

**Molekulargenetische Analyse der
Central Core Disease**

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Werner Wolz

aus

Wertheim/Sachsenhausen

Würzburg 1999

Eingereicht am : 27.05.1999

1. Gutachter : Prof. Dr. Clemens R. Müller-Reible

2. Gutachter : PD Dr. Peter Seibel

der Dissertation

1. Prüfer : Prof. Dr. Clemens R. Müller-Reible

2. Prüfer : PD Dr. Peter Seibel

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung :15.09.1999

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung:

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Des weiteren erkläre ich, daß ich früher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 12.04.1999

Werner Wolz

Liste der verwendeten Abkürzungen:

[α - ³² P]-dCTP	Phosphor-32 Desoxycytidintriphosphat
[γ - ³² P]-ATP	Phosphor-32 Adenosintriphosphat
[α - ³³ P]-ddNTPs	Phosphor-33 Didesoxyribonukleosidtriphosphate
[α - ³⁵ S]-dATPS	Schwefel-35 Adenosin-diphosphat-monosulfat
AA	Acrylamid
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	“Bacterial artificial chromosome”
Bis-AA	Bis-Acrylamid
BSA	“Bovine serum albumine”
<i>Bt</i>	<i>Bos taurus</i>
BWS	Beckenwirbelsäule
CANPS	“Calcium-activated neutral protease, small (subunit)”
cen	Centromer
CEPH	“Centre d' études du polymorphisme humaine”
CK	Creatin-Kinase
COT1-DNA	DNA-Präparation, die angereichert ist für repetitive DNA ($C_0 \cdot t = 1$) (C_0 = Ausgangskonzentration an denaturierter DNA in Mol/l, t = Renaturierungsdauer in Sek.)
COX	Cytochrom c Oxidase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	“Denaturing gradient gel electrophoresis”
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DMF	Dimethylformamid
DNA	“Desoxyribonucleic acid”
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
ECC	“excitation-contraction coupling”
EMG	Elektromyogramm

EST	“Expressed sequence tag”
FISH	Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung
GPI	Glucosephosphat-Isomerase
GUS	Glucuronidase-Gen
H&E	Hämatoxylin und Eosin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IVCT	“In vitro contracture test”
IRD	“Infrared-dye” (Infrarotfarbstoffmarkierung für Oligoprimer zur Analyse auf einem LICOR Sequenziergerät)
KG	Körpergewicht
LGMD	“Limb-girdle muscular dystrophy”
LMP-Agarose	“Low-melting point” Agarose
LLNL	“Lawrence Livermore National Laboratory” (Livermore, Calif., USA)
LWS	Lendenwirbelsäule
Lös.	Lösung
MDE-Gel	“Mutation Detection Enhancement”-Gel
MH	“Malignant hyperthermia”, Maligne Hyperthermie
MHEc bzw. MHEh	“Malignant hyperthermia equivocal” (für Koffein bzw. Halothan)
MHN	“Malignant hyperthermia negative”
MHS	“Malignant hyperthermia susceptible”
Na ₂ -EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetra-azetat
OD _{xxx}	Optische Dichte (“optical density”) bei xxx nm Wellenlänge
OMIM	“Online Mendelian Inheritance in Man”
PAC	“P1 artificial chromosome”
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	“Polymerase chain reaction”
PFGE	“Pulsed-field gel electrophoresis”
PSS	“porcine stress syndrome”
RGD	Arginin (R) - Glycin (G) - Asparaginsäure (D)
RNA	“Ribonucleic acid”
rpm	“Rotations per minute”

SAP	Shrimps Alkalische Phosphatase
SDS	“Sodiumdodecylsulfate”
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSCA, SSCP	“Single-stranded conformation analysis, -polymorphism”
STS	“Sequence-tagged site”
tel	Telomer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
UTR	“Untranslated region”
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galaktosid
YAC	“Yeast artificial chromosome”
V.a.	Verdacht auf
verd.	verdünnt
Vol.	Volumen(-anteile)
w/v	“weight per volume”, Gewichtsprozent
v/v	“volume per volume”, Volumenprozent
w/w	“weight per weight”, Gewichtsverhältnis
Z_{\max}	maximaler Lodscore

Inhaltsverzeichnis:

Liste der verwendeten Abkürzungen:	4
Inhaltsverzeichnis:	7
1. Einleitung	11
2. Grundlagen	13
2.1 Die Veranlagung zur Malignen Hyperthermie (MHS)	13
2.1.1 Definition Maligne Hyperthermie (MIM Nr. #145600)	13
2.1.2 Historisches	13
2.1.3 Die Maligne Hyperthermiekrise	14
2.1.3.1 Triggersubstanzen	14
2.1.3.2 Symptomatik	15
2.1.3.3 Therapie	15
2.1.4 Diagnostik	16
2.1.5 Pathobiologie	17
2.1.5.1 Elektromechanische Koppelung	17
2.1.5.2 Der Ryanodinrezeptor	20
2.1.5.3 Biochemie des MHS-Muskels	21
2.1.6 Genetik	22
2.1.6.1 Erbgang und Häufigkeit	22
2.1.6.2 Genetische Kartierung	24
2.1.6.3 Physikalische Kartierung	27
2.2 Die Central Core Disease (CCD)	29
2.2.1 Definition	29
2.2.2 Klinik	29
2.2.2.1 Muskulatur	30
2.2.2.2 Skelettanomalien	30
2.2.2.3 Herzsymptomatik	31
2.2.2.4 Assoziation mit anderen Erkrankungen	31
Maligne Hyperthermie	31
2.2.2.5 Differentialdiagnostik	32
2.2.3 Histopathologie	33
2.2.4 Genetik	35

2.3 Ziel der Arbeit	37
3. Patienten, Material und Methoden	39
3.1 Die CCD-Patienten	39
3.2 Methoden	45
3.2.1 DNA-Isolierung	45
3.2.1.1 Isolierung von menschlicher, gesamtgenomischer DNA aus Leukocyten (Miller et al., 1988)	45
3.2.1.2 Isolierung von DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Scherer & Tsui, 1991)	45
3.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Sambrook et al., 1989)	46
3.2.1.4 Isolierung von Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i>	47
3.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	48
3.2.2 Elektrophorese (Sambrook et al., 1989)	49
3.2.2.1 Horizontale Agarosegelelektrophorese	49
3.2.2.2 Horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese	50
3.2.2.3 Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese	50
3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (Mullis & Faloona, 1987)	51
3.2.4 Typisierung von Mikrosatelliten-Markern (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989)	52
3.2.5 Alu-PCR von YACs und Cosmiden (Nelson et al., 1989)	56
3.2.6 Inverse PCR (Ochman et al., 1989)	56
3.2.7 Single Stranded Conformation Analysis (Orita et al., 1989)	57
3.2.8 PCR-Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (PCR-RFLP)	60
3.2.9 Klonierung	62
3.2.9.1 Klonierung von PCR-Produkten mit TA cloning Kit (Invitrogen)	62
3.2.9.2 "sticky-end" Subklonierung von Cosmidfragmenten	62
3.2.10 DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)	64
3.2.10.1 Radioaktive Sequenzierung von PCR-Produkten (USB, Amersham)	64
3.2.10.2 Radioaktive Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA (USB, Amersham, Licor)	66
3.2.10.3 Infrarotfluoreszenzsequenzierung auf dem Licor 4000 DNA-Sequencer	67
3.2.11 Southern-Hybridisierung (Southern, 1975)	69

3.2.12 Pulsfeld-Gelelektrophorese von YACs (Schwartz et al., 1983; Schwartz & Cantor, 1984)	70
3.2.13 Muskel-cDNA-Selektion mit Cosmiden und YACs (Parimoo et al., 1991; Lovett et al., 1991)	72
3.2.13.1 Präparation von YAC- und Cosmid-DNA	72
3.2.13.2 Herstellung eines Skelettmuskel-cDNA Pools	73
3.2.13.3 cDNA Selektion	78
3.3 Verwendete Chemikalien u. Lösungen	80
3.3.1 Pufferlösungen und Kulturmedien	80
3.3.2 Enzyme	84
3.3.2.1 Restriktionsenzyme	84
3.3.2.2 DNA-Polymerasen	85
3.3.2.3 sonstige Enzyme	85
3.3.3 Bakterienstämme und Plasmidvektoren	86
3.3.3.1 Bakterienstämme:	86
3.3.3.2 Plasmide:	86
3.3.3.3 Cosmide, YACs:	86
3.3.4 Radioaktive Lösungen:	86
3.3.5 Oligonukleotide:	86
4. Ergebnisse	87
4.1 Genetische Kartierung	87
4.1.1 Charakterisierung eines neuen, hochpolymorphen Markers, WUT1.9 auf Chromosom 19q13.1	87
4.1.2 Genetische Feinkartierung von CCD-Familien	90
4.1.3 STS-Kartierung von Chromosom 19 YACs und Cosmiden	106
4.2 cDNA-Selektion (gene tracking)	111
4.2.1 Herstellung des Muskel-cDNA Pools	111
4.2.2 cDNA-Selektion mit Chromosom 19 YACs	112
4.2.3 cDNA-Selektion mit Chromosom 19 Cosmiden	113
4.3 Mutationsanalyse von CCD-Patienten in Kandidatengen	116
4.3.1 Das Gen für den sarkoplasmatischen Calciumkanal (Ryanodinrezeptorgen, RYR1)	116
4.3.1.1 Die MHS-Mutationen	116

4.3.1.2 Die CCD-Mutationen	117
4.3.2 Das Gen für die <i>a</i> -Untereinheit des Myosins (MYH7)	119
4.3.3 Das Gen für Cytochrom <i>c</i> Oxidase Untereinheit VIb (COX6B)	120
4.3.4 Das Gen für Cytochrom <i>c</i> Oxidase Untereinheit VIIa (COX7A1)	123
4.3.4.1 Genomische Organisation des Gens COX7A1	123
4.3.4.2 Mutationsanalyse in CCD-Familien	131
4.3.5 Das Gen für die kleine Untereinheit der Ca ²⁺ -aktivierten neutralen Proteasen (CANPS)	133
5. Diskussion	135
5.1 Genetische Kartierung	135
5.1.1 Charakterisierung eines neuen, hochpolymorphen Markers auf Chromosom 19q13.1	135
5.1.2 Genetische Feinkartierung von CCD-Familien	137
5.1.3 STS-Kartierung von Chromosom 19 YACs und Cosmiden	140
5.2 cDNA-Selektion	141
5.3 Kandidatengene	143
5.3.1 Das Gen für den sarkoplasmatischen Calciumkanal (RYR1)	143
5.3.2 Das Gen für die <i>b</i> -Untereinheit des Myosins (MYH7, MYHCB)	145
5.3.3 Das Gen für Cytochrom <i>c</i> Oxidase Untereinheit VIb (COX6B)	146
5.3.4 Das Gen für Cytochrom <i>c</i> Oxidase Untereinheit VIIa (COX7A1)	148
5.3.5 Das Gen für die kleine Untereinheit der Ca ²⁺ -aktivierten neutralen Proteasen (CANPS)	150
5.3.6 Weitere Kandidatengene	152
5.3.7 Ungeklärte Fragen	153
6. Literatur	155
7. Zusammenfassung	173
8. Abstract	175
Publikationsliste	177
Lebenslauf	178

1. Einleitung

Das menschliche Genom umfaßt eine geschätzte Anzahl von 80 000 Genen, von denen bisher nur ein Bruchteil bekannt ist. Trotz der Fortschritte des Humangenom-Projekts, das die Sequenzierung des kompletten haploiden Genoms des Menschen von ca. 3 Milliarden Basenpaaren vorsieht, wird man weiterhin verschiedene Ansätze nutzen, um die Funktion(en) dieser Gene aufzuklären. Ein möglicher Ansatz, die biologische Funktion eines Gens zu eruieren ist die Analyse von natürlichen Defektmutanten für dieses Gen, was letztlich eine Grundlage humangenetischer Forschung ist. Das Forschungsobjekt ist hier der Mensch, die Defektmutanten sind die Erbkrankheiten des Menschen. Oft erlaubt es die Analyse von Mutationen eines Gens, Rückschlüsse zu ziehen auf die biologische Funktion dieses Gens bzw. seines Produktes und man kann so das Verständnis der untersuchten biologischen Phänomene erweitern.

Es gibt prinzipiell vier verschiedene Strategien zur Identifizierung von Krankheitsgenen (Strachan & Read, 1996), zwei davon, die funktionspezifische Klonierung und die positionsunabhängige Kandidatengenmethode, benötigen keine Information über den genetischen Locus der Erkrankung, während Positionsklonierung und positionsabhängige Kandidatengenmethode diese Information als Ausgangspunkt benutzen. Die funktionspezifische Klonierung, bei der man einen Umweg über das Genprodukt macht, hat heutzutage praktisch keine Bedeutung mehr. Die positionsunabhängige Kandidatengenmethode verliert auch zusehends an Bedeutung, da hiermit nur wenige Erfolge erzielt wurden und mittlerweile ausreichend genetische Informationen vorliegen, so daß eher die positionsabhängige Kandidatengenmethode Anwendung findet. Da es sich hierbei zunächst um Datenbankabfragen handelt, brauchen hierfür, zumindest in der Anfangsphase, keine Experimente durchgeführt zu werden. Dieser Ansatz ("In silico cloning") hat sich in der letzten Zeit als Standard etabliert, während auch die 4. Methode, die Positionsklonierung, nach und nach an Bedeutung verliert. Allen Methoden gemeinsam ist jedoch die anschließende Untersuchung von Patienten auf Mutationen in den gefundenen Kandidatengen. Das Vorliegen von Mutationen im Patientenkollektiv im Vergleich zu einer Kontrollgruppe identifiziert dabei jenes Gen, das für das Entstehungsgeschehen der Krankheit eine Rolle spielt.

Die Central Core Disease (CCD; deutsch: Zentralfibrillen Myopathie) ist eine neuromuskuläre Erkrankung, die charakterisiert ist durch eine Schwäche der distalen Muskulatur, eine

verzögerte statomotorische Entwicklung und eine Assoziation mit der genetischen Disposition zur Malignen Hyperthermie. Ausgehend von der genetischen Assoziation konnte der Locus für die CCD mittels Koppelungsanalysen in betroffenen Familien kartiert werden. Aus der genetischen Kartierung resultierte gleich ein potentielles Kandidatengen, doch mittlerweile ergaben sich Zweifel an der Bedeutung dieses Gens für die Ätiologie der Zentralfibrillen Myopathie. Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit versucht werden, unter Anwendung vom Methoden, die dem Bereich der Positionsklonierung entstammen sowie mit Locus-abhängigen Kandidatengen-Analysen neue Kandidatengene zu finden und ein Kollektiv von CCD-Patienten mit einer Screening-Methode auf Mutationen zu untersuchen. Im Erfolgsfalle sollte die Art der Mutationen nachgewiesen werden sowie die Beschränkung der Mutationen auf den Kreis der Patienten, um die Relevanz des Gens für die Ätiologie der Erkrankung aufzuzeigen.

Mit einer erfolgreichen Kandidatengen-Analyse erhielte man einen tieferen Einblick in die Molekularbiologie der Genprodukte, die eine funktionelle Rolle in der Skelettmuskulatur spielen. Da die diagnostischen Möglichkeiten zur Zeit eher eingeschränkt sind, wäre damit nicht zuletzt auch eine Verbesserung für die Patienten und ihre Angehörigen verbunden.

2. Grundlagen

Das Hauptthema der vorliegenden Arbeit ist die Central Core Disease (CCD), aufgrund der engen symptomatischen und genetischen Assoziation mit der Malignen Hyperthermie (MH), soll jedoch zuerst die MH besprochen werden.

2.1 Die Veranlagung zur Malignen Hyperthermie (MHS)

2.1.1 Definition Maligne Hyperthermie (MIM Nr. #145600)

Die Maligne Hyperthermie ist eine pharmakogenetische Veranlagung, die 1960 erstmals von Denborough und Lovell beschrieben wurde. Sie wird ausgelöst durch flüchtige Narkotika und depolarisierende Muskelrelaxantien und führt zu einem hypermetabolen Syndrom, das einhergeht mit der namensgebenden Erhöhung der Körpertemperatur und unbehandelt häufig zum Tode führt. Ursache ist ein genetischer Defekt, der eine gestörte Calciumhomöostase des Muskels zur Folge hat.

2.1.2 Historisches

Die Mitte des letzten Jahrhunderts beginnende Anwendung von Äther als Narkosemittel für Operationen zeigte bald, daß eine schmerzfreie Operation auch mit erheblichen Nebenwirkungen und Komplikationen verbunden sein kann. Bereits um die Jahrhundertwende wurden erste Fälle sogenannter perioperativer "Hitzschläge" publiziert, deren Ursache nicht geklärt werden konnte (Gibson & Tuttle, 1900). Es folgten weitere Beschreibungen von hohem Fieber und Tachykardie nach Operationen, von denen meist Kinder und Jugendliche betroffen waren und man nannte das Syndrom nun "Ätherkrämpfe". Erst 1960 wurde das Maligne Hyperthermie Syndrom dann als eigenständiges Krankheitsbild mit genetischer Grundlage beschrieben an einer großen Familie, in der bereits 10 Personen an Narkosezwischenfällen verstorben waren (Denborough & Lovell, 1960).

Ein wichtiger Meilenstein der MH-Forschung war die bald darauf folgende Entdeckung eines Tiermodells für die Maligne Hyperthermie, nämlich des Succinylcholin-induzierten "porcine stress syndrome's" (PSS) beim Schwein (Hall et al., 1966). Dieses Tiermodell erlaubte unter anderem die Erprobung des Therapeutikums Dantrolen (Harrison, 1975), mit dem es gelang, das Mortalitätsrisiko nach einer MH-Krise von 70 - 80 % auf 10 - 20 % zu senken (Roewer, 1991). Zu Beginn der 70er Jahre wurde ein diagnostisches Verfahren entwickelt, das auf die

Arbeiten von Kalow et al. (1970) zurückgeht, der In-Vitro Kontrakturtest (IVCT) mit Koffein und Halothan, der sich mittlerweile als Standardmethode der MH-Diagnostik etabliert hat (European Malignant Hyperpyrexia Group, 1984).

Beim Schwein wurde bereits 1977 eine genetische Koppelung des Locus *HAL* (für Halothan-Sensitivität) mit dem Locus für die Glucosephosphat-Isomerase (*GPI*) gefunden (Andresen & Jensen, 1977). McCarthy et al. (1990) und MacLennan et al. (1990) gelang es mit dieser Information und dem bekannten Locus für *GPI* auf Chromosom 19, das Gen für die humane MHS auf Chromosom 19q13.1 zu kartieren. In den beiden Arbeiten wurde das Gen für den sarkoplasmatischen Calciumkanal (Ryanodinrezeptor, *RYRI*) als Kandidatengen für die MHS vorgeschlagen und wenig später wurde die Mutation C1843T (R615C) beim Schwein beschrieben, die das PSS hervorruft (Fuji et al., 1991).

Es zeigte sich bald, daß die analoge Mutation C1840T auch beim Menschen ursächlich ist für MH (Gillard et al., 1991), jedoch nur in 4 % der europäischen MHS Patienten (Manning et al., 1998 b). Außerdem fanden sich etliche Familien, in denen die Veranlagung nicht zu dem Ryanodinrezeptor Gen gekoppelt ist (Levitt et al., 1991; Deufel et al., 1992; Fagerlund et al., 1992; Iles et al., 1992). Mittlerweile zeigt es sich, daß nur etwa bei der Hälfte aller MH-Familien eine Koppelung zum *RYRI*-Gen vorliegt und daß es mindestens vier, wahrscheinlich sechs oder mehr Gene gibt, die eine Maligne Hyperthermie auslösen können (Robinson et al., 1997).

2.1.3 Die Maligne Hyperthermiekrise

2.1.3.1 Triggersubstanzen

Neben der genetischen Disposition bedarf es einer oder mehrerer Triggersubstanzen, um eine Maligne Hyperthermiekrise hervorzurufen. Die bekanntesten Trigger sind zum Einen flüchtige Inhalationsnarkotika wie Chloroform, Äther, Halothan, Isofluran, Sevofluran und Defluran, zum Anderen depolarisierende Muskelrelaxantien, z.B. Suxamethonium (Ellis & Heffron, 1985). Selten wurde auch über Narkoseunabhängige Hyperthermie-Krisen berichtet, die z.B. durch Überwärmung und/oder physischen oder psychischen Streß ausgelöst wurden (Olthoff & Vonderlind, 1997).

Beim Schwein hingegen ist Streß und Aufregung (z.B. bei Transport, Paarung, Rivalenkämpfen, Geburt etc.) als Auslöser des PSS ein lange bekanntes Phänomen (Gronert, 1980).

Nicht-triggernde Anästhetika sind Lachgas, nicht-depolarisierende Muskelrelaxantien sowie Lokalanästhetika, die daher auch bei MH-veranlagten Personen zur Narkotisierung verwendet werden können.

2.1.3.2 Symptomatik

Die Maligne Hyperthermie fällt auf durch eine variable Symptomatik, die sich durchweg aus einer gestörten Calciumhomöostase ableiten läßt. Zur genaueren Diagnose einer MH-Krise wurde eine Punktwertung eingeführt, bei der jedem aufgetretenen Symptom ein bestimmter Punktwert zugewiesen wird, um letztlich den Verdacht einer vorliegenden MH-Krise bestätigen zu können. Neben einer schwächer ausgeprägten "abortiven" bzw. "possiblen" Verlaufsform, spricht man im Vollbild von einer "fulminanten" Krise. Erstes Anzeichen der Krise ist häufig ein Masseterspasmus, der jedoch auch unspezifisch auftreten oder fehlen kann. Weitere frühe Zeichen sind: Sinus-Tachycardie, Anstieg der endexpiratorischen CO₂-Konzentration, metabolische Azidose, Hypoxämie (Abfall des Blut-Sauerstoffpartialdrucks), Muskelsteifigkeit und Hautrötung. Im späteren Verlauf können komplexe Arrhythmien, Zyanose, Hyperkaliämie, Hypertonie, Rhabdomyolyse und Hyperthermie hinzukommen. Die spezifischsten Symptome sind der Anstieg des endexpiratorischen CO₂ sowie die metabolische Azidose. Die Hyperthermie, die bei 50 % der Fälle unter einer Körpertemperatur von 39 °C bleibt, im Extremfall jedoch auch 43 °C erreichen kann, ist ein Spätsymptom und kein obligatorisches (Mauritz et al., 1986). Spezifisch ist jedoch der schnelle Anstieg der Körpertemperatur (Gronert, 1980), dessen Rate sich etwa auf 1 °C pro 5 Min. beläuft. Ohne Behandlung führen 70 - 80 % der fulminanten Krisen zum Exitus (Roewer, 1991). Je nach überwiegender Symptomatik, kann der Tod durch Kammerflimmern innerhalb Minuten, durch Lungenödeme oder eine Koagulopathie nach einigen Stunden oder durch neurologische Schäden bzw. Nierenversagen nach Tagen eintreten (MacLennan & Phillips, 1992).

2.1.3.3 Therapie

Eine erste therapeutische Maßnahme nach Erkennen einer Malignen Hyperthermiekrise ist das sofortige Absetzen der Triggersubstanz(en) und der Wechsel zu einem MH-sicheren Anästhetikum, mit dem die Narkose vertieft wird. Ein potentes Gegenmittel bei MH ist Dantrolen-Natrium-3 1/2-Hydrat, das intravenös in Einzeldosen (2,5 mg/kg KG) solange verabreicht wird, bis der Hypermetabolismus beendet ist. Der Patient wird mit 100 % O₂ hyperventiliert, um den endexpiratorischen CO₂ zu senken und Hypoxämie zu verhindern. Mit

Natriumbikarbonat versucht man die Azidität des Blutes zu mindern. Im Falle einer abortiven Krise kann unter bestimmten Voraussetzungen sogar die Operation fortgesetzt werden.

2.1.4 Diagnostik

Die Diagnostik der Veranlagung zur MH wird i.d.R. bei Angehörigen eines Patienten, der bereits eine Maligne Hyperthermiekrise erlitten hat, durchgeführt. Obwohl es eine Reihe von Versuchen gab, eine MHS-Diagnostik auf biochemischer, neurologischer oder morphologischer Ebene (Übersicht bei Hartung, 1995) durchzuführen, gibt es bis heute keine Alternative zum invasiven und teuren, aber verlässlichen In-vitro Kontrakturtest (IVCT). Die Grundlagen für den Test wurden von Kalow et al. (1970) und Ellis et al. (1971) erarbeitet, die Messungen der Kontrakturschwellenwerte an isolierten Muskelfasern durchführten. Der Test wurde durch die europäische Maligne Hyperthermie-Gruppe standardisiert für den europäischen Raum (EMHG, 1984), daneben gibt es für Nordamerika einen ähnlichen Standard, der als Koffein-Halothan-Kontrakturtest (CHCT) bezeichnet wird.

Für den IVCT wird eine Muskelbiopsie des M. quadriceps, bevorzugt vom Vastus medialis entnommen, die eine Länge von 15 - 25 mm und einen Durchmesser von 2 - 3 mm haben sollte. Die Biopsie wird sofort nach Entnahme in Krebs-Ringer-Lösung überführt und mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) durchperlt. Die Biopsie wird auf einem Träger am einen Ende fixiert und am anderen Ende ein Meßgerät zur Messung des Muskeltonus angeschlossen. Zur Messung befindet sich die Probe in einem auf 37 °C temperierten Gewebebad mit Krebs-Ringer-Lösung und Carbogen-Begasung, in das auch die Triggersubstanzen appliziert werden. Die Muskelfasern werden elektrisch so stimuliert, daß eine über 10 Min. konstante, horizontale Kontraktionsbasislinie von etwa 2 g gehalten wird. Dann erfolgt die Zugabe von Koffein (0,5 - 32 mMol) bzw. Halothan (0,11 - 0,44 mMol oder 0,5 - 3 % v/v) in mehreren Schritten und man mißt die jeweilige, resultierende Muskelspannung. Als Ergebnis des Kontrakturtests erhält man diejenige Koffein- bzw. Halothan-Konzentration, die eine Muskelspannung erzeugt, die um mind. 0,2 g höher liegt als die Kontraktionsbasislinie.

Je nach den resultierenden Schwellenwerten, teilt man die Patienten in 3 Klassen ein bezüglich des MH-Risikos:

MHS (Malignant Hyperthermia susceptible): Ein Koffein-Schwellenwert von 2 mMol oder weniger und ein Halothan-Schwellenwert von 0,44 mMol oder weniger

($\leq 2\%$ v/v) wurden erreicht. Beide Tests sind positiv ausgefallen, die Patienten haben eine gesicherte Veranlagung zu MH.

MHN (Malignant Hyperthermia negative): Die Schwellenkonzentration für Koffein liegt bei 3 mMol oder mehr und für Halothan über 0,44 mMol ($> 2\%$ v/v). Die Tests sind negativ ausgefallen, der Proband hat kein MH-Risiko.

MHE (Malignant Hyperthermia equivocal): Es ist nur einer von beiden Tests positiv, welcher durch ein zusätzliches Kürzel, MHE_h bzw. MHE_c , angegeben werden kann. Der jeweils andere Test fiel negativ aus. In Bezug auf das Narkoserisiko, werden diese Probanden dem MHS-Phänotyp gleichgestellt.

2.1.5 Pathobiologie

Wie bereits beschrieben, kann die Symptomatik der Malignen Hyperthermie im wesentlichen auf eine genetische bedingte Störung der Calciumregulation im Muskel zurückgeführt werden. Hierzu gibt es eine Reihe von Untersuchungen (Übersicht bei Mickelson & Louis, 1996), die hauptsächlich an Halothan-sensitiven Schweinen durchgeführt wurden.

2.1.5.1 Elektromechanische Koppelung

Die myoplasmatische Calcium-Konzentration stellt einen wichtigen Regulator für die Muskelkontraktion und den Zellmetabolismus dar (Mickelson & Louis, 1996). Eine Störung der Calciumregulation wird verursacht durch eine Mutation in einem Protein, das in die elektromechanische Koppelung (ECC, "excitation-contraction coupling") zwischen Nerv und Muskel involviert ist, nämlich der Ryanodinrezeptor (RYR1), ein sarkoplasmatischer Calciumkanal (Abb. 2.1.5.1 und 2.1.5.2). Die elektromechanische Koppelung ist der Prozeß, der ein Aktionspotential eines motorischen Nerven "übersetzt" in mechanische Energie in Form einer Gleitbewegung von Aktin- und Myosinfilamenten. Ein an der motorischen Endplatte einer Muskelfaser ankommendes Aktionspotential führt dabei zu einer Depolarisierung des Sarcolemma, die sich über die Einstülpungen der Transversaltubuli rasch bis ins Innere der Muskelfaser ausbreitet. Nach Detektion der Membrandepolarisierung durch einen Spannungssensor wird das Signal weitergeleitet an das Sarkoplasmatische Retikulum (SR), was in der Freisetzung von Ca^{2+} aus dessen terminalen Zisternen resultiert. Im Sarcoplasma bindet das Ca^{2+} an die Troponin-C-Moleküle eines dünnen Aktinfilaments und löst das eigentliche Filamentgleiten aus.

