient stabil, sollte er für weitere 24 Stunden intensivmedizinisch überwacht werden. Dabei sind Kapnographie, Pulsoxymetrie, EKG, Körperkerntemperatur, intravenöse Blutdruckmessung, zentral-venöser Druck und Diurese von besonderem Interesse.

So bald wie möglich nach Äußerung des MH-Verdachtessollten laborchemische Untersuchungen unternommen werden. Primäre Bedeutung kommen Blutgasanalyse, Serumkalium und Kreatinkinase (CK) zu. Weiterhin sollten Gerinnungsparameter, Leberenzyme, Glucose, Laktat und Myoglobin bestimmt werden. Im weiteren Verlauf werden diese Parameter je nach klinischem Bild kontrolliert.

### *1.3.1 Dantrolen*

Dantrolen wurde im Jahr 1967 als potenzielles Antibiotikum synthetisiert. Im Tierexperiment wurde aber klar, dass es in diesem Bereich nicht einsetzbar sein würde, da es eine relevante Muskelschwäche induzierte. Man machte sich aber diese Wirkung zu Nutze und setzte es bei der Behandlung von Muskelspasmen ein. Im Schweinemodell wurde 1975 erstmals eine Wirksamkeit bei MH beschrieben (41). Nach einer klinischen Multizenterstudie ist das Medikament nun seit 1980 in jedem Operationsbereich als Notfallmedikament der MH vorzuhalten (28).

Bei Dantrolen handelt es sich chemisch um ein Hydantoinderivat. Es ist extrem hydrophob, was die Entwicklung einer infundierbaren Form sehr erschwerte. In der heute verwendeten Darreichungsform liegt es als Pulver vor, dem zur Verbesserung der Löslichkeit Mannitol beigemischt wurde. Zur Bereitung einer Injektionslösung wird das Pulver in aqua destillata (aqua dest.) aufgelöst.

Die Wirkweise von Dantrolen ist noch nicht abschließend geklärt. Im Muskel kommt es zu einer Blockade der Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ohne Beeinflussung des Aktionspotentials an der motorischen Endplatte. Es wird eine direkte oder indirekte Interaktion mit dem RYR1 vermutet. Einige Untersuchungen deuten auf einen Dantrolenrezeptor im RYR1 hin (28).

Im klinischen Alltag werden als Nebenwirkungen von Dantrolen in 22% der Fälle Muskelschwäche, in 10% Phlebitis am Ort des intravenösen Zugangs, hervorgerufen durch den alkischen pH-Wert der Injektionslösung und in je 3% respiratorische Insuffizienz und gastrointestinale Beschwerden beobachtet (28).

Eine weitere Indikation für die Therapie mit Dantrolen ist das maligne neuroleptische Syndrom (MNS). Auch hier ist die Wirkweise des Medikamentes nicht geklärt, was daran liegen mag, dass die Genese des MNS ebenfalls noch unklar ist (28).

## **1.4 Inzidenz der MH**

Die empirische Inzidenz der MH liegt bei etwa 1 von 15000 Anästhesien bei Kindern und 1 von 50000 bei Erwachsenen (29). Diese Zahlen können die tatsächliche Inzidenz der MH aber nicht wiedergeben. Dies liegt daran, dass milde Verläufe gelegentlich nicht als MH diagnostiziert werden, viele MH-Anlageträger nie eine Anästhesie erhalten und an der inkompletten Penetranz des Gens.

## **1.5 Diagnostik der MH**

### *1.5.1 Der in-vitro-Kontrakturtest (IVCT)*

Jeder Patient, der während einer Anästhesie eine MH-Krise oder eine abortive Form der MH entwickelt hat, sollte zur weiteren Diagnostik an ein MH-Zentrum überwiesen werden. Dort wird gemäß den Leitlinien der Europäischen MH-Gruppe (EMHG) (42) eine Muskelbiopsie entnommen, an Hand derer der IVCT zur MH-Diagnostik sowie weitere histologische und histochemische Untersuchungen zum Ausschluß anderer Myopathien durchgeführt werden. In Regional- oder Allgemeinanästhesie wird aus dem *M. vastus lateralis* des Oberschenkels ein vitales Muskelbioptat mit einer Größe von 20x10x5 Millimeter gewonnen und sofort in 37°C warme, carboxygenierte Krebs-Ringer-Lösung transferiert. Einzelne Muskelbündel werden in einer Versuchskammer an einem isometrischen Kraftaufnehmer eingespannt und bis zum Erreichen der optimalen Einzelreizamplitude, generiert durch elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,2 Hz, vorgedehnt. Muskelbündel mit einer Einzelreizamplitude kleiner als 1g werden ausgeschlossen. Nach Einstellung einer konstanten Ruhespannung werden die Bündel

entweder mit Koffein oder Halothan in ansteigender Konzentration inkubiert. Laut EMHG werden für den Koffein-Test Konzentrationen von 0,5/1,0/1,5/2,0/3,0/4,0 und 32 mM, für den Halothan-Test von 0,5/1/2 und 3 Vol% verwendet. Die Messdauer beträgt für jede Konzentration drei Minuten beziehungsweise so lange bis ein Kontrakturplateau erreicht ist. Für jede Testsubstanz wird der Test mit einem frischen Muskelbündel wiederholt. Nun kann die Schwellenkonzentration für Koffein und Halothan bestimmt werden. Sie ist definiert als die Konzentration, die einen Grundlinienanstieg von 0,2 g hervorruft. Ein Patient wird als MH-sensitive (MHS) eingestuft, wenn die Koffeinschwellenkonzentration kleiner oder gleich 2 mM, und die Halothanschwellenkonzentration kleiner oder gleich 2 Vol% ist. Liegen beide Schwellenwerte höher ist der Patient MH-normal (MHN), liegt nur ein Schwellenwert im pathologischen Bereich, bezeichnet man den Patienten als MH-equivocal (MHE<sub>c</sub> bei pathologischem Wert für Koffein oder MHE<sub>h</sub> bei pathologischem Wert für Halothan). Die Sensitivität ist mit 99,0% hoch. Das heißt, dass nur 1 % der Ergebnisse falsch negativ sind. Falsch positiv sind dagegen 6,4% ohne die MHE-Patienten aber nur 1,6% der Ergebnisse. Die Spezifität beträgt damit 93,6% beziehungsweise 98,4%. Das in einigen Punkten leicht abweichende Protokoll der Amerikanischen MH-Gruppe weist mit 97% und 78% schlechtere Sensitivität und Spezifität auf (25).

### *1.5.2 Experimentelle Ansätze zur nicht-invasiven Diagnostik*

Leider gibt es keinen spezifischen laborchemischen Parameter, der zur Diagnostik der MH herangezogen werden könnte. Die CK ist bei 50 % der Patienten erhöht. Dies ist aber auch bei 10% der MHN-Personen der Fall (34). Auch in der Muskelhistologie finden sich nur unspezifische Veränderungen wie zentralisierte Kerne oder atypische Faserverteilung (34). Ein vielversprechender Ansatz ist die Messung der durch Triggersubstanzen stimulierten Calciumfreisetzung in B-Lymphozyten, die die gleiche Isoform des RYR1 exprimieren (43). Eine weitere minimalinvasive Methode ist die Messung der metabolischen Aktivität unter lokaler, intramuskulärer Applikation von Triggersubstanzen im Skelettmuskel betroffenen Patienten (36).

## 1.6 Assoziierte Erkrankungen

### 1.6.1 Central Core Disease (CCD)

Die Central Core Disease (CCD) ist eine seltene, nicht-progressive Erkrankung, die sich in der Kindheit oder im Rahmen einer MH-Krise manifestiert. Sie ist charakterisiert durch Muskelhypotonie, proximal betonte Muskelschwäche, verzögerte motorische Entwicklung und CK-Erhöhung. Je nach Ausprägungsgrad werden zusätzlich Fußdeformitäten, Kyphoskoliose, Gelenkkontrakturen und kongenitale Hüft dysplasie gefunden. Der Schweregrad der Erkrankung schwankt stark, 40 % der Patienten mit „central cores“ sind asymptomatisch (55). Die Diagnose der CCD wird anhand einer Muskelbiopsie gestellt. Dort finden sich die namensgebenden typischen „central cores“, die aus unstrukturierten Myofibrillen und Regionen mit Mangel an Mitochondrien bestehen und entlang der kompletten Länge von Typ I-Muskelfasern, die die slow-twitch Calcium-ATPase exprimieren, auftreten (29). Der Mangel an Mitochondrien kann histochemisch nachgewiesen werden, da in diesen Bereichen die Aktivität oxidativer Enzyme verringert ist. Elektronenmikroskopisch können amorphe zentrale Areale (cores) in Typ I-Fasern mit Mangel an oder Fehlen von Mitochondrien, verminderte Anzahl an Glycogengranula, unstrukturierte Myofibrillen, kontrahierte Sarkomere, Z-Scheiben-Anomalitäten und pathologische Veränderungen der transversalen Tubuli und des SR gefunden werden (56). Die pathogenetische Grundlage wird in einer Calciumüberladung des Myoplasmas mit der Folge von Mitochondrienschädigung vermutet (29). Diese führt zu verminderter metabolischer Aktivität. Außerdem kommt es zu einer erhöhten Expression kompensatorischer Gene, was als Grund für die Proliferation der T-Tubuli und des SR anzusehen ist. Die Anzahl der cores korreliert nicht mit der Schwere der Erkrankung. Genetische Analysen deuten darauf hin, dass die CCD eine autosomal dominant vererbte Krankheit mit variabler Penetranz ist (29). Auch hier wurde eine Kopplung zum RYR1 festgestellt. Dies erklärt die Prädisposition von CCD-Patienten zur Entwicklung einer MH-Krise. Es wurden bereits zahlreiche Mutationen im RYR1-Gen gefunden. Zunächst beschränkte man sich auf Untersuchungen in denselben Hotspotregionen, in denen die meisten MH-verursachenden Mutationen gefunden worden waren, wo tatsächlich auch einige CCD-Mutationen beschrieben wurden (25). Neuere

Screeningreihen zeigten jedoch einen relevanten neuen Hotspot in der Transmembrandomäne des RYR1, die die Pore des Proteins bildet.

Weitere, äußerst seltene, mit MH assoziierte Myopathien sind die Evans Myopathie und das King Denborough-Syndrom.

### *1.6.2 Malignes Neuroleptikasyndrom (MNS)*

Das MNS ist eine seltene, potenziell letale Komplikation einer antipsychotischen Therapie. Es zeichnet sich durch die Symptomentrias Hyperthermie, Muskelrigidität und CK-Erhöhung aus. Häufig sind auch katatonisches Verhalten des Patienten und autonome Dysfunktionen. Zur Entstehung des MNS gibt es verschiedene Theorien. Laut der Theorie von Gurrera könnte das MNS als neurogene Form der MH verstanden werden. Dafür spricht auch die therapeutische Wirksamkeit von Dantrolen (33).

### *1.6.3 Porcine Stress Syndrome (PSS)*

Das PSS ist eine der MH ähnliche Reaktion des Schweines auf Stress und Halothan. Deshalb wurde es schon bald als Tiermodell für die MH entdeckt. Anhand dieses Modells wurden die Kandidatengen für PSS und MH sowie die erste Mutation identifiziert. Auch für Studien zum besseren Verständnis der Pathogenese der MH und der Wirkungsweise von Dantrolen wurde Material von PSS-Schweinen verwendet.

Im Gegensatz zur MH wird das PSS autosomal rezessiv vererbt. Es ist nur eine verursachende Mutation bekannt (Arg615Cys) (16). Dieses Wissen macht man sich heute in der Schweinezucht zu Nutze. Homozygot betroffene Tiere entwickeln unter Stress wie beispielsweise beim Transport entweder eine akute Muskelnekrose des *M. longissimus dorsi* oder das Vollbild des PSS gleich einer MH-Krise. Das Fleisch dieser Tiere ist nicht mehr zu verwenden. Es wird als PSE-Fleisch bezeichnet (pale, soft, exsudative). Andererseits haben diese Tiere, auch wenn sie nur heterozygote Mutationsträger sind, mehr Muskelmasse bei geringerem Fettanteil. Man vermutet, dass bei diesen Tieren die Hypersensitivität des RYR1 zu spontanen Muskelkontraktionen führt, wodurch die Muskelmasse zunimmt und Energiereserven in Form von Fett verbraucht werden. In der

Schweinezucht werden daher homozygot betroffene Eber mit nicht mutationstragenden Säuen gekreuzt, um heterozygote Ferkel mit dem gewünschten hohen Fleischertrag zu erhalten (29).

## **1.7 Muskelphysiologie**

Zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der MH soll hier ein kurzer Überblick über die Physiologie des Muskels gegeben werden (24).

Die kontraktile Elemente des Muskels sind die Myofibrillen. In diesen sind Aktin und Myosin in regelmäßigem Muster angeordnet. Aktinmonomere (G-Aktin) sind globuläre Proteine, die zu fibrillären Aktinfäden (F-Aktin) polymerisieren. Je zwei bilden ein dünnes Filament der Myofibrille. Die dünnen Filamente sind an den Z-Scheiben, die die Myofibrillen in Sarkomere unterteilen, wie Borsten an einer Bürste befestigt. Eingelagert in die Aktinkette sind noch zwei weitere Proteine, das globuläre Troponin, bestehend aus Troponin T und C und das filamentäre Tropomyosin.

Zwischen den dünnen Filamenten liegen parallel zu diesen angeordnet in der Mitte des Sarkomers die dicken Filamente, die aus Myosin bestehen. Sie setzen sich aus je zwei ineinander verdrillten leichten und schweren Peptidketten zusammen. Am Ende der letzteren befinden sich zwei globuläre Köpfchen, die über je eine Bindungsstelle für Aktin und ATP verfügen. Durch diese Anordnung der Filamente entsteht das elektronenmikroskopische Bild des quergestreiften Muskels.

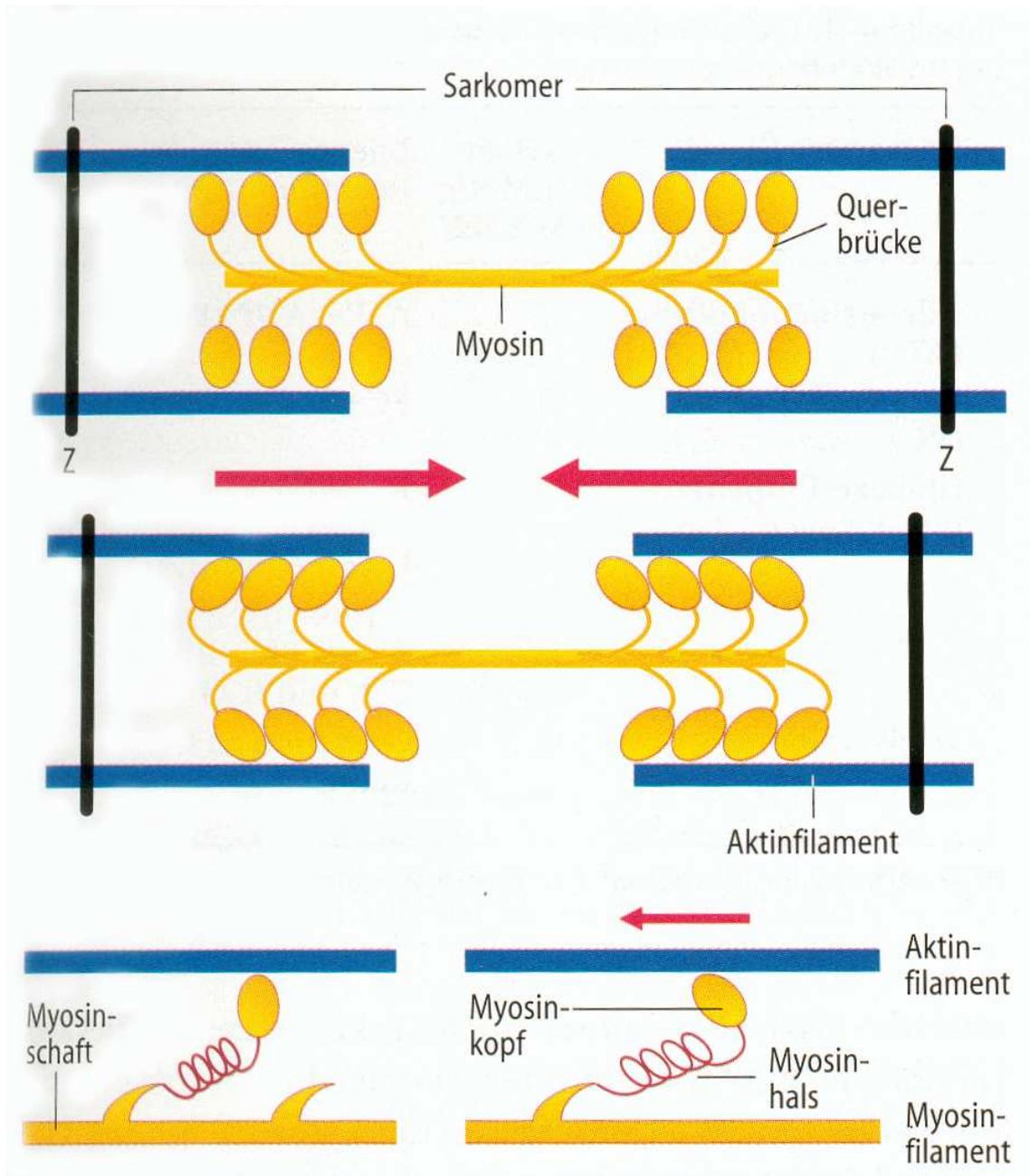


Abbildung 1: Sarkomer, aus J.C. Ruegg. Muskel in R.F. Schmidt, G. Thews. Physiologie des Menschen (24)

Eingelagert in die Myofibrillen finden sich Mitochondrien sowie das Kanalsystem longitudinaler und transversaler Tubuli. Das transversale Röhrensystem entsteht durch Einstülpung der Außenmembran der Muskelzelle an unzähligen Punkten. Daher kommuniziert es auch mit dem extrazellulären Raum. Senkrecht dazu, also parallel zu den Myofibrillen, befindet sich das longitudinale System, das eigentliche sarkoplasmatische Re-

tikulum (SR), dessen Terminalzisternen den Membranen des Transversalsystems eng anliegen. Diese Struktur wird Triade genannt.