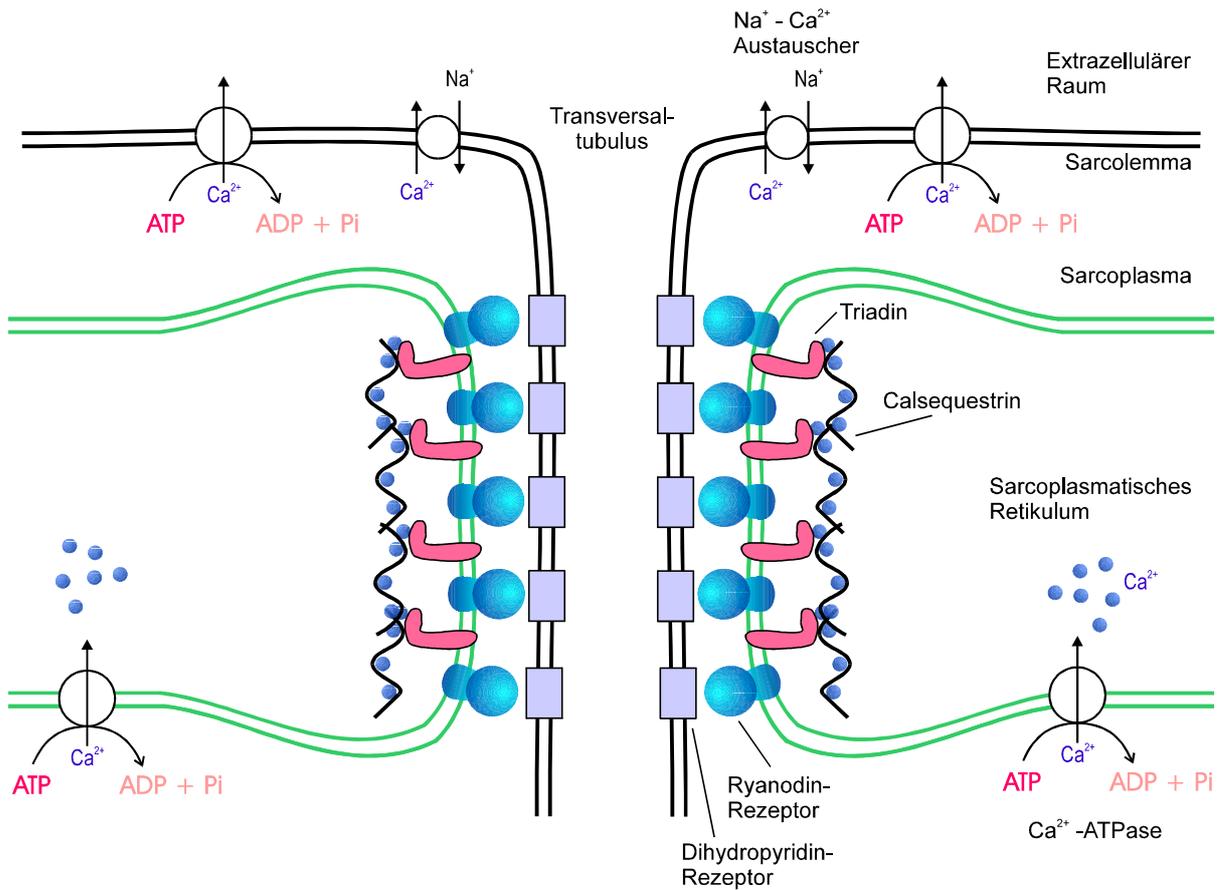


Abb. 2.1.5.1 Komponenten der elektromechanischen Koppelung an der Triade einer Skelettmuskeifaser (nach Mickelson & Louis, 1996).

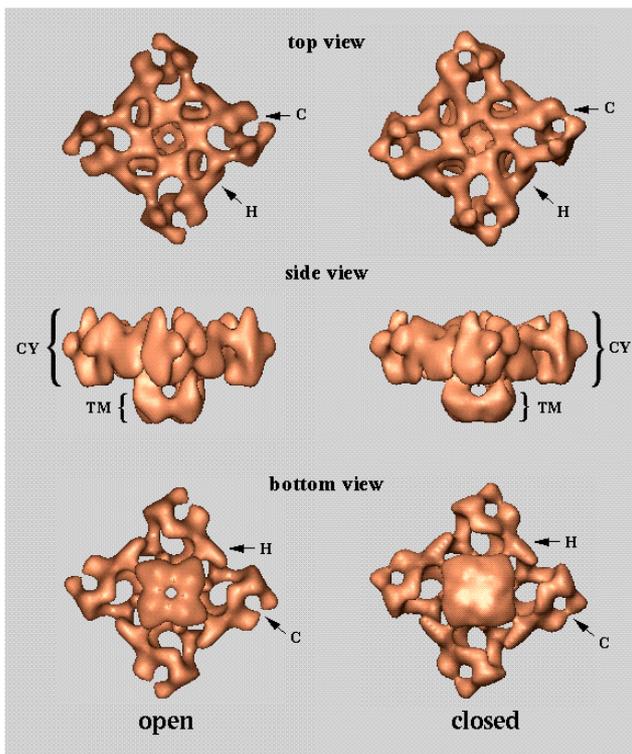


Abb. 2.1.5.2 3D-Rekonstruktion eines homotetrameren Ryanodinrezeptor-Moleküls, erstellt nach gefrierenmikroskopischen Aufnahmen. Links: der Calciumkanal im offenen Zustand, rechts: geschlossen. TM: Transmembrandomäne, CY: Cytoplasmatische Domäne, C: "clamp"-Domäne, H: "handle"-Domäne. Die Aufsicht von der Lumen-Seite des SR (3. Reihe) zeigt die zentrale Kanalpore, die im geschlossenen Zustand (ohne Ryanodin und Calcium) nicht erkennbar ist. Die als "clamp"-Struktur beschriebene Domäne hat im offenen Zustand geöffnete Finger, im geschlossenen Zustand berühren sich die Finger. Die "handle"-Domäne verbindet die "clamp"-Domäne mit dem Zentrum der cytoplasmatischen Domäne (aus Orlova et al., 1996).

Als Ca^{2+} -Kanal und Spannungssensor der Muskelzelle fungiert der Dihydropyridinrezeptor (DHPR), der in den Membranen der Transversaltubuli angesiedelt ist und in Verbindung steht mit dem eigentlichen Ca^{2+} -Freisetzungskanal, dem Ryanodinrezeptor (Abb. 2.1.5.1). Im Ruhezustand sorgen verschiedene aktive und passive Transportsysteme für die Aufrechterhaltung eines Calcium-armen Milieus im Zellinnern mit einer Calcium-Konzentration im nanomolaren Bereich (Ervasti et al., 1989). Daran beteiligt sind auch die Ca^{2+} -ATPasen, die von den Genen *SERCA1* und *SERCA2* codiert werden, und die hauptsächlich der schnellen Reakkumulation von Calcium im SR in der Relaxationsphase nach einer Faserkontraktion dienen. Diese machen etwa die Hälfte der gesamten SR-Proteine aus (Meissner et al., 1988). Die Membrandepolarisierung durch ein ankommendes Aktionspotential löst einen langsamen Calcium-Einstrom ("L-current") in das Sarcoplasma aus, der von der $\alpha 1$ -Untereinheit des DHPR vermittelt wird und der für die Calcium-Freisetzung aus dem SR erforderlich ist (Tanabe et al., 1988). Durch den Anstieg des myoplasmatischen Calciums wird der Ryanodinrezeptor aktiviert und setzt nun massiv Calcium frei. Der Mechanismus wird auch als Calcium-induzierte Calcium Ausschüttung (CICR, "calcium-induced calcium release") bezeichnet (Endo et al., 1970; Ford & Podolsky, 1970). Der DHP-Rezeptor steht wahrscheinlich in Kontakt mit Triadin, das seinerseits mit dem Ryanodinrezeptor in Verbindung steht, der die Muskelkontraktion initiiert, indem er Calcium aus dem SR in das Sarcoplasma freisetzt. Der Ryanodinrezeptor ist assoziiert mit dem Protein Calsequestrin, das als Speicher für das Calcium dient (Ikemoto et al., 1993).

Die Calcium-induzierte Calcium Ausschüttung ist wahrscheinlich der Mechanismus der elektromechanischen Koppelung im Herzmuskel, daneben spielt sie auch eine Rolle für die Entstehung einer Malignen Hyperthermiekrise (Ogawa, 1994). Im Skelettmuskel jedoch wird für die Aktionspotential-induzierte Ausschüttung von Calcium ein anderer Mechanismus diskutiert: das mechanische Modell der elektromechanischen Koppelung (Franzini-Armstrong, 1975). Nach diesem Modell würde die Pore des Calciumkanals (RYR1) durch einen Stempel verschlossen und dieser durch ein spannungssensorisches Molekül (DHPR) hin- und herbewegt. Demnach würde eine Membrandepolarisierung des Sarcolemma eine Konformationsänderung des DHPR hervorrufen, die auf nicht bekannte Weise auf den Ryanodinrezeptor übertragen wird und den Kanal mechanisch öffnet.

Meissner (1994) postuliert eine Kombination des mechanischen und des chemischen Modells, nach der nur ein Teil der Ryanodinrezeptoren mechanisch mit DHP-Rezeptoren gekoppelt sind, die übrigen würden über den Ca^{2+} -Einstrom des DHPR aktiviert.

2.1.5.2 Der Ryanodinrezeptor

Der Ryanodinrezeptor ist ein homotetrameres Protein aus einer Untereinheit von 565 kDa, das in der Membran der terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Fleischer & Inui, 1989; Abb. 2.1.5.1 und 2.1.5.2). Ein Fünftel des COOH-Endes bildet die Transmembrandomänen, die das Protein in der Membran des Retikulums verankern, während der Rest die große cytoplasmatische Domäne bildet, die man als "Fuß"-Struktur bezeichnet hat und die den Spalt zwischen terminaler Zisterne und Transversaltubulus überbrückt (Meissner, 1994; Abb. 2.1.5.2). Über die genaue Anzahl an Transmembrandomänen gibt es verschiedene Ansichten, nach Takeshima et al. (1989) sind es vier, Zorzato et al. (1990) hingegen halten sechs bis acht zusätzliche Domänen für wahrscheinlich. Der Membrananteil der Kanalpore wird wahrscheinlich aus den transmembranen Anteilen jeder der vier Untereinheiten gebildet, während in der cytoplasmatischen Domäne vier Kanäle radiär ausstrahlen (Franzini-Armstrong & Jorgensen, 1994).

Mikromolare Calciumkonzentrationen, Koffein und ATP aktivieren die Calciumausschüttung durch den Ryanodinrezeptor, während Magnesium, Calmodulin und millimolares Calcium inhibitorisch wirken (Meissner et al., 1986; Meissner, 1994). Wenig bekannt ist darüber, welche Moleküle in der Zelle die Calciumausschüttung regulieren und wo diese am Ryanodinrezeptor wirken. Auch die Bindungsstellen für die o.g. Modulatoren wurden nicht eindeutig festgelegt (Ogawa, 1994). Dagegen wurde ein sogenannter Leucin-Reißverschluß gefunden, der vermutlich neben den hydrophoben Wechselwirkungen einiger oder aller Transmembrandomänen, zur Polymerisierung der Untereinheiten beiträgt. Weiterhin wurde ein, bei den bisher bekannten RYR-Isoformen evolutionär konserviertes, RGD-Motiv identifiziert, das bei Proteinen der Zelladhäsion oder der Zellerkennung vorkommt und möglicherweise die Verbindung zwischen RYR und DHPR ermöglicht. (Ogawa, 1994).

Der Ryanodinrezeptor kommt in drei Isoformen im Muskelgewebe und Gehirn der Säuger bzw. in zwei Isoformen bei den übrigen Vertebraten vor (Ogawa, 1994). RYR1, die hier diskutierte Isoform, wird vom entsprechenden Gen *RYR1* auf Chromosom 19q13.1 codiert und ist im Skelettmuskel und in Purkinje-Zellen im Cerebellum exprimiert (McCarthy et al.,

1990; Otsu et al., 1990). RYR2, dessen Gen auf Chromosom 1q41.2-q43 kartiert, wird im Ventrikelmuskel, im Gehirn und in Endothelzellen exprimiert (Otsu et al., 1990; Hakamata et al., 1992). Die 3. Isoform wird hauptsächlich im Gehirn und in der glatten Muskulatur exprimiert, das Gen dafür liegt auf Chromosom 15q14 - q15 (Hakamata et al., 1992; Sorrentino et al., 1993). Die drei Formen beim Kaninchen sind evolutionär gut konserviert, besonders das C-terminale Zehntel des Proteins; die Homologie des gesamten Moleküls beläuft sich auf 66 - 70 % bezogen auf die Aminosäuresequenz (Ogawa, 1994).

Jede Untereinheit des Ryanodinrezeptors ist mit einem Molekül FKBP12 (FK506-bindendes Protein mit $M_r = 12$ kDa) assoziiert, das eine funktionale Bedeutung für den Calciumkanal hat (Jayaraman et al., 1992; Brillantes et al., 1994). Mit einer Größe von über 2,3 Millionen Da, inklusive assoziierter Proteine, imponiert der Ryanodinrezeptor als der größte bislang sequenzierte Ionenkanal (Orlova et al., 1996). Das Gen ist nicht minder imposant mit einer codierenden Sequenz von 15,3 kb organisiert in 106 Exons (Phillips et al., 1996).

2.1.5.3 Biochemie des MHS-Muskels

Im MHS-Muskel entgleist die Regulation des Calciums unter bestimmten Umständen und führt zu den beschriebenen Symptomen einer MH-Krise. Während der Ryanodinrezeptor im

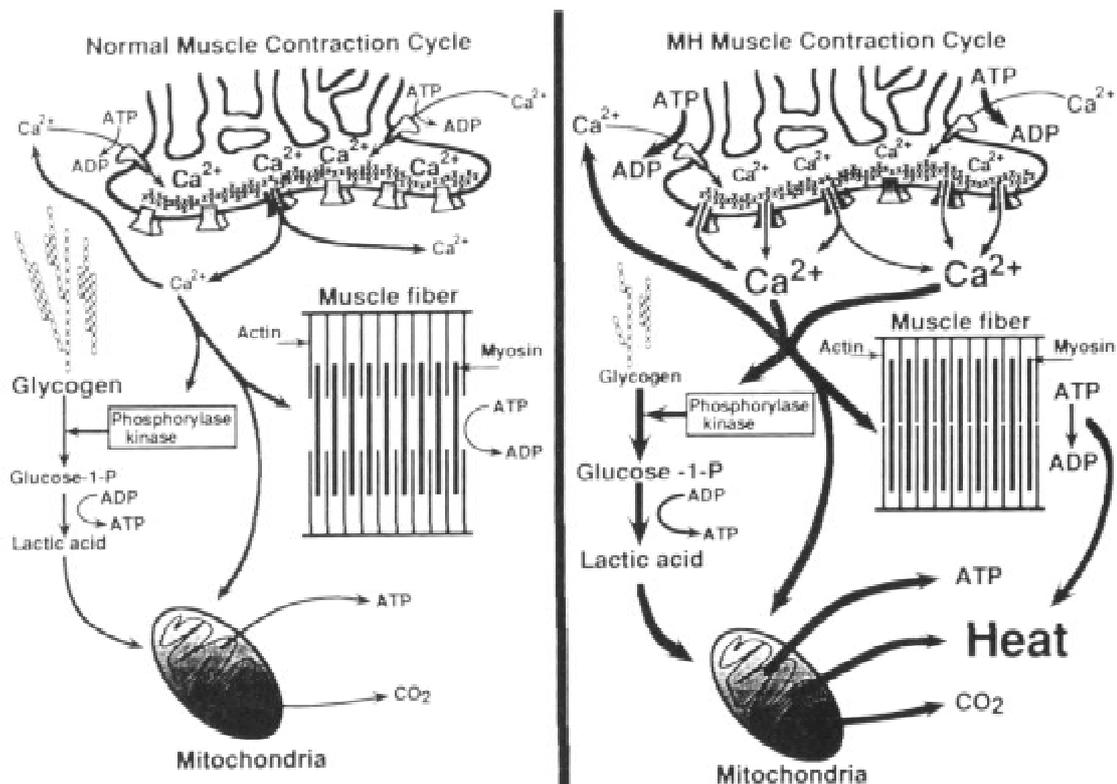


Abb. 2.1.5.3 Biochemie des normalen und des MHS-Muskels (aus: MacLennan & Phillips, 1992).

normalen Muskel eine relativ geringe Öffnungswahrscheinlichkeit hat, ist beim mutierten Rezeptor (R615C beim Schwein) die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht und der Kanal schließt langsamer (Mickelson & Louis, 1996). Auch die Freisetzungsrates für sarkoplasmatisches Calcium durch den Ryanodinrezeptor ist erhöht, wodurch das Myoplasma mit Ca^{2+} -Ionen überschwemmt wird. Der hohe Calciumeinstrom ins Myoplasma regt den kontraktile Apparat zu maximaler Aktivität an, was die Muskelsteifheit und den Masseterspasmus erklärt. Calcium verstärkt auch die Glykogenolyse, indem es die Phosphorylase-Kinase aktiviert und erhöht damit den Katabolismus (ATP-Produktion, Wärme). Die mitochondrialen Enzyme der Atmungskette, Pyruvat-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase und 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase scheinen durch Calcium aktiviert zu werden (Denton & McCormack, 1990) und tragen zur Erhöhung des Metabolismus bei. Letztendlich übersteigt jedoch der ATP-Bedarf die Synthese bei weitem und der Stoffwechsel schaltet um auf die ineffizientere, anaerobe ATP-Gewinnung durch Glykolyse, was die metabolische Azidose, den Anstieg des expiratorischen CO_2 , und das Sauerstoffdefizit im Blut erklärt (MacLennan & Phillips, 1992). Der Hypermetabolismus führt auch zu den Herz-/Kreislaufsymptomen mit Hypertonie, Arrhythmie und Tachycardie (Hartung, 1995). Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zur Schädigung der Zellmembran, verbunden mit einer zunehmenden Permeabilität für Ionen und Enzyme sowie andere Moleküle, die zu Hyperkaliämie, Hypercalciämie, einem Anstieg der Creatinphosphokinase (CK) und von Myoglobin im Blut und Rhabdomyolyse führen. Untherapiert münden diese Vorgänge aufgrund der sich autokatalytisch aufschaukelnden Pathomechanismen letztlich in den irreversiblen Zelluntergang (Roewer, 1991).

2.1.6 Genetik

2.1.6.1 Erbgang und Häufigkeit

Der Erbgang der MH-Veranlagung des Menschen wurde zunächst als autosomal dominant beschrieben (Kalow, 1970), nach neueren Erkenntnissen trifft dies zwar in vielen Fällen zu, jedoch geht man in einigen Fällen auch von einer multifaktoriellen Vererbung aus. Das Streßsyndrom beim Schwein (PSS) dagegen wird rezessiv bzw. intermediär vererbt. Der Erbgang ist autosomal rezessiv im Bezug auf die Streßanfälligkeit und die Halothan-Sensitivität im Halothan-Challenge-Test (Eikelenboom & Minkema, 1974), die fast nur bei homozygoten Trägern der Mutation R615C beobachtet wird, intermediär dagegen im Bezug auf andere Merkmale. Die Mutation R615C wurde bei allen Schweine-Zuchtrassen, bei

denen das PSS vorkommt, gefunden, und konnte auf einen Gründereffekt zurückgeführt werden. Die Mutation wurde deshalb so weit verbreitet, weil das PSS mit einem Heterozygoten-„Vorteil“ assoziiert ist, der sich in einem niedrigeren Fettanteil und einem hohen Anteil an magerem Muskelfleisch niederschlägt, weshalb diese Tiere wohl bevorzugt weitergezüchtet wurden (MacLennan & Phillips, 1992). Der Effekt beruht auf einer Muskelhypertrophie, die durch das heterozygote Vorliegen der Mutation bewirkt wird und man könnte diesen Phänotyp als intermediär ansehen zwischen normalem Phänotyp und PSS. Letztlich jedoch kann der Erbgang sowohl beim Menschen als auch beim Schwein, nicht in eines der klassischen Mendelschen Schemata zur Vererbung eingepaßt werden, aufgrund der beschriebenen Probleme. Lediglich die Homogenität der MHS beim Schwein scheint festzustehen, demgegenüber steht allerdings eine beträchtliche Heterogenität bei der menschlichen MHS.

Die Veranlagung zur Malignen Hyperthermie wurde in vielen ethnischen Gruppen und allen Altersstadien beobachtet. Eine deutliche Häufung findet sich jedoch unter Kindern und jungen Erwachsenen (ca. 3 - 30 Jahre), bei der Geschlechterverteilung überwiegen die Männer (Mauritz et al., 1986). Eine annähernd genaue Bestimmung der Inzidenz des MH-Syndrom scheitert daran, daß die Veranlagten keine klinischen Symptome zeigen und die Disposition erst durch eine unter Narkose aufgetretene MH-Episode zu Tage tritt. Dementsprechend unterschiedlich sind die Angaben der verschiedenen Autoren zur Häufigkeit (Übersicht bei de Vries et al., 1993). Während in einer Studie Ørding (1985) eine Inzidenz von 1 : 250000 Anästhesieereignissen in Dänemark berichtet, wurde im österreichischen Voralberg, wo MHS endemisch auftritt, eine Inzidenz von 1 : 1300 unter Jugendlichen beobachtet (Mauritz et al., 1986). Im Allgemeinen nimmt man eine klinische Inzidenz von 1 : 10000 bis 1 : 20000 Anästhesien an, für die fulminante Krise gilt ein Bereich von etwa 1 : 25000 bis 1 : 50000, während man die Anzahl genetisch disponierter Personen auf ca. 1 : 10000 schätzt (Hartung, 1995). Die Diskrepanz rührt daher, daß das MH-Syndrom eine reduzierte Penetranz aufweist: eine Narkose mit einer oder mehreren Triggersubstanzen muß bei einer disponierten Person nicht zwangsläufig zur MH-Krise führen. Eine oder sogar mehrere komplikationslos überstandene Narkosen besagen nicht, daß keine Prädisposition vorliegt; ein Patient wurde beschrieben, der erst nach der 13. Narkose eine Hyperthermiekrise manifestierte (Püschel et al., 1978). Dieser Aspekt ist gerade für CCD-Patienten wichtig, ist doch die CCD oft

vergesellschaftet mit operationspflichtigen Skoliosen, so daß dieser Personenkreis mit erhöhter Wahrscheinlichkeit einer Anästhesie unterworfen wird (NN, 1988).

Weiter erschwert wird die Feststellung der Inzidenz dadurch, daß es andere neuromuskuläre Krankheiten gibt, die ungewöhnliche Anästhesieereignisse hervorrufen können, deren Symptome einer MH-Episode ähneln: Muskeldystrophie Duchenne, Myotone Dystrophie, Hyperkalämische Periodische Paralyse, King Denborough Syndrom und Central Core Disease. Hierbei handelt es sich meist um sporadische Einzelfälle, die in keinem systematischen Zusammenhang mit der MH-Disposition stehen. Lediglich die beiden letztgenannten Erkrankungen sind regelmäßig mit MHS assoziiert (Brownell, 1988; Mortier, 1990).

2.1.6.2 Genetische Kartierung

Die Maligne Hyperthermie ist eine der ersten Erbkrankheiten, die aufgrund der evolutionären Konservierung einer gekoppelten Gruppe von Genen kartiert wurde. Ausgangspunkt war die von Andresen & Jensen (1977) beschriebene Koppelung zwischen der Halothan-Sensitivität (PSS) beim Schwein zum Locus *GPI*, der wiederum 1988 durch Davies et al. mittels in situ Hybridisierung auf Chromosom 6q12 kartiert wurde (Abb. 2.1.6.1). Mit dem *GPI*-Locus als Anker gelang es McCarthy das Gen für die menschliche MH-Veranlagung *MHS1* auf Chromosom 19q12 - q13.2 zu lokalisieren (McCarthy et al., 1989; McCarthy et al., 1990). MacLennan und Mitarbeiter fanden zur selben Zeit eine Koppelung zwischen MHS-Familien und dem *RYR1*-Locus (MacLennan et al., 1990), und MacKenzie et al. (1990) konnten das Gen für *RYR1* mit Somazellhybriden auf Chromosom 19q13.1 kartieren. Die Koppelungsgruppe mit den Genen *RYR1* (*CRC*), *COX6B*, *SCN1B*, *ZFP36*, *ATP4A* ist auch bei der Maus als Cluster von gekoppelten Genen auf Chromosom 7 repräsentiert, jedoch in einer invertierten Orientierung bezüglich der Achse Centromer - Telomer (Stubbs et al., 1996; Abb. 2.1.6.2, vgl. auch Abb. 4.1.3.1). Beim Rind ist die syntäne Koppelungsgruppe *GPI*, *CRC* (*RYR1*), *APOE* auf Chromosom 18q2.2 - q2.6 lokalisiert (Mohrenweiser et al., 1996). In der Tierzucht wird für das Ryanodinrezeptorgen auch das Symbol *CRC* für "Calcium release channel" benutzt.

Mittlerweile hat es sich jedoch gezeigt, daß lediglich die Hälfte der MHS-Familien zu Chromosom 19q13.1 gekoppelt sind, d.h. es liegt genetische Heterogenität vor. Es dauerte daher nicht lange, bis erste Familien vom *MHS1* Locus ausgeschlossen wurden (Levitt et al., 1991) und ein zweiter Locus auf Chromosom 17q11 - q24 gefunden wurde, zu dem fünf

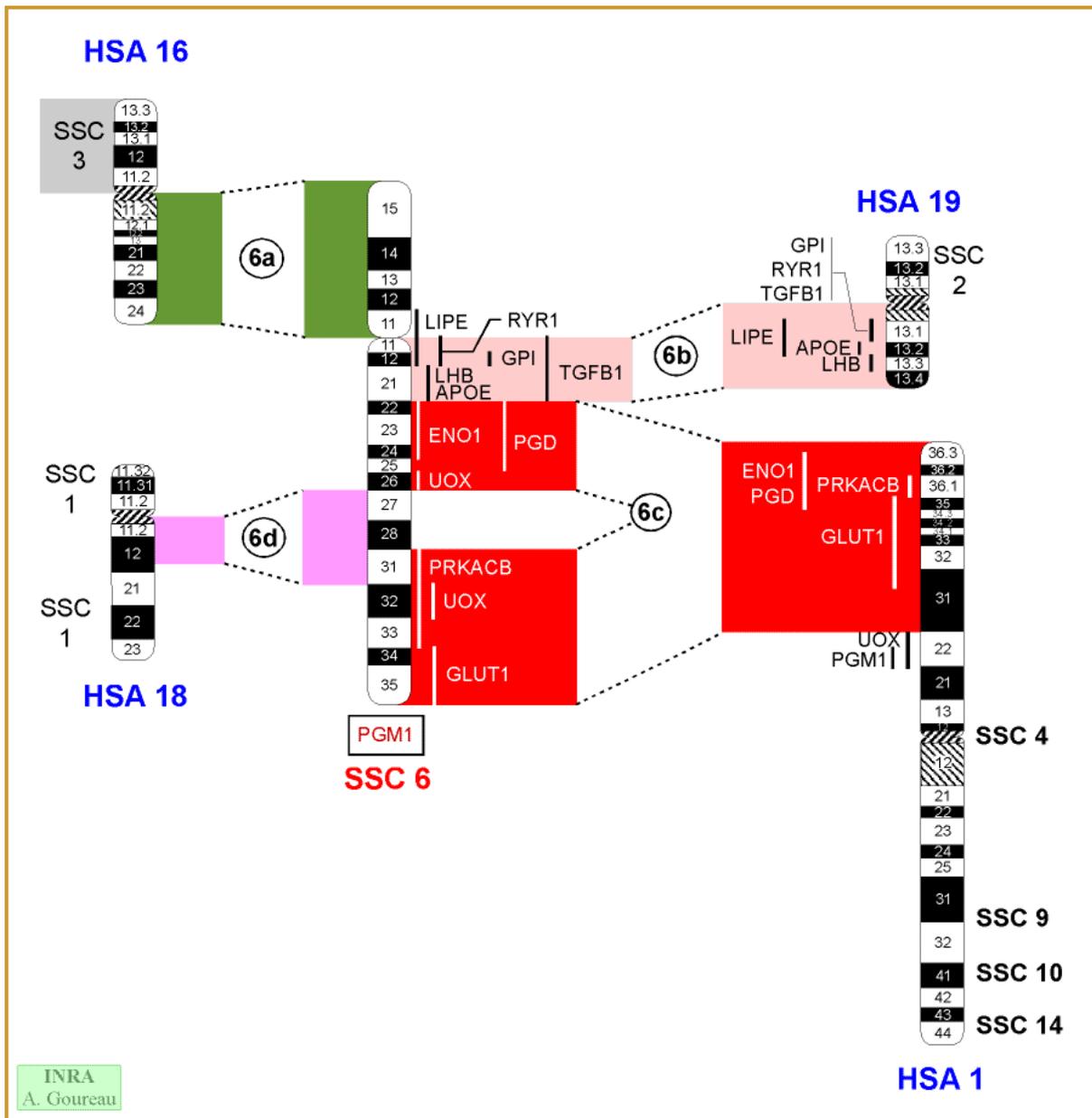


Abb. 2.1.6.1 Homologiekarte der Chromosomen 6 (Schwein) und 19 (Mensch). HSA: *Homo sapiens*, SSC: *Sus scrofa* (aus Yerle et al., 1997).