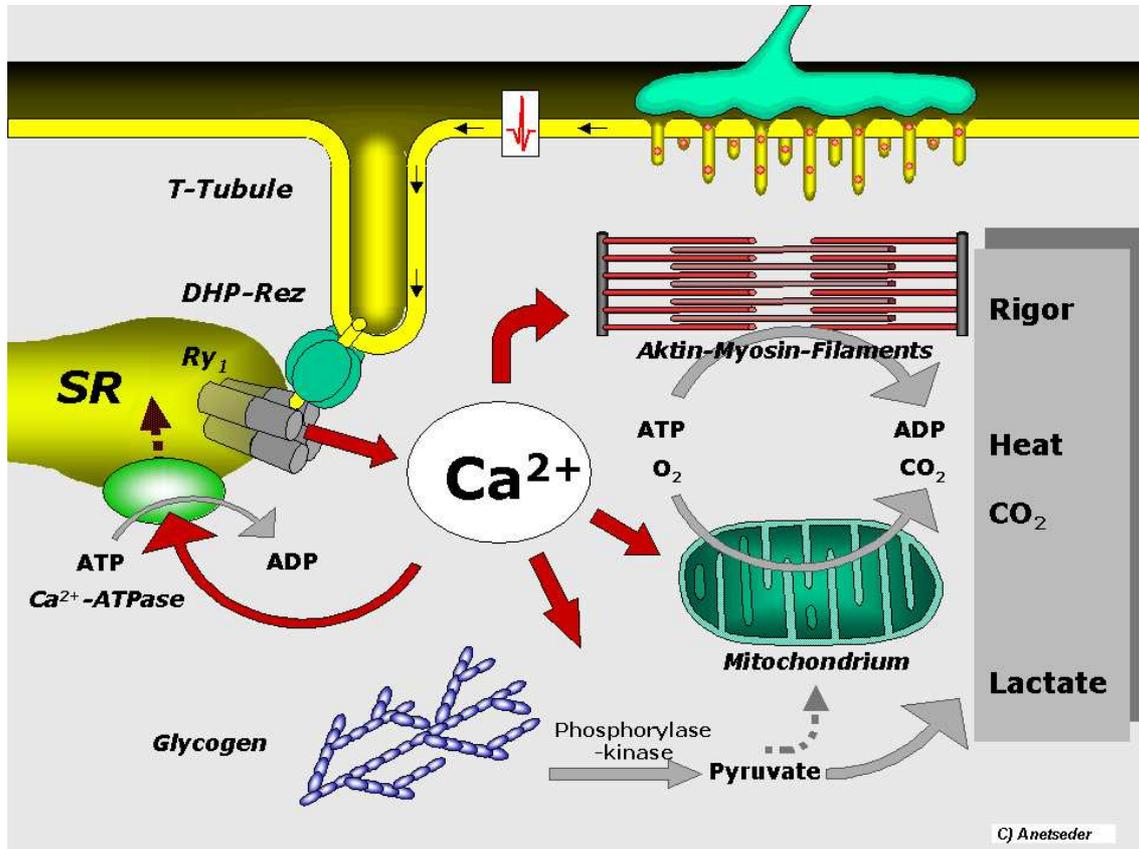


Abbildung 2: Triade und Elektomechanische Kopplung; Graphik Anetseder

Elektromechanische Kopplung führt zur Muskelkontraktion. Das vom Motoneuron fortgeleitete und durch den Transmitter Acetylcholin auf die Muskelzelle übertragene Aktionspotential breitet sich entlang der Zellmembran der Muskelzellen und damit auch entlang der transversalen Tubuli aus. Die Depolarisation der Tubulusmembran beeinflusst die Konformation des in der Tubulusmembran lokalisierten Dihydropyridinrezeptors, eines modifizierten Calciumkanals, der als Sensor für die elektrische Spannung fungiert. Am Triadensystem kommt es zu direkter Interaktion mit dem in der Membran des SR liegenden RYR1 mit der Folge der Calciumfreisetzung aus dem SR durch den RYR1. In Ruhe liegt die Calciumkonzentration im Myoplasma bei  $10^{-7}$  mol/l. Die Öffnung des Calciumkanals RYR1 bewirkt die Freisetzung von über 250 nmol Calcium je Gramm Muskel in nur 1-2 ms. Das so freigesetzte Calcium bindet an Troponin C, was

wiederum eine Konformationsänderung im Troponinkomplex bewirkt. Nun kann Troponin T mit Tropomyosin interagieren. Dieses gibt die Aktinbindungsstellen am Myosin frei, die es im Ruhezustand blockiert.

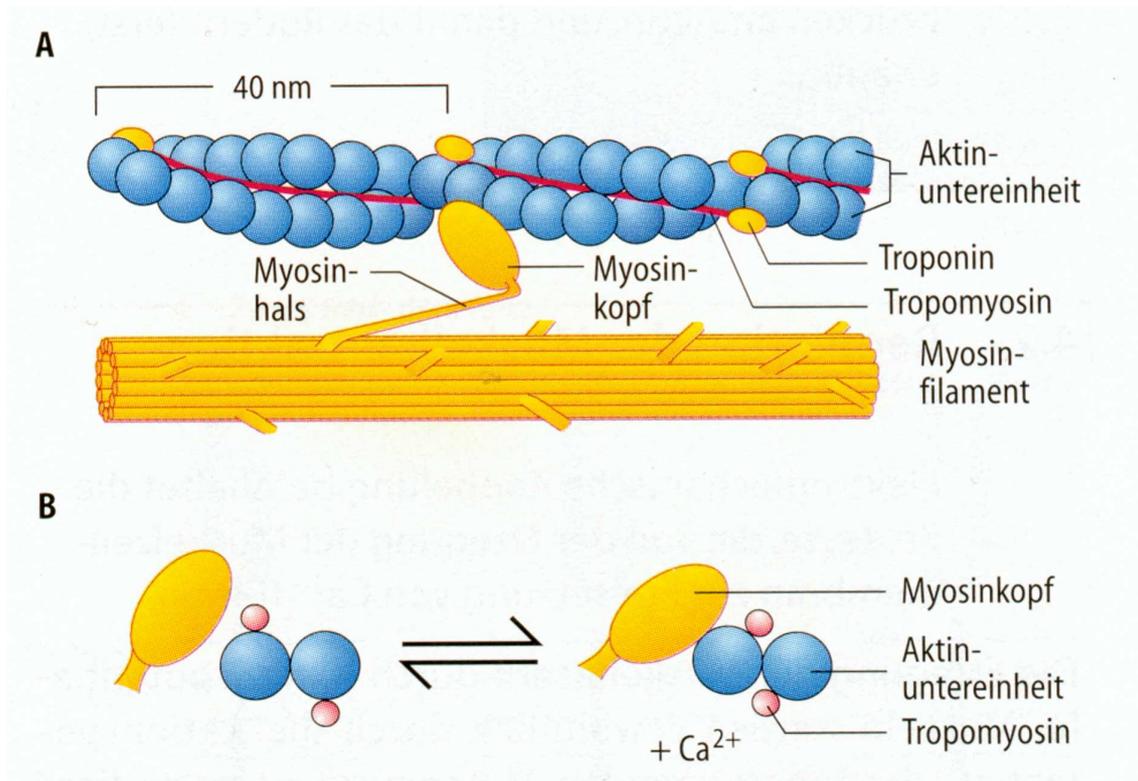


Abbildung 3: F-Aktin und Tropomyosin, Interaktionen mit Myosin, aus J.C. Ruegg. *Muskel in R.F. Schmidt, G. Thews. Physiologie des Menschen (24)*

Die Myosinköpfchen, an deren ATP-Bindungsstelle schon zuvor ein ATP gebunden hat, hydrolysieren das ATP. Durch Freisetzung des Phosphates kommt es zur Ausbildung einer festen Bindung zwischen Aktin und Myosin. Die bei der Hydrolyse freiwerdende chemische Energie wird in Form eines Ruderschlags des Myosinköpfchens in mechanische Arbeit und Wärme umgesetzt. Der Ruderschlag bewirkt ein Ineinandergleiten der dicken und dünnen Filamente und damit eine Verkürzung des Sarkomers. Dieser Querbrückenzyklus wiederholt sich etwa 10-100 mal pro Sekunde je nach Muskelfasertyp. Dadurch und durch das Hintereinanderschalten vieler Sarkomere ergibt sich die tatsächliche Muskelverkürzung.

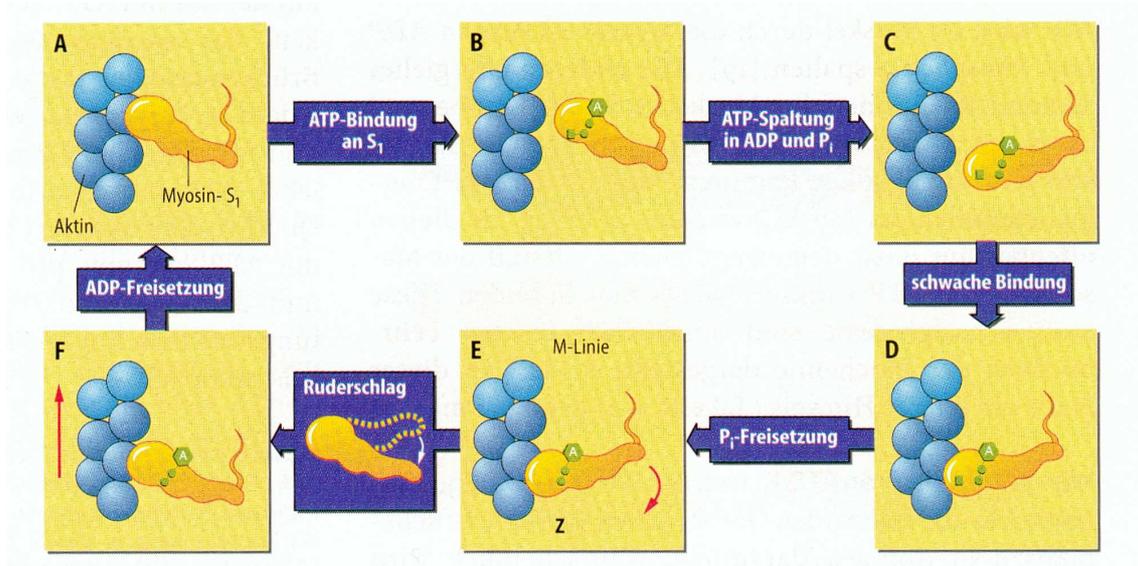


Abbildung 4: Querbrückenzyklus, aus J.C. Ruegg. Muskel in R.F. Schmidt, G. Thews. Physiologie des Menschen (24)

Die Calciumkonzentration im Myoplasma wird durch aktive Wiederaufnahme des Calciums in das SR durch eine Calcium-ATPase auf den Ruhewert abgesenkt.

### 1.8 Der Ryanodinrezeptor 1 (RYR1)

Ryanodinrezeptoren haben ihren Namen von der hohen Affinität für das unphysiologische, pflanzliche Alkaloid Ryanodin. Der RYR1 ist eine der drei Isoformen des Ryanodinrezeptors. Alle drei sind Calciumkanäle und weisen 65-70% homologe Anteile auf (27). Der RYR1 ist die prädominante Isoform im Skelettmuskel, während RYR2 vorwiegend im Herzmuskel nachgewiesen wird. RYR3 kann in vielen Geweben gefunden werden, darunter auch im Skelett- und Herzmuskel. Seine höchste Dichte erreicht er im Gehirn. Die MH sowie die Central Core Disease (CCD) sind mit diversen Mutationen des RYR1 assoziiert. Für die katecholaminerge und die familiäre polymorphe ventrikuläre Tachykardie wie auch für die arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie Typ 2 konnten Mutationen des RYR2 verantwortlich gemacht werden (44). Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen dem malignen Neuroleptika-Syndrom (MNS) und dem RYR3 (33).

Der RYR1 ist ein 2 Millionen Dalton schweres Kanalprotein, das aus vier identischen Untereinheiten besteht, die eine vierblättrige Struktur einnehmen. 90% der Proteinmasse bilden die hydrophile zytoplasmatische Domäne, die den Spalt zwischen T-Tubulus und SR-Membran überspannt. Die C-terminalen hydrophilen Bestandteile der vier Untereinheiten liegen transmembran und bilden die Pore. Das Protein verfügt über Bindungsstellen für aktivierende Liganden wie Calmodulin, ATP, Calcium in mikromolaren Konzentrationen, FKBP (FK506-binding-protein), Koffein und Ryanodin in nanomolaren Konzentrationen sowie für inaktivierende Liganden wie Calcium ( $> 100 \mu\text{M}$ ), Magnesium in millimolaren Konzentrationen, Ryanodin in mikromolaren Konzentrationen und Dantrolen (29).

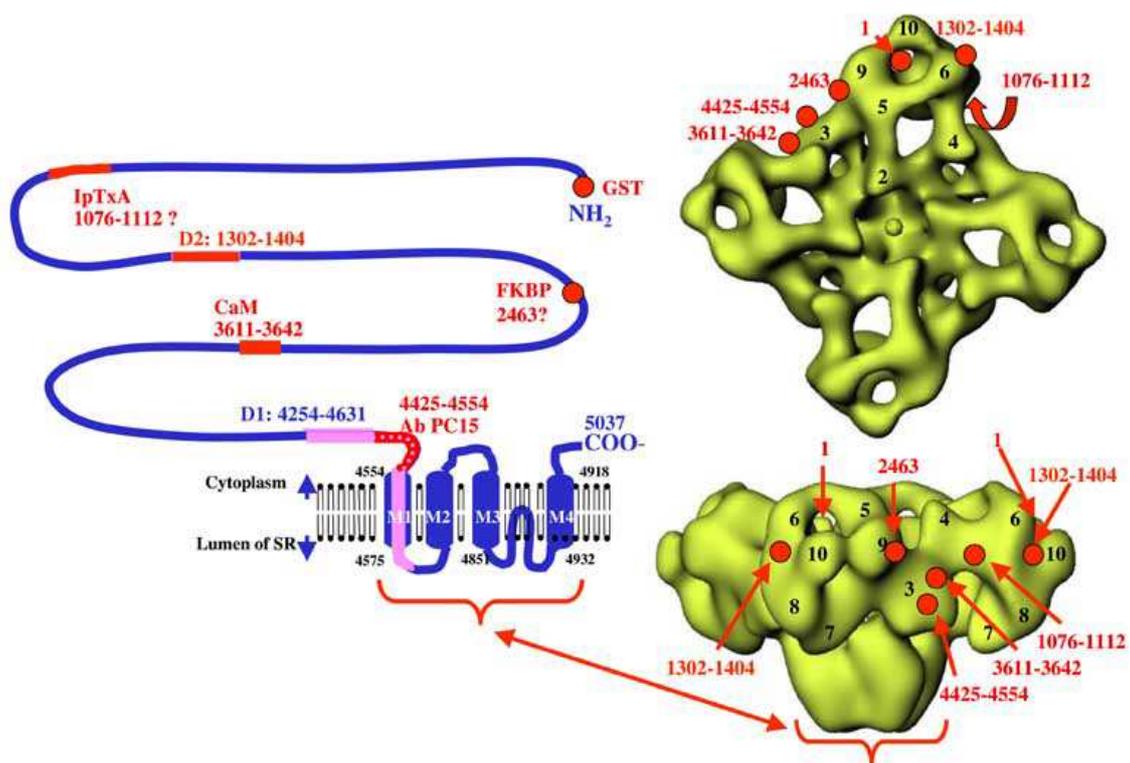


Abbildung 5: RYR1 aus T. Wagenknecht, M. Samsó. Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors (64). Links schematische Rekonstruktion der RYR1-Sequenz aus 4 transmembranen Domänen und einer luminalen Schleife mit spezifischen Ligandenbindungsstellen. Rechts Rekonstruktion gemäss 3D-cryo-Elektronenmikroskopie, oben Ansicht von cytoplasmatisch aus, unten seitliche Ansicht.

Der RYR1 verfügt über drei mit dem DHPR interagierende Regionen. In den Bereichen 1303-1406 (45) und 954-1112 (46) wurden Bindungsstellen für die korrespondierenden Regionen des DHPR identifiziert. Der durch die Depolarisation des Sarkolemmas aktivierte DHPR korrespondiert so mit dem RYR1. Auf diese Weise wird die Calciumfreisetzung aus dem SR durch den RYR1 vermittelt. Ist eine dieser Regionen deletiert, bleibt zwar die Kanalfunktion erhalten, die elektromechanische Kopplung ist aber verloren. Nach erfolgter Signaltransduktion hemmt der RYR1 seinerseits über Interaktion der Stelle 2659-3720 mit dem DHPR diesen retrograd(47).

### **1.9 Der Dihydropyridinrezeptor (DHPR)**

Der DHPR ist ein Calciumkanal vom L-Typ (longlasting), der seinen Namen der Sensitivität für Dihydropyridine zu verdanken hat. Das Protein ist ein Pentamer, das sich aus der  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\delta$ -,  $\beta 1$ - und  $\gamma$ - Untereinheit zusammensetzt. Die  $\alpha 1$ -Untereinheit bestimmt viele wichtige Charakteristika des DHPR wie die Ionenselektivität und enthält den Ionenkanal, Spannungsmesser und Bindungsstellen für exogene und endogene Liganden. Sie ist in vier nahezu homologe Domänen (Repeat I-IV) unterteilt, von denen jede sechs transmembrane  $\alpha$ -Helices (S1-S6) besitzt. Die Repeats sind durch intrazelluläre, S1-S6 durch intra- und extrazelluläre Interlinker verbunden. Die Interlinker S5-S6 bilden den Ionenkanal, S4 enthält positiv geladene Aminosäuren, über die die Depolarisation des Sarkolemmas mittels einer Konformationsänderung vermittelt wird. Die Interlinker II-III und III-IV interagieren mit den oben genannten korrespondierenden Regionen des RYR1 (29).

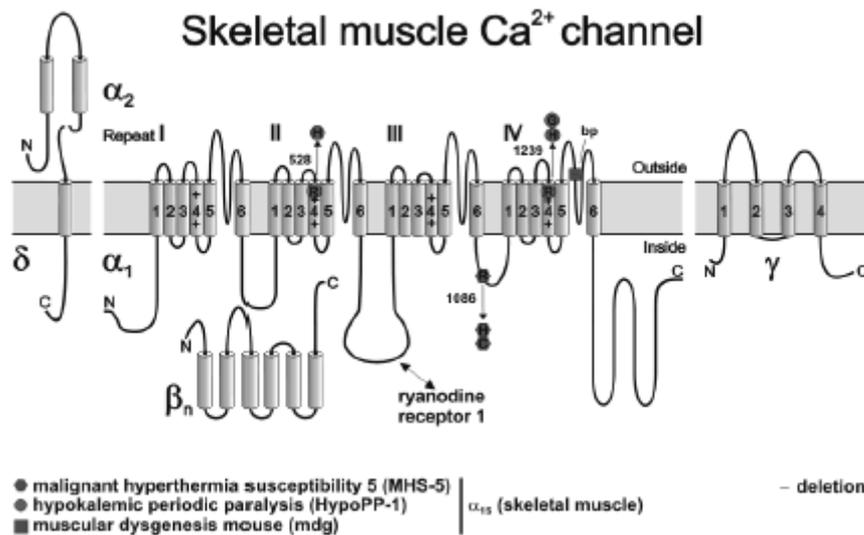


Abbildung 6: DHPR aus K. Jurkatt-Rott, H. Lerche, F. Lehmann-Horn. *Skeletal muscle channelopathies* (57)

### 1.10 Pathophysiologie der MH

Schon vor der Entdeckung des genetischen Zusammenhangs zwischen MH und RYR1 wurde ein Defekt in der Regulation muskulärer Calciumkanäle als Grundlage der unkontrollierten Muskelkontraktion bei Gabe halogenierter Anästhetika oder depolarisierender Muskelrelaxanzien beim MH-Patienten postuliert, weil eine Erhöhung des myoplasmatischen Calciumspiegels sowohl für die Muskelkontraktion verantwortlich ist als auch für die Stimulation der Phosphorylasekinase, die wiederum die Glycolyse aktiviert. Der Rücktransport von Calcium in das SR und die Muskelkontraktion benötigen viel ATP. Das dabei entstehende ADP stimuliert seinerseits die Glycogenolyse und oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien. Diese hypermetabole Antwort führt zu Erschöpfung der ATP-, Glycogen- und Sauerstoffvorräte und zu exzessiver Produktion von Laktat und CO<sub>2</sub>. Als Folge daraus kommt es zu respiratorischer und metabolischer Azidose und zur Zerstörung des Sarkolemmas mit daraus resultierender Hyperkaliämie.