Familien gekoppelt sind (Levitt et al., 1992)¹. Iles et al., (1994) beschrieben Familien, die weder zu Chromosom 17 noch 19 gekoppelt waren und fanden einen dritten Locus *MHS3* auf Chromosom 7 mit flankierenden Markern für das Gen für *CACNL2A*, eine Untereinheit des DHP. Durch die Kartierung ergab sich auch gleich ein potentiell Kandidatengen, das

¹ Eine Koppelung zu Chromosom 17 in europäischen *MHS*-Familien konnte von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Iles et al., 1993). Rückblickend wurden auch Zweifel an der methodischen Korrektheit der Linkage-Berechnung laut, da in der zitierten Arbeit lod scores mehrerer kleiner Familien addiert wurden, was bei einer derart heterogenen genetischen Ursache nicht zulässig ist (C.R. Müller-Reible, persönl. Mitteilung).

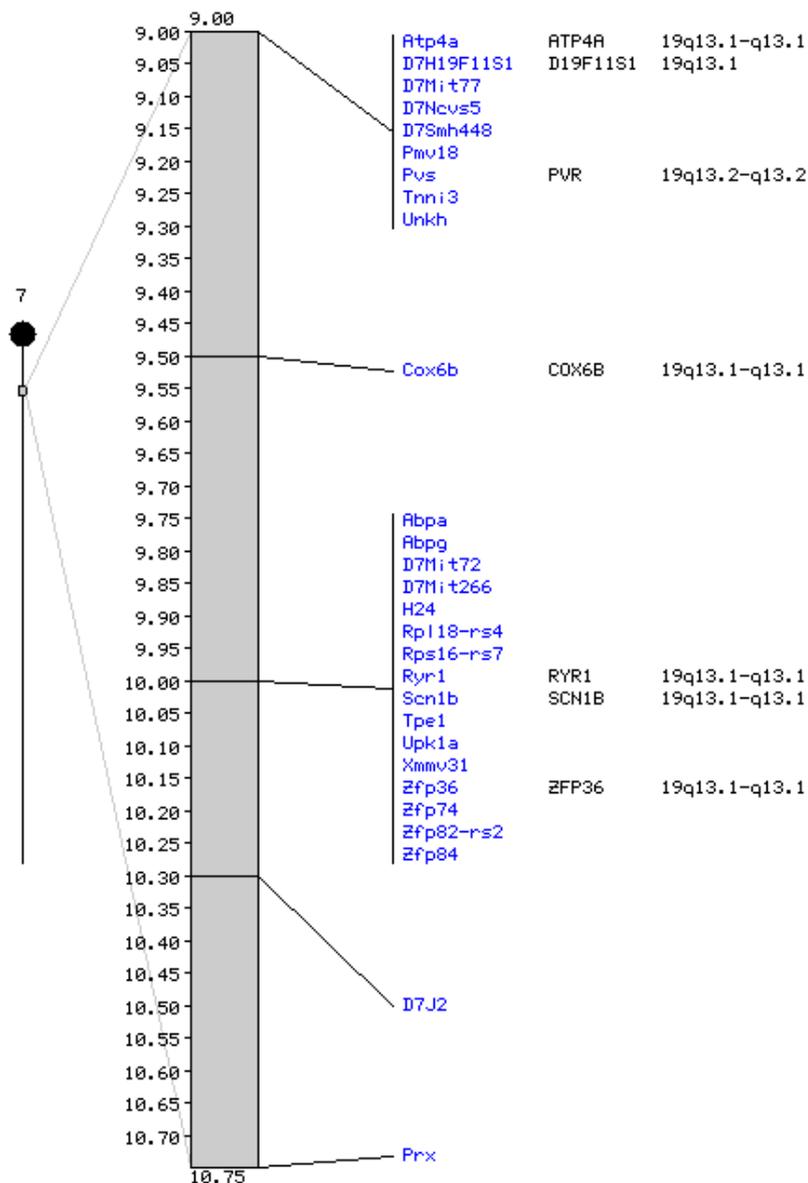


Abb. 2.1.6.2 Homologiekarte der Chromosomen 7 (Maus) und 19 (Mensch). Die Skala auf der linken Seite gibt die Kartenposition in cM an, rechts von der Karte sind die Gene der Maus angegeben, rechts davon die homologen Gene beim Menschen mit der chromosomalen Zuordnung. Mouse Genome Database (Oktober, 1998).

ursächlich für diese Form der MH sein könnte, bisher wurden aber keine Mutationen beschrieben. Ein weiterer MH-Locus wurde von Sudbrak et al. (1995) beschrieben auf Chromosom 3q13.1 (*MHS4*), hier findet sich jedoch aufgrund des großen Kandidatenintervalls kein geeignetes Kandidatengen, so daß man versucht, das verantwortliche Gen mit Positionsklonierung zu finden. In einer genomweiten Suche nach weiteren MH-Loci wurde in einer französischen Familie eine Koppelung zu Chromosom 1q32 gefunden (Robinson et al., 1997). Der Locus *MHS5* liegt in der Nähe des Gens für *CACNL1A3*, einer weiteren Untereinheit des DHPR. Monnier et al. (1997) haben schließlich in der Familie eine Mutation

Arg1086His gefunden, die wahrscheinlich kausal für MH in dieser Familie ist. In der genannten Arbeit von Robinson et al. (1997) wurde noch ein weiterer Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 vermutet, jedoch in einem sehr großen Kandidatenintervall und, bedingt durch eine Rekombinante, auch nicht mit einem signifikanten Lodscore. Darüber hinaus blieb noch eine weitere Familie, für die noch kein Locus gefunden wurde.

In Anbetracht der zahlreichen Proteine, die an der elektromechanischen Koppelung beteiligt sind, ist die beobachtete große Heterogenität der Malignen Hyperthermie nicht verwunderlich.

2.1.6.3 Physikalische Kartierung

Eine wesentliche Grundlage der vorliegenden Arbeit ist eine Publikation von Rouquier et al. (1993), sowie die darin vorgestellten Ressourcen, nämlich ein ~ 800 kb Cosmid-/YAC-Contig, das das komplette Ryanodinrezeptorgen enthält (Abb. 2.1.6.3). Dieses Contig war ebenfalls die Basis für die Etablierung der Exon-Intron Struktur von *RYR1* durch Phillips et al. (1996).

Am Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL) wurden menschliche Chromosomen 19 mittels Durchflußcytometrie isoliert (deJong et al., 1989) und für die Erstellung mehrerer Cosmid-Bibliotheken mit ca. 30000 Cosmiden benutzt. Außerdem bediente man sich bei der

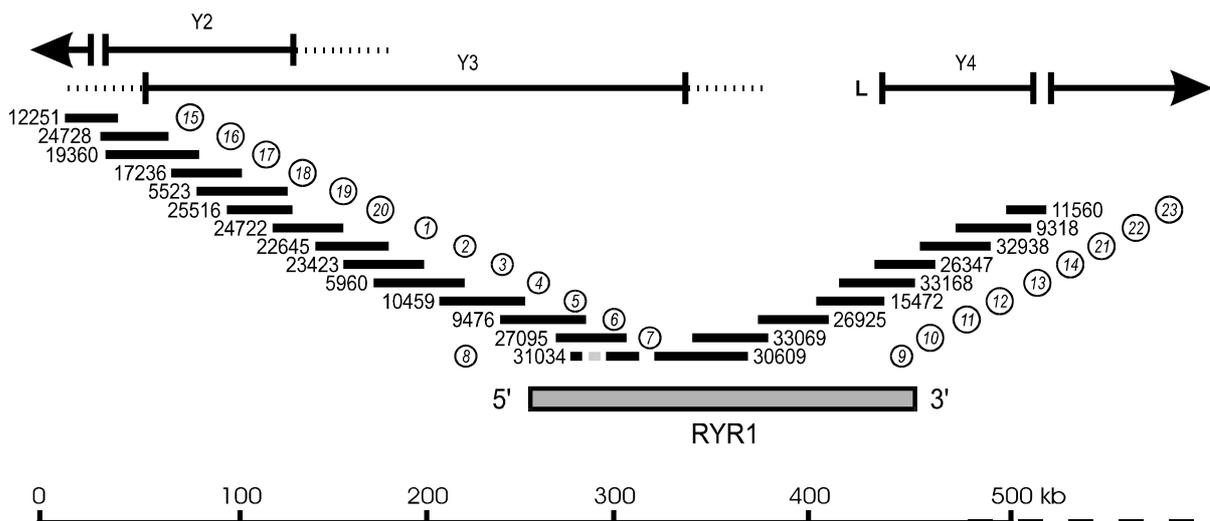


Abb. 2.1.6.3 Physikalische Karte des *RYR1* Cosmid- und YAC-Klon Contig des Lawrence Livermore National Laboratory (Rouquier et al., 1993). Die genomische Region des *RYR1*-Gens wird abgedeckt durch 23 Cosmidklone, repräsentiert durch eine horizontale Linie. Die Pfeile darüber bezeichnen die YAC-Klone, die durchgehenden Linien den zum *RYR1*-Contig gehörenden Anteil der YACs, unterbrochene Linien bezeichnen den chimären Anteil. Die vier- bis fünfstelligen Nummern neben jedem Cosmidklon ist die Originalbezeichnung des Klons, die Nummern im Kreis sind eine Kurznamenklatur (vereinfacht, nach Rouquier et al., 1993).

Erstellung des Contigs einer YAC-Bibliothek des Imperial Cancer Research Fund, London (18000 Klone; Larin et al., 1991). Eine Ryanodinrezeptor-cDNA (Zorzato et al., 1990) diente als Sonde, um die Bibliotheken nach genomischen Klonen mit dem Ryanodinrezeptorgen zu durchsuchen. Die Cosmide wurden mittels einer automatisierten Restriktionsfragment-“Fingerprint” Prozedur in überlappende Abschnitte (“Contigs”) angeordnet (Carrano et al., 1989). In der Publikation von Rouquier et al. (1993) wurde die Größe des Ryanodinrezeptorgens noch mit ~ 205 kb angegeben, während Phillips et al. eine Größe von 160 kb ermittelten.

Das dargestellte Cosmid-/YAC-Contig (Abb. 2.1.6.3) gehört zu einem Teilprojekt des Humangenom-Projekts am LLNL, das die Klonierung, Kartierung und Sequenzierung des menschlichen Chromosoms 19 vorsieht. Zum derzeitigen Zeitpunkt (Oktober 1998) sind ca. 54 Mb genomische DNA in Form von YACs, PACs, BACs und Cosmiden kloniert, das sind etwa 98 % des ganzen Chromosoms, davon ist ein Sechstel (9,3 Mb) bereits sequenziert.

2.2 Die Central Core Disease (CCD)

2.2.1 Definition

Die Central Core Disease (CCD, MIM #117000) ist eine seltene, kongenitale Myopathie, die einhergeht mit allgemeiner Hypotonie und Muskelschwäche hauptsächlich der proximalen, unteren Extremitäten. Namengebend sind die, nur im histologischen Präparat sichtbaren, amorphen, scharf begrenzten Areale ("cores"), die i.d.R. zentral ("central") in den meisten Typ I-Muskelfasern liegen. Im Deutschen wird die Krankheit als Zentralfibrillen-Myopathie bezeichnet. Die Erstbeschreibung erfolgte 1956 durch Shy & Magee, der Name "Central Core Disease" wurde von Greenfield et al. (1958) erstmals erwähnt. Die CCD wird den kongenitalen Myopathien bzw. Strukturmyopathien zugerechnet und damit von den metabolischen und den mitochondrialen Myopathien differenziert (Wallgren-Pettersson & Clarke, 1997). Kongenitale Myopathien beruhen auf strukturellen Abnormitäten des Skelettmuskels, die nach enzymatischer Anfärbung histologischer Schnitte zu Tage treten.

2.2.2 Klinik

Der Schweregrad der klinischen Symptome der Central Core Erkrankung ist extrem variabel, das Spektrum reicht dabei von praktisch gesunden, asymptomatischen Trägern bis zur lebenslangen Gehunfähigkeit. In der Regel fallen betroffene Kinder bereits in den ersten Lebensjahren auf durch eine verzögerte Entwicklung der motorischen Fähigkeiten, Hypotonie und eine milde, nicht oder schwach progressive Muskelschwäche (Shy & Magee, 1956). Durch die verzögerte statomotorische Entwicklung lernen die Kinder oft erst im Alter von 3 oder 4 Jahren laufen. Im späteren Leben treten oft Probleme auf beim Rennen, Treppensteigen oder beim Aufstehen aus einer sitzenden Position.

Das Alter der Erstdiagnose liegt entweder zwischen 0 - 5 Jahren (12 Fälle, n = 75) oder im jugendlichen oder Erwachsenenalter (39/75 zwischen 11 und 40). Die Erstdiagnose erfolgt dagegen eher seltener über 40 (11 Patienten) oder zwischen 5 und 10 Lebensjahren (8 Fälle) (Übersicht bei Shuaib et al., 1987).

Die Intelligenz ist normalerweise nicht reduziert, die Lebenserwartung ist, von besonders schweren Verlaufsformen abgesehen, nicht erniedrigt (Wallgren-Pettersson & Clarke, 1997).

2.2.2.1 Muskulatur

Über 40 % der Patienten (n = 75) berichten über eine generalisierte Muskelschwäche, bei weiteren 27 % sind die oberen und unteren Extremitäten betroffen (Übersicht bei Shuaib et al., 1987), während eine Beteiligung der Gesichtsmuskulatur nur selten zu beobachten ist. In der Mehrzahl der Fälle sind die proximalen Muskeln stärker betroffen als die distalen, die Beine mehr als die Arme (Dubowitz & Roy, 1970; Shuaib et al., 1987). In einer Studie an 13 CCD-Patienten von Shuaib et al. (1987) waren jedoch bei vier von acht Patienten mit einer Muskelschwäche auch die Gesichtsmuskeln betroffen und bei drei die Nackenmuskulatur. Die restlichen fünf Patienten hingegen hatten überhaupt keine Muskelschwäche. Selbst wenn eine Muskelschwäche vorhanden ist, sind die Symptome insgesamt jedoch meist mild, so daß die Patienten hierdurch nicht sehr stark eingeschränkt sind. Die Schwäche der Muskulatur bleibt im Normalfall über längere Zeit stationär, gelegentlich verschlechtert sich die Symptomatik allmählich, andererseits wurde auch eine leichte Verbesserung in manchen Fällen beobachtet. In seltenen Fällen jedoch, verläuft die Erkrankung stark progredient. Shuaib et al. (1987) berichten von einem Patienten (n=13), der nie selbstständig laufen lernte und im Alter von vier Jahren bereits an den Rollstuhl gebunden war.

In einem Drittel aller Fälle wird die Muskelschwäche von einer milden Muskelatrophie begleitet, wobei die beiden Phänomene korreliert sind, die am stärksten atrophierten Muskeln weisen auch die größte Schwäche auf.

Die Sehnenreflexe sind häufig nicht auslösbar oder stark vermindert, im Patientenkollektiv von Shuaib et al. (1987) hatten jedoch 12 von 13 Patienten normale Reflexe.

Die Werte für die Serum Creatin-Kinase (CK), ein Enzym des Muskelstoffwechsels, sind normal oder nur leicht erhöht (Wallgren-Pettersson & Clarke, 1997). Das EMG ist meist normal, kann aber auch myopathisch ausgeprägt sein.

In Einzelfällen wurde auch über zusätzliche, ungewöhnliche Symptome berichtet, wie Muskelsteifheit nach körperlicher Belastung oder Alkoholgenuß sowie über Muskelkrämpfe.

2.2.2.2 Skelettanomalien

Häufig werden die muskulären Symptome auch von Fehlbildungen des Skeletts begleitet. Diese treten auf in Form einer Kyphoskoliose (seitliche Verbiegung der Wirbelsäule sowie Torsion der Wirbelkörper mit daraus folgender Buckelbildung), Hüftgelenksluxation,

Kontrakturen und Deformationen des Fußes (Wallgren-Pettersson & Clarke, 1997). Die Skoliose verläuft meist progressiv und wird dann operationspflichtig. Sie ist mit 37 % (26/75 Fälle) die häufigste Skelettanomalie bei CCD (Shuaib et al., 1987). Ebenfalls häufig (~ 20 %) bei CCD-Patienten beobachtet wird die Hüftgelenksluxation, eine Verrenkung des Hüftgelenks, bei der der Kopf des Femurs aus der Gelenkpfanne tritt. Auch die Hüftgelenksluxation wird chirurgisch korrigiert. Etwa gleich häufig wie die Hüftgelenksluxation treten Deformationen des Fußskeletts auf, wie Pes cavus (Hohlfuß) und Pes planus (Plattfuß). Ein eher selteneres Phänomen ist die Hypermobilität einzelner Gelenke.

2.2.2.3 Herzsymptomatik

Bei einigen anderen Myopathien sind Herzarrhythmien, Kardiomyopathien, Erkrankungen der Herzklappen oder der plötzlich Kindstod (SIDS, "Sudden infant death syndrome") als gelegentlich assoziierte Erscheinungen mehrfach beschrieben. Für die Central Core Disease gab es nur einzelne Berichte einer kardialen Involvierung. Smith et al. (1976) beschrieben bei acht von 11 Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie strukturelle Veränderungen in der Muskelbiopsie, die Hälfte hiervon war von CCD betroffen. In einer Arbeit von Fananapazir et al. (1993) wurde ebenfalls eine Assoziation von CCD und hypertropher Kardiomyopathie postuliert, die auf Punktmutationen im Gen für eine Myosin-Isoform beruhen soll. Im Patientenkollektiv von Shuaib et al. (1987) fand sich bei knapp einem Viertel (3/13) ein Mitralklappenprolapsyndrom und die Autoren empfahlen daher jeden CCD-Patienten auf eine kardiale Involvierung zu untersuchen.

2.2.2.4 Assoziation mit anderen Erkrankungen

Maligne Hyperthermie

Bereits 1973 wurde von Denborough und Mitarbeitern eine Assoziation zwischen der Central Core Disease und Episoden von Maligner Hyperthermie beschrieben. In der darauffolgenden Zeit wurden weitere Fälle gefunden, in denen beide Syndrome assoziiert waren (Eng et al., 1978; Frank et al., 1980; Wedel, 1992). Harriman (1982) beobachtete das Vorkommen von CCD mit einer Häufigkeit von 6 % bei MHS-getesteten Probanden, allerdings schienen die Symptome nicht immer der Charakteristik einer "klassischen" CCD zu entsprechen. In der retrospektiven Studie von Shuaib et al. (1987) wurden 13 Fälle von Central Core Disease unter 750 Muskelbiopsien (entsprechend 1,73 %) gefunden. Bei 11 der 13 Patienten, die aus vier verschiedenen Familien stammten, wurde eine IVCT-Diagnostik durchgeführt, und bei

allen eine Veranlagung zur MH diagnostiziert. Auch hier gab es Abweichungen in der relativen Häufigkeit einzelner Symptome im Vergleich zu 62 CCD-Fällen aus der Literatur. Auf der anderen Seite schätzten Krisovic-Horber & Krisovic (1989), daß nur 28 % der CCD-Patienten auch eine Veranlagung für Maligne Hyperthermie-Krisen haben.

Die genaue Grundlage der Assoziation zwischen CCD und MHS bleibt daher unklar. Zwar wurde ein Locus für MHS auf Chromosom 19q13.1, im selben Intervall des CCD-Locus (s. u.) gefunden und eine Allelie beider Loci mit dem *RYR1*-Gen postuliert, jedoch kann die genetische Assoziation zwischen CCD und MHS auch zufälliger Natur sein.

Hypertrophe Cardiomyopathie

Wie bereits beschrieben, scheint in einigen Fällen eine Assoziation zwischen CCD und HCM vorzuliegen. Dies ist jedoch ein eher seltenes Phänomen und die Trennung zwischen primären und sekundären Effekten nicht eindeutig.

Nemaline Myopathie

Die Nemaline Myopathie gehört, ebenso wie die Central Core Disease, zum Formenkreis der kongenitalen Myopathien (Strukturmyopathien) und ist klinisch bedeutsam für die Differentialdiagnostik der CCD, da die Symptome ähnlich sind. Assoziationen zwischen beiden Erkrankungen sind eher selten. In einem Fall, den Afifi et al. (1965) beschrieben, kamen beide Erkrankungen bei demselben Patienten vor. Thomas (1997) beschreibt ebenfalls einen sporadischen Fall mit einer koexistierenden Nemalinen Myopathie und Central Core Disease, weitere Fälle wurden von Fardeau & Tomé (1994) beobachtet. Möglicherweise ist bei beiden Krankheiten der Entstehungsmechanismus ähnlich, die involvierten Gene müssen jedoch nicht notwendigerweise dieselben sein.

2.2.2.5 Differentialdiagnostik

Die Diagnose der Central Core Disease erfolgt in der Zusammenschau der klinischen Symptomatik mit der Histopathologie (Wallgren-Pettersson & Clarke, 1997), da die klinische Symptomatik variabel ist und die Expressivität, selbst innerhalb einer Familie, sehr unterschiedlich sein kann. Am ehesten kann CCD mit anderen kongenitalen Strukturmyopathien, allen voran die Nemaline Myopathie, sowie die angeborene Fasertypendisproportion (CFTD, "Congenital fibre type disproportion") verwechselt werden, aber auch die Gliedergürteldystrophie (LGMD, "Limb-girdle muscular dystrophy), die

mitochondrialen Myopathien oder die Spinale Muskelatrophie (SMA) weisen eine ähnliche Symptomatik auf. Oft ergibt erst die Histopathologie genauen Aufschluß über die Krankheitsursache, jedoch auch hier kann es Interferenzen mit anderen Myopathien geben, da einige histologische Merkmale der Krankheit auch mehr oder weniger unspezifisch bei anderen Myopathien vorkommen können (Wallgren-Pettersson & Clarke, 1997).

2.2.3 Histopathologie

Das namensgebende Kennzeichen der Erkrankung sind die “central cores”, die man an histologischen Schnitten von frischen Muskelbiopsaten beobachten kann. Am besten können die cores dargestellt werden mit Färbetechniken, die auf dem Nachweis mitochondrialer Enzymaktivitäten beruhen, wie z.B. die NADH-Dehydrogenase- oder Succinat-Dehydrogenase-Färbung (s. Abb. 2.2.3.1; Fardeau & Tomé, 1994). Im quergeschnittenen Muskel erkennt man meist zentral, gelegentlich auch exzentrisch liegende, meist scharf abgegrenzte Areale, die “cores” (Greenfield et al., 1958), die frei sind von Mitochondrien und Glykogen. Diese hellen Bereiche verminderter oder fehlender Enzymaktivität kontrastieren hierbei mit den umgebenden, normal reagierenden Bereichen, gelegentlich jedoch sind die cores auch von einem stärker anfärbenden, nicht membranösen Rand umgeben. Die cores treten meist einzeln, gelegentlich multipel auf und sind auf Typ I-Muskelfasern beschränkt. Im Längsschnitt erkennt man, daß sich die cores über die ganze Länge der Muskelfaser erstrecken.

Meist besteht auch eine erhebliche Abweichung von der normalen Fasertypenverteilung (Fasertypendisproportion), sowie mehr oder weniger ausgeprägte Kaliberschwankungen. Im normalen quergestreiften Muskel sind ca. 65 % der Fasern vom Typ I und 35 % vom Typ II, im CCD-Muskel findet man dagegen einen erhöhten Anteil Typ-I Fasern (Dubovitz & Roy, 1970). Die Faserdominanz kann soweit gehen, daß praktisch alle Fasern vom Typ I sind. Der Anteil der Typ-I Fasern mit cores schwankt beträchtlich und reicht von wenigen Prozent bis hin zur Anwesenheit von cores in praktisch allen Typ-I Fasern.

Im elektronenmikroskopischen Bild (Abb. 2.2.3.2) imponieren die cores durch ihren Gehalt an dicht gepacktem myofibrillärem Material, das seine regelmäßige Anordnung verloren hat. Je nachdem ob die Struktur der Sarcomere erhalten bleibt oder nicht, bezeichnet man die cores als strukturiert oder unstrukturiert (Neville & Brooke, 1973). Dachte man zunächst, beide Formen würden unterschiedliche Typen von Patienten repräsentieren, konnte später die Koexistenz bei demselben Patienten, sowie in derselben Muskelbiopsie, ja sogar in derselben

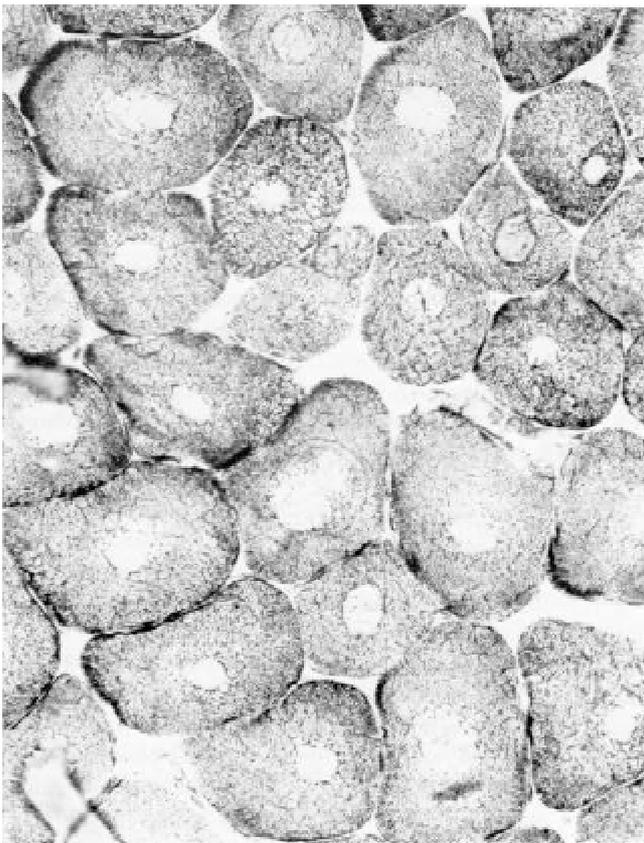


Abb. 2.2.3.1 Muskelfaserquerschnitt eines CCD-Patienten. Deutlich erkennbar sind die Kaliberschwankungen, die Typ-I Faserdominanz und die zentralen "cores" in nahezu allen Typ-I Fasern. Die hellen Bereiche sind frei von Mitochondrien und Glykogen, bei einigen cores tritt der Rand verstärkt hervor. NADH-TR, 250 x (aus: Byrne et al., 1982).