Um diese Defekte genauer zu spezifizieren wurden von mehreren Arbeitsgruppen Experimente mit isolierten SR-Vesikeln und Muskelfasern am Tiermodell oder an Material von normalen Probanden und MH-Patienten durchgeführt. C.F. Louis, E.M. Balog und B.R. Fruen gehen in ihrem Modell von verschiedenen Geschlossen-Zuständen des RYR1 aus (27). Sie unterscheiden den calciumsensitiven und den calciuminsensitiven Zustand. Sie postulieren eine erhöhte Stabilität des calciumsensitiven geschlossenen RYR1 beim MH-Patienten. So gibt das Modell die höhere Rate von Kanälen, die durch Calcium aktiviert werden können, wieder. Dantrolen dagegen soll, in Übereinstimmung mit seinem nicht-kompetitiven Wirkmechanismus, den calciuminsensitiven Zustand stabilisieren. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass der Übergang von insensitivem zu sensitivem Zustand durch Depolarisation, vermittelt durch direkte Protein-Protein-Interaktion vom DHPR auf den RYR1, kontrolliert wird. Anhand dieses Modells wird auch klar, dass Spannung und Calcium nicht unabhängig voneinander agieren, sondern im Rahmen eines Mechanismus, der „spannungsabhängige calciuminduzierte Calciumfreisetzung“ genannt wird. Der RYR1 wird also nicht allein durch eine Depolarisation des transversalen Tubulus kontrolliert, sondern durch ein Zusammenspiel verschiedener Effektoren wie Calcium, Magnesium und im Experiment auch Koffein. Das Modell erklärt auch die Rolle von Calmodulin. Dieses soll die Schwelle für den Übergang vom insensitiven in den sensitiven Zustand senken und somit eine Aktivierung des RYR1 auch bei unterschwelligen intrazellulären Calciumkonzentrationen erlauben. So wird klar, dass nicht nur Mutationen im RYR1-Gen MH verursachen können, sondern auch solche in Genen interagierender Proteine. Bekannt ist bereits eine Mutation im Gen für die  $\alpha$ -Untereinheit des DHPR. Sie liegt in der III-IV-Schleife, die direkt mit dem RYR1 interagiert.

Auch E.M. Balog et al. beschäftigten sich mit der calcium- und magnesiumvermittelten Aktivierung beziehungsweise Hemmung des RYR1 (26). Sie gehen von zwei Kationen-Bindungsstellen im RYR1 aus, einer inhibitorischen I-Site und einer aktivierenden A-Site, die beide sowohl Calcium als auch Magnesium binden können. Sie fanden heraus, dass die Affinität der I-Site für beide Ionen beim MHS-RYR1 nahezu zweifach erniedrigt war im Vergleich zum normalen RYR1. Die A-Site des MHS-RYR1 dagegen zeigte eine 250-fach höhere Affinität für Calcium im Vergleich zu Magnesium, während diese

beim normalen Rezeptor nur etwa 75-fach erhöht ist. Sie schlussfolgerten daraus, dass diese erhöhte Calciumselektivität nicht nur für die höhere Spannungssensitivität des MHS-Muskels, sondern möglicherweise auch für die höhere Sensitivität für Koffein und andere Pharmaka verantwortlich ist.

Bis heute ist es allerdings noch nicht gelungen, den Mechanismus, über den MH-verursachende Mutationen die Funktion des RYR1 beeinflussen, eindeutig zu identifizieren.

### **1.11 Genetik der MH**

Die MH wird autosomal dominant vererbt. Die Penetranz ist unvollständig. Mittels Kopplungsanalysen konnten bislang sechs Genloci in MH-Familien identifiziert werden. Dabei ist der RYR1 (MHS-1 Locus) mit mehr als 50% Anteil das am häufigsten betroffene Gen (39). Einen zweiten großen Hauptlocus gibt es nicht. R. Robinson führte eine Studie durch, die sogar auf einen noch höheren Anteil des RYR1-Gens an der MH hindeutet (30). Von 20 Familien waren neun klar mit dem RYR1 gekoppelt, bei acht war die Kopplung zum RYR1 wegen eines nicht aussagekräftigen LOD-Scores unklar, was vielleicht auf eine Fehldiagnose im IVCT zurückzuführen ist, während bei nur drei Familien eindeutig eine Verbindung ausgeschlossen werden konnte. Falls in den acht Familien mit der unklaren Kopplung tatsächlich eine Verbindung zum RYR1 bestünde, wäre dieser für 85 % der MH-Erkrankungen verantwortlich. Wie bei der Inzidenz gilt auch hier, dass tatsächliche Zahlen unklar bleiben, da bei weitem nicht alle Betroffenen im Laufe ihres Lebens diagnostiziert werden.

#### *1.11.1 Das Ryanodinrezeptor-Gen (MHS-1)*

Das Gen für den RYR1 ist mit 5038 Aminosäuren eines der größten bislang bekannten Gene, codiert durch 106 Exons. Es befindet sich auf Chromosom 19q13.1. Mutationshotspots der MH befinden sich zwischen den Aminosäuren 35 und 614 (Exons 2 bis 17)

sowie 2163 und 2458 (Exons 39 bis 46). Beide liegen im großen cytosolischen N-Terminus des Proteins. Die Nukleotidsequenzen dieser beiden Regionen sind homolog zu denen der Inositoltrisphosphat(IP<sub>3</sub>)-Bindungsstelle des IP<sub>3</sub>-Rezeptors. Dies deutet darauf hin, dass sich in diesen Regionen eine regulatorische Domäne für die ligandenvermittelte Aktivierung des RYR1 befinden könnte. Bislang wurden im RYR1 37 Mutationen identifiziert, von denen vier auch als Verursacher der Central Core Disease (CCD) gelten. Einen Überblick über die bisher beschriebenen Mutationen im RYR1 sowie ihre Verteilung innerhalb des Gens gibt Abbildung 7.

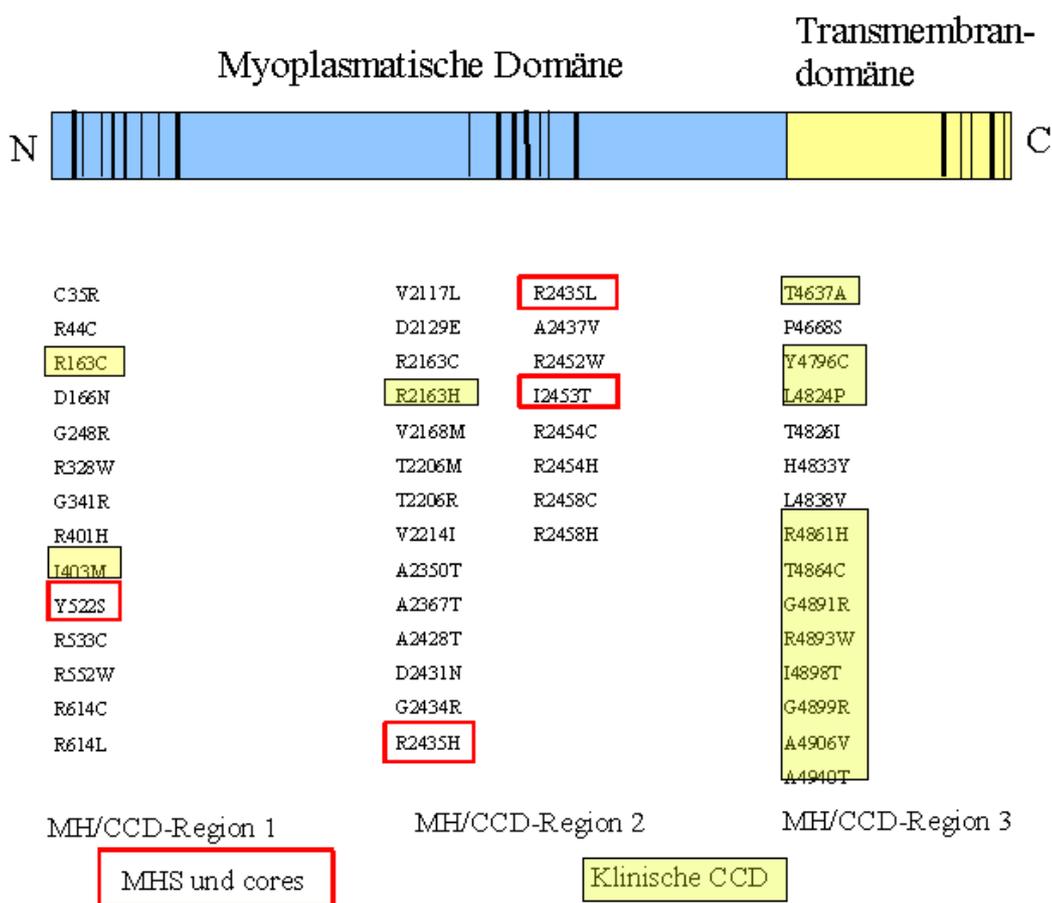


Abbildung 7: Bisher bekannte Mutationen im RYR1, eigene Graphik

### 1.11.2 Andere Gene und Loci für MH

Ein zweiter MH-Locus (MHS-2) wurde von einer amerikanischen Arbeitsgruppe auf Chromosom 17q11.2-q24 lokalisiert und brachte den spannungsabhängigen Natriumka-

nal des Skelettmuskels in den Verdacht, Kandidatengen zu sein (29). Dieses Ergebnis wurde in europäischen Studien nicht bestätigt und es konnte bis heute keine Mutation des Natriumkanals bei MH-Patienten nachgewiesen werden. Man vermutet allerdings, dass Muskelerkrankungen, die durch eine Mutation des oben genannten Gens verursacht sind zu MH-ähnlichen Ereignissen prädisponieren.

Durch gezielte Suche wurde der MHS-3 Locus auf Chromosom 7q21.1 gefunden (48). Dort befindet sich das Gen für die  $\alpha 2/\delta$ -Untereinheit des DHPR. Mit einem LOD-Score von 2,91 ist dieses Gen ein Kandidatengen, wenngleich bisher keine Mutation gefunden werden konnte. Das Gleiche gilt für den MHS-4 Locus auf Chromosom 3q13.1 (49). Hier wurde allerdings noch kein Kandidatengen identifiziert. Im Kandidatengen CACNL1A3 des MHS-5 Locus auf Chromosom 1q32, der für die  $\alpha 1$ -Untereinheit des DHPR codiert, wurden dagegen bereits zwei Mutationen entdeckt (50,51). Diese betreffen dieselbe Aminosäure und liegen im Interlinker III-IV, einer intrazellulären Schleife, die -wie schon oben erwähnt- funktionell mit dem RYR1 verbunden ist. Weiterhin wurde in einer Familie der MHS-6 Locus identifiziert (52). Er liegt auf Chromosom 5p. Ein Kandidatengen ist noch nicht bekannt.

Bedingt durch diese Heterogenität ist die molekulargenetische Untersuchung nicht die Methode der Wahl zur primären Sicherung der Diagnose MH. Diese Rolle kommt dem in-vitro-Kontrakturtest (IVCT) zu. Trotzdem werden MH-Patienten der molekulargenetischen Untersuchung zugeführt. Wird eine Mutation gefunden, können Familienmitglieder auf diese untersucht und ihr MH-Status ohne Durchführung des kostspieligen und invasiven IVC-Tests bestimmt werden. Mehrere Arbeitsgruppen haben nachgewiesen, dass die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen aus IVCT und molekulargenetischer Untersuchung groß genug ist, um eine zuverlässige Diagnose rein anhand der molekulargenetischen Untersuchung zu erlauben (31,32,53). Dennoch empfiehlt die EMHG, Familienangehörige, bei denen keine Mutation gefunden wurde, mit dem IVCT zu untersuchen, um das Risiko falsch negativer Ergebnisse zu minimieren. Außerdem führt sie in ihren Richtlinien die 15 Mutationen auf, für die mittels geeigneter Untersuchungen bewiesen ist, dass sie krankheitsverursachend sind (54). Nur bei diesen sollen positiv getestete Familienangehörige als MHS eingestuft werden.

## **2 Ziel dieser Arbeit**

Die Identifizierung von Mutationen des RYR1-Gens bei MH-Patienten wird durch zwei Faktoren erschwert: die Größe des Gens (106 Exons mit mehr als 15000 kodierenden Nukleotiden) und die Heterogenität der bisher bekannten Mutationen. Daraus ergibt sich die Frage, mit welcher Methode ein Mutationsscreening am besten durchgeführt werden kann. Dabei soll das Augenmerk auf Praktikabilität für große Patientenkollektive, möglichst großer Sensitivität und Spezifität der Methode und Zeitaufwand im Labor liegen. Nicht zuletzt müssen bei der Auswahl auch finanzielle Faktoren eine Rolle spielen.

Des Weiteren sollten in den Familien, bei denen eine Mutation im RYR1 identifiziert werden konnte, auch die Familienmitglieder genetisch untersucht werden. So kann die Übereinstimmung mit den Ergebnissen des vorangegangenen IVC-Tests überprüft und somit die Sicherheit einer reinen genetischen Untersuchung abgeschätzt werden.

Da die Patientenproben aus den MH-Testzentren Würzburg und Wien stammen, kann das Mutationsmuster von zwei Populationen verglichen werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die im Labor zur Erstellung dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Gibco-BRL, Serva, Amersham, United States Biochemical Corporation (USB), Sigma, Roth und Invitrogen bezogen. Für die Agarosegele wurde PeqLab Agarose benutzt. Die Enzyme für Enzymspaltungen stammen von den New England Biolabs, das Pre-Sequenzier-Kit von USB und der DTCS Quick Start Kit von Beckman Coulter. Die eingesetzten Nukleotide lieferte die Firma Invitrogen. Alle Primer wurden bei der MWG- Biotech AG bestellt. Die verwendete Taq DNA- Polymerase wird im Institut für Humangenetik in Würzburg hergestellt.

##### 3.1.2 Geräte

Zentrifugen	Sigma 1 K15 Eppendorf Centrifuge 5415C Qualitron DW-41
Wasserbäder	Lauda MT/2 GFL
Cycler	Biometra Trio-Thermoblock MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-200 Biometra Thermocycler T3 Bio-med Thermocycler 60
Mikrowelle	Siemens
Elektrophorese- Kammern	Gibco BRL life Technologies Model S2 mit Gibco BRL PS 9009 Power Supply Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus Ho- rizon 11•14 mit Gibco BRL ST 305
Heizblock	Liebisch
Sequenziergerät	Beckman Coulter CEQ 8000 mit Genetic Analysis System
Pipetten	Eppendorf Gilson
Magnetrührer	Ikamag RET-GS

Vortex	GLW L46
Waagen	Mettler AE200 Mettler PM4800 Delta Range
Röntgenfilmentwickler	Protec Compact 35
Kontaminationsmonitor	Berthold LB122 Berthold LB1210B
Geltrockner	Bio-RAD Gel Dryer Model 583

### *3.1.3 Sonstige Materialien*

Röntgenfilme	Retina X- ray
Pipettenspitzen	Greiner Abimed
Reaktionsgefäße	Eppendorf

### *3.1.4 Untersuchungsmaterial*

Das für das Mutationsscreening notwendige Patientenmaterial wurde von den MH-Testlabors der Kliniken für Anästhesiologie in Würzburg und Wien in Form von EDTA- Blut an das Institut für Humangenetik Würzburg geschickt, und die daraus isolierte genomische DNA für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Bei den Patienten aus Würzburg waren bereits im Vorfeld dieser Arbeit einige Mutationen des RYR1-Gens (C487T, G1021A, C1840T und G7300A) untersucht worden. Träger einer dieser Mutationen wurden hier nicht erneut analysiert.

## **3.2 Methoden**

### *3.2.1 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)*

#### *3.2.1.1 Grundlagen*

Die PCR ist eine 1984 von Kary Mullis beschriebene Methode zur in vitro- Amplifizierung von Nucleinsäure- Fragmenten. Mit Hilfe von 15-25 Basen langen Oligonucleotiden (Primern), die der Sequenz des gewünschten Fragments am 5`-Ende der beiden durch Denaturierung der genomischen DNA gewonnenen Einzelstränge komplementär



### 3.2.1.2 Primer und PCR- Bedingungen

Die Reaktionsbedingungen und Sequenzen der für das Screening verwendeten Primer für die Exons 39, 40, 45 und 46 des RYR1 sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

<b>Primer</b>	<b>Primersequenz (forward/ reverse)</b>	<b>Annealing- Temperatur</b>
<b>Exon 39</b>	5`-ctccaagccttgcatgtctcc-3` 5`-taccaaggggatatgcaaagtaagg-3`	65°C
<b>Exon 40</b>	5`-tgtcacagtgggtggctatgg-3` 5`-gggccctcaccttgac-3`	64°C
<b>Exon 45</b>	5`-tgcctcccaaccaccaccttc-3` 5`-tgcctgccctccctccatcctg-3`	68°C
<b>Exon 46</b>	5`-actccccagtaatccaagc-3` 5`-catcactccttcgccaagt-3`	59°C/ 57°C

Die Dauer der Denaturierungs-, Annealings- und Extensionsschritte beträgt für alle Exons jeweils 30 Sekunden. Dieser Zyklus wird 30 mal wiederholt. Für Exon 46 wird wegen des Unterschieds in der Annealing- Temperatur der beiden Primer ein Vierschrittprogramm benutzt, das statt einem zwei aufeinanderfolgende Annealingschritte hat.

### 3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Um den Erfolg der PCR zu kontrollieren bedient man sich der elektrophoretischen Auftrennung von DNA- Stücken in plattenförmigen Agarosegelen. Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, das im Gel netzähnliche Strukturen bildet, durch die DNA- Fragmente bei Anlegen von Spannung mit ihrer Größe entsprechender Geschwindigkeit wandern. Die Auflösung ist um so feiner je höher der Agaroseanteil ist. Für die hier untersuchten Exons wurden 1,7%ige Agarosegele aus Agarose und 1x TAE Puffer gekocht. Derselbe Puffer dient als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer. Um die DNA- Banden später unter dem UV- Transilluminator sichtbar zu machen wird dem Gel außerdem noch Ethidiumbromid, ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt. Nach dem Gießen in einen abgedichteten Gelschlitten wird in das noch flüssige Gel ein Kamm eingesetzt. Dieser wird nach dem Erkalten gezogen, und in die so entstandenen Kammern werden die mit Stop- Puffer vermischten Proben pipettiert. Der Strom wird so

angelegt, dass die DNA bei etwa 130 Volt in Richtung der positiv geladenen Elektrode durch das Gel läuft.

50x TAE- Puffer	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M NaEDTA ad 1000 ml aqua dest.
-----------------	--

10x Stop- Puffer	0,1% Bromphenolblau 0,1 M NaEDTA 50% Sucrose
------------------	--

### 3.2.3 Sequenzierung von PCR- Produkten

#### 3.2.3.1 Verdau mit dem Pre- Sequenzung- Kit

Das PCR- Produkt wird vor der eigentlichen Sequenzierreaktion mit den Enzymen Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) und Exonuklease I (ExoI) verdaut. Die SAP dephosphoriliert die PCR-Fragmente am 5`-Ende, um, die Sequenzierreaktion störende Interferenzen zu vermeiden, während die ExoI einzelsträngige DNA und Rest-Primer beseitigt. Die Enzyme benötigen keinen eigenen Puffer, sondern sind im PCR- Puffer aktiv. Der Verdau geschieht bei 37°C innerhalb von 15 Minuten. Anschließend werden die Enzyme durch 15minütiges Erhitzen auf 80°C inaktiviert.

Verdau	2 µl PCR Produkt 0,5 µl SAP 0,5 µl ExoI 8 µl aqua dest.
--------	--

Direkt vor der Weiterverarbeitung folgt dann noch ein 2- minütiger Denaturierungsschritt bei 96°C, nach dem die Proben sofort auf Eis gestellt werden um zu verhindern, dass die gerade getrennten Einzelstränge sich wieder aneinander lagern.

### 3.2.3.2 Sequenzierung mit dem Quick Start Kit

Aus der so vorbehandelte Probe, den Sequenzierprimern und dem DTCS Quick-Start-Mix wird nun ein Sequenzieransatz hergestellt. In den meisten Fällen können für die Sequenzierung die gleichen Primer benutzt werden wie für die PCR. Es wird allerdings zu diesem Zweck eine Verdünnung von 1,6 pmol/μl hergestellt. Sollten in der PCR zusätzliche schwache Banden auftreten, die durch unspezifisches Binden der Primer entstehen, müssen für die Sequenzierreaktion nested- Primer erstellt werden, die im Bezug auf die PCR- Primer um einige Basen Richtung Exonanfang beziehungsweise –ende versetzt sind. Dies war nötig für Exon 45:

<b>Nested-Primer</b>	<b>Primersequenz (forward/ reverse)</b>	<b>Annealingtemperatur</b>
<b>Exon 45</b>	5`-caccaccttcctgc-3` 5`-ctggctcagggtctcatgc-3`	49°C/ 60°C

Im DTCS-Mix sind vierfarbig fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide, Desoxynukleotide, Reaktionspuffer und DNA- Polymerase enthalten. Pro Probe werden zwei Ansätze hergestellt, die entweder mit dem forward- oder dem reverse- Primer versetzt werden.

Sequenzieransatz	4 μl DTCS- Mix
	8 μl aqua dest.
	2 μl forward- oder reverse- Primer (1,6 pmol/μl)
	3 μl vorbehandelte Probe

Diese Proben durchlaufen nun eine der PCR ähnlich Reaktion aus 30 Zyklen mit folgenden Schritten:

• Denaturierung	20 Sekunden	98°C
• Annealing	20 Sekunden	Primerspezifische Annealing- Temperatur
• Extension	4 Minuten	60°C

Bevor die Proben sequenziert werden können muss die Reaktion gestoppt, das Produkt mit Ethanol gefällt und in 30 μl Sample Loading Solution aufgenommen werden. Zum

Sichtbarmachen des Pellets nach der Zentrifugierung wird der Stopplösung Glycogen zugesetzt.

Stopplösung pro Probe	2 µl 3 M NaOAc
	2 µl 100 mM EDTA
	0,8 µl Glycogen (20 mg/ml)

Nun können die fertigen Proben auf eine 96- Well- Platte aufgetragen, mit Öl überschichtet, und die automatische Sequenzierung gestartet werden.

### 3.2.3.3 Prinzip der automatischen Sequenzierung

Während der oben beschriebenen PCR-ähnlichen Reaktion ruft der Einbau von Dideoxynukleotiden in die wachsende Polypeptidkette einen Kettenabbruch hervor, da keine freie 3'-OH- Gruppe für die Polymerisierung mehr vorhanden ist. So entstehen aus dem PCR-Produkt einzelsträngige Fragmente ganz verschiedener Länge, deren 3'- Ende jeweils durch ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid gebildet wird. Diese Fragmente werden nun im automatischen Sequenzer in einer gelgefüllten Kapillare von 100 µm Durchmesser elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Mittels eines Laserfluorometers kann nun die Fluoreszenz der einzelnen Bruchstücke vermessen werden. Die aus der Position des Fragmentes in der Kapillare und seiner Farbe am 3'- Ende gewonnenen Daten werden vom Computer ausgewertet und als vierfarbige Peaks wiedergegeben, anhand derer die Sequenz des gewünschten Fragmentes abgelesen werden kann.

### 3.2.4 Single- stranded conformation polymorphism (SSCP)

#### 3.2.4.1 Grundlagen

Eine einfachere Technik, die auch bei der Suche nach Mutationen angewandt wird ist das SSCP. Sie beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten einzelsträngiger DNA in nicht denaturierenden Gelen auf Grund ihrer Sekundärstruktur, die durch Paarung von Basen innerhalb des DNA- Einzelstrangs zustande kommt. Schon Punktmutationen können so zu einer Änderung der Konformation führen und damit zu einem abweichenden Laufverhalten im Polyacrylamidgel. Um die Banden sichtbar zu machen, wird

in der vorangehenden PCR radioaktiv markiertes dCTP in das zu amplifizierende Fragment eingebaut. Wenn das Gel nun nach der Elektrophorese auf einen Röntgenfilm aufgelegt wird, wird durch die Stellen auf dem Gel, an denen DNA vorhanden ist der Film geschwärzt, und es entsteht ein fragmenttypisches Bandenmuster mit abweichenden Banden im Falle, dass Proben mit Mutationen auf dem Gel vorhanden sind.

#### 3.2.4.2 SSCP- Gele

Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, werden Polyacrylamidgele (PAA) mit und ohne Zusatz von Glycerol verwendet. Glycerol reagiert mit Bor- Ionen, wodurch der pH-Wert des Puffers gesenkt wird. Man nimmt an, dass dies der Grund für die bessere Auftrennung normaler und mutierter Fragmente der mit Glycerol versetzten Gele ist.

+ Glycerol-PAA- Gel	3,5 ml Glycerol 10,5 ml 40% PAA 7,0 ml 5x TBE- Puffer 49 ml aqua dest.
---------------------	---

- Glycerol- PAA- Gel	10,5 ml 40% PAA 7,0 ml 5x TBE- Puffer 52,5 ml aqua dest.
----------------------	--

5x TBE- Puffer	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 0,002 M NaEDTA ad 5000 ml aqua dest.
----------------	---

Vor dem Gießen wird der Mischung jeweils noch 160 µl 40% Ammoniumpersulfat und 60 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugesetzt, die gemeinsam zur Polymerisierung führen. Das Gel wird zwischen zwei, durch zwei dünne Spacer getrennte, silanisierte Glasplatten gegossen. Zwei Haifischzahnkämme werden mit den Zähnen vom Gel abgewandt oben in die Gele eingelegt. Nach dem Polymerisieren werden die Gele vor dem Probenauftrag eine Stunde bei 4°C gekühlt. Auch die Elektrophorese muss in einem bei 4°C gehaltenen Raum erfolgen. Dort werden die Gele nun in die Elektropho-

resekammern eingespannt, in die auch der Laufpuffer, gekühlter 0,5x TBE- Puffer, eingefüllt wird. Nun werden die vor dem Einsetzen gezogenen Kämme mit den Zähnen nach unten in die Gele eingesetzt, so dass Taschen entstehen, in die dann die Proben eingefüllt werden.

#### 3.2.4.3 Probenvorbereitung

Die Reaktion zur Amplifizierung des zu untersuchenden Fragments entspricht weitestgehend der PCR. Es werden die oben beschriebenen Primer und Bedingungen angewandt. Der einzige Unterschied besteht darin, dass in der Nukleotidstammlösung weniger dCTP (4 µl statt 12 µl) verwendet wird. Stattdessen werden jedem Ansatz 0,2 µl [ $\alpha$  P<sup>32</sup>] radioaktiv markiertes dCTP (541 µCi) zugesetzt. Außerdem werden die Proben mit Paraffinöl überschichtet um das Verdunsten von radioaktiver Probe zu vermeiden. Nach der PCR werden je 3 µl PCR- Produkt mit 9 µl in einer Mikrotiterplatte vorgelegtem SSCP- Stoppuffer vermischt.

SSCP-Stoppuffer	550 µl PAA- Stoppuffer 450 µl aqua dest.
-----------------	---

PAA- Stoppuffer	0,5% Bromphenolblau 0,5% Cyanol 95% Formamid 5 mM NaOH
-----------------	---

Die Mikrotiterplatte wird für 6 Minuten auf einen 100°C heißen Heizblock gelegt, wodurch die Proben denaturiert werden. Danach kommt die Platte sofort auf Eis, um das Wiederaneinanderlagern der Einzelstränge zu verhindern. Die so behandelten Proben können nun auf das wie oben beschrieben vorbereitete Gel aufgetragen werden. Dazu werden von jeder Probe jeweils 4 µl in eine Tasche der beiden Gele gefüllt. Die Elektrophorese läuft bei 25 W. Die Dauer ist abhängig von der Größe des zu untersuchenden Fragments.

#### *3.2.4.4 Vorbereitung zur Auswertung*

Nach der Elektrophorese wird das Gel wieder aus der Kammer genommen, und der Puffer entsorgt. Die obere Glasplatte wird vorsichtig abgehoben, und ein Whatmann- Papier auf das Gel aufgelegt. Das Gel haftet nun mit einer Seite auf dem Papier, die andere Seite wird mit Folie bedeckt. Nun kann das Gel für 20 Minuten bei 80°C unter Vakuum getrocknet werden. Das trockene Gel wird über Nacht auf einen Röntgenfilm aufgelegt und anschließend entwickelt. Sollte der Film zu wenig oder zu stark geschwärzt sein, kann ein weiterer Film für eine im Vergleich zum ersten Film längere oder kürzere Zeit aufgelegt werden. Nun kann anhand des Bandenmusters abgelesen werden, ob bei den untersuchten Patienten Mutationen im untersuchten Fragment vorliegen.

#### *3.2.5 Restriktionsenzymverdau*

##### *3.2.5.1 Grundlagen*

Eine weiter einfache Methode zum Nachweis von Mutationen ist der Restriktionsenzymverdau. Er kommt dann zum Einsatz, wenn die zu untersuchende Mutation in der Erkennungsregion eines Enzymes liegt, das dann dort nicht mehr schneiden kann, oder wenn eine zusätzliche Spaltstelle für ein Enzym entsteht. Im ersten Fall zeichnen sich von der Mutation Betroffene dadurch aus, dass ihr Produkt im Agarosegel statt zweier nur eine Bande hat, im zweiten Fall dadurch, dass zwei oder bei heterozygotem Vorliegen der Mutation drei Banden nachzuweisen sind, während nicht- Betroffene nur eine Bande aufweisen.

##### *3.2.5.2 Anwendung*

Nachdem das zu untersuchende Fragmente mit Hilfe der PCR amplifiziert, und im Agarosegel der Erfolg der Reaktion kontrolliert worden ist, wird das PCR- Produkt mit dem Enzym und dem geeigneten 10x Restriktionspuffer verdaut. Es wird soviel Puffer eingesetzt, dass der Ansatz als 1x Puffer vorliegt.

Ansatz für Restriktionsenzymverdau	15 µl PCR- Produkt 1 µl Enzym (10 U) 2 µl 10x Restriktionspuffer ad 20 µl aqua dest.
------------------------------------	---

Dieser Ansatz wird für 30 Minuten bei der für das Enzym optimalen Temperatur im Wasserbad inkubiert, mit 0,5 µl Enzym nachgespalten und für weitere 15 Minuten inkubiert. Anschließend wird das Spaltungsprodukt auf ein höherprozentiges Agarosegel (2,5%-3%) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis kann unter dem UV-Transilluminator betrachtet werden.

Für diese Arbeit wurden zwei Enzyme verwendet:

<b>Enzym</b>	<b>Erkennungssequenz und Schnittstelle</b>	<b>Reaktionstemperatur</b>
<b>Dde I</b>	C/TNAG	37°C
<b>Bst U1</b>	CG/CG	60°C

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gefundene Mutationen im RYR1

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Mutationsscreening im RYR1 durchgeführt. Die mit 106 Exons beachtliche Größe des Gens legt für das Screening eine Konzentration auf bisher gefundene Hotspot-Regionen nahe. Es wurden dementsprechend die Exons 39 und 40 sowie 45 und 46 untersucht. In diesen Regionen sind bislang acht beziehungsweise zehn Mutationen von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert worden. 134 DNA-Proben von Patienten aus 95 Familien, darunter 38 von MHE-getesteten Personen aus dem Testzentrum Würzburg sowie 56 Proben von Patienten aus 31 Familien aus Wien wurden in diesen beiden Regionen unter Anwendung der Methode SSCP untersucht. Bei einem auffälligen oder zweifelhaften SSCP-Ergebnis folgte eine automatische Sequenzierung, an Hand derer der genaue Mutationsort festgestellt werden konnte. Für ein Exon erfolgte zum Zwecke des Methodenvergleichs ein Screening aller Patienten neben dem SSCP auch mit automatischer Sequenzierung.

Im Folgenden werden die gefundenen Mutationen unter Angabe ihrer Häufigkeit einzeln aufgelistet, eine Darstellung des Ergebnisses der automatischen Sequenzierung zur Verdeutlichung angeführt und, sofern vorhanden, Stammbäume der betroffenen Familien hinzugefügt, wobei der Indexpatient jeder Familie mit einem Pfeil gekennzeichnet ist, bei erfolgtem IVCT das Ergebnis angegeben wird sowie das Ergebnis der genetischen Untersuchung. Als betroffen (schwarz ausgefülltes Symbol) werden Patienten markiert, die entweder im IVCT als MHS eingestuft worden sind oder bei denen eine MH-verursachende Mutation nachgewiesen wurde oder beides.

#### 4.1.1 Mutation G6377A (R2126Q)

Im Rahmen der Untersuchung wurde die Mutation G6377A in Exon 39 als einzige neue Mutation in einer Würzburger Familie identifiziert. Sie bewirkt einen Aminosäureaus-

tausch von Arginin an der Stelle 2126 durch Glutamin. Mutationsträger sind der Indexpatient (WZ 812) sowie zwei Tanten (WZ 844 und WZ 850). Die Mutationshäufigkeit, bezogen auf die Würzburger Gruppe beträgt 1,05% sowie 0,79% für alle untersuchten Familien. Bemerkenswert ist weiterhin, dass nur der Indexpatient im IVCT als MHS klassifiziert wurde, während seine beiden Angehörigen nur bei Halothan pathologische Ergebnisse zeigten und somit als MHE<sub>n</sub> gelten.

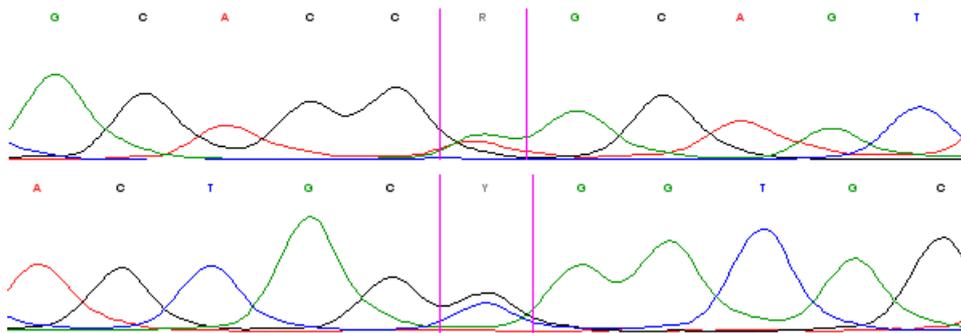
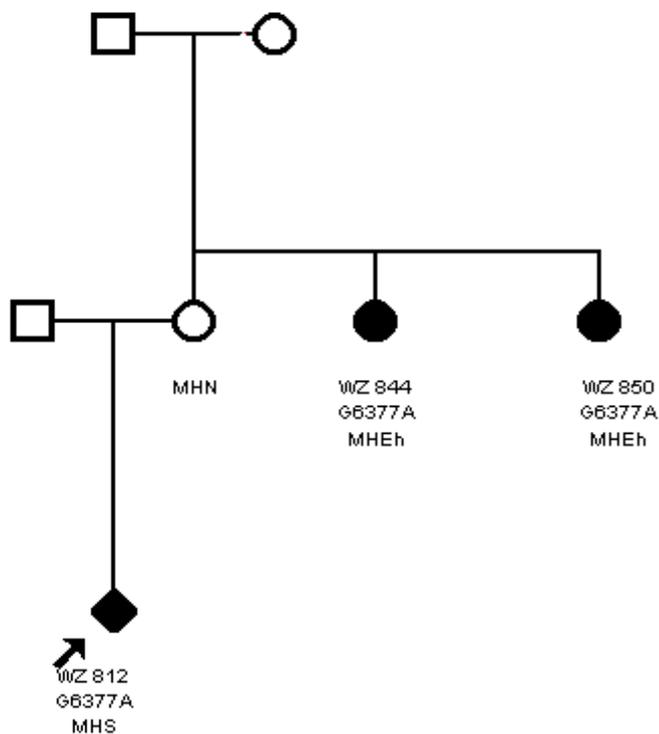


Abbildung 8: Mutation G6377A (R2126Q) forward/reverse



Stammbaum 1: Familie mit neuer Mutation

#### 4.1.2 Mutation C6487T (R2163C)

Beim Patienten WI 1105 der Wiener Gruppe fand sich die Mutation C6487T, die zu einem Austausch von Arginin durch Cystein an der Stelle 2163 des RYR1-Proteins führt. Dieselbe genetische Veränderung weist auch das Familienmitglied WI 1090 auf. In der Würzburger Gruppe kommt diese Mutation nicht vor. Die Mutationshäufigkeit beträgt damit in beiden Gruppen 0,79%, in der Wiener Gruppe 3,23%. Erstbeschreiber der Mutation ist Manning et al. 1998 (58).

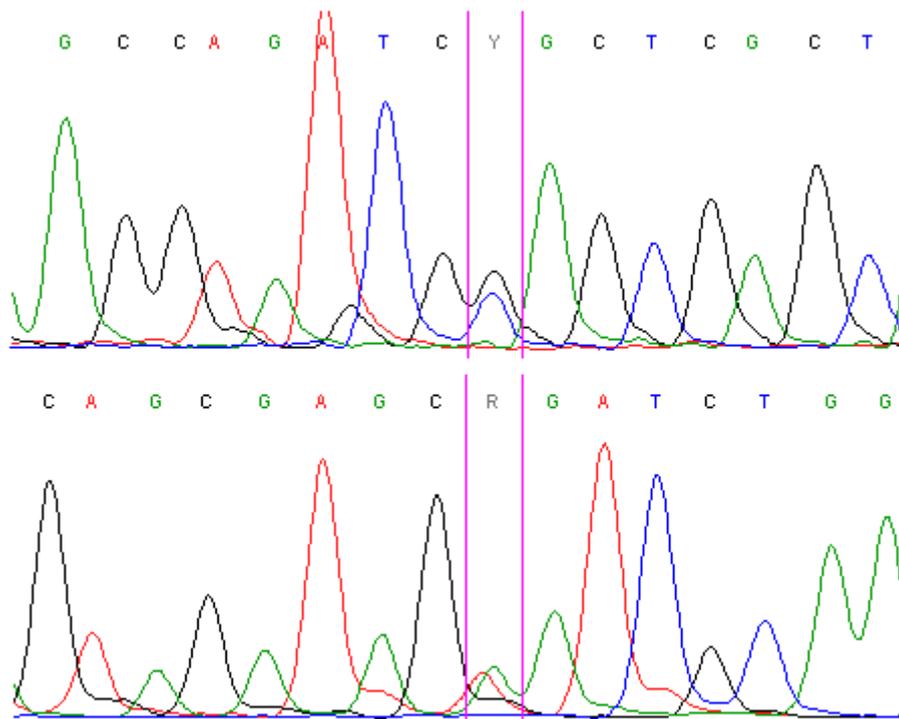


Abbildung 9: Mutation C6487T (2163C) forward/reverse

#### 4.1.3 Mutation G6488A (R2163H)

Die Mutation G6488A mit Aminosäureaustausch von Arginin nach Histidin an der Stelle 2163 kam bei einem Patienten (WZ 799) aus der Würzburger Gruppe vor. Familienmitglieder sind bislang noch nicht untersucht worden. Die Mutationshäufigkeit in der

Würzburger Gruppe beträgt 1,05%, in beiden Gruppen 0,79%. Die Mutation wurde ebenfalls von Manning et al. 1998 (58) erstmals beschrieben.