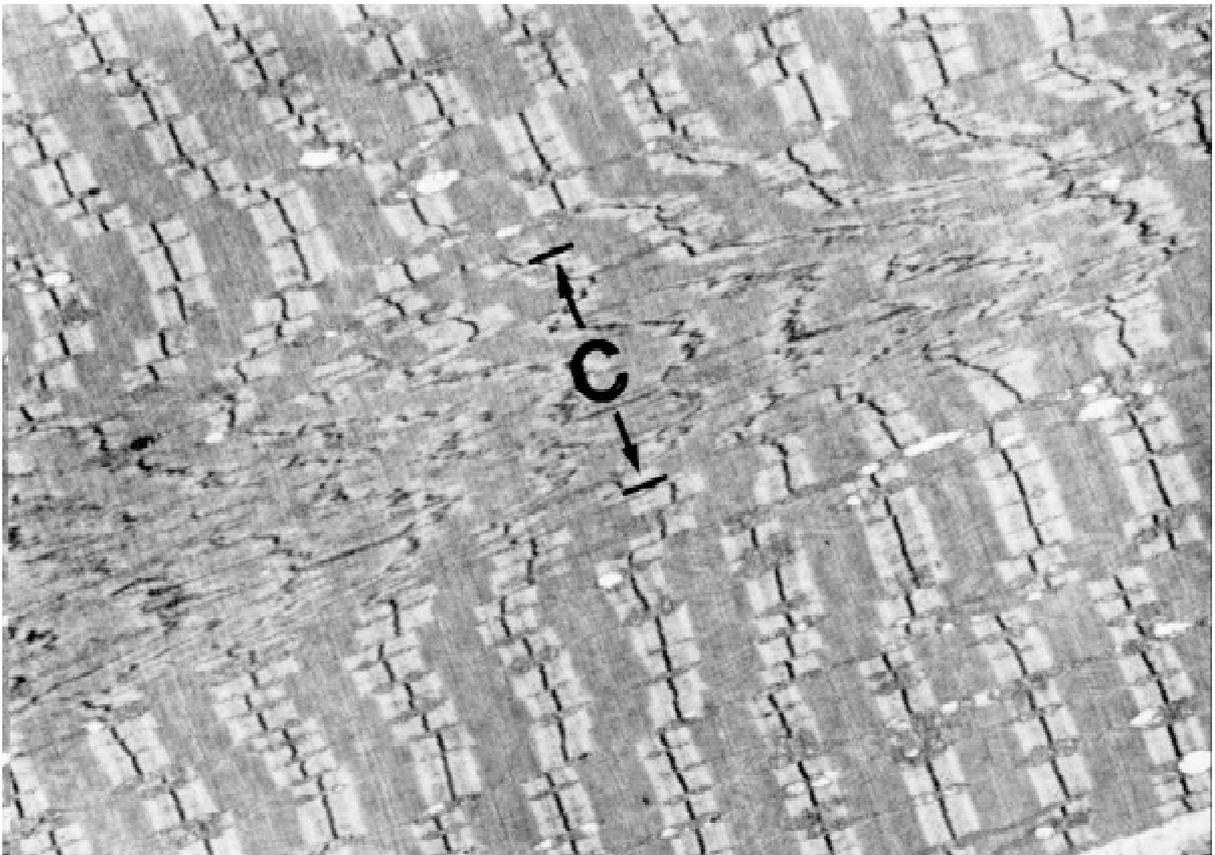


Abb. 2.2.3.2 Longitudinalschnitt durch die Muskelfaser eines CCD-Patienten. Im Bereich des "cores" (C) ist die myofibrilläre Struktur massiv gestört, die Z-Scheiben sind stark gezackt und die Struktur der Sarcomere hat sich aufgelöst. Elektronenmikroskopische Aufnahme, 8750 x (aus: Byrne et al., 1982).

Muskelfaser gezeigt werden (Isaacs et al., 1975). Die Z-Scheiben sind verbreitert und zackig verformt und das normale Muster der Querstreifung kann vollständig verschwunden sein. Der Übergang zwischen dem core-Bereich und den umliegenden normalen Myofibrillen kann bisweilen ziemlich abrupt sein.

Immunohistologische Untersuchungen an central cores zeigten eine Überexpression von Actin, α -Actinin und dem Actin-bindenden Protein Gelsolin (Busby & Squier, 1998). Schon länger bekannt ist die veränderte Desminexpression, die in den cores vermindert und an den Rändern der cores verstärkt ist (Vita et al., 1994). Die Bedeutung der veränderten Proteinexpression für die Ätiologie der CCD ist unklar, zumindest bei Desmin jedoch scheint es sich um einen unspezifischen Effekt zu handeln, der als Sekundärphänomen bei anderen Myopathien ebenfalls auftreten kann (Busby & Squier, 1998)

2.2.4 Genetik

Bereits Shy & Magee (1956) beschrieben den Erbgang der Central Core Disease als autosomal dominant. Es folgten zahlreiche Familienstudien, in denen der Erbmodus bestätigt wurde, unter anderem in einer australische Familie, in der die Segregation über fünf Generationen verfolgt werden konnte (Byrne et al., 1982). Zwar wurde gelegentlich ein autosomal rezessiver Erbgang bei sporadischen Fällen vermutet, oft ist dies jedoch auf eine ungenaue Familienanamnese zurückzuführen (Bodensteiner, 1994). Zumindest sollte von beiden Eltern des Probanden eine Muskelbiopsie histologisch untersucht werden, um klinisch unauffällige Überträger zu erkennen (Wallgren-Pettersson & Clarke, 1997).

Über die Häufigkeit der Krankheit gibt es keine verlässlichen Angaben. Wallgren-Pettersson & Clarke (1997) schätzen die Inzidenz aller kongenitalen Myopathien auf 0,06 pro 1000 Lebendgeburten, das entspricht etwa einem Zehntel aller neuromuskulären Erkrankungen.

Schon kurz nach der genetischen Kartierung der MHS auf Chromosom 19q13.1 durch McCarthy et al. (1990) und MacLennan et al. (1990) und der Etablierung von *RYR1* als Kandidatengen, wurden aufgrund der klinischen Assoziation der MHS mit CCD Koppelungsanalysen mit CCD-Familien und Chromosom 19 Markern zur Kartierung des CCD-Locus durchgeführt. Gleichzeitig fanden Haan et al. (1990) sowie Kausch et al. (1991) unabhängig voneinander eine statistisch signifikante Koppelung der CCD-Familien zu den Bereichen 19q12 - q13.3 bzw. 19q13.1. Beide Arbeitsgruppen publizierten 1993 eine

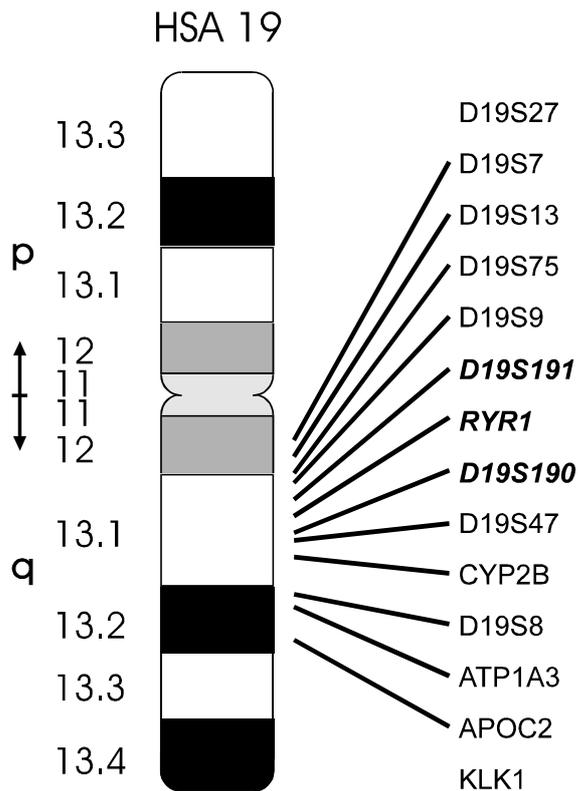


Abb. 2.2.4.1 Ideogramm des menschlichen Chromosoms 19 mit Mikrosatelliten- und VNTR-Markern. Der CCD-Locus wurde mit einem Lodscore von 11.8 bei einem $q = 0$ in das Intervall *D19S191 - D19S190* (kursiv) kartiert (Mulley et al., 1993). Zu den flankierenden Markern gab es Rekombinationen in der CCD-Familie (reproduziert aus Mulley et al., 1993).

verfeinerte genetische Kartierung, bei der das Kandidatenintervall auf Chromosom 19q13.1 eingegrenzt wurde zwischen den Markern D19S190 und D19S191 und damit in der Nähe des Ryanodinrezeptorgens (Abb. 2.2.4.1).

Kurz nach der genetischen Kartierung erschienen erste Berichte von Mutationen im *RYR1*-Gen in CCD/MHS-Familien, nämlich die Aminosäureaustausche Arg163Cys und Ile403Met (Quane et al., 1993) sowie Arg2434His (Zhang et al., 1993). Man vermutete, daß CCD und MHS, zumindest in einigen Fällen, allelische Ausprägungen ein und desselben Gens, nämlich des Ryanodinrezeptorgens (*RYR1*) sind, wobei jedoch für die Auslösung der CCD weitere Gene oder Faktoren eine Rolle spielen können.

Das Verhältnis zwischen MHS und CCD wird zusätzlich kompliziert dadurch, daß möglicherweise auch die CCD heterogene Entstehungsmechanismen aufweist. Fananapazir et al. (1993) fanden in den Skelettmuskelbiopsien von Patienten (17/25) mit familiärer hypertropher Kardiomyopathie (HCM) cores, die charakteristisch für CCD erschienen. Diese HCM-Patienten trugen eine von vier verschiedenen Mutationen im Gen für die schwere Kette des β -Myosins (*MYH7*), allerdings hatten nur zwei eine Muskelschwäche und keiner hatte Skelettdeformationen. Die Autoren der genannten Arbeit schlossen daraus, daß ein Teil der Patienten mit einer familiären HCM, die auf Mutationen im *MYH7*-Gen basiert, auch anfällig für CCD ist.

Das weite Spektrum der klinischen Symptomatik ist Zeichen einer sehr variablen Expressivität. Die Penetranz, d.h. die konditionale Wahrscheinlichkeit beim Vorliegen eines bestimmten

Genotyps einen entsprechenden Phänotyp zu beobachten, für die CCD liegt sicher deutlich unter 1,0, wenn man die symptomlosen Überträger berücksichtigt,.

2.3 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der im Institut eingehenden Kasuistiken sollten weitere CCD-Familien gesammelt und, wo möglich, auch mit Chromosom 19 bzw. 14 Mikrosatelliten untersucht werden. Das Kandidatenintervall für die CCD sollte anhand eventuell aufgetretener genetischer Rekombinationen verkleinert werden, im Hinblick auf die Frage der mutmaßlichen Allelie zwischen CCD und MHS und der Rolle des *RYR1*-Gens für die Ätiologie der CCD. Mit einer oder mehreren Rekombinationen wäre es möglich, das Kandidatenintervall einzuengen und je nach Lage der Rekombination(en) das Ryanodinrezeptorgen als Kandidat zu bestätigen oder auszuschließen. Eine möglichst genaue genetische Kartierung ist auch im Hinblick auf eine Positionsklonierung wünschenswert, da hierdurch der physikalisch zu kartierende und zu untersuchende Bereich auch kleiner wird. Die Feinkartierung hängt im Wesentlichen davon ab, wie dicht die beiden noch rekombinationsfreien Marker D19S191 und D19S190 beieinander liegen sowie von der Anzahl der Meiosen, sprich der Anzahl der Familien. Wie die Abb. 2.2.4.1 zeigt, gab es zu Beginn der Arbeit keine Mikrosatelliten-Marker in dieser Region, die hinreichend genau kartiert waren, deshalb galt es zunächst, neue Mikrosatelliten-Marker für diesen Bereich zu entwickeln, um diese dann für eine Feinkartierung verwenden zu können. Daneben sollte die Integration von physikalischer und genetischer Karte aus dem Bereich 19q13.1 durch STS-Kartierung mit neuen Mikrosatelliten-Markern, die von anderen Arbeitsgruppen charakterisiert wurden, erreicht werden. Grundlage dieser Arbeit waren die Klone des von Rouquier et al. (1993) publizierten, in Abb. 2.1.6.3 dargestellten Cosmid/YAC-Contig.

Um der Frage nach der Allelie von CCD und MHS detaillierter nachzugehen, sollten die CCD-Familien auf bereits bekannte Mutationen im Ryanodinrezeptorgen untersucht werden. Im Rückblick war aufgrund der engen genetischen und klinischen Assoziation, die Annahme naheliegend, daß sowohl CCD als auch MHS auf Mutationen im Gen für den Ryanodinrezeptor des Skelettmuskels beruhen. Demzufolge waren bislang auch keine anderen Gene auf eine ätiologische Involvierung hin untersucht worden. Ging man bisher von einem monogenen Erbgang aus, so deuten neuere Familienuntersuchungen auf einen komplexeren Entstehungsmechanismus hin. Neben einer genetischen Heterogenität, die relativ einfach durch

Koppelungsanalysen überprüft werden kann, besteht auch die Möglichkeit des Zusammenwirkens zweier oder mehrerer benachbarter Gene und letztlich wäre es auch denkbar, daß die Assoziation zwischen CCD und MHS zufällig ist und daß zwei verschiedene, aber physikalisch benachbarte Gene für die beiden Krankheiten verantwortlich sind (zumindest bei der MHS war die genetische Heterogenität bereits bekannt).

Dementsprechend bestand der zweite Schwerpunkt der Arbeit in der Suche nach potentiellen Kandidatengenen in der genomischen Region 19q13.1. Ein erster Ansatz hierzu bestand in der Identifizierung muskulärer Transkripte, die ihren genomischen Ursprung in der Kandidatenregion haben. Die Technik, die hier angewendet werden sollte, die cDNA-Selektion, setzt auf die Isolierung von RNA aus dem Zielgewebe, das Umschreiben in cDNA und die Hybridisierung mit klonierter, genomischer DNA aus der Zielregion. Als Ergebnis sollte man eine Miniaturbibliothek mit Transkripten erhalten, die spezifisch ist bezüglich der Expression im gewünschten Gewebe und der chromosomalen Herkunft und die dann näher charakterisiert werden kann, um letztlich die CCD-Patienten auf Mutationen in diesen Transkripten zu untersuchen. Dieser Teil der Arbeit basierte ebenfalls auf dem bereits erwähnten YAC/Cosmid-Contig von Chromosom 19q13.1. Ein zweite Möglichkeit zur Suche nach Kandidatengenen ist, basierend auf dem raschen Voranschreiten des Humangenom Projektes, die Suche in Datenbanken nach Genen, die im Skelettmuskel exprimiert werden und von dritter Seite charakterisiert und sequenziert wurden. Dieses Vorgehen bezeichnet man mittlerweile mit dem Begriff "In silico cloning". Auch hier steht am Ende die Untersuchung auf Mutationen in diesen Transkripten bei CCD-Patienten.

Die Beschäftigung mit den molekularen Ursachen der CCD begründete sich nicht in erster Linie in der klinischen Relevanz dieser seltenen Myopathie, wenngleich der Leidensdruck der schwer betroffenen Patienten erheblich sein kann. Vielmehr erschien die molekular- genetische Analyse von CCD und MHS als ein geeigneter Ansatzpunkt für die weitere Erforschung der elektromechanischen Koppelung, eines grundlegenden, komplexen Prozesses der Muskelfunktion. Die zu Beginn der Arbeit vorherrschende Hypothese der Allelie von CCD und MHS erschien insofern nicht zwingend, als einerseits die permanente Muskelschwäche der CCD und andererseits die Übererregbarkeit des MHS-Muskels durch Mutationen ein- und desselben Gens erklärt werden müssen.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1 Die CCD-Patienten

Von Fachärzten und Kliniken wurde Blut von Patienten mit Verdacht auf CCD mit dem Auftrag für eine molekulare Diagnostik des *RYR1*-Gens an das Institut für Humangenetik geschickt. Am Institut sind derzeit 151 Personen aus CCD-Familien erfaßt, darunter sind 75 Patienten in 44 Familien, von denen DNA für molekulargenetische Analysen zur Verfügung steht. Von den 75 Patienten sind 37 männlichen Geschlechts, 34 sind weiblich, das Geschlecht der übrigen ist nicht bekannt, weil diese Patienten nicht näher dokumentiert sind. Die CCD-Patienten und ihre Angehörigen stammen größtenteils aus mitteleuropäischen Ländern, nämlich: Deutschland, Britische Inseln, Italien, Dänemark, Österreich, Türkei und eine Familie stammt aus Indien. Der Altersdurchschnitt der Patienten beträgt 35,85 Jahre bei einer Standardabweichung von 19,08, das Erkrankungsalter ist meist nicht bekannt. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die Patientendaten, soweit vorhanden, die Abbildungen 3.1.1 sowie 3.1.2 zeigen die Stammbäume der Familien. Einige der Familien sind bereits bei Schwemmler et al. (1993) beschrieben.

CCD-Nr.	ID-Nr.	Alter	Sex	Bemerkungen
01	III:1	41	w	beidseitige Hüftdysplasie, Skoliose, Patientin sitzt seit 1989 im Rollstuhl
01	II:3	77	m	ein Bruder 1 Woche nach Geburt verstorben, SIDS ?
01	III:2	47	m	
02	III:1	16	m	“floppy infant”, Gowers Zeichen, hypotrophe Muskulatur
02	I:2	68	w	Muskelschwäche, Hohlkreuz, Patientin geht an Krücken, mehrfache Operationen ohne Narkosezwischenfall, ein Kind verstarb postnatal → “SIDS” ? aber: erhöhtes Alter der Mutter bei der Geburt (40)
02	II:2	42	m	IVCT-MHS
02	II:3	42	m	IVCT-MHS, hat nie laufen gelernt
02	III:3		m	OP wg. Leistenhernien ohne Narkosekomplikation
03	I:1	58	m	hypotrophe Muskulatur, Gowers Zeichen

CCD-Nr.	ID-Nr.	Alter	Sex	Bemerkungen
03	II:2	34	w	
03	II:4	31	w	
04	II:2	61	m	
04	III:1	29	m	
04	III:2	26	m	Muskelbiopsie
05	II:5	60	m	
05	III:2	32	w	
06	II:3	61	m	Schwäche der Beckenmuskulatur, erhöhte CK, Gowers Zeichen, myopathisches EMG, Biopsie mit cores, keine Komplikationen bei Anästhesie
06	III:2	39	w	CCD und MHS, Schwäche der Beckenmuskulatur, erhöhte CK, Gowers Zeichen, EMG normal,
06	III:3	37	m	erhöhte CK, bisher kein Kontakt mit MH-Triggeragentien
06	III:4	31	m	keine cores, MHS, MH-Krise 1993, EMG und CK normal
07	I:2		w	Biopsie mit cores, Myopathie
08	II:2	39	w	
08	III:3	19	w	
09	II:3	66	m	
09	III:4	39	m	erhöhte CK, IVCT-MHS, Biopsie mit cores
09	III:6	41	w	2 mal biopsiert, 1 x unklar, 1 x mit cores, Skoliose, Muskelschwäche
09	IV:1	13	w	erhöhte CK, Hohlrücken, Wadenhypertrophie, LWS-Skoliose, Gowers Zeichen
10	I:2		w	
10	II:2	57	w	CCD
10	II:4		m	
10	III:2	37	m	Muskelschwäche, V.a. Linksherzhypertrophie
11			m	Watschelgang, Muskelschwäche Schultergürtel, chronische Diarrhöe, Ophthalmoplegie, Biopsie mit cores
12	II:1	17	w	

CCD-Nr.	ID-Nr.	Alter	Sex	Bemerkungen
14	I:2	59	w	
14	II:1	32	w	Muskelbiopsie
14	II:2	26	m	EMG myopathisch
15		18	m	
16			m	Cardiomyopathie, V.a. CCD
17	II:1	50	m	
17	II:2	44	m	
18		18	m	
19		17	w	Skoliose
20		34	m	Histologie fraglich, IVCT-MHS aber Patient nimmt tricyclische Antidepressiva
21	I:1	52	m	Watschelgang, Hüftgelenksluxation, milder betroffen als Tochter
21	II:1	22	w	Hüftgelenksluxation, Muskelschwäche, Watschelgang, Biopsie mit cores, "klassische" CCD
22		21	w	mgw. MH-Krise, IVCT-MHS, Biopsie mit cores, Einzelpatientin
23		61	m	erhöhte CK, Kyphoskoliose, IVCT-MHS, 2 x biopsiert, 1 x unklar, 1 Biopsie mit cores
24			m	
25			w	
26		8	m	CCD "elektronenmikroskopisch gesichert"
27			w	Hüftluxation, Skoliose, Muskelatrophie, Familienanamnese unauffällig
28			m	Muskelbiopsie, Histologie
29			w	Einzelpatientin
30	II:1	6	w	Differentialdiagnose unklar: CCD oder Centro-nukleäre Myopathie
31	II:1	38	m	CCD, Muskelschwäche, Biopsie mit cores
31	III:1	4	m	motorische Entwicklung retardiert

CCD-Nr.	ID-Nr.	Alter	Sex	Bemerkungen
32		55	w	Muskelschwäche, -hypertrophie, Biopsie mit cores, Diabetes mellitus IIb
33		8	w	leicht erhöhte CK, nur klinische Daten vorhanden
34		67	m	Schwäche der Rumpfmuskulatur, BWS-Lordosierung und -skoliose, Patient ist nur an Stützen gehfähig, negative Familienanamnese
35		43	m	Cores in Typ I-Fasern, Typ I Faserdominanz, CK und LDH leicht erhöht, Zwerchfell- und Rumpfmuskulatur-Paresen, Diabetes mellitus, Leistenhernien
36		6	w	Hypotonie, verzögerte motorische Entwicklung, Muskelschwäche, Gowers Zeichen
37				keine Daten (ID-Nr. Basel 220)
38			w	
39			m	schwere CCD, rezessiv ??
40			w	schwere CCD, rezessiv ??
41			w	
42			w	Einzelpatientin
43		11	w	
43		29	w	
44	I:2	48	w	
44	II:1	18	w	
44	II:2	7	m	

Tab. 3.1 Identifikation, Alter, Geschlecht und Diagnose der CCD-Patienten. Die Familien sind fortlaufend durchnummeriert (CCD-Nr.), die ID-Nr. verweist auf die entsprechende Person im Stammbaum der Abbildungen 3.1.1 und 3.1.2.

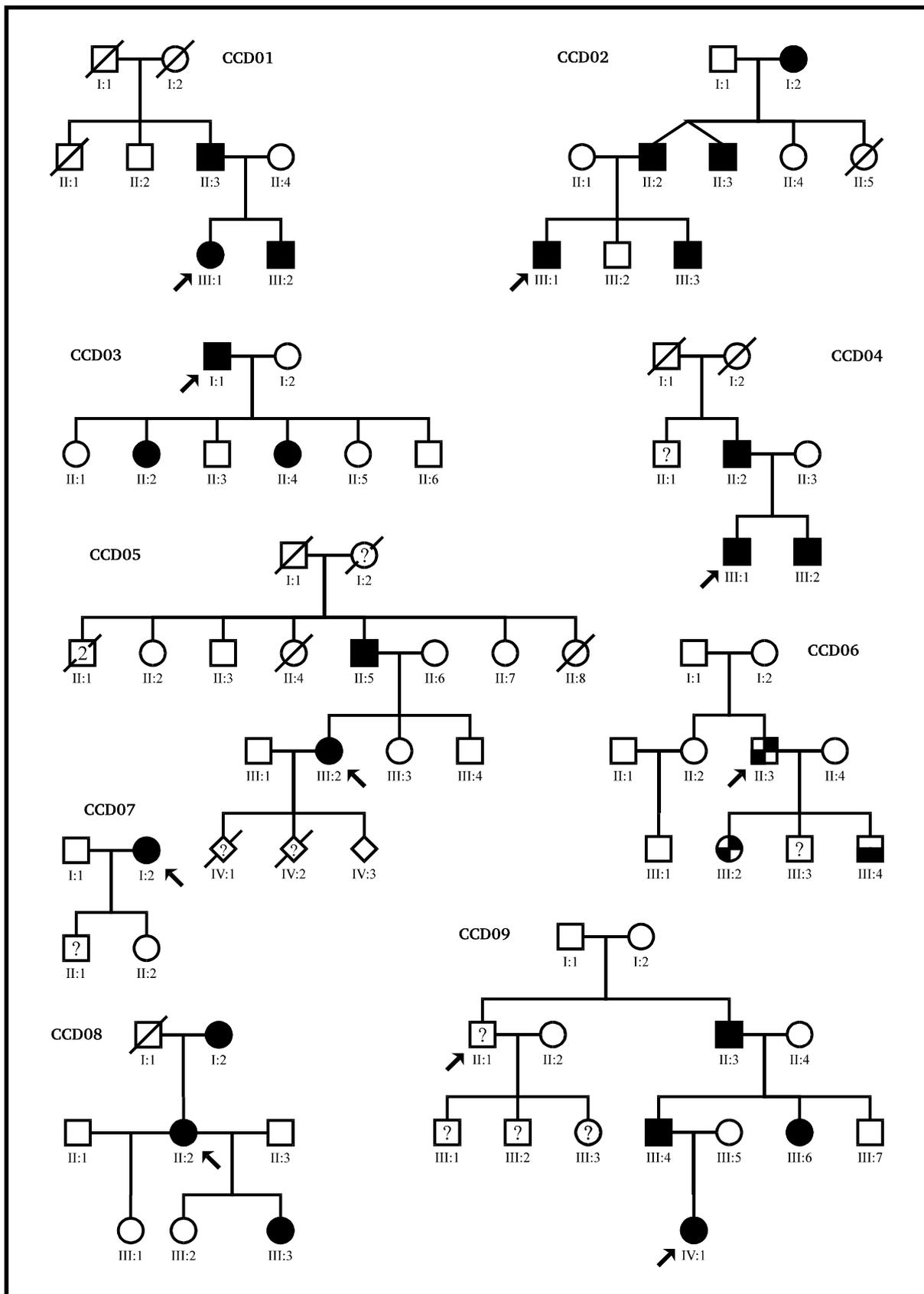


Abb. 3.1.1 Stammbäume der CCD-Familien 1-9. Mit der DNA der Patienten, die mit Pfeil gekennzeichnet sind wurde das Mutations-Screening durchgeführt, i. d. R sind das auch die Indexpatienten der jeweiligen Familie.

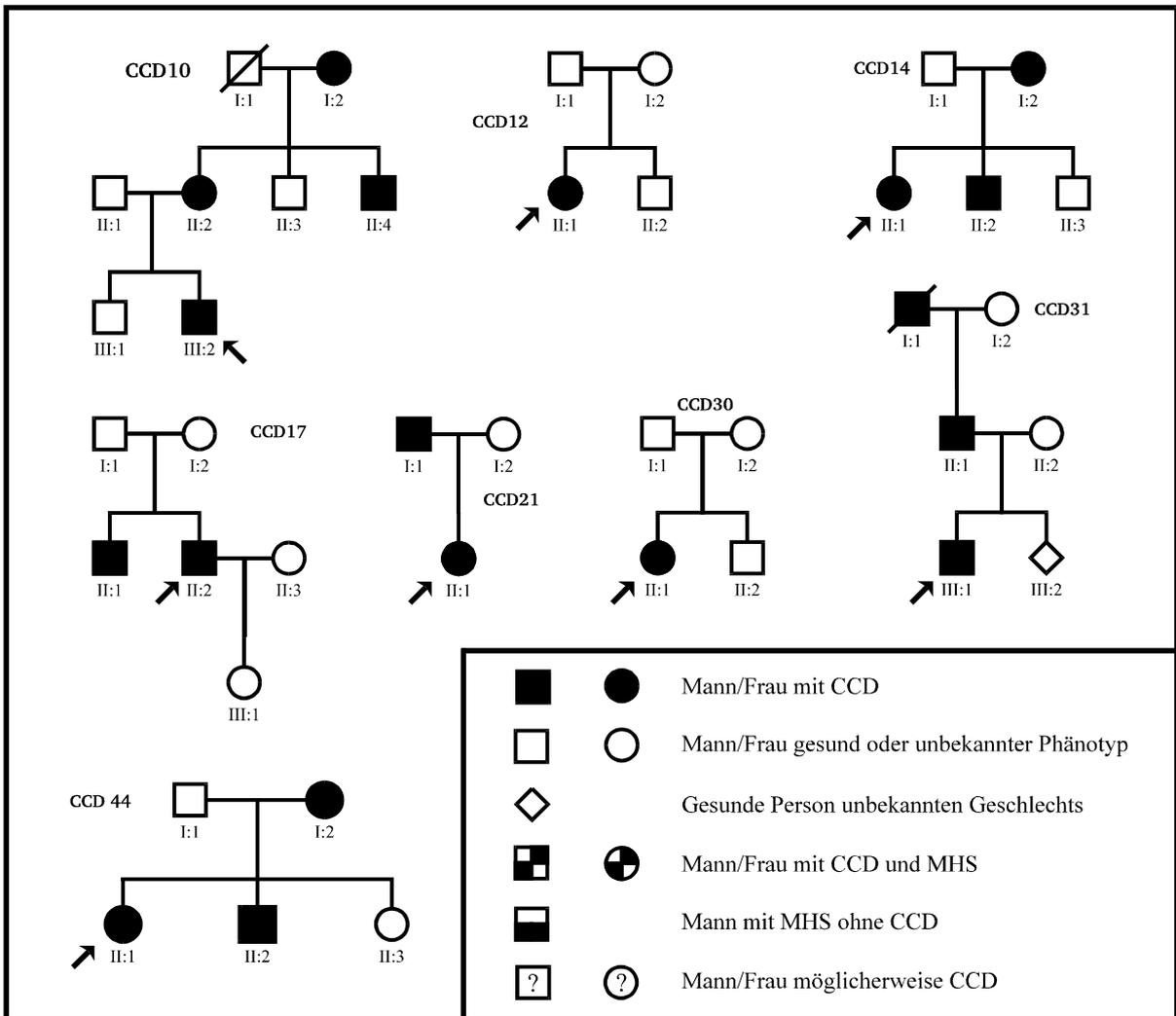


Abb. 3.1.2 Stammbäume der CCD-Familien 10-31 und Legende.

3.2 Methoden

Die in den folgenden Protokollen verwendeten Chemikalien und Lösungen sind in Kap. 3.3 beschrieben.

3.2.1 DNA-Isolierung

3.2.1.1 Isolierung von menschlicher, gesamtgenomischer DNA aus Leukocyten (Miller et al., 1988)

Zehn ml EDTA-Blut wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 30 ml Lysispuffer addiert. Die Mischung wurde 15 Min. auf Eis inkubiert und während dessen mehrere Male durch Invertieren gemischt. Anschließend wurde die Lösung 10 Min. bei 4 °C mit 1600 rpm zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Röhrchen auf einem Papierhandtuch austropfen lassen, 10 ml eiskalter Lysispuffer addiert, das Pellet gut suspendiert und die Lösung nochmals wie oben zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder dekantiert und das Röhrchen auf einem Papierhandtuch abtropfen gelassen. Das Pellet mit den kernhaltigen Zellen wurde in 5 ml SE-Puffer aufgenommen, 25 µl Pronase und 250 µl SDS (20%) hinzugefügt und mehrere Stunden bei 55 °C inkubiert.

Nach der Proteolyse wurden weitere 5 ml SE-Puffer addiert und die Lösung bei 55 °C für 5 - 10 Min. inkubiert. Durch Hinzufügen von 3 ml saturiertem NaCl wurden die Proteine ausgefällt. Nach der Zugabe von NaCl wurde die Lösung 15 - 20 sec. auf dem Vortex geschüttelt und anschließend bei Raumtemperatur für 15 Min. mit 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Zentrifugenröhrchen abgegossen und die DNA mit zwei Volumina Ethanol ausgefällt.

Das ausgefallene DNA-Knäuel wurde mit einem sterilen Glashäkchen herausgefischt, einmal in 70 % Ethanol gewaschen und 10 - 20 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die DNA wurde schließlich in 500 µl sterilem TE-Puffer gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gemischt.

3.2.1.2 Isolierung von DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (Scherer & Tsui, 1991)

Aus einem Glycerinstock oder von einer Petrischale wurden mit einer Impföse Hefezellen abgeschabt und damit 10 ml AHC- oder YPD-Medium angeimpft. Die Kulturen wurden für 2

Tage bei 30 °C im Schüttler mit 150 rpm inkubiert. Die Zellen wurden geerntet durch Zentrifugation mit 2000 rpm für 5 Min. und gewaschen, indem das Pellet in 500 µl H₂O suspendiert und für 10 Sec. zentrifugiert wurde. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl GDIS resuspendiert und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) sowie 350 mg glass beads addiert. Die Proben wurden für 2,5 Min. auf höchster Stufe gevortext, 200 µl H₂O addiert und für 4 Min. zentrifugiert mit 13000 rpm. Der wäßrige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und ein RNase-Verdau durchgeführt mit 30 µg RNase A bei 37 °C für 10 Min. Anschließend wurde die DNA bei Raumtemperatur gefällt durch Addition von 10 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 1 ml Ethanol. Durch einen letzten Zentrifugationsschritt mit 13000 rpm für 15 Min. bei Raumtemperatur wurde die DNA gesammelt und das Pellet in 50 µl H₂O suspendiert. Die Ausbeute an DNA betrug ca. 10 - 20 µg pro Ansatz.

3.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Sambrook et al., 1989)

Für eine Übernachtskultur wurden 3 ml LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen angeimpft mit einer Einzelkolonie oder 10 µl einer 150 µl-Übernachtskultur in Mikrotiterplattenvertiefungen oder mit der Impföse aus einem Glycerinstock. Die Kultur wuchs über Nacht bei 37 °C im Schüttler mit 220 rpm. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Kultur entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen geerntet durch Zentrifugation mit 10000 rpm für 3 Min. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 100 µl Lösung I durch Vortexen suspendiert. Die Zellen wurden dann aufgebrochen durch Zugabe von 200 µl frisch zubereiteter Lösung II und Inkubation für 5 Min. auf Eis. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wurden die Proben für 5 Min. auf Eis gestellt und anschließend die ausgefällten Zelltrümmer abzentrifugiert (15000 rpm, 15 Min). Der Überstand wurde abgehoben und aufgereinigt durch einmalige Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Schließlich wurde die DNA gefällt durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol und gesammelt durch Zentrifugation für 20 Min. mit 15000 rpm bei 4 °C. Das DNA-Pellet wurde ein Mal gewaschen mit 70 % Ethanol, kurz an der Luft getrocknet und in 20 - 30 µl TE oder H₂O + 20 µg/ml RNase A gelöst. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug ca. 5 - 10 µg und wurde für Restriktionsanalyse, PCR und Sequenzierung mit ³⁵S-dATP eingesetzt.

Alternativprotokoll: Plasmid DNA Isolierung (Qiagen Plasmid Mini Handbook)

Die Proben wurden im Prinzip wie oben beschrieben behandelt, statt der Lösungen I-III wurde jeweils 300 µl Qiagen Puffer P1, P2 und P3 verwendet. Nach der Zentrifugation des Zellebrühs wurde der Überstand auf eine vorher äquilibrierte Säule QiagenTip 20 geladen. Die Säule wurde 4 mal mit je 1 ml Waschpuffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 800 µl Elutionspuffer QF eluiert, mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation für 30 Min. bei 4 °C mit 15000 rpm pelletiert. Nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in 20 µl H₂O gelöst. Qiagen-gereinigte DNA wurde zur Infrarotfluoreszenzsequenzierung auf dem Licor DNA4000 Sequencer eingesetzt.

3.2.1.4 Isolierung von Cosmid-DNA aus *E. coli*

Cosmidpräparationen im kleinen Maßstab wurden wie Plasmidpräparationen mit QiagenTip 20 durchgeführt. Cosmidpräparationen im großen Maßstab wurden nach einer Modifikation von 3.2.1.3 durchgeführt. Aus einem Glycerinstock wurde eine Starterkultur in 3 ml LB-Medium + 40 µg/ml Kanamycin angesetzt und mehrere Stunden bei 37 °C im Schüttler mit 150 rpm inkubiert. In einen Schikanekolben wurden 200 ml LB-Medium + 40 µg/ml Kanamycin vorgelegt und mit 2 ml der Starterkultur angeimpft. Nach Inkubation der Kultur über Nacht bei 37 °C im Schüttler mit 150 rpm wurden die Zellen geerntet durch Zentrifugation in einer Sorvall-Zentrifuge (15 Min. mit 3000 rpm bei 4 °C). Die pelletierten Zellen wurden in 4 ml Lösung I durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren suspendiert und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden aufgebrochen durch Zugabe von 8 ml frisch angesetzter Lösung II und Inkubation für 10 Min. auf Eis. Nach Zugabe von 6 ml eiskalter Lösung III und einer Inkubation von 10 Min. auf Eis wurden die Proben zentrifugiert: 15 Min. mit 18000 rpm bei 4 °C in einer Sorvall-Zentrifuge. Der Überstand mit der DNA wurde durch ein Faltenfilter filtriert und mit 0,6 Volumen Isopropanol gefällt. Die pelletierte DNA wurde in 4 ml TE-Puffer gelöst und eine Extraktion mit dem gleichen Volumen Phenol, eine Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1) und schließlich nur mit Chloroform durchgeführt. Dabei wurde jeweils 4 ml des Lösungsmittels addiert, die Proben vorsichtig gemischt durch mehrfaches Invertieren des Zentrifugenröhrchens und für 5 Min. mit 3000 rpm zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette abgehoben und in ein neues Gefäß überführt. Nach der Chloroform-Extraktion wurde die DNA gefällt mit 1/10 Vol. 3 M Kaliumacetat und 2 Vol. Ethanol, abzentrifugiert (30 Min., 6000 rpm, 4 °C) und einmal gewaschen mit 70 % Ethanol. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das DNA-Pellet in 800 µl TE-Puffer gelöst. Die in der

Präparation noch reichlich vorhandene RNA wurde erst vor der Verwendung der DNA durch RNase-Verdau entfernt, da die RNA die mechanisch empfindliche Cosmid-DNA stabilisiert. Wie sich allerdings später herausstellte, ist nach längerer Lagerung der DNA die Entfernung der RNA durch RNase-Verdau nicht mehr möglich.

Alternativprotokoll: Cosmid-DNA Präparation mit Qiagen Säulen Tip100

Analog zu oben wurde eine 100 ml Übernachtskultur in LB-Medium + 40 µg/ml Kanamycin angesetzt. Die Zellen wurden geerntet durch Zentrifugation mit 6000 rpm für 15 Min. bei 4 °C und resuspendiert in 5 ml Puffer P1. Nach Zugabe von je 5 ml Puffer P2 und P3 wurde der Zelldebris abzentrifugiert mit 20000 rpm für 30 Min. Die DNA aus dem Überstand wurde gefällt mit 0,7 Vol. Isopropanol, zentrifugiert mit 15000 rpm für 30 Min. bei 4 °C und das Pellet in 2 ml TE-Puffer und 2 ml Puffer QBT gelöst. Die Lösung wurde dann auf eine äquilibrierte Säule QiagenTip 100 geladen, zweimal gewaschen mit 10 ml Waschpuffer QC und schließlich die DNA eluiert mit 5 ml Elutionspuffer QF. Die DNA wurde gefällt durch Zugabe von 0,7 Vol. Ethanol, zentrifugiert mit 15000 rpm für 30 Min. bei 4 °C und das Pellet mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet für 5 Min. an der Luft getrocknet und in 500 µl H₂O gelöst. Die maximale theoretische Ausbeute einer solchen Präparation betrug 100 µg DNA. Die DNA wurde zur Restriktionsanalyse, Sequenzierung und Subklonierung eingesetzt.

3.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Oftmals ist es nötig, ein bestimmtes DNA-Fragment aus einer Mischung verschiedener Fragmente, z.B. aus einem Restriktionsverdau oder einer PCR, zu isolieren. Die einfachste Methode ist das Auftrennen der Fragmente auf einem niedrigprozentigen (0,7 %) Agarosegel, das Ausschneiden des gewünschten Fragments und die Elution der DNA aus diesem Gelstückchen.

DNA-Elution mittels Dialyseschlauch: Ein vorher autoklavierter Dialyseschlauch wurde mit dest. H₂O ausgespült, an einem Ende mit einer Klammer verschlossen und das Gelstückchen hineingelegt. Der Schlauch wurde mit einem minimalen Volumen H₂O aufgefüllt, am anderen Ende verschlossen und in eine Horizontal-Elektrophoresekammer mit 1 x TBE gelegt. Durch Anlegen einer Spannung von 150 V für 20 - 30 Min. wurde die DNA aus dem Gel eluiert. Die Flüssigkeit im Schlauch mit der DNA wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, mit einem 1/10 Volumen 3M Kaliumacetat und 2 Volumen Ethanol gefällt und die DNA durch

Zentrifugation mit 15300 rpm für 15 Min. gesammelt. Das Pellet wurde ein Mal mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und schließlich in einem angemessenen Volumen TE-Puffer oder H₂O gelöst. Diese Methode wird vor allem für größere Gelstücke angewendet.

Alternativprotokoll: Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen)

Bei diesem Verfahren wird das Gel gelöst, die DNA durch Bindung an eine Silikatmatrix abgetrennt und eluiert. Die Methode wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und bei geringen DNA-Mengen angewendet.

Alternativprotokoll: Ultrafree MC 0,45 µm Centrifugal Filter (Millipore)

Die DNA wird hierbei durch Mazeration des Gels und Zentrifugation durch eine 0,45 µm Filtermembran nach den Angaben des Herstellers eluiert und durch Ethanol-fällung aufkonzentriert.

Zur Analyse der eluierten DNA wurde ein Aliquot auf einem Agarosegel auf Qualität und Quantität untersucht.

3.2.2 Elektrophorese (Sambrook et al., 1989)

Die Elektrophorese von DNA ist eine der gängigsten Anwendungen der Molekularbiologie. DNA-Moleküle in der Größenordnung von einigen wenigen Basenpaaren bis hin zu einigen Megabasen können auf Agarosegelen getrennt werden. Die Trennung der Moleküle erfolgt aufgrund ihrer Ladung; DNA trägt infolge des Phosphatrückgrats eine negative Nettoladung und wandert deshalb im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von Konzentration und Vernetzungsgrad der Gelmatrix und in einem gewissen Bereich proportional zur Molekülgröße. Die gängigsten Gelmatrices sind verschiedene Arten von Agarose in einer Konzentration von 0,5 - 4 % und Polyacrylamid in einem Bereich von 5 - 20 %. Die Porosität von Polyacrylamid kann zusätzlich durch unterschiedliche Anteile des Crosslinkers (Bis-Acrylamid o.ä.) variiert werden (19:1 bis 99:1)

3.2.2.1 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Horizontale Agarosegelelektrophorese wurde in Elektrophoresekammern von Gibco/BRL (Schlittengröße 11,5 x 14 cm und 5 x 8 cm) sowie von peqlab (20 x 10 cm) durchgeführt. Für Restriktionsverdau wurden 0,7 oder 2 % SeaKem GTG Agarosegele (FMC), für PCR-

Produkte 1 - 4 % NuSieve GTG Agarosegele (FMC), jeweils mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und 1 x TBE, verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 2 - 5 V/cm in 1 x TBE als Laufpuffer. Das Gel wurde auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm betrachtet und ein Abbild mittels Still-Video-System (Herolab) auf Thermopapier ausgedruckt.

3.2.2.2 Horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese

Horizontale Acrylamidgele wurden u.a. für PCR-RFLPs und SSCP eingesetzt. Die bereits fertig gegossenen und dehydrierten Polyacrylamidgele (10 bzw. 15 % CleanGel) wurden von Pharmacia und ETC bezogen. Die Gele wurden rehydratisiert durch eine 1 - 2 stündige Inkubation des Gels in 25 ml Rehydratationslösung und überschüssiger Puffer durch Abreiben mit Whatman-Papier entfernt. Einige Tropfen Petroleum wurden auf die Thermostatplatte der Elektrophoresekammer gegeben und das Gel aufgelegt. Zwei kleine Stückchen Whatman-Papier wurden in 20 ml Elektrodenpuffer eingeweicht und auf die beiden Enden des Gels plaziert, um den Kontakt zu den Elektroden herzustellen. Die Proben wurden 1:5 mit Stoppuffer vermischt und davon 7 µl pro Tasche geladen. Die Elektrophorese wurde für 30 Min. mit 150 V, 10 W und für 1,5 bis 3 Std. mit 400 V, 20 W durchgeführt. Die Fragmente wurden anschließend mittels Silberfärbung detektiert. Hierzu wurde das Gel 30 Min. fixiert mit 10 % Eisessig und anschließend 3 mal gewaschen für je 5 Min. mit 250 ml H₂O. Zur Färbung wurde das Gel 30 Min. in 0,1 % Silbernitrat + 200 µl Formaldehyd inkubiert und 20 Sek. gewaschen mit 250 ml H₂O. Das Gel wurde schließlich in 200 ml Entwicklerlösung gelegt, bis die Banden deutlich sichtbar gefärbt waren. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 250 ml Entfärberlösung und eine 10 minütige Inkubation. Das Gel wurde schließlich für 30 Min. bis 2 Std. imprägniert in 250 ml 10 % Glycerin und schließlich an der Luft getrocknet und in PE-Folie eingeschweißt.

3.2.2.3 Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese

Vertikale Polyacrylamidgele wurden zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten (< 100 bp) benutzt. Das Elektrophoresesystem bestand aus einer Protean II Elektrophoresekammer von Biorad mit 10,1 x 8,2 cm Gelplatten und 0,75 mm Abstandhalter. Die Polymerisation der 10prozentigen Acrylamidlösung wurde durch Zugabe von 0,1 % APS und 0,1 % TEMED gestartet und das Gel zwischen die Glasplatten gegossen. Nach erfolgreicher Gelierung wurden 10 - 15 µl je Probe + Ladepuffer geladen und mit 1 x TBE als Laufpuffer für 1 - 2 Std.

bei einer Spannung von 120 - 140 V aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden nach 10 minütiger Färbung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TBE auf einem UV-Transilluminator visualisiert.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (Mullis & Faloona, 1987)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine universell einsetzbare, enzymatische Methode zur spezifischen Vervielfältigung eines bestimmten DNA Segments. Unterwirft man eine Mischung aus Matrizen-DNA ("template"), dNTPs sowie zwei spezifischen, gegensinnig orientierten Oligonukleotid-Primern und einer thermostabilen DNA-Polymerase einem dreistufigen Temperaturprofil aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation der DNA, so wird die Zielsequenz mit jedem Zyklus verdoppelt. Die Zielsequenz wird dabei so angereichert, daß eine weitergehende Analyse oder methodische Verwendung des PCR-Produkts leicht möglich ist, z.B. DNA-Sequenzierung, Restriktionsverdau, Sonde für Hybridisierungen, Mutationsanalyse, Klonierung etc.

Die Sequenzen der für eine PCR notwendigen Starter-Oligonukleotide (Primer) wurden entweder der Literatur entnommen oder mit Hilfe der Sequenzanalyse-Software "Generunner" (Hastings Software, Inc., New York) ausgewählt. Die PCR wurde in der Regel als Mastermix, mit allen Komponenten außer dem DNA-template, vorpipettiert, aliquotiert und dann die DNA zu den einzelnen Ansätzen hinzugegeben. Hierdurch ist gewährleistet, daß die Reaktionsbedingungen in den einzelnen Ansätzen gleich sind. Neue Primerpaare wurden in der Regel anhand einer Formamid-Titration (0 - 4 %) und bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen auf eine möglichst hohe Produktspezifität getestet. Ein typischer PCR-Ansatz enthält die folgenden Komponenten:

1 x PCR-Puffer
200 µM dNTPs
1,5 mM MgCl ₂
je 10 pmol Forward- und Reverse-Primer
1 U <i>Taq</i> Polymerase
H ₂ O ad 25 oder 50 µl
50 - 1000 ng DNA

Falls notwendig, wurden die Proben mit dickflüssigem Paraffin überschichtet als Schutz gegen Verdunstung. Die Proben wurden dann dem folgenden thermischen Profil ausgesetzt:

1. 5 Min. 94 °C initiale Denaturierung

2. 30 - 40 sec bei 94 °C; Denaturierung
3. 30 - 40 sec. bei Annealing-Temperatur (meist 55 °C); Primerhybridisierung
4. 60 - 90 sec. bei 72 °C; Primerverlängerung (Extension)

5. 5 Min. bei 72 °C letzte Extension

Die Schritte 2 - 4 wurden 30 bis 35 mal wiederholt.

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde ein Teil der PCR-Reaktion entnommen (1/5 bis 1/2), 0,2 Vol. 5 x Ladepuffer zugesetzt und auf 2 oder 3prozentigen Agarosegelen aufgetrennt.

3.2.4 Typisierung von Mikrosatelliten-Markern (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989)

Mikrosatelliten sind hochpolymorphe DNA-Sequenzen, bestehend aus Tandemwiederholungen von einfachen Di- bzw. Trinukleotidmotiven (z.B. [CA]_n oder [CAG]_n), die zur genetischen Koppelungsanalyse eingesetzt werden. Zur Analyse führt man eine PCR mit den DNA-Proben von Familien für einen oder mehrere Mikrosatellitenloci durch und trennt die Produkte auf einem Polyacrylamidgel. Bei jeder Person entdeckt man eine oder zwei charakteristische Bandenleitern, die jeweils einem Allel des Locus entsprechen und nach den Mendelschen Regeln vererbt werden.

Zur Typisierung von Mikrosatelliten-Markern bei CCD-Familien, wurde eine radioaktive PCR mit genomischer DNA der Familienmitglieder durchgeführt:

1 x PCR-Reaktionspuffer
je 200 μM dGTP, dATP, dTTP
20 μM dCTP
0,2 μl [α - ^{32}P]-dCTP (entspricht ca. 0.08 MBq)
1,5 mM MgCl_2
je 5 - 10 pmol Forward- und Reverse-Primer
1 U *Taq* Polymerase
 H_2O ad 25 μl
50 - 200 ng DNA

Nach der PCR wurden von jedem Ansatz 3 μl entnommen, mit 3 μl Formamid-Ladepuffer gemischt, für 3 Min. denaturiert bei 94 °C und auf Eis gekühlt. Von der Mischung wurden 3 - 4 μl auf ein denaturierendes Sequenziergel (6 % Polyacrylamid, 7,5 M Harnstoff, 1 x TBE oder 6 % Polyacrylamid, 5,35 M Harnstoff, 32 % Formamid, 1 x TBE) geladen und mit 1800 V, 40 W aufgetrennt. Die Dauer der Elektrophorese betrug je nach Fragmentgröße 90 - 150 Min. Das Gel wurde bei 80 °C für eine Stunde unter Vakuum getrocknet. Die Banden der PCR-Produkte wurden durch ein- bis dreitägige Exposition eines Röntgenfilms auf dem Gel detektiert. Für die Auswertung der Markerallele wurden die Banden einer Familie der Größe nach von oben nach unten durchnummeriert.

Für die Mikrosatellitentypisierung wurden die folgenden Primer (Tab. 3.2.4.1) für Chromosom 19 Mikrosatelliten verwendet:

Primer	Sequenz	Allelgröße		Allele	T _A
		von	bis		
D19S190*	TTCTACTTGGAGGAAGAGGAGG	111	117	3	55
D19S190*	CCCATTGGTTGATTTTGCTGC				
D19S191	AGTAAAGAGGTTGAATTAATGACC	103	125	11	58
D19S191	TGCCAGCGAAGCTATCTGG				
D19S220	ATGTTTCAGAAAGGCCATGTCATTTG	265	283	10	62
D19S220	TCCCTAACGGATACACAGCAACAC				
D19S223	CAAAATCGAGGTGCATAGAA	228	246	9	55
D19S223	ACCATGACTGGCTAATTGTG				
D19S421	AGCCCTTGCTGGTTTATG	188	220	9	55
D19S421	GAGCCTGTGGTGGAGC				
D19S422	AGCTATGATCTCACCCTGTA	183	199	9	55
D19S422	CAGCATTTTGCCAGACTT				
D19S425	CCACAGGTGTGCATAAAAG	252	280	13	55
D19S425	GCCATGTGACTGTAGCAGA				
D19S47	AATACCTAGGAAGGGGAGGG	88	106	9	55
D19S47	GATGTCTCCTTGGTAAGTTA				
D19S570	TACAGGCATGAGCCACC	186	210	11	55
D19S570	AATGAAGACCAGTACTTGGGC				
RYR1-CA	GCATCACGGTCTGCAATTCAT	221	233	7	58
RYR1-CA	GCAATGGCATAATCTCAGCT				
WUT1.9**	AGTCTTGAAGTTATCTGTCTG	211	398	16	54/
WUT1.9**	TGGATGACAGAGCGAGGC				58

Tab. 3.2.4.1 Eigenschaften der Mikrosatellitenprimer von Chromosom 19.

* für den Marker D19S190 wurde ein spezieller PCR-Puffer benutzt: 16,6 mM (NH)₄SO₄, 65 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, 0,065 mM EDTA, 10 mM 2-Mercapto-Ethanol, 10 % DMSO, 0,17 mg/ml BSA.

** Annealing Temperatur für nichtradioaktive/radioaktive PCR.

Folgende Mikrosatelliten-Marker (Tab. 3.2.4.2) von Chromosom 14 wurden untersucht:

Primer	Sequenz	Allelgröße		Allele	T _A
		von	bis		
D14S283	GGGACTATATCTCCCAGGC	133	145	9	55
D14S283	TGTTTTCTTAGTAACCGCA				
D14S43	TGGAACACTCAGGCGA	155	193	10	53
D14S43	CCAGAGCCACTTTCTAC				
D14S47	CAACATAGCAAGACCCTGTC	75	89	6	55
D14S47	GCACATGCCACCAAGACAAG				
D14S49	GAATCTTAAGTAGTTATCCCTC	167	190	17	55
D14S49	TCTACAAAAAGTCAGATACCT				
D14S50	AACACCCCTAATTCACCACT	166	180	8	53
D14S50	ATGATTCCACAAGATGGCAG				
D14S51	GATTCTGCACCCCTAAATCC	131	149	9	53
D14S51	ATGCTCAATGAACAGCCTGA				
D14S52	TTACTCCCTGCAAAACAAAC	79	99	11	55
D14S52	GATGAATTTTCAGAAATGGAG				
D14S53	CAACAAGAGCGAAACTCGC	135	161	11	55
D14S53	GAAGACTCAAGATATAGCAG				
D14S54	GATCCTATCTCTAAACAC	254	288	15	48
D14S54	TCTAAGTAACCTTAACCTTC				
D14S72	TGTAAAGTTTTGTACATGGTGTAAT	257	271	7	55
D14S72	TCCTAACATTCTGCTACCCA				
TCRD	GCTGAGACTAAACCTACCAC	118	128	6	53
TCRD	GTTAGTGGAAGAGCAGAGCA				
MYH7-F	TTGAGAGTTGTGGGGCCTAG	130	158	15	55
MYH7-R	CATCCTCTAACCCCTACCCCC				
MYH7 2.1	GCATCTGAGCATATGGGACCA	126	134	5	55
MYH7 2.2	TATTTCTGTATCAGTCAGTGAG				

Tab. 3.2.4.2 Eigenschaften der Mikrosatellitenprimer von Chromosom 14.

3.2.5 *Alu*-PCR von YACs und Cosmiden (Nelson et al., 1989)

Mit der "*Alu*-PCR" macht man sich das Vorhandensein zahlreicher Kopien der ca. 300 bp langen *Alu*-Repeats im Primatengenom zunutze. Die PCR-Primer entstammen aus einer Consensus-Sequenz der jeweiligen *Alu*-Subfamilie und werden einzeln oder als Kombination mehrerer Primer eingesetzt. Ein PCR-Produkt entsteht jeweils da, wo im Genom zwei *Alu*-Elemente in der richtigen Orientierung zueinander liegen und in einem solchen Abstand, daß er durch die DNA-Polymerase noch überbrückt werden kann. Typischerweise wendet man dieses Verfahren an, um "Fingerprints" von klonierter DNA zu erstellen. Amplifiziert man mehrere überlappende Klone mit einem *Alu*-Primer, dann sollten benachbarte Klone jeweils einige PCR-Fragmente derselben Größe aufweisen. Eine andere Anwendung ist die Suche nach Klonen in einer Bibliothek, hierbei werden einzelne ausgeschnittene Banden oder das ganze PCR-Produktgemisch als Hybridisierungssonde eingesetzt. Eine besondere Variante der *Alu*-PCR, die *Alu*-Vektor-PCR, erlaubt es in günstigen Fällen, auf einfache Weise eine Probe von den Enden klonierter DNA zu erhalten. Hier wird ein unspezifischer *Alu*-Primer in Kombination mit einem spezifischen Vektorprimer benutzt, um die Endfragmente klonierter DNA zu amplifizieren.

Für die PCR wurden 50 ng Cosmid- oder YAC-DNA und 20 pmol Primer je Ansatz eingesetzt. Die PCR wurde bei der angegebenen Annealing-Temperatur durchgeführt (s. Tab. 3.2.5). Die PCR-Produkte wurden auf einem 2prozentigen Agarosegel aufgetrennt.

Name	Sequenz	T _A
PDJ 34	TGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGG	60
TC65	AAGTCGCGGCCGCTTGACAGTGAGCCCAGAT	60
PDJ67	GCATGGATCCCCTGCACTCCAGCC	60

Tab. 3.2.5 Sequenzen der verwendeten *Alu*-Primer.

3.2.6 Inverse PCR (Ochman et al., 1989)

Die Inverse PCR erlaubt die Bestimmung unbekannter, flankierender DNA-Sequenzen zu einer definierten Zielregion, indem man zunächst die template-DNA (genomische oder klonierte DNA) mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen schneidet und anschließend eine Ligation durchführt, unter Bedingungen, die die Bildung zirkulärer Moleküle begünstigt. Schließlich führt man eine PCR-Reaktion durch mit Primern, die auf beiden Seiten von der

bekannten Sequenz weg orientiert sind. Restriktionsfragmente, die in einer amplifizierbaren Länge religiert sind, dienen als Ausgangsprodukt für die PCR.