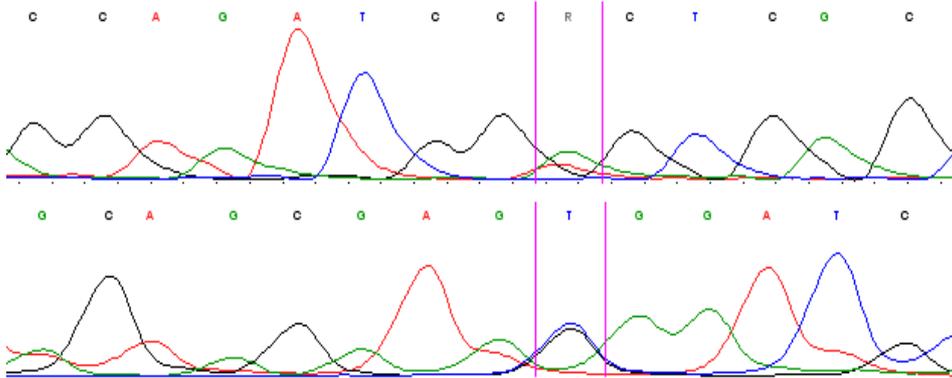


Abbildung 10: Mutation G648A (R2163H) forward/reverse

#### 4.1.4 Mutation G6502A (V2168M)

Wiederum ausschließlich in der Wiener Gruppe kommt die Mutation C6502A mit Ersatz des Valin an Stelle 2168 durch Methionin bei Patient WI 965 sowie dem Familienmitglied WI 945 vor. Die Mutationshäufigkeiten betragen 0,79% in beiden Gruppen beziehungsweise 3,23% in der Wiener Gruppe. Auch bei dieser Mutation waren Manning et al. 1998 (58) Erstbeschreiber.

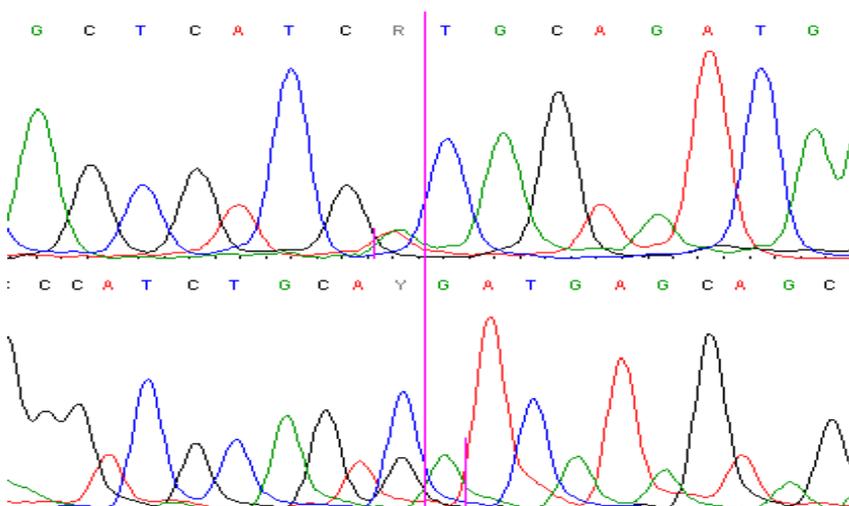


Abbildung 11: Mutation G6502A (V2168M) forward/reverse

#### 4.1.5 Mutation C6617T (T2206M)

Die Mutation C6617T in Exon 40 mit Ersatz eines Threonins durch ein Methionin war in der Würzburger Gruppe am häufigsten vertreten, während in der Wiener Gruppe kein Patient Träger dieses Austausches ist. Insgesamt sieben Indexpatienten sind betroffen, die alle im IVCT als MHS getestet wurden. Die Mutationshäufigkeit bezogen auf die Würzburger Gruppe beträgt also 7,34%, für alle Familien liegt sie bei 5,56%. Erstbeschreiber dieses Basenaustausches war wiederum Manning et al. 1998 (58).

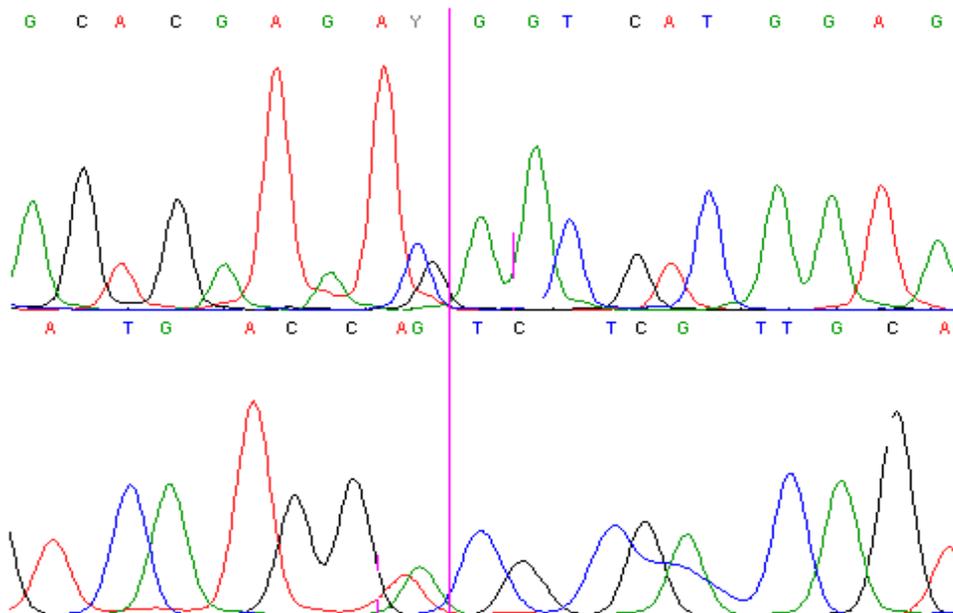
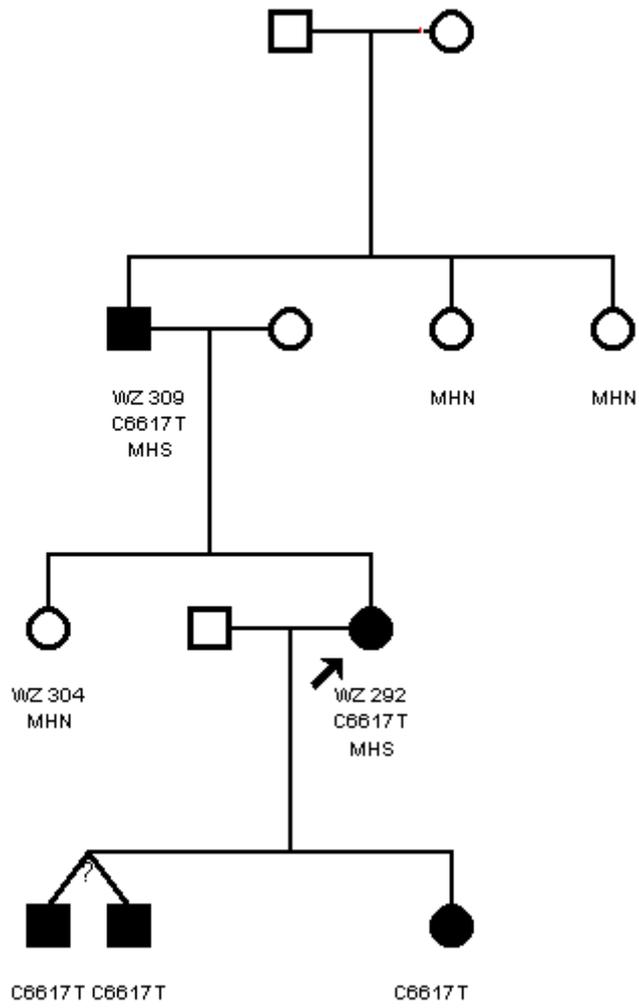


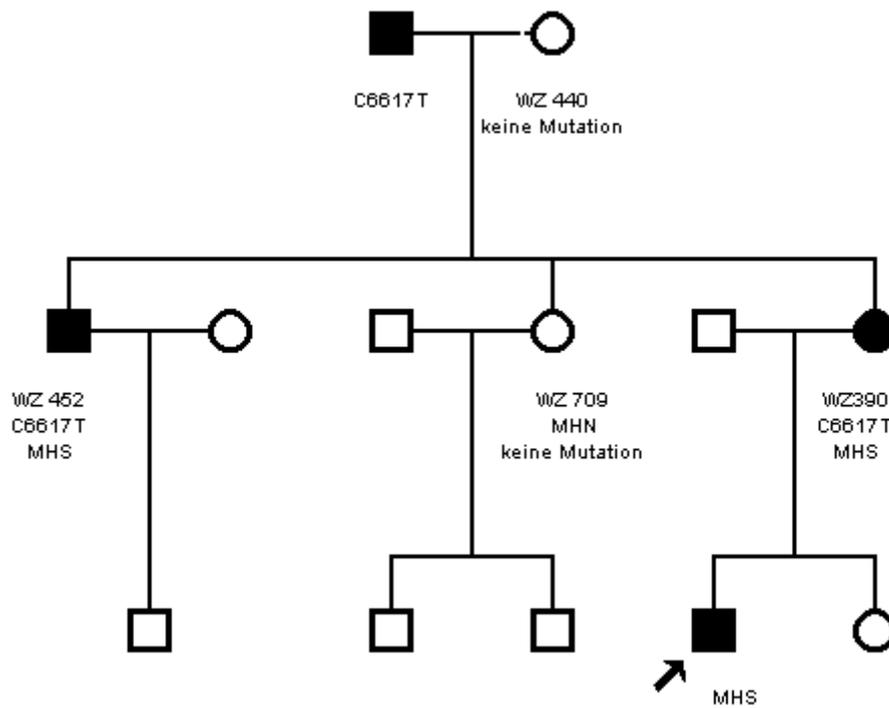
Abbildung 12: Mutation C6617T (T2206) forward/reverse

Die Mutation wurde bei der Patientin WZ 292 sowie bei ihren drei Kindern und ihrem Vater, WZ 309 gefunden. Die Schwester der Patientin ist gesund.



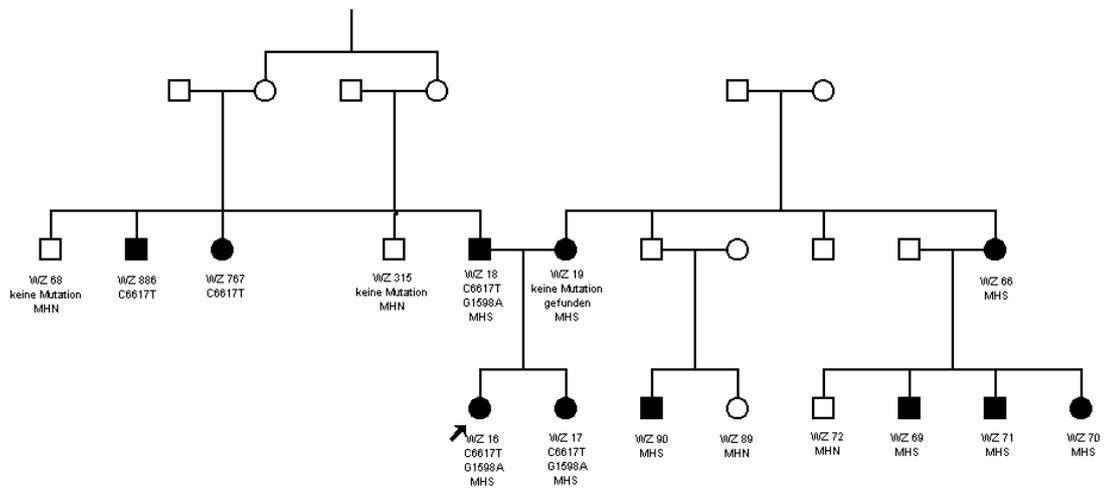
*Stammbaum 2: MH-Familie WZ 77*

Patientin WZ 390 ist die Mutter eines Indexpatienten. Die Mutation stammt von ihrer väterlichen Seite. Auch ein Bruder ist betroffen.



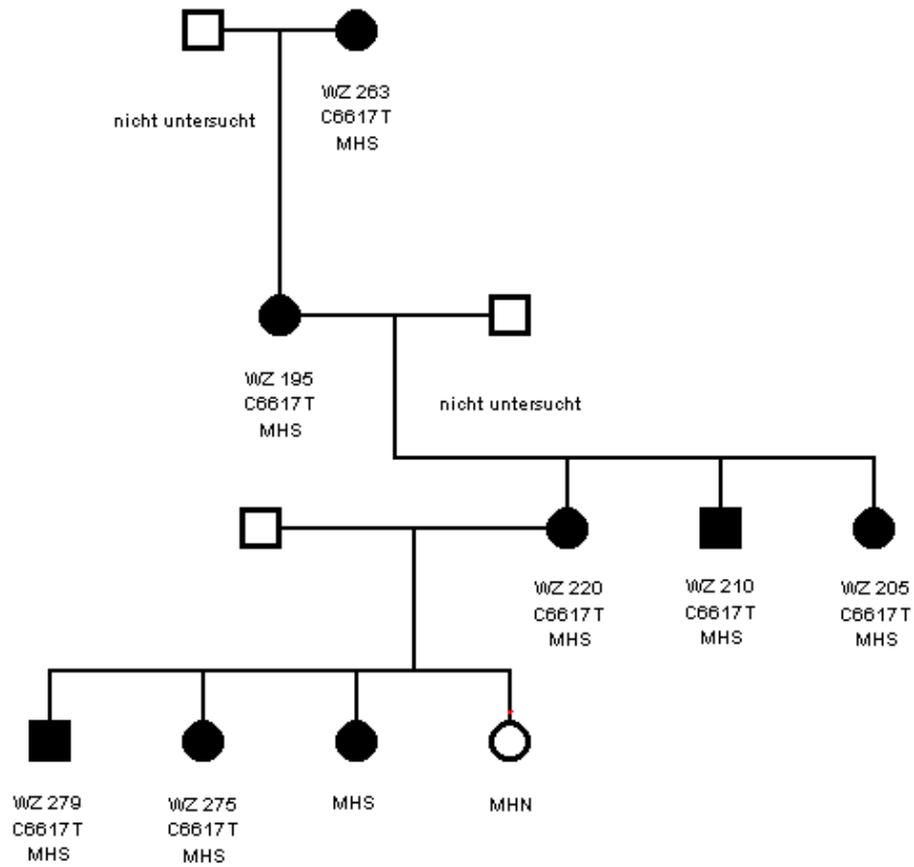
Stammbaum 3: MH Familie WZ 102

Patient WZ 16 stammt aus einer Familie, in der zwei Mutationen vorkommen. Von der väterlichen Seite werden die Mutationen T2206M und R533H vererbt, mütterlicherseits besteht auch die Disposition zur MH, was bisher jedoch nur durch den IVCT bestätigt werden konnte. Eine Mutation wurde bislang in diesem Zweig der Familie nicht identifiziert. Außer WZ 16 sind noch die Familienmitglieder WZ 18, Vater der Indexpatientin, WZ 17, die Schwester, WZ 767, eine Tante sowie ein Onkel, WZ 886, von der Mutation T2206M betroffen. Alle anderen untersuchten Mitglieder sind nicht Mutationsträger.

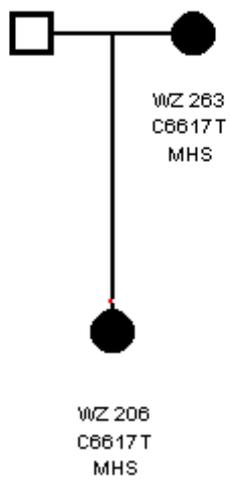


Stammbaum 4: MH-Familie WZ 1

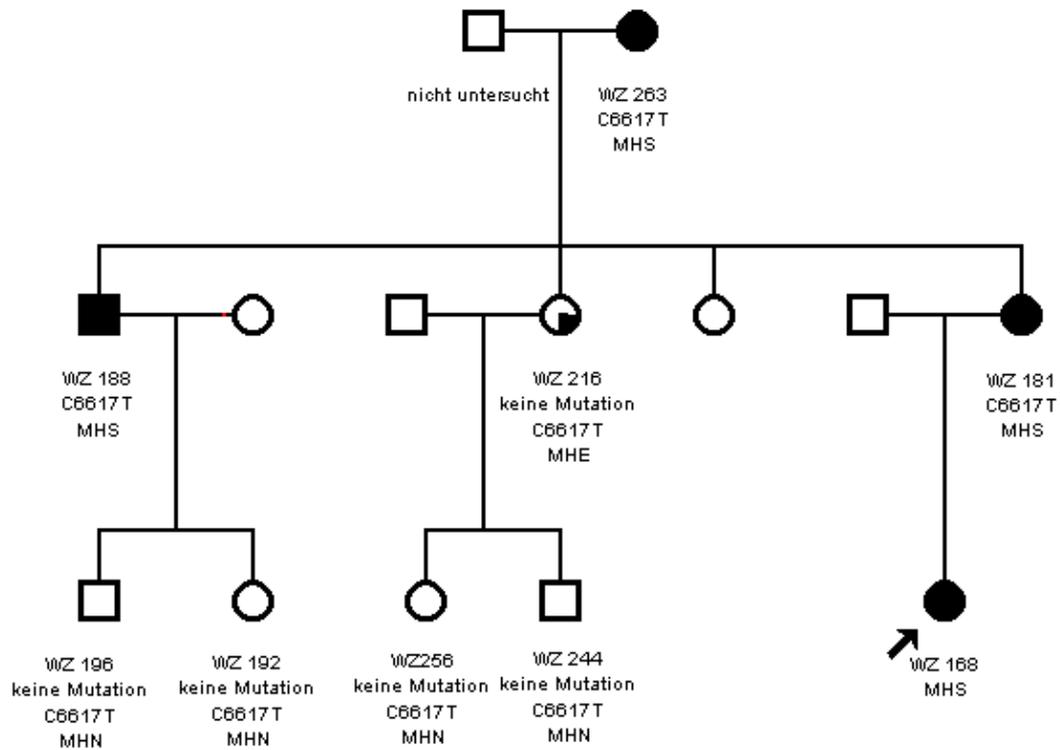
In einer weiteren großen Familie wurde die Mutation T2206M von der Patientin WZ 263 auf Kinder ihrer drei Ehen weitervererbt. Auf der Seite ihrer Geschwister kommt die Veranlagung zur MH nicht vor. Es wurden insgesamt 23 Familienmitglieder untersucht, von denen acht Mutationsträger sind. Die als MHE geltende Patientin WZ 216 ist nicht Trägerin der Mutation.