Für die Inverse PCR wurden je 20 ng DNA von Cosmid 28874 mit je 15 U der Enzyme *Dra* I, *Bcl* I und *Bgl* II im jeweiligen Restriktionspuffer für 1 Std. bei 37 °C verdaut und die Enzyme bei 70 °C für 5 Min. deaktiviert. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl und wurde durch Zugabe von 10 µl 5 x Ligationspuffer (Gibco/BRL), 10 U T4 Ligase (Boehringer Mannheim) und H₂O auf 50 µl erhöht. Die Ligationsreaktion wurde bei 15 °C über Nacht inkubiert. Von jedem Ansatz wurden 1, 3 und 5 µl als Matrize für die PCR entnommen und mit 10 pmol F- und R-Primer (s. Tab. 3.2.6) bei 60 °C Annealing-Temperatur amplifiziert. PCR-Produkte wurden mit dem TA-cloning Kit (s.u.) kloniert.

Name	Sequenz	Lokalisation/Orientierung	T _A
Cox7-Ex1R	CGTATTAGGGCGGGGTTTTCTG	COX7A1 Intron 1/antisense	60
Cox7-Ex4F	GATTAGGTCTCATTCTGTCTC	COX7A1 Intron 3/sense	60

Tab. 3.2.6 Sequenz und Lokalisation der Primer, die für Inverse PCR benutzt wurden.

3.2.7 Single Stranded Conformation Analysis (Orita et al., 1989)

Die single-stranded conformation analysis (SSCA, SSCP) gestattet die Untersuchung mutierter oder polymorpher DNA-Abschnitte, ohne genaue Kenntnis der zugrunde liegenden Veränderung. Die Zielsequenz, meist die codierenden Bereiche von Genen, wird mittels einer radioaktiven PCR amplifiziert, die PCR-Produkte werden dann verdünnt und denaturiert auf einem nativen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die beiden Einzelstränge der PCR-Produkte wandern separat durch das Gel, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit abhängt von der räumlichen Konformation der Moleküle. Diese hängt wiederum ab von der Art und Weise, wie die Einzelstrang-DNA mit sich selbst eine partielle Basenpaarung eingeht und damit letztendlich von der Basensequenz. Unterscheidet sich die Basensequenz einer Probe von der des Wildtyps, so ergeben sich Verschiebungen von Banden ("band-shifts"), weil der mutierte Einzelstrang eine andere Wanderungsgeschwindigkeit hat als der Wildtyp-Einzelstrang.

Die radioaktive PCR wurde nach demselben Protokoll durchgeführt wie die Mikrosatelliten-PCR (Primer: s. Tab. 3.2.7.1 bis 3.2.7.3). Nach der Amplifikation wurden 5 µl PCR-Produkt entnommen, 1:5 oder 1:10 verdünnt mit 1 x PCR-Puffer, hiervon wurden wiederum 5 µl

entnommen, mit 5 µl Formamid-Ladepuffer gemischt und für 5 Min. bei 94 °C denaturiert. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt und 3 µl auf ein Polyacrylamidgel (6 % Acrylamid [AA:Bis-AA=19:1 oder 99:1 w/w], 0,5 x TBE, 5 % Glycerol, oder alternativ: 0,5 x MDE-Gel, FMC Corp.) geladen. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet, die Elektrophorese wurde bei 4 °C durchgeführt mit einer Spannung von 2000 V und einer Leistung von 25 W für 3 - 7 Std. Das Gel wurde bei 80 °C für eine Stunde unter Vakuum getrocknet. Die Banden der PCR-Produkte wurden durch ein- bis dreitägige Exposition eines Röntgenfilms auf dem Gel

Primer	Mutation	Sequenz	Produktgröße/bp	T _A
RYR1-1486	A1565C	TACACCACTGCTGCCCACTTT	193	58
RYR1-1578		CGATTGCCACGGATTAGAGAA		
RYR1-7342	C6487T	AGGCCCTGCGATCCGCGCCA	54	58
RYR1-7375	G6502A	CAAGGTCCTCCAAGGGCACAA		

Tab. 3.2.7.1 PCR-Primer für die SSCP-Analyse des RYR1-Gens.

Primer	Exon	Sequenz	Produktgröße/bp	T _A % FA
COX7a-cDNA-1	1	AGGAGAAGGGAGGTGACTC	114	50
COX7Ex1-R		CGTATTAGGGCGGGGTTTTCTG		
COX7Ex2,3sns	2	TCCAGGTGCCTCCAATACCCG	308	55
COX7Ex2-R		CGGTACAGGATGTTGTCAACGATG		
COX7Ex3-F	3	GGATCCGACGCGCCAGCCGGGA	249	55
COX7Ex3-R		AGCCACCTCTTACTCTGGGTCCAGC		
COX7Ex4-F	4	GATTAGGTCTCATTTCTGTCTC	105	55
COX7a-cDNA-R		GGCTTCTTGGTCTTAATTCCTG		

Tab. 3.2.7.2 Name, Lokalisation, Sequenz, Größe des PCR-Produkts sowie PCR-Bedingungen (Annealing-Temperatur, Formamid-Konzentration) der verwendeten Primer für die SSCP-Analyse des COX7A1-Gens.

Primer	Exon	Sequenz	Produktgröße/bp	T _A % FA
CANPS-Ex 2-F	2	AGCAGTGAGTCGCAGCCATGTTC	248	60
CANPS-Ex 2-R		CCTCTGATAGTCTCCGCCTTACCTG		
CANPS-Ex 3-F	3	CCCTGGCACTAACCCTC	92	54 2
CANPS-Ex 3-R		TCTGGTTACAGAGGGGGC		
CANPS-Ex 4-F	4	TCTGAGCTCTCCTCCCTTTGC	134	54 3
CANPS-Ex 4-R		CAGGGACCCCAAGTTACTTAC		
CANPS-Ex 5-F	5	CTGACCTGCCCTAACTTC	109	54 3
CANPS-Ex 5-R		ATTCCTTAACCCCGGTCAC		
CANPS-Ex 6-F	6	TTTCAACCTGTTACCCACAGAC	86	55 3
CANPS-Ex 6-R		CATCCATCACGGCCACCATGC		
CANPS-Ex 7.3-F	7	AACTGGTGTCCCAAGGATTTAGTG	1078*	55 3
CANPS-Ex 8-R		CATGTCCCTGCCAGCCATAC		
CANPS-Ex 8.2-F	8	ACAGGCAAGCTGGGCTTTG	260	57 3
CANPS-Ex 8-R		CATGTCCCTGCCAGCCATAC		
CANPS-Ex 9-F	9	CCCGCACCTGAAGACTACATC	163	55 3
CANPS-Ex 9-R		CTGGGTTGTCACTCACGGAAC		
CANPS-Ex 10-F	10	CGCCAAACCTCTGCATCTCCTC	112	55 3
CANPS-Ex 10.2-R		CATACCCCAATATGGGGTCC		
CANPS-Ex 11-F	11	TGTCCTCACTCTCCACCCTCCTCTC	103	55 3
CANPS-Ex 11-R		TGACTCCTATAGCAAGGCAGTGAG		

Tab. 3.2.7.3 Name, Lokalisation, Sequenz, Größe des PCR-Produkts sowie Annealing-Temperatur der verwendeten Primer für die SSCP-Analyse des CANPS-Gens. *Das PCR-Produkt wurde vor der Elektrophorese mit den Enzymen Nsi I und Nco I verdaut.

detektiert. Ansätze, bei denen auffällige Zusatzbanden oder eine Verschiebung von Banden auftraten, wurden im präparativen Maßstab ohne Radioaktivität amplifiziert und nach der "chain-termination"-Methode sequenziert.

3.2.8 PCR-Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (PCR-RFLP)

Eine schnelle Methode zur Analyse von definierten Sequenzvarianten (Mutationen, Polymorphismen) stellen PCR-RFLPs dar. Man nutzt hierbei die Tatsache, daß durch eine Mutation in der betreffenden Zielsequenz gelegentlich entweder die Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym verändert wird, so daß das Enzym nicht mehr schneidet oder daß erst eine Erkennungssequenz geschaffen wird. Die Zielsequenz wird mittels PCR amplifiziert, dann behandelt man die Proben mit dem entsprechenden Restriktionsenzym und trennt die verdauten PCR-Produkte auf einem Agarose- oder Polyacrylamidgel auf. Anhand der Anzahl und Größe der Fragmente auf dem Gel kann man erkennen, ob eine bestimmte Mutation vorliegt. Falls es keine internen Kontrollschnittstellen für das verwendete Restriktionsenzym gibt, muß man je nach der Art des Nachweises auch einen Partialverdau der Probe in Betracht ziehen, der eine Mutation nur vortäuscht.

Die DNA-Proben der Probanden wurden unter den jeweiligen Bedingungen (Tab. 3.2.8.1) mittels PCR im 50 µl-Maßstab amplifiziert und anschließend ein 25 µl-Aliquot entnommen. Hierzu wurden jeweils 5 µl des entsprechenden 10 x Restriktionspuffers, 5 - 10 U Restriktionsenzym sowie H₂O ad 50 µl addiert. Die Proben wurden bei der jeweiligen optimalen Temperatur für das Enzym (s. Tab. 3.2.8.1) für eine bis mehrere Std. inkubiert. Von jeder verdauten und unverdauten Probe wurde nochmals die Hälfte entnommen und mit 5 µl Ladepuffer auf einem Gel, entweder 2 - 3 % Agarose oder 10 % Polyacrylamid, aufgetrennt. Im Falle eines Partialverdau wurde der verbliebene Rest nochmals mit 5 - 10 U verdaut und die Elektrophorese wiederholt.

Mutation	Primer	Sequenz	PCR bp	Enzym	PCR ✂ bp	T _A /°C	T _I /°C
C487T	RYR1-457	TCCAAGCAGAGGTCTGAAGGAGAA	76	<i>Bst</i> UI	44, 32	60	60
	RYR1-532	AGCGCTCGGAGGAGACACTGACAA					
G1021A	RYR1-1001-C	GCCCCCTGAGATCAAGTCC	86	<i>Msp</i> I	65, 21	60	37
	RYR1-1066	GTCTGGAGCGGCATAGGTGAG					
C1209G	RYR1-1143	CCACATGGACGACGCACTGTC	92	<i>Mbo</i> I	63, 29	60	37
	RYR1-1213	CGTTGTATAGGCCATTGGTGCT					
C1840T	RYR1-922-F	TTGCCACATCTTATCCCGATGCGC	922	<i>Rsa</i> I	729 , 550, 199, 179, 19	65	37
	RYR1-922-R	ACCTGTCCAGAGATGCAGTCCATC					
C6487T	RYR1-Ex39F	CTCCAAGCCTTGCATTGTCTCC	345	<i>Aci</i> I	140 , 106, 71, 69, 64, 33, 2	58	37
	RYR1-Ex39R	TACCAAGGGATATGCAAAGTAAGGG					
G6502A	"	"	"	"	220 , 132, 88, 86, 39	"	37
G7303A	RYR1-7270	TTCTATGCCGCCTTGATCGACCTG	55	<i>Dde</i> I	30 , 25	62	37
	RYR1-7301	TTAGATGCATCTCTGGTGCACAGC					
G7307A	G7301A-F	TTCCCTGCAGCTTTGGTGAGGAACC	210	<i>Hga</i> I	115, 95	58	37
	G7301A-R	GAGTGCCTGCATGAGGCGTTCAAAG					
C7372T	RYR1-7342	AGGCCCTGCGATCCGCGCCA	54	<i>Aci</i> I	40 , 28, 14, 12	57	37
	RYR1-7375	CAAGGTCCTCCAAGGGCACAA					
G7373A	"	"	"	"	"	"	"

Tab. 3.2.8.1 Liste der verwendeten Primer für PCR-RFLPs im RYR1-Gen. PCR: Größe des PCR-Produkts, PCR ✂: Größe der geschnittenen PCR-Produkte, T_A: Annealing-Temperatur der PCR, T_I : Inkubationstemperatur für die Restriktionsspaltung, Fett-/Kursivschrift: Größe des diagnostischen Fragments bei vorliegender Mutation.

3.2.9 Klonierung

3.2.9.1 Klonierung von PCR-Produkten mit TA cloning Kit (Invitrogen)

Die für die PCR häufig benutzte *Taq*-Polymerase fügt unspezifisch an das 3'-Ende eines neusynthetisierten DNA Stranges ein desoxy-Adenosin an. Dies macht man sich zur einfachen Klonierung von PCR-Produkten zunutze, indem die cloning-site des Plasmidvektors komplementäre 3'-desoxy-Thymidinüberhänge besitzt und man so PCR-Produkte ohne weitere Aufarbeitung klonieren kann.

Von der PCR wurden 2 µl Produkt entnommen und 1 µl 10 x Ligationspuffer, 50 ng Vektor-DNA pCRII sowie 1 U T4 DNA-Ligase addiert. Das Reaktionsvolumen wurde mit H₂O auf 10 µl eingestellt und die DNA über Nacht bei 15 °C ligiert. Ein zehntel oder 1/5 der Ligation sowie 2 µl Mercapto-Ethanol wurden zu 50 µl kompetenten *E. coli*/INVα F⁺-Zellen gegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden transformiert durch einen Hitzeschock von 30 Sek. bei 42 °C und nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium für 1 Std. bei 37 °C inkubiert, um die Antibiotikaresistenz zu induzieren. Je 50 und 200 µl des Ansatzes wurde auf einer LB-Agarplatte (145 x 20 mm) mit 100 µl X-Gal (2 % in DMF) ausgestrichen und 12 - 18 Std. inkubiert. Rekombinante Klone wurde in 3 ml LB mit 50 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler mit 225 rpm inkubiert, um dann, wie beschrieben, DNA zu isolieren.

3.2.9.2 "sticky-end" Subklonierung von Cosmidfragmenten

Vektor: *E. coli* mit pUC18 oder pBTKSII- (Bluescript) als Plasmid wurde nach 3.2.1.3 kultiviert und Plasmid-DNA im Maximaßstab präpariert. Davon wurden 50 µl DNA entnommen, mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut und mit 5 U SAP für 1 Std. bei 37 °C dephosphoryliert. Das Enzym wurde anschließend für 15 Min. bei 65 °C deaktiviert. Die DNA wurde anschließend gefällt mit 1/10 Vol. 3 M Kaliumacetat und 2 - 3 Vol. Ethanol und für 30 Min. bei -70 °C stehen gelassen. Die DNA wurde pelletiert durch Zentrifugation mit 15300 rpm für 20 Min. bei 4 °C und 2 mal gewaschen mit 70 % Ethanol. Das Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Vol. H₂O gelöst. Ein Aliquot der behandelten Vektor-DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Menge abgeschätzt.

Beim sogenannten "forced cloning", d.h. der Klonierung mit zwei verschiedenen Enzymen, entfiel die Dephosphorylierung, statt dessen wurde die doppelt verdaute Vektor-DNA auf

einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und hieraus nach einer der unter 3.2.1.5 beschriebenen Methoden eluiert. Auch hier wurde ein Aliquot für die Mengenabschätzung entnommen.

Insert: Einige Mikrogramm Cosmid-DNA wurden mit dem jeweiligen Restriktionsenzym verdaut und auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Die zu klonierende Bande wurde ausgeschnitten und eluiert nach einer der Methoden unter 3.2.1.5. Alternativ wurde das verdaute Cosmid ohne Separation kloniert ("shotgun cloning") und das fragliche Fragment nachträglich identifiziert.

Ligation: Einige hundert Nanogramm Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 oder 3:1 mit der Vektor-DNA gemischt und 0,2 Vol. 5 x Ligationspuffer, 1 U T4-DNA-Ligase und H₂O ad 10 oder 20 µl addiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei 15 °C inkubiert. Falls die Vektor- oder Insert-DNA in zu geringer Verdünnung vorlag, wurde sie in der Speedvac eingetrocknet und in einem kleinen Volumen H₂O resuspendiert.

Transformation: Transformationskompetente *E. coli*/DH5α wurden nach der Methode von Nishimura et al. (1990) hergestellt. Von der Ligationsreaktion wurden 1 - 5 µl (1/10 - 1/4) entnommen und in die kompetenten Zellen nach der Hitzeschockmethode (Hanahan, 1983) transformiert. Die transformierten Zellen wurden in verschiedenen Mengen auf LB-Agarplatten (145 x 200 mm; mit 50 µg/ml Ampicillin, 100 µl 2 % X-Gal und 10 µl 2 % IPTG) ausgestrichen und über Nacht (12 - 18 Std.) bei 37 °C inkubiert.

Charakterisierung der Klone: In die Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden je 150 µl LB/Amp. vorgelegt und mit je einem rekombinanten Klon angeimpft. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Klone anhand einer PCR charakterisiert. Die PCR-Primer entstammten entweder der multiple cloning site des Vektors (s. Tab. 3.2.9.2) oder der Sequenz des erwarteten Inserts. Geeignete Klone wurden nach 3.2.1.3 präpariert und die Plasmid-DNA einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen. Wenn eine kleinere Anzahl Klone (10 - 12) gepickt wurde, dann wurden 3 ml LB/Amp. angeimpft und die Plasmid-DNA am nächsten Tag präpariert. Von Klonen mit dem gewünschten Insert wurde ein Glycerinstock angelegt mit 150 µl Glycerin und 850 µl Zellsuspension und bei -70 °C gelagert.

Name	Sequenz	Größe des PCR-Produkts (bp)
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	pUC18 - 150
M13-R	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA	pUC18 - 150
pCRIISeq-F	GCCGCCAGTGTGATGGATAT	pCRII - 290
pCRIISeq-R	CTCGGATCCACTAGTAACGG	pCRII - 290

Tab. 3.2.9.2 Sequenzen der verwendeten Amplifikations- und Sequenzierprimer. Die Größenangaben beziehen sich auf den angegebenen Klonierungsvektor ohne Insert.

3.2.10 DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Nahezu alle heute verfügbaren Sequenziermethoden basieren auf der "chain termination"-Methode von Sanger. Ein Sequenzierprimer bindet dabei an die einzelsträngige template-DNA und wird durch eine DNA-Polymerase verlängert, bis die Synthese nach Einbau eines Didesoxynukleotids (ddNTP, Terminator) abbricht. Der Einbau eines ddNTPs erfolgt statistisch, so daß in dem Reaktionsgemisch Fragmente verschiedener Längen vorliegen. Führt man vier Reaktionen mit je einem Terminator durch und trennt das Fragmentgemisch auf einem Polyacrylamidgel, so kann man in den vier Spuren die Basensequenz der template-DNA von unten nach oben ablesen.

Für die Sequenzierung wurde entweder ein Primer der Tab. 3.2.9.2 oder ein anderweitig beschriebener, spezifischer Primer eingesetzt.

3.2.10.1 Radioaktive Sequenzierung von PCR-Produkten (USB, Amersham)

Vor der Sequenzierung von PCR-Produkten müssen die überschüssigen PCR-Primer und die dNTPs entfernt werden, weil diese die Sequenzierreaktion stören könnten. Die PCR-Produkte werden vorbehandelt mit Exonuclease I, die die Primer zu Mononukleotiden verdaut und mit Alkalische Phosphatase, die die Nukleotide dephosphoryliert und damit eine Verwendung als DNA-Baustein unmöglich wird.

Vorbereitung: Pro Sequenzierreaktion wurden 5 µl PCR-Produkt entnommen, 1 µl (5 - 10 U) Exonuclease I addiert und für 15 Min. bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde durch eine 15 minütige Inkubation bei 80 °C deaktiviert. Anschließend wurde 1 µl (1 U) Shrimps Alkalische Phosphatase zugesetzt und erneut bei 37 °C und 80 °C für je 15 Min. inkubiert.

Annealing-Reaktion: Zu den vorbehandelten PCR-Produkten wurden 1 μl (5 - 10 pmol) Sequenzierprimer und 2 μl 5 x Sequenzierpuffer addiert. Die DNA wurde durch 5 minütige Inkubation bei 98 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

Markierungsreaktion: Auf Eis wurden folgende Komponenten für die Markierungsreaktion addiert:

1 μl	0.1 M DTT
2 μl	Labelling Mix (1:5 verd. mit H_2O)
0,5 μl	[^{35}S]-dATPS
2 μl	Sequenase Polymerase (1,6 U/ μl) + Pyrophosphatase ($6,25 \times 10^{-4}$ U)

Die Markierungsreaktion wurde 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Terminationsreaktion wurden jeweils 3,5 μl der Markierungsreaktion entnommen und zu je 2,5 μl (G-, A-, T-, C-) Terminationsmix mit den entsprechenden Didesoxynukleotiden gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Min. bei 37 °C wurden die Reaktionen gestoppt durch Zugabe von 4 μl Formamid-Ladepuffer. Die Proben wurden für 5 Min. auf 75 °C erhitzt und von jeder Sequenzierreaktion wurden 2 - 3 μl auf ein denaturierendes Sequenziergel (6 % Polyacrylamid, 7,5 M Harnstoff, 1 x TBE) geladen und mit 1800 V, 40 W aufgetrennt für 1 - 2 Stunden. Gegebenenfalls wurden die Proben nach 90 Min. Elektrophorese nochmals geladen, um die Leseweite zu erhöhen. Die Banden der Sequenzierreaktion wurden durch Autoradiographie für 1 - 7 Tage bei Raumtemperatur oder -70 °C visualisiert.

Alternativprotokoll: PCR-Produkt Sequenzierung mit [^{33}P]-ddNTPs: Im Unterschied zu der beschriebenen radioaktiven Sequenziermethode, die auf der Markierung des Produkts mit einem radioaktiven Desoxynukleotid beruhen, sind bei der [^{33}P]-ddNTP-Sequenzierung die Didesoxyterminatoren radioaktiv markiert. Das führt zu einer spezifischeren Sequenzierung, vor allem durch das Wegfallen von sog. "Stops", d.h. unspezifische Syntheseabbrüche aufgrund von DNA-Sekundärstrukturen, die das Abfallen der Polymerase vom Matrizenstrang bewirken. Zudem wird das relativ neue Isotop ^{33}P verwendet, das bezüglich Halbwertszeit und Strahlungsintensität zwischen den gängigen Isotopen ^{32}P und ^{35}S steht und somit die Vorteile der beiden Isotopen in sich vereint.

Die PCR-Produkte wurden wie beschrieben mit Exonuclease und Phosphatase vorbehandelt. Davon wurden 0,5 - 2 μ l als Matrize für die zyklische Sequenzierung eingesetzt. Auf Eis wurden folgende Komponenten addiert (Vormix):

2 μ l	10 x Reaktionspuffer
2 - 5 pmol	Sequenzierprimer
ad 20 μ l	H ₂ O
2 μ l (8 U)	Thermosequenase

Terminations Mastermix: Je 2 μ l Terminations Mastermix, entweder dGTP oder dITP-Mix, wurden zu je 0,5 μ l [α -³³P] ddNTP (G-, A-, T- und C-) addiert.

Im Weiteren wurden je 4,5 μ l des Vormixes zu 2,5 μ l G-, A-, T- und C-Terminationsmix gemischt, die Proben mit Paraffin überschichtet und nach folgendem Thermoprofil sequenziert:

dGTP	dITP
95 °C, 30 Sek.	95 °C, 30 Sek.
55 °C, 30 Sek.	50 °C, 30 Sek.
72 °C, 60 Sek.	60 °C, 5 - 10 Min.

Es wurden entweder 30 oder 35 oder 40 Zyklen gefahren. Nach Addition von 4 μ l Formamid-Ladepuffer wurden die Proben für 5 Min. auf 75 °C erhitzt und 2 - 3 μ l auf ein Sequenziergel geladen und die Elektrophorese durchgeführt wie oben beschrieben.

3.2.10.2 Radioaktive Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA (USB, Amersham, Licor)

Plasmid-DNA Präparationen nach Sambrook et al. (3.2.1.3) wurden mit Sequenase Polymerase 2.0 (USB) und [³⁵S]-dATPS sequenziert. Zunächst wurden 3 - 5 μ g doppelsträngige Plasmid-DNA durch Addition von 1/10 Vol. 2 M NaOH, 2 mM EDTA und eine Inkubation für 30 Min. bei 37 °C denaturiert. Das Gemisch wurde schließlich neutralisiert mit 1/10 Vol. 3 M Kaliumacetat und die DNA gefällt mit 2 - 4 Vol. Ethanol bei -70 °C für 15 Min. Die DNA wurde durch Zentrifugation mit 13000 rpm für 15 Min. gesammelt, das Pellet einmal gewaschen mit 70 % Ethanol und schließlich in 7 μ l H₂O resuspendiert. Nach Addition von 2 μ l 5 x Sequenzierpuffer und 1 μ l (5 - 10 pmol) Sequenzierprimer wurde die Annealing-Reaktion für 2 Min. auf 65 °C erhitzt und über einen Zeitraum von 30 Min. auf 37 °C abkühlen lassen.

Markierungs- und Terminationsreaktionen sowie die Elektrophorese wurden wie in 3.2.10.1 beschrieben durchgeführt.

3.2.10.3 Infrarotfluoreszenzsequenzierung auf dem Licor 4000 DNA-Sequencer

Die Fluoreszenzsequenzierung bietet gegenüber anderen Methoden den Vorteil, daß keine radioaktiven Substanzen verwendet werden müssen. Die Signale werden in Echtzeit detektiert, womit die Wartezeit für die Autoradiographie entfällt. Die Sequenzdaten liegen gleich in elektronischer Form vor, ohne zeitraubendes und fehleranfälliges manuelles Einlesen. Das Licor-System weist darüber hinaus noch eine höhere Leseweite, Unabhängigkeit von einem bestimmten Sequenzierkit und einfache Handhabung auf. Die Sequenzierreaktion wird mit einem Infrarotfarbstoff-gekoppelten Primer markiert und einer Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen. Die Detektionseinheit befindet sich über dem unteren Rand des Gels auf einem beweglichen Schlitten und besteht aus einem Infrarotlaser (785 nm) und einer Silizium-Photodiode. Der Laser regt die farbstoffmarkierten Sequenzierprodukte zur Fluoreszenz an, die durch die Avalanche-Diode detektiert und verstärkt wird. Die Detektionseinheit scannt in regelmäßigen Abständen die ganze Breite des Sequenziergels und sendet die Daten an einen angeschlossenen Computer zur graphischen Darstellung und Auswertung.

Sequenzierung von Plasmid-DNA mit Sequitherm Polymerase (Epicentre): Für die Plasmidsequenzierung wurden 500 - 1000 ng Qiagen-gereinigte DNA eingesetzt. Dazu wurden folgende Komponenten addiert:

2,5 µl	10 x Sequitherm Puffer
1 - 2 pmol	IRD41-markierter Primer
ad 16 µl	H ₂ O
1 µl (5 U)	Sequitherm DNA Polymerase

Je 4 µl Vormix wurden zu je 2 µl (G-, A-, T-, C-) Long-Read Termination Mix addiert und die Reaktionen mit Paraffin überschichtet. In einem Thermocycler wurde die DNA denaturiert für 5 Min. bei 95 °C und anschließend eine zyklische Sequenzierung mit dem folgenden Profil durchgeführt: 30 Sek. bei 95 °C, 20 Sek. bei 55 (60) °C und 60 Sek. bei 70 °C. Nach der Sequenzierung wurden 4 µl Formamid-Ladepuffer addiert, die Proben für 5 Min. bei 75 °C inkubiert und je 1.5 µl auf ein Sequenziergel (6 % PAA, 7,5 M Harnstoff, 1,2 x Long Run TBE; 0,4 mm Dicke, 41 cm Trennstrecke) geladen. Die Elektrophorese-bedingungen waren:

1500 V, 35 mA, 50 Watt, 55 °C. Es wurden 25 frames gesammelt und die DNA-Sequenzen nach der automatischen Sequenzierung durch die Software manuell korrigiert.

Sequenzierung von Plasmid-DNA mit Sequitherm EXCEL Polymerase (Epicentre): Als template wurden 500 - 1000 ng Qiagen-gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt. Bei Bedarf wurde die DNA in der Speedvac eingetrocknet und das Pellet in wenigen µl H₂O gelöst. Schließlich wurden folgende Komponenten zum Vormix addiert:

5 µl	5 x Sequitherm EXCEL Puffer A
2,5 µl	10 x Sequitherm EXCEL Puffer B
1 - 2 pmol	IRD41-markierter Primer
ad 16 µl	H ₂ O
1 µl (5 U)	Sequitherm EXCEL DNA Polymerase

Die Reaktionen wurden nun wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Sequenzierung von Plasmid-DNA mit Thermosequenase (Amersham): Für den Vormix wurden 500 - 1000 ng Qiagen-gereinigte Plasmid-DNA, 2 pmol IRD41-markierter Primer und H₂O ad 25 µl angesetzt. Davon wurden je 6 µl entnommen und auf Eis zu den 4 G-, A-, T-, C-Reagentien (inkl. Puffer und Thermosequenase) addiert. Die Reaktionen wurden mit Paraffin überschichtet und mit demselben Thermoprofil wie oben zyklisch sequenziert. Die Elektrophorese wurden wie oben durchgeführt.