Stammbaum 5: MH-Familie WZ 31, Ehe 1 WZ 263

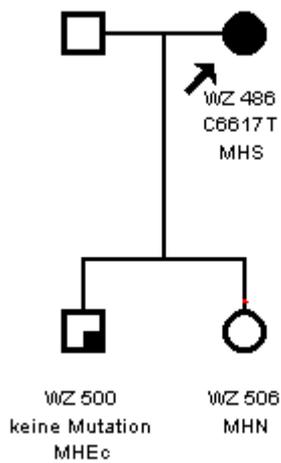


Stammbaum 6: MH-Familie WZ 31, Ehe 2 WZ 263



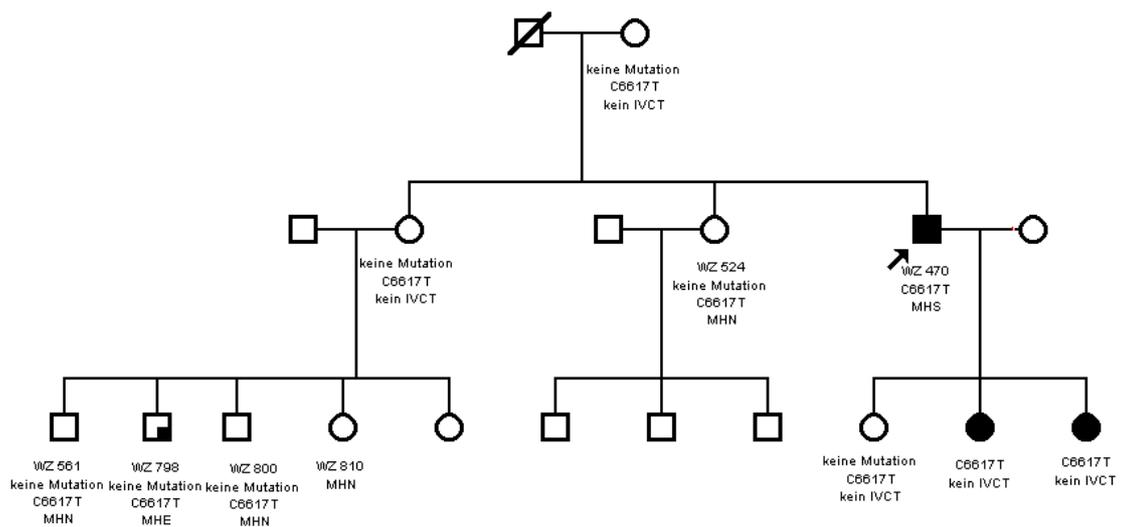
Stammbaum 7: MH-Familie 31, Ehe 3 WZ 263

In ihrer Familie ist die Patientin WZ 486 neben ihrem Sohn bislang die einzige, die auf die Mutation T2206M untersucht wurde. Sie ist bei bekannter klinischer MH-Disposition Mutationsträgerin. Ihr Sohn dagegen, dessen Muskel im IVCT eine pathologische Reaktion auf Koffein zeigte und damit als  $MHE_c$  anzusehen ist, ist nicht Merkmalsträger.



Stammbaum 8: MH-Familie WZ 123

In einer weiteren großen MH-Familie mit der Mutation T2206M wurden bislang nur wenige Mitglieder untersucht. Mutationsträger sind der Indexpatient WZ 470 und zwei seiner drei Kinder. Seine beiden Schwestern sind gesund. Ein im IVCT als MHE getesteter Neffe ist wie seine Mutter und Geschwister nicht Mutationsträger. Auch die Mutter des Indexpatienten ist nicht Merkmalsträgerin. Die Mutation muss also von der väterlichen Seite stammen.



Stammbaum 9: MH-Familie WZ 121

#### 4.1.6 Mutation C6617G (T2206R)

Im Codon 2206 der zuletzt aufgeführten Mutation kann das Cytosin auch durch ein Guanin ersetzt werden. Dies führt dann zu einem Aminosäureaustausch von Threonin nach Arginin. Diese Mutation war mit nur einem Träger deutlich seltener als die zuvor beschriebene. Die Mutationshäufigkeit beträgt für die Würzburger Gruppe 1,05%, für alle untersuchten Familien 0,83%. Gefunden wurde die Veränderung bei Patient WZ 418. Außer diesem ist noch kein Familienmitglied untersucht worden. Veröffentlicht wurde die Mutation 1999 von Brandt (59).

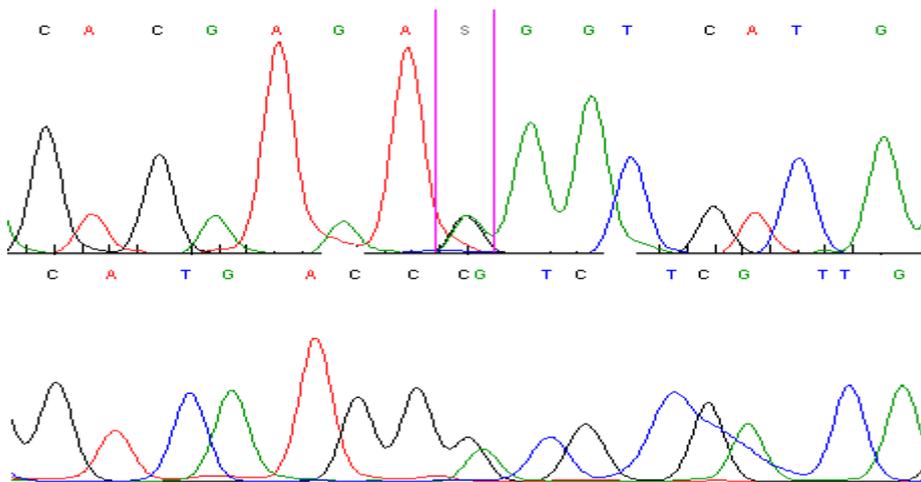
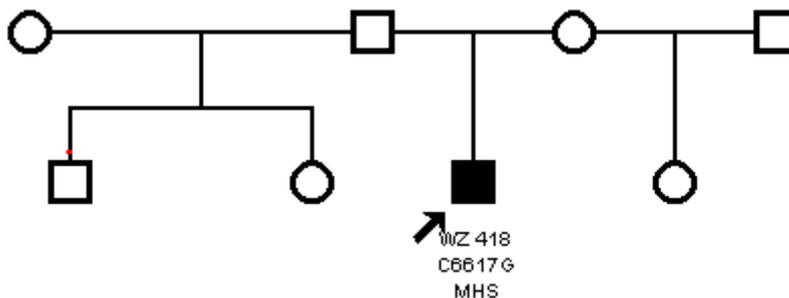


Abbildung 13: Mutation C6617G(T2206) forward/reverse



Stammbaum 10: MH-Familie WZ 109

#### 4.1.7 Mutation G7282A (A2428T)

Bei einem Patienten (WZ 126) der Würzburger Gruppe fand sich die Mutation G7282A in Exon 45, die einen Austausch von Alanin durch Threonin an Stelle 2428 des Proteins nach sich zieht. Diese Mutation wurde von Rueffert et al. erst 2002 (32) zum ersten Mal beschrieben. Die Mutationshäufigkeit beträgt somit 1,05% für die Würzburger beziehungsweise 0,79% für alle Familien.

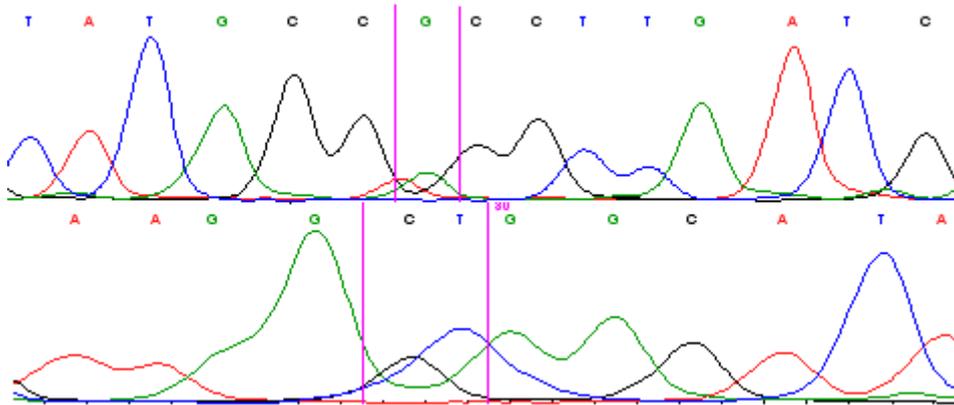
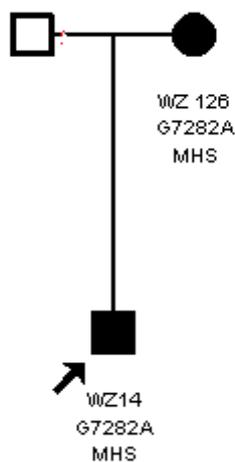


Abbildung 14: Mutation G7282A (A2428T) forward/reverse

Die Patientin ist Mutter eines Indexpatienten und hat die Veranlagung an ihren Sohn vererbt.



Stammbaum11: MH-Familie 34

#### 4.1.8 Mutation G7300A (G2434R)

In Exon 45 trat weiterhin die Mutation G7300A mit Austausch eines Glycins durch ein Arginin an Stelle 2434 bei einer Würzburger und einer Wiener Familie auf. Die Mutationshäufigkeit beträgt damit in der Würzburger Gruppe 1,05%, in der Wiener Gruppe 3,23% sowie 1,59% für alle Familien. Erstbeschreiber der Mutation waren Keating et al. 1996 (60). Da bereits aus Voruntersuchungen bekannt war, dass die Mutation G7300A eine in Deutschland häufig vorkommende Mutation ist, wurde eine Screeninguntersuchung auf diese Mutation bereits im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt. Das erklärt die relativ geringe Häufigkeit der neu gefundenen Mutationsträger in dieser Untersuchung.

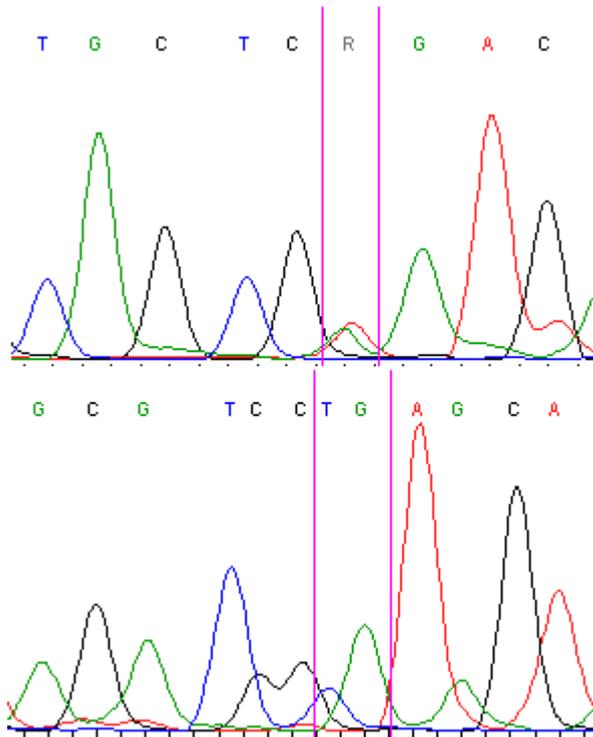
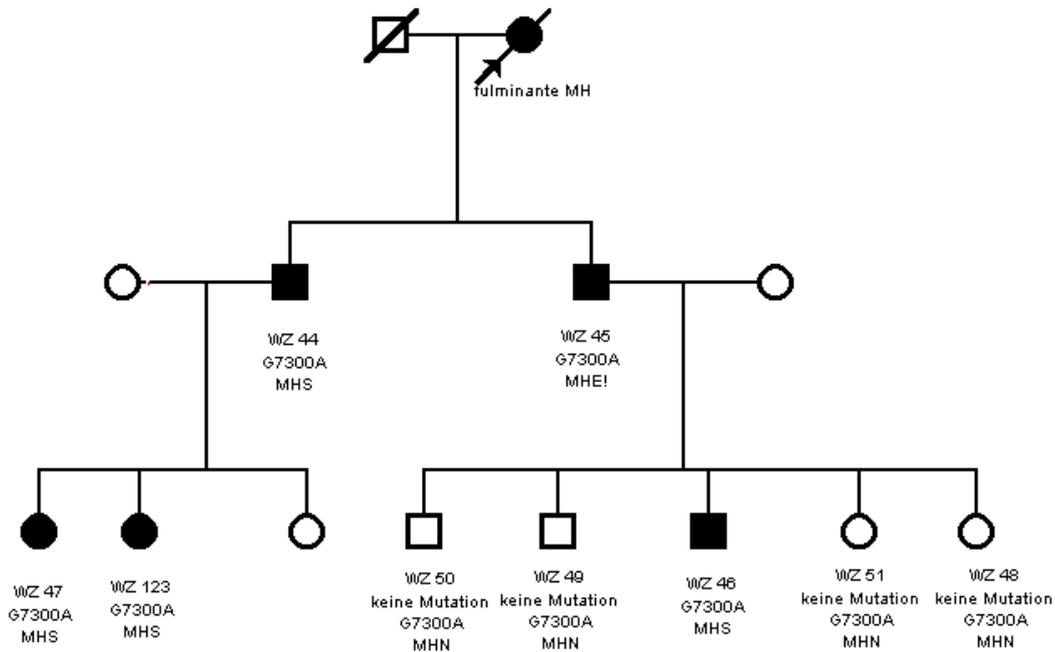


Abbildung 15: Mutation G7300A (G2434R) forward/reverse

In der Würzburger Gruppe betrifft die Mutation die MH-Familie 2, aus der im Screening zuerst der Patient WZ 44 untersucht wurde. Er ist Sohn einer bereits verstorbenen Indexpatientin. Sein Bruder (WZ 45), der auch Mutationsträger ist, wurde im IVCT als

MHE diagnostiziert wurde. Weiterhin wurden noch die Enkelkinder untersucht, von denen drei die Disposition für die MH geerbt haben.



Stammbaum 12: MH-Familie WZ 2

In der Wiener Familie stand die DNA von zwei Familienangehörigen (WI 1044 und WI 931) zur Verfügung, die auch beide Mutationsträger sind.

Des Weiteren wurden Mitglieder dreier MH-Familien untersucht, bei denen die Mutation G7300A bereits bekannt war. Diese kann nämlich durch ein mutations-spezifisches Screening auch mittels Restriktionsenzymverdau detektiert werden. Durch die Mutation entsteht eine Schnittstelle für das Enzym *Dde* I. Heterozygot betroffene Personen weisen dann im Agarosegel zwei Banden auf (die dritte kurze Bande läuft im Gel mit den Primerresten und ist nicht zu identifizieren), Gesunde dagegen nur eine. In einer der genannten Familien kam diese Methode zusätzlich zur Sequenzierung zur Anwendung, um das bei einem Familienmitglied (WZ 753) der Familie WZ 74 gefundene seltene homozygote Auftreten der Mutation mit einer zweiten Methode zu belegen. Es ist anzunehmen, dass dem Patienten die Mutation nicht nur von mütterlicher sondern auch

von väterlicher Seite vererbt wurde. Es stand jedoch bislang kein Material des Vaters zur genetischen Untersuchung zur Verfügung um diese Vermutung zu bestätigen.

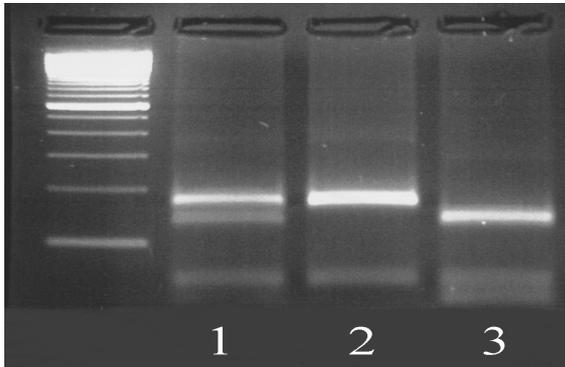
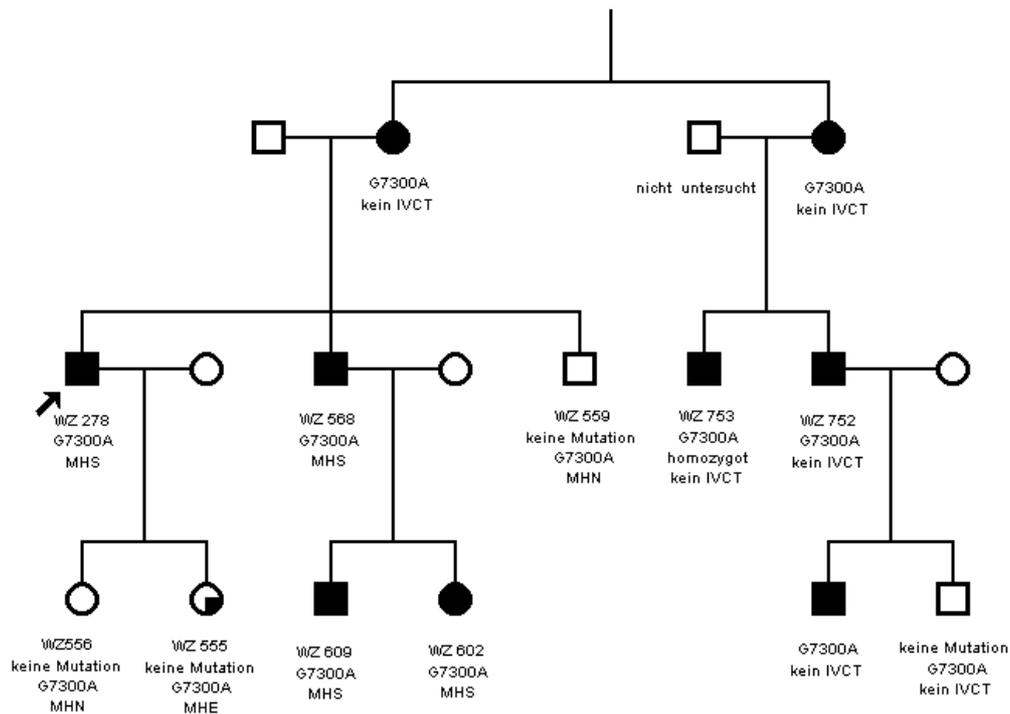


Abbildung 16: Dde I-Spaltung im Agarosegel; 1: Positivkontrolle für Mutation G7300A, zwei Banden; 2: Negativkontrolle ohne Spaltstelle für Enzym, eine Bande; 3: WZ 753 mit zwei mutierten Allelen mit Spaltstellen für das Enzym, eine Bande.



Stammbaum 13: MH-Familie WZ 74

#### 4.1.9 Mutation G7361A (R2454H)

Bei zwei Wiener Familien trat die Mutation G7361A mit Austausch des Arginins an Stelle 2454 durch ein Histidin auf. In der Würzburger Gruppe kam sie dagegen nicht vor. Die Mutationshäufigkeiten betragen für die Wiener beziehungsweise alle Familien 6,45% und 1,59%. Erstbeschreiber der Mutation war Barone et al. 1999 (60).

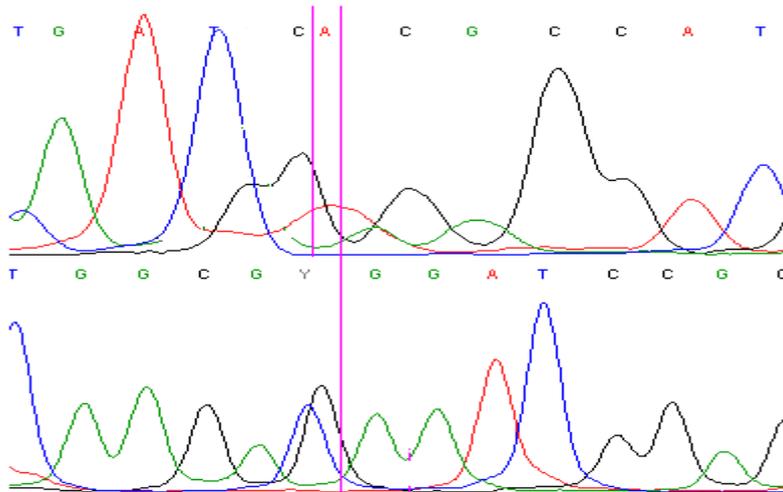


Abbildung 17: G7361A (R2454H) forward/reverse

Von einer der beiden Familien lagen vier Patienten-DNAs vor, von denen zwei (WI 909 und WI 912) bei der Sequenzierung den Basenaustausch aufwiesen. Da der MH-Status aus dem IVCT initial für alle vier Familienmitglieder als MHS angenommen wurde, was mit dem Sequenzierergebnis nicht übereinstimmte, wurde dieses mit einem Restriktionsenzymverdau verglichen. Im Falle der Mutation geht eine Schnittstelle für das Enzym *Bst* UI verloren. Man kann betroffene Patienten also im Agarosegel anhand der in der ursprünglichen Größe des PCR-Produktes erhaltenen Bande erkennen. Der Restriktionsenzymverdau stimmt mit dem Ergebnis der automatischen Sequenzierung überein. Es kann als sicher angenommen werden, dass die Familienmitglieder WI 1007 und WI 925 nicht Träger des Basenaustausches sind. Wie sich später herausstellte entspricht das doch auch den Ergebnissen des IVCT, da beide Personen MHN getestet worden waren.

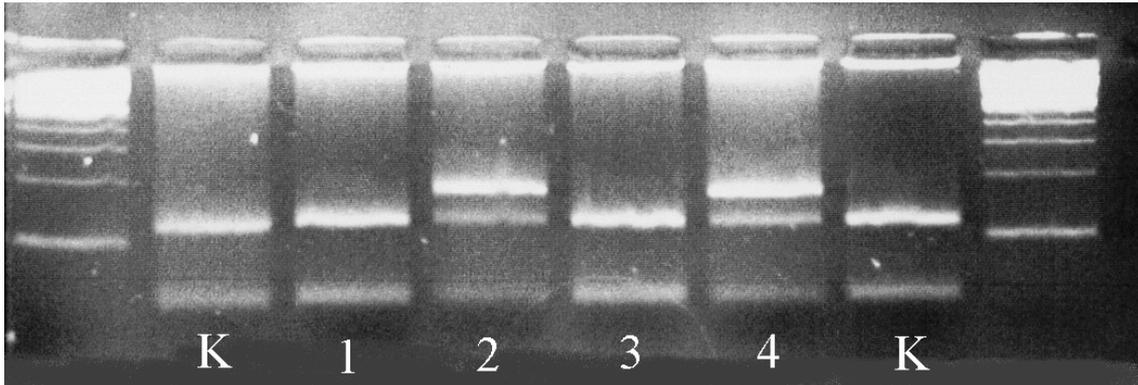


Abbildung 18: *Bst* UI-Spaltung im Agarosegel; K: Negativkontrollen ohne das Vorliegen der Mutation, eine Bande; 1: WI 1007, kein Vorliegen der Mutation; 2: WI 909, G7361A, zwei Banden; 3: WI 925, kein Vorliegen der Mutation; 4 WI 912, G7361A. (auch hier bei 2 und 4 dritte kurze Bande mit Primerresten)

In der anderen Wiener Familie sind beide Mitglieder (WI 890 und WI 946), von denen Untersuchungsmaterial vorlag, Träger der Mutation.

#### 4.1.10 Mutation C7372T (R2458C)

Ebenfalls in Exon 46 befindet sich die Mutation C7372T, die den Austausch des Arginins an Stelle 2458 durch ein Cystein bewirkt. Sie wurde bei einem Würzburger Patienten gefunden. Die Mutationshäufigkeiten betragen damit 1,05% in der Würzburger Gruppe respektive 0,79% für alle Familien. Die Mutation wurde 1998 von Manning et al. beschrieben (62).

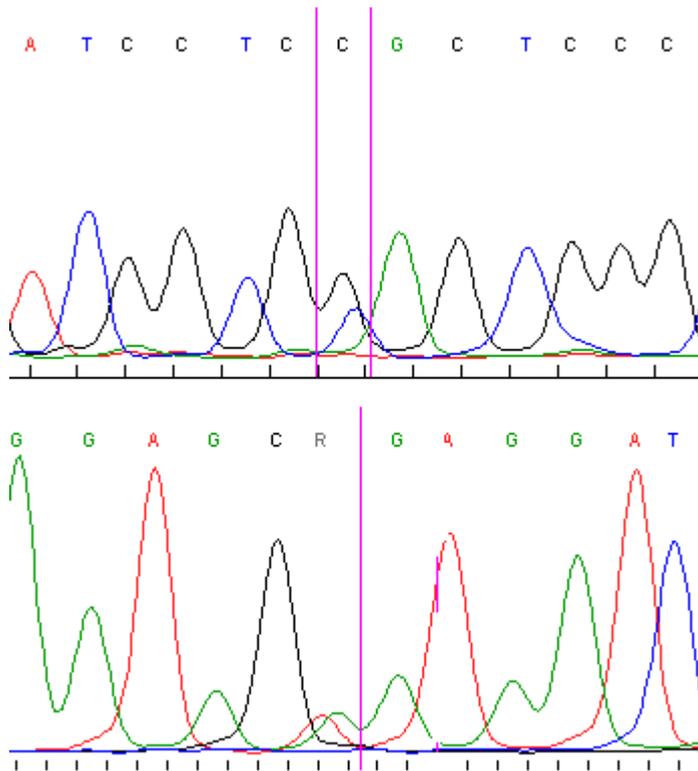


Abbildung 19: Mutation C7372T (R2458C) forward/reverse

#### 4.2 Polymorphismus C7260T

In Exon 45 kam bei 12 von allen 134 (8,96%) untersuchten Würzburger Patienten-DNAs ein Polymorphismus an der Stelle 7260 vor. Die Aminosäuresequenz ist davon nicht betroffen, da sowohl CAC als auch CAT für Histidin codieren. In der Wiener Gruppe trat der Polymorphismus dagegen nicht auf.

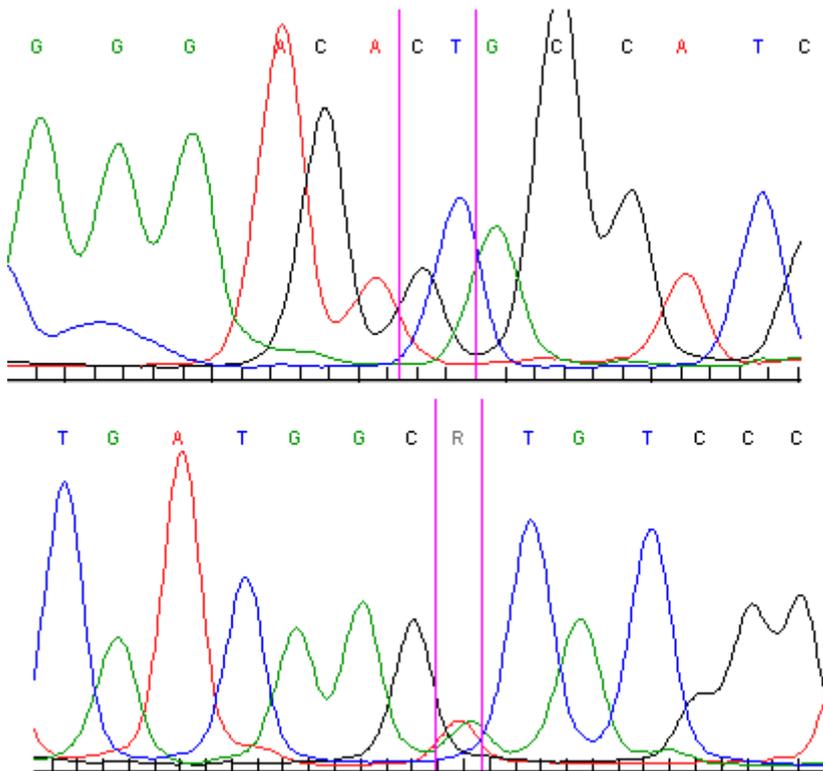


Abbildung 20: Polymorphismus C7260T forward/reverse

### 4.3 Zusammenfassung

Es wurden insgesamt 126 Familien untersucht, davon stammen 95 aus dem Würzburger und 31 aus dem Wiener Testzentrum. Eine Mutation konnte in 18 MH-Familien identifiziert werden. Von diesen gehören 13 der Würzburger Gruppe und fünf der Wiener Gruppe an. Die Gesamtdetektionsrate liegt somit bei 14,29%. Für das Würzburger Kollektiv ergibt sich eine Detektionsrate von 13,68% während sie im Wiener Kollektiv bei 16,13% liegt.

Die Verteilung der einzelnen Mutationshäufigkeiten soll in der folgenden Übersicht tabellarisch zusammengefasst werden.

<b>Exon</b>	<b>Mutation</b>		<b>Häufigkeit in MH-Familien</b>	
	Nukleotidaustausch	Aminosäurenaustausch	Würzburg	Wien
Exon 39	G6377A	R2126Q	1/95 (1,05%)	0/31 (0%)
	C6487T	R2163C	0/95 (0%)	1/31 (3,23%)
	G6488A	R2163H	1/95 (1,05%)	0/31 (0%)
	G6502A	V2168M	0/95 (0%)	1/31 (3,23%)
Exon 40	C6617T	T2206M	7/95 (7,34%)	0/31 (0%)
	C6617G	T2206R	1/95 (1,05%)	0/31 (0%)
Exon 45	G7282A	A2428T	1/95 (1,05%)	0/31 (0%)
	G7300A	G2434R	1/95 (1,05%)	1/31 (3,23%)
Exon 46	G7361A	R2454H	0/95 (0%)	2/31 (6,45%)
	C7372T	R2458C	1/95 (1,05%)	0/31 (0%)

*Tabelle 1: Überblick über in dieser Arbeit gefundene Mutationen und ihre Häufigkeiten*

## 5 Diskussion

Bei einem Mutationsscreening der Exons 39, 40, 45 und 46 des RYR1-Gens mit der SSCP-Methode konnte unter 190 MHS-Patienten aus 126 Familien in 18 Fällen eine Mutation gefunden werden. Das entspricht einer Detektionsrate von 14,29%. Die Patientenproben stammten aus zwei MH-Testzentren, Würzburg und Wien. Die Mutationsprävalenzen waren in beiden Gruppen erstaunlich unterschiedlich (vgl. Tab. 1).

### 5.1 Vergleich der Mutationshäufigkeiten

In einer Studie aus dem Jahr 2001 stellen Girard et al. (63) die in ihrer Schweizer Patientengruppe gefundenen Mutationen den Ergebnissen anderer Autoren gegenüber. Diese Auflistung soll hier tabellarisch wiedergegeben und um die, aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse sowie einige Ergebnisse anderer Autoren erweitert werden.

<b>Nukleotidaustausch</b>	<b>Inzidenz</b>	<b>Population</b>	<b>Referenz</b>
<b>G6377A</b>	1,05%	MHS Würzburg	Diese Arbeit
<b>C6487T</b>	3,23%	MHS Wien	Diese Arbeit
	4%		Manning et al. 1998 (58)
	1%	Deutsche MHS	Brandt et al.1999 (59)
<b>C6488A</b>	1,05%	MHS Würzburg	Diese Arbeit
	1 Familie		Manning et al.1998 (58)
<b>G6502A</b>	3,23%	MHS Wien	Diese Arbeit
	7%	Schweizer MHS	Manning et al.1998 (58)
	1%	Deutsche MHS	Brandt et al. 1999 (59)
	27%	Schweizer MHS	Girard et al.2001 (63)
<b>C6617T</b>	7,34%	MHS Würzburg	Diese Arbeit
	1 Familie		Manning et al.1998 (58)
	3%		Brandt et al 1999 (59)

<b>C6617G</b>	1,05%	MHS Würzburg	Diese Arbeit
	1%	Deutsche MHS	Brandt et al.1999 (59)
<b>G7282A</b>	1,05%	MHS Würzburg	Diese Arbeit
<b>G7300A</b>	1,05%	MHS Würzburg	Diese Arbeit
	3,23%	MHS Wien	Diese Arbeit
	4%		Keating et al.1994 (60)
	1,7%	Italienische MHS	Barone et al.1999 (61)
	7%	Deutsche MHS	Brandt et al. 1999 (59)
	4%	Schweizer MHS	Girard et al. 2001 (63)
<b>G7361A</b>	6,45%	MHS Wien	Diese Arbeit
<b>G7372T</b>	1,05%	MHS Würzburg	Diese Arbeit
	4%		Manning et al.1998 (62)
	1,7%	Italienische MHS	Barone et al.1999 (59)
	2%	Schweizer MHS	Girard et al.2001 (63)

*Tabelle 2: Vergleich der Mutationshäufigkeiten im RYR1 bei MH*

Es zeigt sich, dass sich die Mutationshäufigkeiten innerhalb der beiden in dieser Arbeit untersuchten Kollektive stark unterscheiden und auch von den Ergebnissen anderer Autoren abweichen. Dies mag zum einen durch tatsächliche ethnische Unterschiede bedingt sein, zum andern lassen sich Art und Umfang der Screeningmethoden der einzelnen Studien nicht ohne weiteres miteinander vergleichen. Die wahren Mutationsprävalenzen wären nur nach einer vollständigen Untersuchung des gesamten RYR1-Gens zu ermitteln, die bisher noch in keiner Studie erfolgt ist.

Auffällig ist die große Häufigkeit der Mutation C6617T in der Würzburger Gruppe, die deutlich häufiger vorkommt als in dem von Brandt et al. untersuchten, ebenfalls deutschen Kollektiv, sowie der Mutation G7361A in der Wiener Gruppe.

Entgegen Studien anderer Gruppen war die Mutation G7300A äußerst selten vertreten. Das Würzburger Kollektiv war jedoch durch Voruntersuchungen zum Teil bereits auf das Vorliegen dieser Mutation getestet worden. Zuvor identifizierte Mutationsträger wurden hier nicht erneut untersucht. Die relativ hohe Häufigkeit der Mutation (ca. 10%) wird auch deutlich, wenn man die Zahl der Familien betrachtet, aus denen Verwandte auf das Vorliegen dieser Mutation untersucht wurden.

Eine erhebliche Diskrepanz zu den Ergebnissen der Gruppe um Girard findet sich bei der Mutation G6502A. In ihrer Schweizer MHS-Population fanden sie den betreffenden Basenaustausch bei 27% der Familien, während er in der vorliegenden Arbeit in der Würzburger Gruppe nicht und in der Wiener Gruppe in nur einer Familie auftrat. Hier könnte es sich um einen „Founder-Effekt“ handeln, der gegebenenfalls durch die geringe Mobilität der Schweizer Bergbevölkerung in der Vergangenheit zu erklären wäre.

Die übrigen Mutationshäufigkeiten decken sich weitgehend mit denen anderer Arbeitsgruppen, die sowohl deutsche als auch andere europäische Kollektive untersuchten.

## **5.2 Mutation G6377A**

Die einzige noch nicht beschriebene Mutation, die in dieser Arbeit gefunden wurde, ist der Basenaustausch des G durch ein A an der Stelle 6377. Da keine funktionellen Tests durchgeführt wurden, kann keine Aussage über die Funktionseinschränkung des RYR1 gemacht werden. Auffällig ist, dass nur der Indexpatient dieser Familie als MHS eingestuft wurde, während seine beiden Familienangehörigen als MHE gelten. Möglicherweise bedeutet das, dass die Mutation G6377A nur einen geringen Einfluss auf die Funktion des RYR1 hat. Es kann also derzeit nicht entschieden werden, ob es sich um eine MH-verursachende Mutation handelt oder nicht.

## **5.3 Übereinstimmung der Mutationsdaten mit den Ergebnissen des IVCT**

Alle Indexpatienten, die im Screening untersucht wurden, hatten sich schon vorher dem IVCT unterzogen. Auch von vielen Familienmitgliedern war der MH-Status aus dem IVCT bekannt. So lassen sich dessen Ergebnisse mit denen der genetischen Untersuchungen vergleichen.

Bei keinem der als MHN-eingestuften Familienangehörigen von Indexpatienten wurde die in dieser Familie bekannte Mutation gefunden. Dies spricht für die hohe Spezifität des IVCT.

In drei Familien war jeweils ein als MHE getesteter Angehöriger nicht von der in dieser Familie vererbten Mutation betroffen. Dagegen waren drei MHE-Patienten aus zwei Familien Mutationsträger. Dieses Ergebnis unterstreicht die Einschätzung eines MHE-Ergebnisses im IVCT als „equivocal“. Die MHE-Kategorie spiegelt die Problematik des IVCT wieder, bei dem mit Halothan und Koffein zwei verschiedene Triggersubstanzen eingesetzt werden. Nicht selten reagieren die Muskelbündel nur auf eine der Substanzen positiv. Aus Gründen der klinischen Sicherheit sieht das IVCT-Protokoll der EMHG vor, dass Personen mit einem MHE-Testergebnis wie Betroffene anzusehen sind. Tatsächlich verbergen sich in diese Kategorie jedoch zwei Personengruppen, solche die eine genetische Disposition zur MH haben und solche, die sie nicht haben. Die genetischen Daten der kleinen MHE-Gruppe in dieser Studie unterstützen diese Tatsache.

## **5.4 Methodenvergleich**

Ein Ziel dieser Arbeit war neben der Suche nach Mutationen in bekannten MH-Familien, die Methoden SSCP und automatische Sequenzierung für ein Screening größerer Kollektive zu vergleichen. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf eine Gegenüberstellung der Methoden im Hinblick auf Genauigkeit, Zeitaufwand und entstehende Kosten gelegt. Dies soll in dem nun folgendem Kapitel betrachtet werden.

### *5.4.1 Sicherheit und Genauigkeit*

Das SSCP ist eine schon seit langer Zeit angewandte Methode, um große Quantitäten von Proben auf Mutationen zu untersuchen. Die Zuverlässigkeit der Methode hängt dabei erheblich von der Beschaffenheit des zu amplifizierenden Stückes ab. So bestehen beispielsweise große Schwierigkeiten bei der Aufbereitung Guanin- und Cytosin-reicher

Sequenzen. Gerade hier, aber auch bei jedem anderen Fragment ist eine Optimierung der PCR-Bedingungen Voraussetzung für das Gelingen des SSCP. Das Ziel hierbei muss sein, möglichst ausschließlich das gesuchte Stück zu amplifizieren, da es andernfalls zu Störbanden kommt, die das Ablesen erschweren. Des Weiteren sind auch die Konditionen, unter denen der Versuch durchgeführt wird, von erheblicher Relevanz. Die bei dieser Arbeit verwendeten Bedingungen (Polyacrylamidgele mit und ohne Zusatz von Glycerol, TBE-Puffer, Elektrophorese bei 4° C) wurden bereits für andere Sequenzen in unserem Labor etabliert und stellten sich auch für die hier untersuchten Fragmente als geeignet heraus.

Die vier untersuchten Exons 39, 40, 45 und 46 ließen sich alle problemlos amplifizieren und erlaubten auch ein einfaches und sicheres Ablesen des SSCP-Ergebnisses. Für den Methodenvergleich bot sich Exon 40 an, da in ihm für das untersuchte Kollektiv die meisten Mutationen gefunden wurden und so die höchste Anzahl an Positivkontrollen zur Verfügung stand. Die Mutationsträger waren zuvor mittels automatischer Sequenzierung identifiziert worden. Für einige gesunde Probanden und andere MH-Patienten waren Mutationen in diesem Bereich wiederum mittels automatischer Sequenzierung ausgeschlossen worden. Die Mutationsträger wurden zusammen mit den Negativkontrollen auf zwei SSCP-Gele mit und ohne Glycerol aufgetragen. Ein abweichendes Bandenmuster zeigten alle Mutationsträger und keine der Negativkontrollen. Es wurden also mit einer Sicherheit von 100% alle Mutationsträger als solche identifiziert, während wiederum mit einer Genauigkeit von 100% keine der nicht-mutationstragenden Proben ein positives Ergebnis zeigte. Selbst wenn man diese beiden Parameter für Routine-Screeninguntersuchungen etwas niedriger annimmt, ist die Sicherheit noch groß genug, um sich des SSCPs als Screeningmethode der Wahl zu bedienen, ohne Gefahr zu laufen, eine relevante Anzahl von der Mutation Betroffener nicht zu identifizieren.