Sequenzierung von PCR-Produkten mit Sequenase 2.0 (USB): Die PCR-Produkte wurden wie in 3.2.10.1 beschrieben vorbehandelt und sequenziert. Statt eines unmarkierten Primers wurden 2 pmol IRD41-markierter Primer verwendet. Die Elektrophorese wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Sequenzierung von PCR-Produkten mit Sequitherm Polymerase (Epicentre): Die PCR-Produkte wurden wie in 3.2.10.1 beschrieben vorbehandelt. Davon wurden 1 - 2 µl als Matrize für eine zyklische Sequenzierung mit 1 - 2 pmol IRD41-markiertem Primer eingesetzt. Das weitere Vorgehen ist unter Plasmid-DNA Sequenzierung (s. o.) beschrieben.

3.2.11 Southern-Hybridisierung (Southern, 1975)

Die Southern-Hybridisierung ist eine Methode zur Analyse von DNA und beruht auf der spezifischen Hybridisierung einer bestimmten, als Sonde benutzen DNA zu einer

immobilisierten Ziel-DNA. In einem Blotting-Verfahren wird die Ziel-DNA z.B. von einem Agarosegel auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran transferiert oder in einem Dot-Blot-Verfahren auf die Membran aufgebracht. Die Membran wird bei erhöhter Temperatur (meist 65 °C) in einer Hybridisierungslösung mit der radioaktiv oder chemisch markierten und denaturierten Sonden-DNA inkubiert und nicht gebundene Sonden-DNA wird durch Waschen entfernt. Die Sonde wird dann durch Autoradiographie oder Chemilumineszenz nachgewiesen.

Kapillarblot: Restriktionsverdau von genomischer oder Cosmid-DNA sowie ein Größenmarker (*Hind* III-verdaute DNA des Phagen λ) wurden auf einem 0,8 oder 2 % Agarosegel mit niedriger Spannung (2 V/cm) aufgetrennt. Die Elektrophorese von genomischer DNA dauerte über Nacht, Cosmid-DNA mehrere Stunden. Unverdaute oder verdaute Hefe-DNA wurde wie unter 3.2.12 beschrieben auf einem 1,5 % Agarosegel im Pulsfeld aufgetrennt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel in 1 x TBE + 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid für 15 - 30 Min. gefärbt und mittels Still-Video-Printer dokumentiert. Zur Depurinisierung der DNA wurde das Gel zweimal für je 20 - 30 Min. in 0,25 N HCl unter ständiger Bewegung inkubiert und anschließend zweimal je 1 Min. mit H₂O gewaschen. Gele mit einer Agarosekonzentration von mehr als 0,8 % wurden zweimal für je 10 - 15 Min. in 0,4 N NaOH denaturiert. Der Kapillarblot erfolgte mit 0,4 N NaOH in einer Fotoschale mit Plexiglasbrücke. Ein breiter Filterkarton (Schleicher & Schüll Nr. 2282) diente als "Docht" und wurde auf die Brücke gelegt und in die Blotlösung getaucht. Auf den Filterkarton wurde das Gel gelegt und darauf eine gleich große Hybond N+ Nylon Membran. Auf die Membran wurden noch zwei dünne (Whatman 3MM) und zwei dicke Filterkartons und schließlich mehrere Lagen Zellstoff gelegt. Am nächsten Tag wurde die Membran entnommen, für 1 - 2 Min. in 2 x SSC geschwenkt und zwischen 2 Lagen Whatman-Papier getrocknet.

Markierung der Sonden-DNA (Feinberg & Vogelstein, 1983): Als Hybridisierungssonde wurden aufgereinigte PCR-Produkte, Inserts von klonierter DNA, Plasmide mit klonierter DNA, humane gesamtgenomische DNA oder humane COT1-DNA verwendet. Zwanzig bis fünfzig ng Sonden-DNA wurden mit 50 - 200 pg *Hind* III-verdauter λ -DNA gemischt, mit TE-Puffer auf 11 μ l aufgefüllt und im Wasserbad-Thermocycler für 5 Min. bei 98 °C denaturiert. Nach dem Abschrecken auf Eis wurden 4 μ l OLB-Puffer, 1 μ l BSA, 1 μ l Klenow-Enzym und 2 μ l [³²P]-dCTP addiert und der Ansatz bei Raumtemperatur über Nacht oder bei 37 °C für 2 - 3 Std. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 μ l TEN

gestoppt. Zur Aufreinigung der Sonden-DNA wurde eine Gelfiltration mit Sephadex-G50 Säulen durchgeführt (Maniatis et al., 1989).

Hybridisierung: Die Membran wurde in einen Hybridisierungszylinder mit 20 ml vorgewärmtem Church-Puffer gegeben und bei 65 °C für eine bis mehrere Std. in einem Rotations-Hybridisierungssofen vorhybridisiert. Der Puffer wurde durch 20 - 30 ml frischen Church-Puffer ersetzt und vorgewärmt, dann wurde die für 10 Min. bei 98 °C denaturierte und auf Eis abgeschreckte Sonde zugegeben und über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Die Sonde wurde für eine nochmalige Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die Membran wurde im Zylinder gewaschen für je 20 Min. bei 65 °C erst mit 2 x SSC + 0,1 % SDS, dann mit 0,5 x SSC + 0,1 % SDS und schließlich mit 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Für sehr stringente Waschbedingungen wurde noch ein Schritt mit 1 x SSC + 0,1 % SDS angehängt, für weniger stringentes Waschen der letzte oder vorletzte der obigen Schritte weggelassen. Für ganz niedrige Stringenz wurde mit 5 x SSC + 0,1 % SDS begonnen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde die Membran mit einem β -Strahlen Detektor gemessen.

Die Membran wurde in eine Polyethylenfolie eingeschweißt und die Signale durch Autoradiographie für 1 - 7 Tage bei Raumtemperatur oder -70 °C detektiert.

3.2.12 Pulsfeld-Gelelektrophorese von YACs (Schwartz et al., 1983; Schwartz & Cantor, 1984)

Die normale Agarose-Gelelektrophorese findet ihre Grenze bei DNA-Fragmenten, die größer als 30 - 40 kb sind. Man vermutet den Grund darin, daß sich diese langen Moleküle im elektrischen Feld so orientieren, daß sie der Länge nach die Poren der Gelmatrix "durchtunneln" und somit den Siebeffekt aufheben, der kleinere Fragmente der Größe nach auftrennt. Das hat zur Folge, daß die Wanderungsgeschwindigkeit und Position im Gel unabhängig von der Größe der Fragmente ist. Diese Problematik wurde überwunden durch die Pulsfeld-Gelelektrophorese, bei der das Gel zwischen zwei alternierenden elektrischen Feldern, die in einem Winkel von 120 ° wirken, gefahren wird. Das zwingt die DNA-Moleküle bei jedem Wechseln des Feldes zu einer Neuorientierung und letztendlich zur Auftrennung entsprechend der Molekülgröße. Die Pulsfeld-Gelelektrophorese erlaubt die Separation von hochmolekularer DNA bis in den Bereich von einigen Megabasen.

Präparation von Hefe-Blöckchen: Hefezellen eines YAC-Klons wurden aus einem Glycerinstock oder von einer Petrischale abgeschabt und damit 10 ml AHC- oder YPD-Medium angeimpft. Die Kultur wuchs für 2 Tage bei 30 °C im Schüttler mit 150 rpm. Die Zellen wurden geerntet durch Zentrifugation mit 2000 rpm für 5 Min., das Pellet in 500 µl H₂O suspendiert und für 10 Sec. zentrifugiert. Die Zellen wurden nun suspendiert in 270 µl SEM und 300 U Lyticase. Eine 1 % Lösung von LMP-Agarose in 50 mM EDTA wurde aufgekocht und in einem 50 °C Wasserbad abkühlen lassen. Hiervon wurden 375 µl entnommen, schnell mit den Hefezellen gemischt und in eine Blöckchengießform pipettiert. Pro Ansatz ergaben sich 5 - 7 Blöckchen (ca. 7,5 x 7,5 x 1,5 mm). Die Gießform wurde für 10 Min. bei 4 °C abgekühlt, die Blöckchen in 3 ml SCEM überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Blöckchen in 3 ml YLB überführt und mehrere Std. unter vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur die Hefezellen lysiert, wobei der Lysispuffer zwischendurch einmal gewechselt wurde. Die Lyse wurde für 2 Tage bei 50 °C fortgesetzt. Die Blöckchen wurden schließlich 3 mal für je 1 Std. gewaschen in 3 ml TE bei 50 °C und schließlich in frischem TE-Puffer bei 4 °C aufbewahrt.

Restriktionsverdau von Hefe-Blöckchen: Für einen Restriktionsverdau wurde je ein halbes YAC-Blöckchen in ein Eppendorfgefäß gegeben und ein Restriktionsmix aus den folgenden Komponenten addiert: 2 x Restriktionspuffer, 100 U Restriktionsenzym und H₂O ad 50 µl. Die Ansätze wurden bei der entsprechenden Temperatur, meist 37 °C, über Nacht inkubiert.

Gelelektrophorese: Für die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde ein rundes 1,5 % Agarosegel in 0,5 x TBE gegossen und abkühlen lassen. In die Taschen des Gels wurde je ein halbes Hefe-Blöckchen blasenfrei versenkt und mit LMP-Agarose aufgefüllt. Als DNA-Standard wurde ein halbes Blöckchen einer lambda-ladder (FMC BioProducts) geladen. Das Gel wurde in die PFGE-Apparatur eingebaut und unverdaute Hefe-DNA bei einer Spannung von 160 V aufgetrennt mit einer Pulszeit von 70 Sek. für 15 Std. und anschließend 120 Sek. Puls für eine Dauer von 12 Stunden. Restriktionsverdau wurden mit 180 V für 24 Std. bei einer Pulszeit von 30 Sek. aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer fungierte auf 14 °C temperiertes 0,5 x TBE. Das Gel wurde für 1 - 2 Std. in 0,5 x TBE + 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, dokumentiert und falls nötig geblotted wie beschrieben.

3.2.13 Muskel-cDNA-Selektion mit Cosmiden und YACs (Parimoo et al., 1991; Lovett et al., 1991)

Ein Problem der Positionsklonierung und der Suche nach Kandidatengenem ist das Finden von exprimierten Sequenzen in klonierter genomischer DNA. Eine relativ einfache und schnelle Methode ist die cDNA-Selektion (s. Schema 3.2.13.2). Sie basiert auf der Hybridisierung eines Pools gewebespezifischer cDNAs zu klonierter genomischer DNA und der anschließenden Elution, Amplifikation und Klonierung der durch die genomische DNA codierten cDNA. Hierzu isoliert man RNA aus dem Gewebe, das die gesuchten Gene exprimiert und schreibt diese um in cDNA (Reverse Transkription, Abb. 3.2.13.1). Die Primer hierfür sind so gewählt, daß man die diversen cDNAs mit demselben Primer amplifizieren kann. Die genomische DNA kann in beliebige Vektoren kloniert sein: Bakteriophagen P1, YACs, PACs und BACs und wird entweder auf eine Membran aufgebracht (Blot) oder mit einer Markierung für eine magnetische Separation versehen. Bei der Hybridisierung müssen repetitive Sequenzen maskiert werden, z.B. durch Vorhybridisierung mit einem mehrfachen Überschuß an COT1- oder gescherter, humaner Placenta-DNA. Nach der Hybridisierung entfernt man ungebundene cDNA-Moleküle durch Waschen und eluiert die hybridisierten cDNAs. Diese werden in einer PCR amplifiziert und als Ausgangsmaterial für eine 2. oder 3. Hybridisierungsrunde verwendet oder mittels Klonierungskassette in der Primersequenz kloniert und analysiert. Auf diese Weise werden cDNAs, die ihren genomischen Ursprung in der klonierten DNA haben, um mehrere Größenordnungen angereichert und können dann untersucht werden.

3.2.13.1 Präparation von YAC- und Cosmid-DNA

Präparation von YAC-DNA: Die YACs Y3 und Y4 wurden in 30 ml Kulturen für 2 Tage bei 30 °C mit 150 rpm im Schüttler wachsen lassen, nach 3.2.12 Blöckchen hergestellt und 4 davon auf einem präparativen Pulsfeldgel aufgetrennt. Die Bande mit dem künstlichen Hefechromosom wurde ausgeschnitten und in ein Agarosegel eingegossen. Zur Nick-Translation der DNA wurde das Gel 10 Min. in 0,25 M HCl inkubiert und schließlich 30 Min. denaturiert in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl auf einer Wippe. Nach der Neutralisation mit 0,5 M Tris-HCl/1,5 M NaCl pH 8,0 wurde die DNA auf eine Nylonmembran (Hybond N+) im Kapillarverfahren mit 10 x SSC geblotted. Der Membranfleck mit der YAC-DNA wurde ausgeschnitten und für die Selektion mit Muskel-cDNA benutzt. Die YAC-DNA von Y4 comigrierte mit einem Hefechromosom und wurde zusammen mit diesem ausgeschnitten.

Präparation von Cosmid-DNA: Nach 3.2.1.4 hergestellte DNA der Cosmide 15 - 5 (Test-Contig) und 6 - 23 (ohne 8; Kontroll-Contig; s. Abb. 2.1.6.3) wurde für 5 Min. bei 94 °C denaturiert und je ca. 1 µg mit einer Pipette auf zwei kleine Stückchen (ca. 1 cm²) Nylonmembran aufpipettiert und antrocknen lassen. Zusätzlich wurde die DNA in einem UV-Crosslinker (Stratagene UV-Crosslinker 1800) bei 254 nm mit 120000 µJ/cm² für 25 - 50 Sek. fixiert.

3.2.13.2 Herstellung eines Skelettmuskel-cDNA Pools

Präparation von Muskel-RNA (Chomczynski & Sacchi, 1987): Die Muskelbiopsien wurden den Probanden im Rahmen einer IVCT-Diagnostik am Institut für Anästhesie der Universität Würzburg entnommen, ein Teil hiervon wurde für die RNA-Isolierung verwendet. Ca. 200 mg einer Gluteus maximus-Biopsie von einer 32 Jahre alten MHN-Probandin wurden in einer stickstoffgekühlten Apparatur zu einem Pellet geklopft und in 3 ml Denaturierungslösung plus 21 µl β-Mercapto-Ethanol in einem Glas-Teflon-Homogenisator (Framo Gerätetechnik) mit 1800 rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 300 µl 2 Natriumacetat (pH 4) zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 3 ml wassergesättigtem Phenol und nochmaligem Mischen wurden 600 µl einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (49:1) zugegeben, gemischt und 15 Min. auf Eis inkubiert. Die extrahierten Zelltrümmer wurden für 20 Min. mit 10000 g bei 4 °C abzentrifugiert und die wäßrige, obere Phase mit der RNA in ein frisches Röhrchen überführt. Die RNA wurde ausgefällt durch Zugabe von 3 ml 100 % Isopropanol und eine Inkubation bei -20 °C für 30 Min. und pelletiert mit 10000 g für 10 Min. bei 4 °C. Das Pellet wurde in 900 µl Denaturierungslösung resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Muskel-RNA wurde erneut gefällt mit 900 µl 100 % Isopropanol für 30 Min. bei -20 °C und durch Zentrifugation für 10 Min. mit 10000 g bei 4 °C gesammelt. Das Pellet wurde nun in 75 % Ethanol suspendiert, gevortext und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um das Guanidinium vollständig zu entfernen. Die RNA wurde wieder durch Zentrifugation angereichert (5 Min, 10000 g) und das Pellet unter Vakuum für 5 - 15 Min getrocknet. Die RNA wurde in 100 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst und ein Aliquot zur OD-Bestimmung entnommen. Die gewonnene Skelettmuskel-RNA wurde bei -70 °C gelagert.

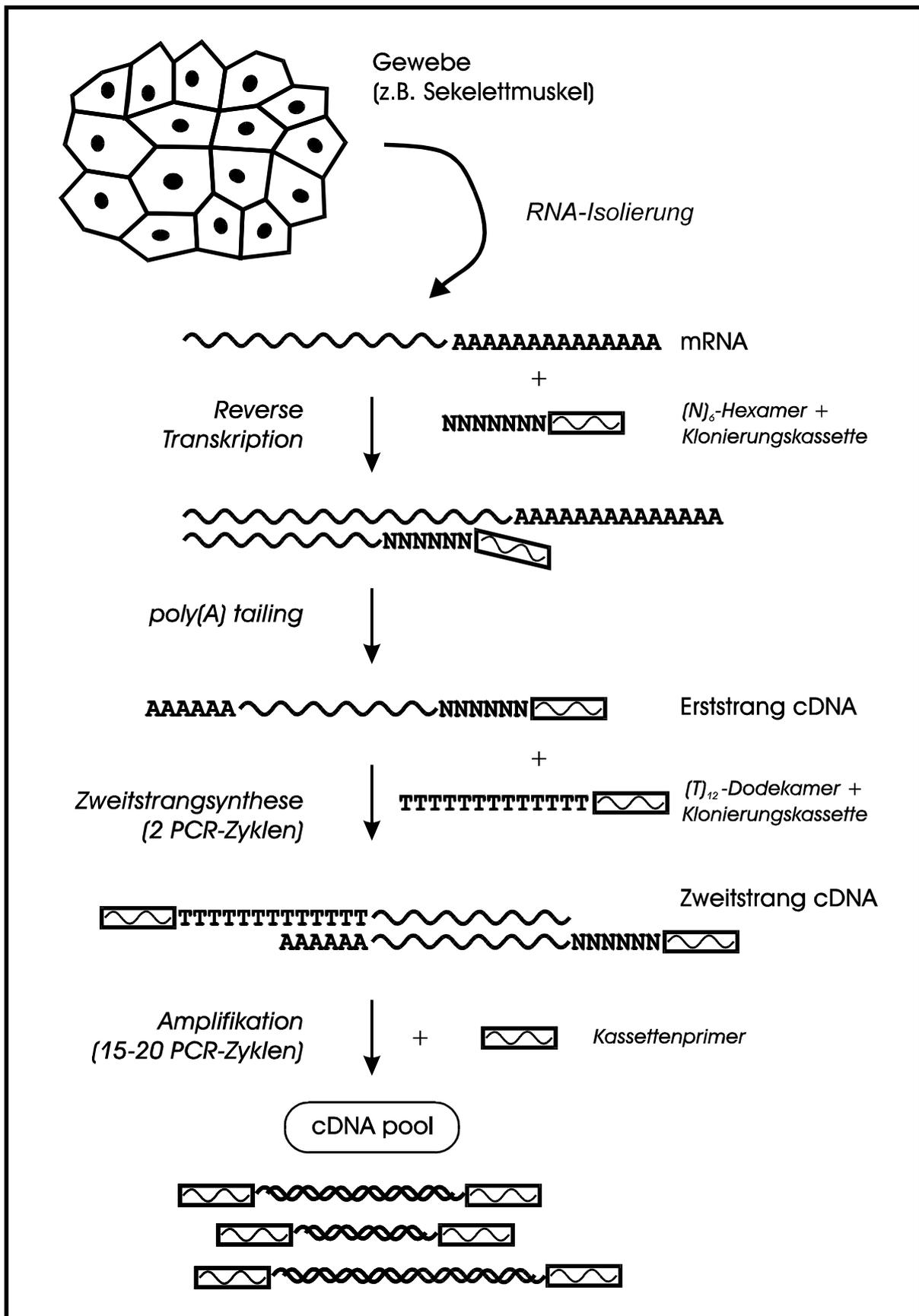


Abb. 3.2.13.1 Schema zur Herstellung des Skelettmuskel-cDNA Pools.

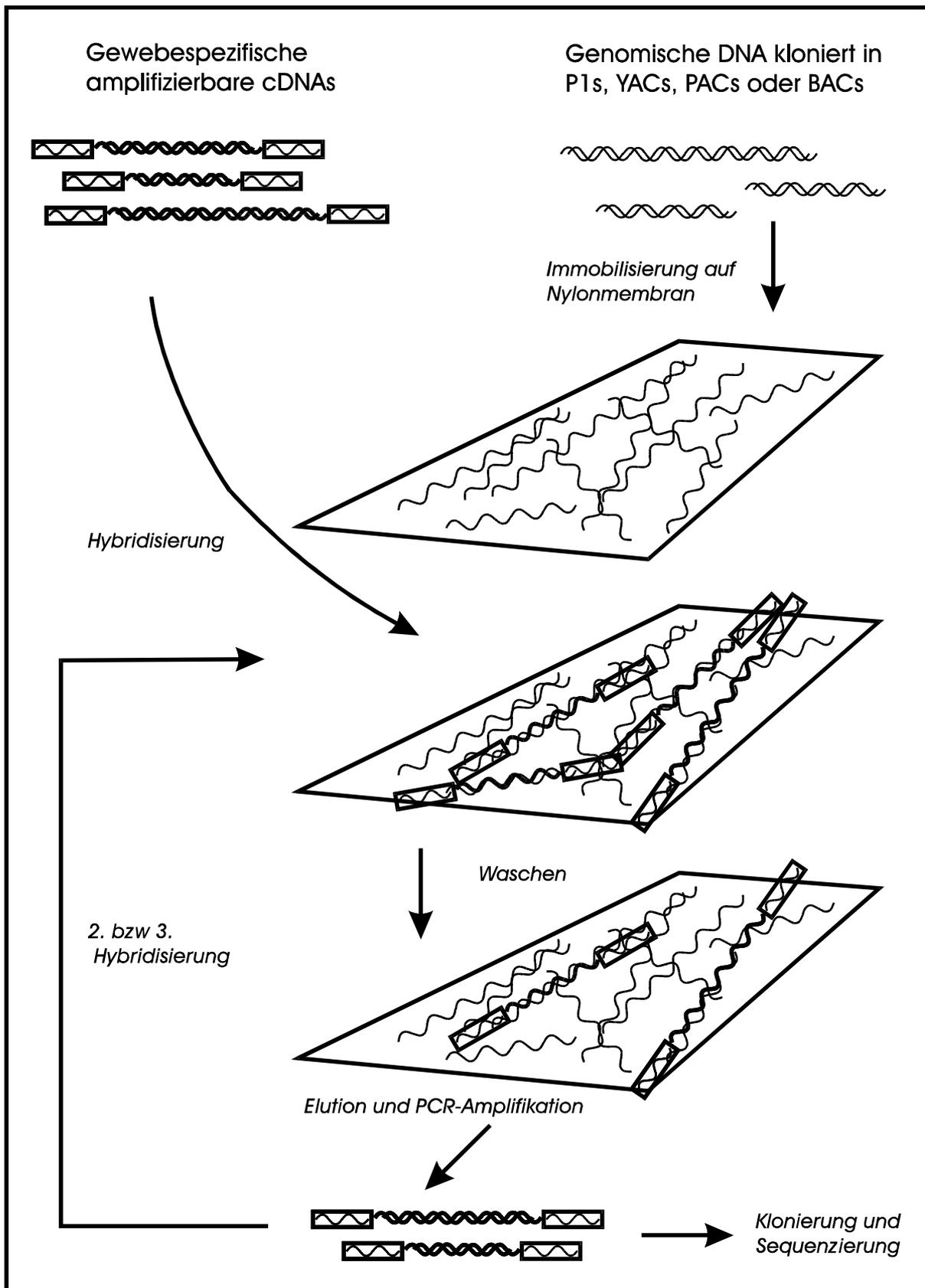


Abb. 3.2.13.2 Vereinfachtes Schema zur cDNA-Selektion.

Erst- und Zweitstrang-cDNA Synthese: Für die Reverse Transkription von Muskel-RNA wurde folgende Komponenten angesetzt:

20 μ l RNA aus Skelettmuskel (~ 20 μ g)
160 μ l DEPC-H ₂ O
6 μ l RNAGuard (205 U)
$\Sigma = 186 \mu$ l

Der Ansatz wurde für 10 Min. bei 65 °C inkubiert und für 10 Min. auf Eis abgekühlt.

Anschließend wurden folgende Komponenten addiert:

60 μ l 5 x Reverse Transkriptase-Puffer
2 μ l RXG-(N) ₆ T-Primer (~ 3,6 μ g)
30 μ l 5 mM dNTPs
2 μ l [α - ³² P]-dCTP
20 μ l M-MLV-Reverse Transkriptase (4000 U)
$\Sigma = 300 \mu$ l

Die Reverse-Transkription wurde für 2 Std. bei 37 °C durchgeführt. Die Transkriptionsreaktion wurde mit 60 μ l 5 x NaOH/EDTA versetzt und für 10 Min. bei 65 °C denaturiert. Schließlich wurden 30 μ l 2,55 M Kaliumacetat (pH 5,5) und 1 ml Ethanol addiert und die Erststrang-cDNA über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Am Vortag wurde eine Biogel-Säule aus Agarose beads (Bio-Gel A-5m, 200 - 400 mesh, BIORAD) in einer 1 ml Plastikpipette hergestellt und 2 mal mit je 5 ml 0,05 x TBE äquilibriert. Die Erststrangsynthese wurde für 20 Min. bei 4 °C mit 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet nach Eintrocknen in der Speedvac in 50 μ l DEPC-H₂O gelöst. Zu der cDNA wurden 50 μ l 0,05 x TBE addiert, das Gemisch auf die Säule gegeben und mit 0,05 x TBE eluiert. Die ersten 1,5 ml wurden verworfen, dann wurden 22 Fraktionen à ca. 300 μ l aufgefangen. Die Fraktionen wurden zwischendurch mit einem β -counter auf Radioaktivität überprüft. Von jeder Fraktion wurde ein 2 μ l-aliquot entnommen, mit 2 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt und auf einem Szintillationsdetektor gemessen. Außerdem wurde von jeder Fraktion ein 10 μ l-aliquot entnommen für eine Test-PCR mit Primern (Tab. 3.2.13.2.1) aus dem Glucuronidase-Gen,

einem sog. Haushaltsgen, das mit ca. einer Kopie pro Zelle exprimiert wird. Eine weitere Test-PCR wurde mit den Primern 1001/1066 (Tab. 3.2.13.2.1) aus der *RYR1*-cDNA durchgeführt, als Positivkontrolle für die Anwesenheit der *RYR1*-mRNA und großer Transkripte allgemein. Die Volumina der eluierten cDNAs wurden in der Speedvac auf ca. 50 µl eingengt. Von den ersten 4 Fraktionen zunehmender Radioaktivität wurden je 4 µl entnommen und vereinigt als gewebespezifischer cDNA Pool für die cDNA-Selektion von genomischer DNA eingesetzt.

Name	Sequenz	Lokalisation	Größe des PCR-Produkts
Gus B3	ACTATCGCCATCAACAACACACTSACC	Gus Exon 8	1086
Gus B4	GCTCTGAATAATGGGCTTCTG	Gus Exon 10	
RYR1-1001	GCCCCCTGAGATCAAGTAC	RYR1	86
RYR1-1066	GTCTGGAGCGGCATAGGTGAG	RYR1	

Tab. 3.2.13.2.1 Sequenzen der verwendeten Primer für die Kontroll-PCR des cDNA Pools.

polyA-tailing der Erststrang-cDNA:

16 µl vereinigte cDNA-Fraktionen
20 µl 5 x tailing buffer (inkl. CoCl ₂)
6 µl TdT (Terminale deoxynucleotidyl Transferase, 17 U/µl)
4 µl dATP 5 mM
ad 100 µl H ₂ O

Die Reaktion wurde 15 Min. bei 37 °C durchgeführt, anschließend das Enzym bei 65 °C, 15 Min. zerstört. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 500 µl verdünnt und 5, 10, und 20 µl Aliquots entnommen für eine Test-PCR mit den Primern RXG und RXG(T)₁₂ im molaren Verhältnis 20:1. Für die Zweitstrangsynthese wurden 4 Parallelansätze mit je 20 µl der Polyadenylierungsreaktion durchgeführt:

10 µl 10 x PCR-Puffer (+ 15 mM Mg ²⁺)
16 µl dNTPs je 1.25 mM
6,5 pmol Primer RXG(T) ₁₂
130 pmol Primer RXG
2 µl <i>Taq</i> Polymerase
ad 100 µl H ₂ O

Die Zweitstrangsynthese wurde im Thermocycler mit dem folgenden Profil durchgeführt: Eine einmalige Denaturierung von 3 Min. bei 94 °C, anschließend 45 Sek. bei 94 °C, 45 Sek. bei 37 °C und 150 Sek. bei 72 °C und letztlich 5 Min. bei 72 °C. Dieses Temperaturprofil wurde einmal wiederholt, dann wurde die Annealing-Temperatur auf 58 °C erhöht und der cDNA Pool in 20 Zyklen amplifiziert. Die 4 Ansätze wurden in einem Gefäß vereinigt.