Dem ist gegenüberzustellen, dass die Auswertung der Ergebnisse bei der automatischen Sequenzierung dank der optischen Darstellung einfacher und klarer ist, während die Deutung der SSCP-Ergebnisse eine gewisse Übung und Erfahrung voraussetzt. Trotzdem ist aber zu betonen, dass auch bei der automatischen Sequenzierung eine sorgfältige und genau angepasste Probenaufbereitung unabdingbar ist, da sonst trotz der

besseren Visualisierung und einfacheren Deutung der Ergebnisse keine zuverlässigen Aussagen und falsche Ergebnisse möglich sind.

#### *5.4.2 Zeitaufwand*

Die Zeit, die für die Vorbereitung jeder einzelnen Probe nötig ist, unterscheidet sich für SSCP und automatische Sequenzierung kaum. Relevant ist dagegen der unterschiedliche Zeitaufwand für die Auswertung der Ergebnisse.

Beim SSCP können 48 Patientenproben, die auf die beiden Gele des Versuchsaufbaus aufgetragen worden sind, nach der Elektrophorese, Trocknung des Gels und Transfer der Signale auf einen Röntgenfilm gemeinsam ausgewertet werden, indem man die Filme am Röntgenschirm betrachtet und die Höhe der entstandenen Banden vergleicht. Anschließend müssen alle auffälligen Proben noch sequenziert werden. Angesichts der relativ geringen Prozentzahlen gefundener Mutationen ist der Zeitaufwand dennoch geringer als der für das komplette Sequenzieren desselben Patientenkollektivs.

Dafür muß nämlich zur Auswertung zunächst für jedes sequenzierte Exon jeder Einzelstrang mit Hilfe des Computerprogrammes analysiert werden und anschließend eine Vergleichssequenz in Gegenüberstellung mit den beiden analysierten Strängen sorgfältig durchgesehen werden, um eventuell vorhandene Mutationen zu entdecken. Es sind also einerseits für den einzelnen Patienten deutlich mehr Arbeitsschritte nötig, andererseits kann auch immer nur ein Patient nach dem anderen angesehen werden, während das SSCP eine Beurteilung vieler Proben gleichzeitig in relativ kurzer Zeit erlaubt.

In einem Fall ist die sofortige automatische Sequenzierung ohne vorhergehendes SSCP vorzuziehen: bei der Untersuchung von Angehörigen betroffener Personen ist eine große Zahl von Mutationsträgern zu erwarten, für die zwei Arbeitsgänge nötig wären, wenn man erst ein SSCP und im positiven Fall eine Sequenzierung durchführen würde. Außerdem muß nur ein Exon amplifiziert, und in diesem nur eine Stelle gezielt angesehen werden, was den Zeitaufwand beträchtlich verringert.

### 5.4.3 Kosten

Betrachtet man den wirtschaftlichen Gesichtspunkt des Methodenvergleichs, muss man die Materialkosten für Gele, Puffer, Kits und die Anschaffungs- und Unterhaltskosten für die verwendeten Geräte berücksichtigen. Dabei ergeben sich deutlich höhere Beträge für die automatische Sequenzierung, da für diese Methode einerseits ein teures Gerät Verwendung findet, dessen Anschaffungskosten die für eine Elektrophoresekammer deutlich übersteigen, andererseits bei der Probenaufbereitung ein Kit der Herstellerfirma verwendet werden muss, während die Zutaten der für das SSCP nötigen Puffer zu einem grossen Teil einzeln gekauft und zusammengemischt werden können. Hierbei kann auf günstigere Produkte verschiedener Firmen zurückgegriffen werden.

Auf die einzelne Probe umgerechnet, ergibt sich also ein höherer Preis für die automatische Sequenzierung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das SSCP aufgrund der Zeit- und Kostenersparnis die ideale Methode für das Screening eines großen Patientenkollektivs darstellt, und dabei auch eine ausreichende Sicherheit bietet.

## 5.5 Ausblick

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde eine Hotspotregion des RYR1, in der sich besonders viele MH-verursachende Mutationen befinden, untersucht. Der Prozentsatz an gefundenen Erbgutveränderungen war mit 14,3% jedoch relativ gering. Um einen höheren Anteil an positiven Ergebnissen zu erreichen, müssen weitere Regionen untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass das SSCP sich als kostengünstige und schnelle Methode hierfür gut eignet. Es besteht auch die Möglichkeit, Fragmente mit unterschiedlichem Laufverhalten im SSCP-Gel zu charakterisieren und dann gemeinsam auf einem Gel laufen zu lassen. So könnten sogar mehrere Fragmente gleichzeitig in einem Arbeitsschritt auf einem Gel untersucht werden. Dennoch darf man nicht außer Acht lassen, dass das Gen für den RYR1 mit 106 Exons eine beträchtliche Größe aufweist und es neben diesem auch noch andere MH-Loci im Genom gibt. Auch nach einem kompletten Screening des RYR1 werden noch ungeklärte Fälle verbleiben. Aus diesem Grund ist

die genetische Diagnostik derzeit keine Alternative zum IVCT oder dem neueren und weniger invasiven Stoffwechseltest. Sie hat trotzdem ihren festen Stellenwert, da in Familien, in denen eine Mutation nachgewiesen werden konnte, die Angehörigen mittels Analyse einer DNA-Probe auf einfachem und sicherem Wege als betroffen oder gesund eingestuft werden können.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden aus den Testzentren Würzburg und Wien DNA-Proben von Patienten, die im Laufe einer Anästhesie eine maligne Hyperthermie (MH) entwickelt hatten, und deren Angehörigen auf MH-verursachende Mutationen im Gen für den Ryanodinrezeptor 1 (RYR 1) untersucht. Es wurde dabei eine Hotspotregion des RYR 1 ausgewählt, für die bereits im Vorfeld mehrere Mutationen bekannt waren. Das Screening wurde mit Hilfe der Methode single-stranded conformation polymorphism (SSCP) durchgeführt. Eine dem abweichenden Laufverhalten eventuell zugrundeliegende Mutation wurde anschließend durch die automatische Sequenzierung identifiziert.

Unter 190 Patienten aus 126 Familien konnte in 18 Fällen eine Mutation gefunden werden. Das entspricht einer Detektionsrate von 14,29%. Insgesamt traten 10 verschiedene Mutationen auf, von denen eine (G6377A) vorher noch nicht beschrieben war. Die Mutationshäufigkeiten unterschieden sich zum Teil erheblich innerhalb der beiden untersuchten Populationen und im Vergleich zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen.

Alle Indexpatienten und viele Angehörige hatten sich bereits einem in-vitro-Kontrakturtest (IVCT) zur Diagnostik der MH unterzogen. So konnten die Ergebnisse des IVCT mit denen der genetischen Untersuchung verglichen werden. Es fand sich eine gute Übereinstimmung, die die Zuverlässigkeit des IVCT stützt.

Begleitend zur Screeninguntersuchung wurden die Methoden SSCP und automatische Sequenzierung hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit im Screening großer Patientenkollektive bewertet. Bei vergleichbarer Sicherheit ist mit dem SSCP in kürzerer Zeit bei geringerem Kostenaufwand eine größere Anzahl an Patientenproben auswertbar.

Der Stellenwert der genetischen Diagnostik bei der MH wurde als ideale Methode zur Identifikation betroffener Familienmitglieder in MH-Familien mit bekannter Mutation bestätigt.

## Literaturverzeichnis

- (1) M.C. Berman et al. Halothane induced hyperpyrexia un landrace pigs. *S Afr Med* 1969; 43: 545-546
- (2) G.E. Burford. Hyperpyrexia following anesthesia. A consideration of control of body temperature during anesthesia. *Anesthesiology* 1940; 1: 208-215
- (3) M.A. Denborough, R.R.H. Lovell. Anesthetic deaths in a family. *Lancet* 1960; ii:45
- (4) C. Gibson et al. Meeting of the Surgical Section of the New York Academy of Medicine. *JAMA* 1900; 1685
- (5) L.W. Hall et al. Unusual reaction to suxamethonium chloride. *Br Med J* 1955; ii:1305
- (6) A.F. Guedel. *Inhalation Anesthesia. A fundamental guide.* New York: MacMillan 1937; 7<sup>th</sup> edition: 133-134
- (7) J.R. Mickelson et al. Abnormal sarcoplasmatic reticulum ryanodine receptor in MH. *J Biol Chem* 1988; 263: 9310-9315
- (8) T.E. Nelson. Abnormality in calcium release from skeletal sarcoplasmatic reticulum of pigs susceptible to MH. *J Clin Invest* 1983; 72: 862-870
- (9) E. Andresen, P. Jensen. Close linkage established between the HAL locus for halothane sensitivity and the PHI locus in pigs of the Danish landrace breed. *Nordisk Vet med* 1977; 29: 502-504
- (10) A.L. Archibald, P. Imlag. The halothan sensitivity locus and its linkage relationship. *Animal blood and biochemical genetics* 1985; 16: 253-263
- (11) A.J.Luis et al. Regional mapping of human chromosome 19. Organisation of genes for plasma lipid transports and the genes C3, PEPD and GPI. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 3929-3933
- (12) T.V. McCarthy et al. Localization of malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature* 1990; 343: 562-564
- (13) D.H. MacLennan et al. Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* 1990; 343: 559-561
- (14) A. Olckers et al. Adult muscle sodium channel alpha.subunit is a gene candidate for MH susceptibility. *Genomics* 1992; 14: 829-831

- (15) R.C. Levitt et al. Evidence for the localization of a MH susceptibility locus (MHS2) to human chromosome 17q. *Genomics* 1992; 14: 562-566
- (16) K. Otsu et al. Cosegregation of porcine MH and a probable causal mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families. *Genomics* 1991; 11: 744-750
- (17) E.F. Gillard et al. A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human MH. *Genomics* 1991; 11: 751-755
- (18) J. Tong et al. Caffeine and halothane sensitivity of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with MH and/or CCD. *J Biol Chem* 1997; 272: 26332-26339
- (19) W. Kalow, B.A. Britt et al. Metabolic error of muscle metabolism after recovery from MH. *Lancet* 1970; 2: 895
- (20) F.R. Ellis et al. Halothane- induced muscle contractures as a cause of hyperpyrexia. *Br J Anaesth* 1975; 47: 62-65
- (21) G. Islander. *Clinical Therapy in Malignant Hyperthermia*. Lengerich: Pabst Science Publishers 2000; 62-66
- (22) D. Olthoff. *Fulminant MH Crisis in Malignant Hyperthermia*. Lengerich: Pabst Science Publishers 2000; 32-36
- (23) M. Görig, K. Agarwal. *A Historical Review on MH in Malignant Hyperthermia*. Lengerich: Pabst Science Publishers 2000; 14-24
- (24) J.C. Ruegg. Muskel in R.F. Schmidt, G. Thews. *Physiologie des Menschen*. Springer 1997; 27. Auflage:67-87
- (25) J. Loke, D.H. MacLennan. MH and CCD: Disorders of  $\text{Ca}^{2+}$  Release Channels. *The Am J of Med* 1998; 104:470-486
- (26) E.M. Balog et al. Divergent Effects of the MHS Arg<sup>615</sup>→Cys Mutation on the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  Dependence of the RyR1. *Biophys J* 2001; 81:2050-2058
- (27) C.F. Louis, E.M. Balog, B.R. Fruen. MH: An Inherited Disorder of Skeletal Muscle  $\text{Ca}^{2+}$  Regulation. *Bioscience Reports* 2001; 21:155-168
- (28) M.U. Gerbershagen et al. Dantrolen: Pharmakologische und therapeutische Aspekte. *Anästhesist* 2003; 52:238-245
- (29) K. Jurkat-Rott, T. McCarthy, F. Lehmann.Horn. *Genetics and Pathogenesis of MH*. *Muscle and Nerve* 2000; 23:4-17

- (30) R. Robinson et al. Genetic heterogeneity and HOMOG analysis in British MH families. *J Med Genet* 1998; 35:196-201
- (31) H. Ruffert et al. Determination of a positive MH disposition without the IVCT in families carrying the RYR1 Arg614Cys mutation. *Clin Genet* 2001; 60:117-124
- (32) H. Ruffert et al. Mutation screening in the RYR1 gene in patients susceptible to MH who show definite IVCT results: identification of three novel mutations. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46:692-698
- (33) R.J. Gurrera. Is MNS a neurogenetic form of MH. *Clin Neuropharmacol* 2002; 25:183-193
- (34) M. Anteseder. MH in Intensivmedizin
- (35) E. Hartung, M. Anteseder. The Standard In-Vitro Contracture Test in Malignant Hyperthermia. Lengerich: Pabst Science Publishers 2000; 251-261
- (36) M. Anteseder et al. Diagnosis of susceptibility to MH by use of a metabolic test. *Lancet* 2002; 359:1579-1580
- (37) S.T. Ohnishi et al. Calcium-induced  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to MH. The effects of halothane and dantrolene. *FEBS Lett.* 1983;161:103-107
- (38) M. Endo et al. Changes in the Ca-induced Ca release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of the muscle from a patient with MH. *Biomed Res.* 1983;4:83
- (39) S.P. Ball, K.J. Johnson. The genetics of MH. *J Med Genet* 1993;30:89-93
- (40) F. Wappler et al. Leitlinien zur Therapie der MH. *Anesthesiol Intensivmed* 2002;43:50-54
- (41) G.G. Harrison. Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br J Anaesth* 1975;47:62-65
- (42) The EMHG. A protocol for the investigation of MH susceptibility. *Br J Anaesth* 1984;56:1267-1269
- (43) T. Girard et al. B-lymphocytes from MHS-patients have an increased sensitivity to skeletal muscle RYR activators. *J Biol Chem* 2001;276:48077-48082
- (44) N. Tiso et al. Identification of mutations in the cardiac RYR-gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2. *Hum Mol Genet* 2001;10:189-194
- (45) T. Yamazawa et al. A region of the RYR critical for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1997;272:8161-8164

- (46) P. Leong, D.H. MacLennan. The cytoplasmatic loops between domains II and III and domains III and IV in the skeletal muscle DHPR bind to a contiguous site in the muscle RYR. *J Biol Chem* 1998;273:29985-29964
- (47) J. Nakai et al. Two regions of the RYR involved in coupling with L-type  $Ca^{2+}$  channels. *J Biol Chem* 1998;273:13403-13406
- (48) D. Iles et al. Localization of the gene encoding the  $\alpha 2/\delta$ -subunits of the L-type voltage-dependent calcium-channel to chromosome 7q and segregation of flanking markers in MHS families. *Hum Mol Genet* 1994;3:969-975
- (49) R. Sudbrak et al. Mapping of a further MHS locus to chromosome 3q13.1. *Am J Hum Genet* 1995;56:684-691
- (50) L. Schleithoff. A novel DHPR mutation for MH reduces calcium channel fast activation. *J Clin Invest.*
- (51) N. Monnier et al. MH-susceptibility is associated with a mutation of the  $\alpha 1$ -subunit of the human DHP-sensitive L-type voltage-dependent calcium channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1997;60:1316-1325
- (52) R.L. Robinson et al. A genome wide search for susceptibility loci in three European MH pedigrees. *Hum Mol Genet* 1997;6:953-961
- (53) R.L. Robinson et al. Recent advances in the diagnosis of MH-susceptibility: How confident can we be of genetic testing? *Europ J Hum Genet* 2003;11:342-348
- (54) A. Urwyler et al. for the EMHG. Guidelines for the detection of MH-susceptibility. *Br J Anaesth* 2001;86:283-287
- (55) A. Shuaib, R.T. Paasuke, K.W. Brownell. CCD. Clinical features in 13 patients. *J Comp Pathol* 1987;97:597-600
- (56) K. Hayashi, R.G. Miller, K.W. Brownell. CCD: Ultrastructure of the SR and T-tubules. *Muscle Nerve* 1989;12:95-102
- (57) K. Jurkatt-Rott, H. Lerche, F. Lehmann-Horn. Skeletal muscle channelopathies. *J Neurol* 2002;249:1493-1502

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich habe mich im Institut für Humangenetik sehr wohlfühlt und die Zeit im Labor immer genossen.

Besonderer Dank geht an

- Prof. Dr. Müller-Reible für die Bereitstellung des Themas und die geduldige Betreuung der Arbeit
- das ganze Team von 305 für die stetige Unterstützung und die guten Ideen, wenn es mal nicht weiter ging
- alle Mitarbeiter im 3. Stock für die nette Einarbeitung
- Dr. Wolfgang Feichtinger für die vielen Sequenzierungen zu jeder Tages- und Nachtzeit
- Birgit für all ihre Hilfe, die Vermittlung ihres riesigen praktischen Könnens, ihre Sorge für mein leibliches Wohl und natürlich für ihre Freundschaft
- meine Eltern, die mir dieses interessante Studium ermöglicht und mich stets unterstützt haben
- und an Wolfgang, meinen Hossi, fürs Drängen zum Zusammenschreiben und das Korrekturlesen trotz der komischen Wörter

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten und Adresse**

Andrea Hoßfeld, geb. Busl, verheiratet  
geboren am 11.02.79 in Würzburg  
wohnhaft Erikaweg 3, 78048 VS-Villingen

### **Schule**

06/1998                      Abitur am Riemenschneider-Gymnasium, Würzburg, Note 1,3

### **Studium**

10/1998-05/2005          Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg  
08/2000                      Physikum, Note 2,0  
08/2001                      1. Staatsexamen, Note 2,0  
03/2004                      2. Staatsexamen, Note 2,0  
04/2004-07/2004          1. Terial des Praktischen Jahres in der Universitätskinderklinik  
Würzburg  
08/2004-11/2004          2. Terial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Innere  
Medizin des Kantonalen Spitals Sursee-Wolhusen, Schweiz  
12/2004-03/2005          3. Terial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Chirurgie  
der Missionsärztlichen Klinik Würzburg  
04/2005                      3. Staatsexamen, Note 2,0

### **Praktika und berufliche Tätigkeiten**

03-04/1999                  Pflegepraktikum in der Missionsärztlichen Klinik Würzburg  
08/1999-09/2001          Pflegeassistentin in der neurologischen Abteilung des  
Juliusspitals Würzburg  
01/2002-12/2003          Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Humangenetik  
Würzburg  
03/2001                      Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin der  
Missionsärztlichen Klinik Würzburg

03/2002 Famulatur beim niedergelassenen Pädiater  
08/2002 Famulatur in der Abteilung für Herz-Thorax-Chirurgie der  
Universitätsklinik Besançon, Frankreich  
03/2003 Famulatur in der Abteilung für Chirurgie des Ospedale Regionale  
della Beata Vergine, Mendrisio, Schweiz  
09/2003 Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des  
St.-Josefskrankenhauses Freiburg

**Doktorarbeit**

seit 09/2001 Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, Thema:  
Mutations-screening im Ryanodinrezeptor 1 bei Patienten mit  
maligner Hyperthermie

Villingen, 30.05.05