Name	Sequenz	Verwendung
RXG*	CGGAATTCTCGAGATCT	Amplifikation des cDNA Pools und der eluierten cDNAs Zweitstrang-cDNA Synthese
RXG(N ₆)T	CGGAATTCTCGAGATCTNNNNNNNT	Reverse Transkription
RXG(T) ₁₂	CGGAATTCTCGAGATCTTTTTTTTTTTTTT	Zweitstrang-cDNA Synthese

Tab. 3.2.13.2.2 Sequenzen und Verwendungszweck der Primer für die cDNA-Selektion. *Der Name leitet sich von den Restriktionsschnittstellen der Klonierungskassette ab: *EcoR* I, *Xba* I und *Bgl* II.

3.2.13.3 cDNA Selektion

Hybridisierung: Dem cDNA Pool wurden 80 µg Ultraschallbehandelte, menschliche Placenta-DNA, 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 7,2) und 2,5 Vol Ethanol hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei -20 °C gelagert. Die gefällte cDNA wurde durch Zentrifugation (20 Min., 15000 rpm, 4 °C) gesammelt und das Pellet in 90 µl H₂O gelöst. Nach Addition von 10 µl 2 M NaOH/ 10 mM EDTA wurde der Pool für 10 Min. auf 60 °C erhitzt und schließlich 1/10 Vol. 2 M Ammoniumacetat und 1/3 Vol. 20 x SSC zugefügt. Die Mischung wurde für 1 Std. bei 55 °C inkubiert und anschließend 700 µl vorgewärmter Church-Puffer addiert. In der Zwischenzeit wurde die Membran mit der Cosmid- oder YAC-DNA in einem 2 ml NUNC-Kryotube mit 1 ml Church-Puffer vorhybridisiert. Der Church-Puffer wurde

abgegossen und durch die vorgewärmte cDNA-Hybridisierungsmischung ersetzt. Die Hybridisierung wurde für 4 Tage in einem Rotationshybridisierungssofen durchgeführt.

Waschen: Die Membran wurde einmal gewaschen mit 2 x SSC + 0,1 % SDS für 30 Min. bei Raumtemperatur und schließlich dreimal je 30 Min. mit 0,2 x SSC + 0,1 % SDS bei 60 °C. Zum Abschluß wurde die Membran in 2 x SSC geschwenkt.

Elution: Die Membran wurde in ein frisches Gefäß überführt, 250 µl H₂O addiert und bei 100 °C für Min. aufgekocht. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und die Elution mit 200 µl H₂O wiederholt. Die Eluate wurden vereinigt, gemischt und halbiert. Eine Hälfte wurde als Ausgangsmaterial für eine 2. oder 3. Hybridisierung benutzt, die andere Hälfte zur Analyse und Klonierung.

Klonierung: Mit 5, 10 und 20 µl Eluat wurde eine Test-PCR mit dem Primer RXG durchgeführt, um die template-Menge für die präparative Amplifikation zu bestimmen. Dann wurden 2 x 100 µl PCR-Reaktionen angesetzt mit der entsprechenden Menge cDNA-Eluat, 50 pmol Primer RXG und 5 U *Taq* Polymerase. Die PCR wurde wie die cDNA-Amplifikation durchgeführt, nur die Annealing-Temperatur wurde auf 54 °C erniedrigt und die Zahl der Zyklen auf 27 erhöht. Die Reaktionen wurden auf einem 1,4 % Agarosegel aufgetrennt und der Bereich von ca. 0,5 bis 1,5 kb ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Agarosegel eluiert, wie beschrieben, mit *Eco* RI verdaut und in *Eco* RI-verdaute und dephosphorylierte pBTKSII- DNA kloniert. Rekombinante Klone wurden einzeln in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten isoliert und in 150 µl LB/Ampicillin über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Charakterisierung der Klone: Zur Charakterisierung der Klone wurden PCRs mit M13-Vektor- und/oder RXG-Primer durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit einer 8-Kanalpipette auf eine Hybond N+ Nylonmembran im Dot Blot-Verfahren aufgebracht. Die Membran mit den PCR-Produkten wurde mit COT1-DNA als Sonde hybridisiert, um Klone mit repetitiven Sequenzen zu erkennen. Die übrig gebliebenen Klone wurden wie beschrieben präpariert und sequenziert. Interessante cDNA Klone wurden schließlich als Sonde für eine Southern Hybridisierung mit verdauter Cosmid- oder YAC-DNA benutzt, um zu prüfen, ob die Klone exklusiv mit einem genomischen Klon hybridisieren.

3.3 Verwendete Chemikalien u. Lösungen

3.3.1 Pufferlösungen und Kulturmedien

AHC-Medium für Hefekulturen:

yeast nitrogen base	0,17 %
NH ₄ SO ₄	0,5 %
Casein	1 %
Adenin-Hemisulfat	0,002 %
Glucose	2 %
[Bacto-agar	2 %, nur für Agarplatten]

Church-Puffer:

Na ₃ PO ₄	0,5 M (140 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ + 360 ml 1 M Na ₂ HPO ₄)
SDS	7 %
Na ₂ -EDTA	1 mM
H ₂ O	ad 1 l

Denaturierungslösung für RNA-Präparation:

Guanidinium-Thiocyanat	4 M
Natriumcitrat pH 7	25 mM
N-Lauroylsarcosin	0,5 %
β-Mercaptoethanol	100 mM, frisch zugeben

Entwicklerlösung für Silberfärbung:

Na ₂ CO ₃	2 %
Formaldehyd	200 µl, frisch zugeben
Natriumthiosulfat	2 %

Entfärber für Silberfärbung:

Glycin	2 %
Na ₂ EDTA	0,5 %

Formamid-Ladepuffer:

Formamid	98 %
Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %

GDIS:

Triton X-100	2 %
SDS	1 %
NaCl	100 mM
Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
Na ₂ EDTA	1 mM

Ladepuffer für Agarosegele:

Na ₂ EDTA	0,1 M
Glucose	50 %
Bromphenolblau	0,25 %

LB-Medium:

Bacto-peptone	1 %
Yeast extract	0,5 %
NaCl	10 mM
[Bacto-agar	1,5 % , nur für Agarplatten]

Long Run TBE (10 x):

Tris/HCl pH 8,8	1340 mM
Borsäure	450 mM
Na ₂ EDTA	25 mM

Lösung I für Plasmidpräparation:

Glucose	50 mM
Tris/HCl, pH 8,0	25 mM
Na ₂ EDTA, pH 8,0	10 mM

Lösung II für Plasmidpräparation:

NaOH	0,2 M
SDS	1 %

Lösung III für Plasmidpräparation: 3 M Kalium/ 5 M Acetat

5 M Kaliumacetat	60 ml
Eisessig	11,5 ml
H ₂ O	28,5 ml

Lysispuffer:

NH ₄ Cl	155 mM
KHCO ₃	10 mM

Na ₂ EDTA	0,1 mM
pH 7,4 einstellen	
NaCl-Lösung, gesättigt:	
NaCl	6 M
NaOH/EDTA (5 x):	
NaOH	2,5 M
EDTA pH 8,0	0,144 mM
Nukleotid-Mischungen:	
dNTP-Mix	je 1,25 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
c ⁷ -dNTP-Mix	je 1,25 mM dATP, dTTP, dCTP, 0,625 mM dGTP, 0,625 mM 7-deaza-2'-dGTP
OLB (100 µl Lösung A, 250 µl Lös. B, 75 µl Lös. C, 75 µl H ₂ O)	
Lösung A:	1 ml 1,25 M Tris-HCl (pH 8,0), 125 mM MgCl ₂ + 20 µl 2-Mercapto-Ethanol (250 mM), + je 5 µl 100 mM dATP, dGTP, dTTP (0,5 M)
Lösung B:	2 M Hepes (pH 6,6 mit 4 M NaOH)
Lösung C:	50 OD ₂₆₀ -Units Hexanukleotidprimer pd(N) ₆ gelöst in 555 µl TE (-> 90 U/ml)
PCR-Puffer (10 x)	
KCl	500 mM
Tris/HCl, pH 8,3	100 mM
MgCl ₂	15 mM
Gelatine	0,01% (w/v)
Qiagen-Puffer:	
Puffer P1 - Resuspensionspuffer:	
	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
Puffer P2 - Lysispuffer:	
	200 mM NaOH
	1% SDS
Puffer P3 - Neutralisierungspuffer:	
	3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Puffer QBT - Äquilibrierungspuffer:

750 mM NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15% Isopropanol
0,15% Triton X-100

Puffer QC - Waschpuffer:

1,0 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15% Isopropanol

Puffer QF - Elutionspuffer:

1,25 M NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 8,5
15% Isopropanol

SCEM:

Sorbitol	1 M
Natriumcitrat	100 mM
Na ₂ EDTA pH 8,0	10 mM
β-Mercaptoethanol	30 mM, frisch zugeben

SEM:

Sorbitol	1 M
Na ₂ EDTA pH 8,0	50 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM, frisch zugeben

SE-Puffer:

NaCl	75 mM
Na ₂ EDTA	25 mM
pH 8,0 (NaOH)	

SSC (20 x):

3 M NaCl
0,3 M Trinatriumcitrat

TBE-Puffer (10 x):

Tris/HCl pH 8,8	890 mM
Borsäure	890 mM
Na ₂ EDTA	50 mM

TE-Puffer:

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
Na ₂ EDTA	1 mM

TEN-Puffer:

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
NaCl	100 mM

YLB (Yeast lysis buffer):

Na ₂ EDTA pH 8,0	100 mM
Tris/HCl pH 8,0	10 mM
Lithiumdodecylsulfat	1 %

YPD-Medium für Hefekulturen:

Bacto-yeast extract	1 %
Bacto-peptone	2 %
Glucose	2 %
[Bacto-agar	2 %, nur für Agarplatten]

3.3.2 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den folgenden Herstellern bezogen:

3.3.2.1 Restriktionsenzyme

Enzym	Hersteller
<i>Mlu</i> I, <i>Nru</i> I, <i>Sfi</i> I	Amersham Pharmacia Biotech
<i>Dra</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II, <i>Dde</i> I, <i>Mbo</i> I, <i>Msp</i> I, <i>Nsi</i> I, <i>Rsa</i> I	Gibco/BRL
<i>Aci</i> I, <i>Bcl</i> I, <i>Bst</i> UI, <i>Dde</i> I, <i>Hga</i> I, <i>Nco</i> I, <i>Rsa</i> I, <i>Sfc</i> I	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III	USB

3.3.2.2 DNA-Polymerasen

Enzym	Hersteller
Klenow-Enzym	USB
M-MLV Reverse Transkriptase	USB
Sequenase 2.0	Amersham Pharmacia Biotech
Sequitherm Polymerase	Biozym
Sequitherm EXCEL Polymerase	Biozym
<i>Taq</i> Polymerase	Gibco/BRL und hausinterne Produktion
Thermosequenase	Amersham Pharmacia Biotech

3.3.2.3 sonstige Enzyme

Enzym	Hersteller
Exonuclease I (50 u. 10 U/ μ l)	USB
Lyticase	Sigma
RNAsin	Amersham Pharmacia Lifescience
RNAguard (34,2 U/ μ l)	Amersham Pharmacia Lifescience
Pyrophosphatase	USB
Shrimps Alkalische Phosphatase (1 U/ μ l)	USB
TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase)	Gibco/BRL
T4-Ligase (1 U/ μ l)	Boehringer Mannheim

3.3.3 Bakterienstämme und Plasmidvektoren

3.3.3.1 Bakterienstämme:

Für Klonierungen wurden die beiden folgenden Stämme von *E. coli* benutzt:

DH5 α : supE44, Δ lacU169, (ϕ 80 lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1

Y1090r-: Δ lacU169, Δ lon, araD139, strA, supF, mcrA, mcrB, trpC22::Tn(tet^r), hsdR

3.3.3.2 Plasmide:

pUC18: Col1E-origin, LacZ, Lac i, MCS, Amp^r

pBTKSII- (Bluescript Phagemid-Vektor): f1(-) origin, Col1E-origin, LacZ, MCS, Amp^r

3.3.3.3 Cosmide, YACs:

Die Cosmide 25368, 28874 sowie die Cosmide und YACs des *RYRI* Contigs (s. Abb. 2.1.6.3) sind eine freundliche Gabe des Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, Kalifornien. Die Cosmide sind in die Vektoren Lawrist 5 und 16 kloniert, der YAC-Vektor ist pYAC4.

3.3.4 Radioaktive Lösungen:

Isotop	Hersteller
[α - ³² P]-dCTP	DuPont NEN, Hartmann Analytic
[γ - ³² P]-ATP	DuPont NEN, Hartmann Analytic
[α - ³³ P]-ddNTPs	Amersham Buchler
[α - ³⁵ S]-dATPS	DuPont NEN, Hartmann Analytic

3.3.5 Oligonukleotide:

Die in den Tabellen angegebenen Oligonukleotid-Primer für PCR, Reverse Transkription, Sequenzierung und Hybridisierung wurden von MWG Biotech, Research Genetics, Amersham Pharmacia Lifescience und von der Abteilung für Physiologische Chemie im Biozentrum hergestellt. IRD-markierte Primer stammen exklusiv von MWG Biotech.

4. Ergebnisse

4.1 Genetische Kartierung

4.1.1 Charakterisierung eines neuen, hochpolymorphen Markers, WUT1.9 auf Chromosom 19q13.1

Von dem Cosmid 25516, das aus dem *RYR1* Cosmid-Contig stammt, war aus Hybridisierungsexperimenten mit einer (CA)₁₅-Sonde bekannt, daß es einen (CA)-Repeat enthält. Dieser Repeat wurde durch Restriktionskartierung auf einem 1.9 kb *Taq* I-Fragment lokalisiert und subkloniert in pUC19. Das resultierende rekombinante Plasmid wurde p25516T1.9 genannt (U. Wendelmuth, persönliche Mitteilung). Da die genaue Lage des Repeats innerhalb des Plasmids unbekannt war, wurde zunächst das Plasmid p25516T1.9 probenhalber von beiden Seiten (Primer: M13-F und M13-R) sequenziert. Es zeigte sich, daß der Repeat relativ nahe an der Klonierungsstelle liegt, so daß auf eine weitere Subklonierung oder Primer-walking Sequenzierung verzichtet werden konnte. Abb. 4.1.1.1 zeigt die Sequenz des Repeats sowie die flankierenden Bereiche. Der CA-Repeat entpuppte sich als zusammengesetzter, perfekter AC/AT-Repeat (Weber, 1990), der auf der 5'-Seite flankiert

```

1  GGTCGAGGGG ACGTACTCTC ACATACTCCA TTATAAAGAG GAGAAAAC TG
51  AGGTCCCAAA GGGATGGAAC CATTTTCCCA TAGTCCCTCA GCATGGAGGG
101 AGTCTTGAAG TTATCTGTCT GACTCCTATA CACACCTGTA CATCCATACC
151 TGTACATACA TATATAGTAC ATACCTGTAC ATACATATAT AGTACATACC
201 TGTACATACA TATATAGTAC ATACCTGTAC ATACATATAT AGTACATACC
251 TGTACATACA TATATAGTAC ATACCTGTAC ATACATATAT AGTACATACC
301 TGTACATACA TATATATGTA TATACCTGTA CATGAACAGA CACACACACA
351 CACACACACA CACACATATA TATATATATA TATATTTTTT TTTTTTTTTT
401 TTTTTTTTGAG ACGGGGCCTC GCTCTGTCAT CCAGGCTGGA GTGCAGTGGT
451 GCAATCATGG CTCACTGCAG ACTTGACTTC CTGGGCTCAA GCAATAC

```

Abb. 4.1.1.1 Teilsequenz des Subklons p25516T1.9 von Cosmid 25516 des *RYR1* Contigs (Wolz et al., 1996; eingereicht bei GenBank unter Eingangs-Nr. U29087). Die einfach unterstrichene Sequenz stellt den zusammengesetzten Dinukleotidrepeat dar, die doppelte Unterstreichung kennzeichnet den 25 bp Minisatellitenlocus (7 vollständige Kopien). Die Sequenz in Fettschrift an Position 101-121 entspricht dem Forward-Primer WUT1.9-F, die Sequenz bei 416-433 rückwärts und komplementär gelesen, entspricht dem Reverse-Primer WUT1.9-R.

wird von einem 25 bp-Minisatellitenlocus. Am 3'-Ende des AC/AT-Repeats folgt unmittelbar ein poly-T, dessen komplementäre Sequenz wiederum dem 3' Ende eines Alu-J Elements entspricht. Da ab einer Repeat-Länge von 10 Dinukleotid-Einheiten damit zu rechnen ist, daß es sich um einen Polymorphismus handelt (Weber, 1990), schien eine weitere Analyse dieses Locus angezeigt. Zunächst wurden mit Hilfe des Sequenzanalyse-Programms "Generunner" PCR-Primer zur Amplifikation dieser Region gesucht (s. Abb. 4.1.1.1). Um zu überprüfen, ob dieser Dinukleotidrepeat auch polymorph ist und sich damit als genetischer Marker eignet, wurde eine PCR mit DNAs von 64 nicht verwandten, weißen Mitteleuropäern durchgeführt (s. Abb. 4.1.1.2). Es fand sich eine Vielzahl von Allelen, die zur genaueren Bestimmung nochmals radioaktiv amplifiziert und auf einem Sequenziergel aufgetrennt wurden. Die Größe der Allele wurde durch eine parallel aufgetragene Sequenzierreaktion des Plasmids pUC18 mit ^{32}P -dCTP

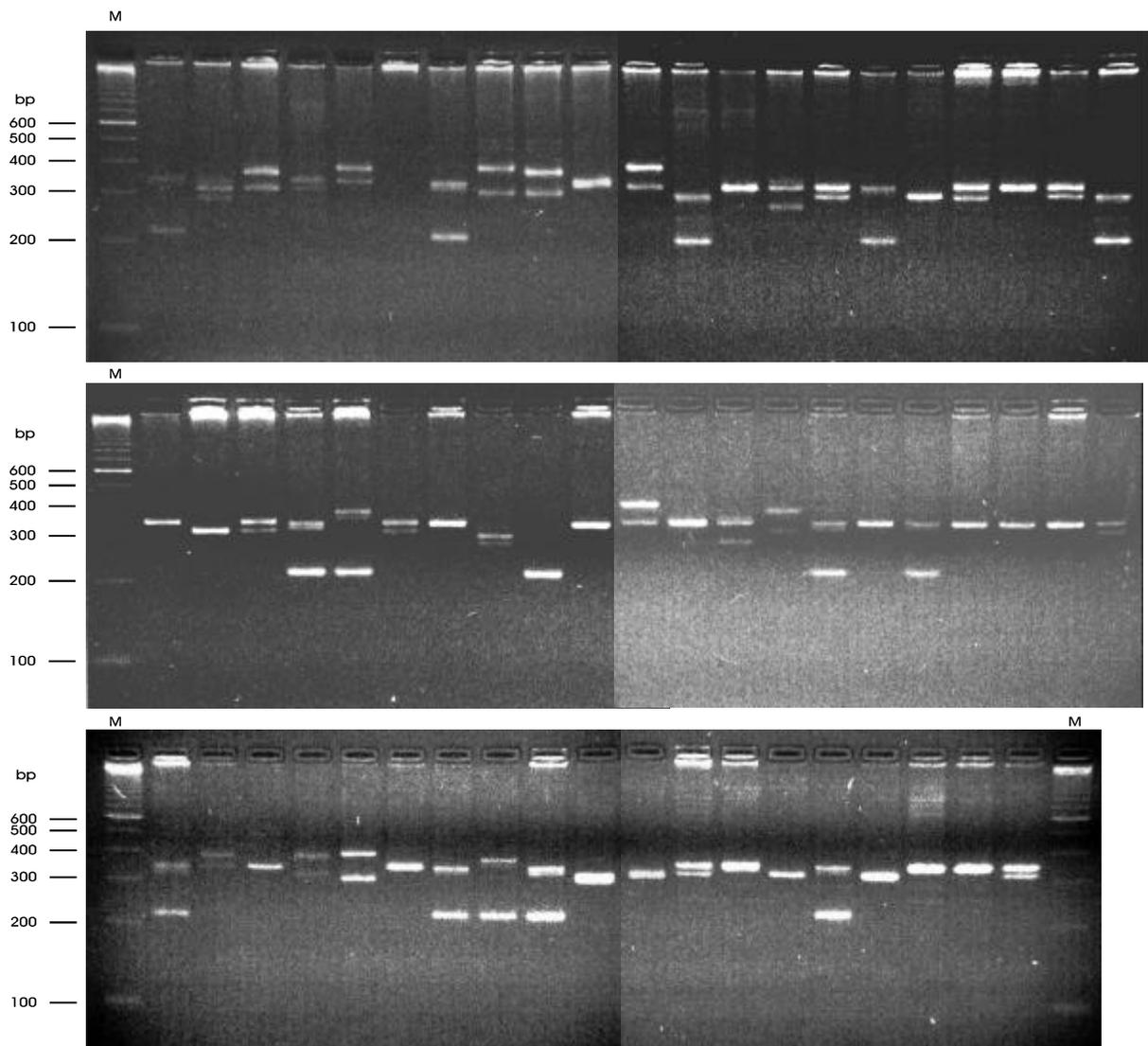


Abb. 4.1.1.2 Agarosegel mit PCR-Produkten von WUT1.9. DNA von 64 Personen wurde mit den Primern WUT1.9-F und WUT1.9-R bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C amplifiziert. M = Größenmarker 100 bp Leiter.

bestimmt. Die Zahl der Allele und der Größenbereich (s. Tab. 4.1.1.1) ließ vermuten, daß an diesem Polymorphismus mehr als nur eine variable Anzahl von CA/TA-Dinukleotiden beteiligt ist. Zur genaueren Analyse wurden die PCR-Produkte von mehreren homozygoten bzw. heterozygoten Personen mittels TA-cloning kit® kloniert und rekombinante Klone sequenziert. Es wurden nur Klone ausgewählt, deren PCR-Produkte für WUT1.9 in der Größe mit den PCR-Produkten der genomischen DNA übereinstimmten. Die Größe der Allele und ihre Frequenzen, sowie die genaue Zusammensetzung einiger klonierter Allele sind in Tab. 4.1.1.1 angegeben (Wolz et al., 1996). Insgesamt wurden 16 Allele in 128 Chromosomen gefunden, der resultierende PIC-Wert beträgt 0,76 (Botstein, 1980).

Die Mendelsche Vererbung des WUT1.9-Polymorphismus wurde anhand der Segregation der Allele in 5 Zweigenerationen- und 2 Dreigenerationen Familien nachgewiesen.

Allel-Nr.	Größe/ bp	Frequenz/ %	Repeat-Anzahl			
			Mini- satelliten	(AC)	(AT)	T
1	398	1,6				
2	381	2,3				
3	373	4,7				
4	354	1,6	7	11	10	21
5	336	0,8				
6	333	3,1				
7	331	40,6	6	13	12	17
8	329	3,1	6	10	12	20
9	318	0,8	6	6	11	19
10	309	0,8				
11	307	20,3	5	13	12	17
12	302	0,8				
13	299	3,1	5	9	9	23
14	278	3,1				
15	213	8,6	2	7	6	22
16	211	4,7				

Tab. 4.1.1.1 Allelgrößen und Frequenz von WUT1.9-Allelen, sowie Zusammensetzung von einigen Allelen nach Anteilen des jeweiligen Repeat-Typs.

Um die Lokalisation des WUT1.9 Locus in den flankierenden Cosmiden sowie überlappenden YACs zu überprüfen, wurde eine STS-Kartierung (s.a. Kap. 4.1.3) mit dem Primern WUT 1.9-F und WUT1.9-R durchgeführt. WUT1.9 kartiert neben dem originären Cosmid 25516 (20) auch in den beiden flankierenden Cosmiden (19) und (1), sowie dem überlappenden YAC Y3. Die physikalische Distanz des WUT1.9-Locus zum Ryanodinrezeptorgen dürfte sich auf maximal 150 kb belaufen. Damit ist WUT1.9 der derzeit am dichtesten flankierende Marker 5' von *RYR1*.

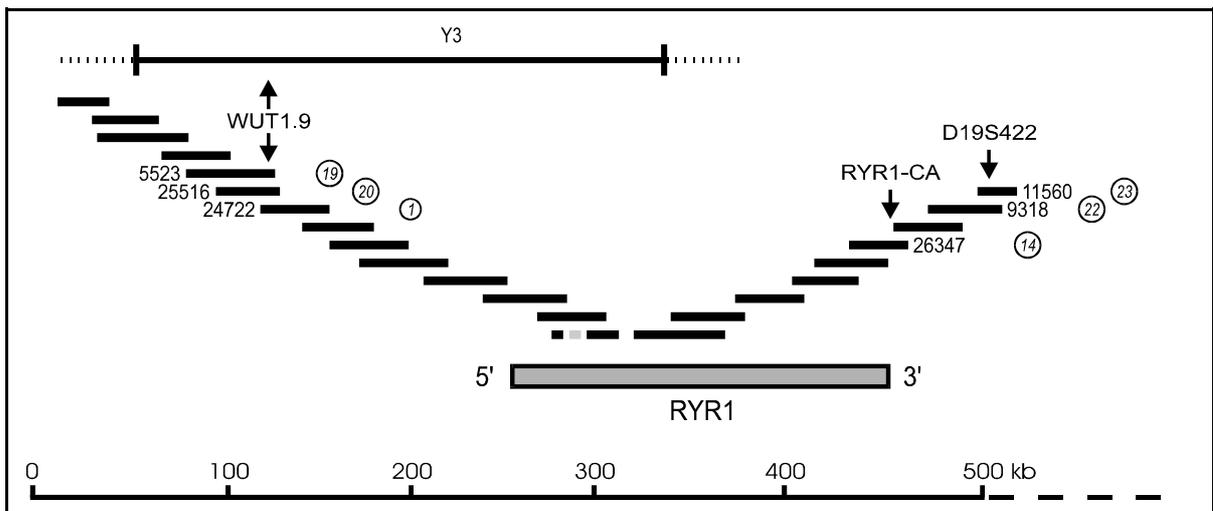


Abb. 4.1.1.3 Schema des Chromosom 19 Cosmid/YAC-Contigs von Rouquier et al. (1993) mit der Lokalisierung des polymorphen Markers WUT1.9. Die Cosmide 5523, 25516 und 24722, sowie der YAC Y3 sind positiv in der STS-PCR mit den Primern WUT1.9-F/R. Das grau schraffierte Rechteck symbolisiert das Gen für den Ryanodin Rezeptor.

Wie die Gele in Abb. 4.1.1.2, sowie die Tab. 4.1.1.1 zeigen, sind die häufigeren Allele auf einem Agarosegel leicht unterscheidbar. Zumindest für kleine Familien kam damit der Einsatz als einfacher, nichtradioaktiver genetischer Marker in Frage. WUT1.9 wurde daher für die im folgenden Kapitel dargestellte genetische Kartierung von CCD-Familien verwendet. Es zeigte sich, daß in den meisten untersuchten Familien, die für die Segregation von CCD innerhalb der Familie relevanten Personen heterozygot waren für WUT1.9 Allele, die bereits auf einem Agarosegel deutlich unterscheidbar sind. Meist wurde daher auf die radioaktive Darstellung des Markers verzichtet.

4.1.2 Genetische Feinkartierung von CCD-Familien

Eine wichtige Voraussetzung für die Positionsklonierung von krankheitsverursachenden Genen ist die genetische Kartierung des Locus anhand von Stammbaumanalysen. Der Locus für CCD wurde 1991 kartiert auf Chromosom 19q13.1 zwischen den Markern D19S191 und

θ	0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	n
Marker								
D19S425	0,9	0,88	0,79	0,68	0,45	0,23	0,07	3
D19S191	-°	1,28	2,03	2,19	1,9	1,28	0,57	8
D19S220	3,44	3,4	3,2	2,91	2,21	1,4	0,6	6
WUT1.9	-°	1,89	2,59	2,69	2,27	1,51	0,65	8
D19S422	-°	1,27	1,78	1,8	1,45	0,93	0,39	5
D19S190	-°	3,79	4,09	3,86	2,99	1,88	0,75	8
D19S223	2,11	2,07	1,91	1,7	1,24	0,75	0,28	4
D19S47	-°	3,19	3,74	3,66	2,91	1,84	0,72	8

Tab. 4.1.2.1 Zweipunkt Lodscores ($Z(q)$) für die untersuchten CCD-Familien (außer CCD 10). Signifikant positive Lodscores sind in Fettschrift dargestellt. Für die Berechnung des Lodscore wurden folgende Parameter angenommen: Allelfrequenz des CCD-Gens = 0.0005, Penetranz = 100 %, Neumutationsrate = 0 und gleiche Allelfrequenzen für den jeweiligen Marker (q = Rekombinationsfrequenz, n = Anzahl untersuchter Familien).

D19S190 (Kausch et al., 1991; Haan et al., 1991). Zunächst wurden für die genetische Feinkartierung daher diese beiden Mikrosatelliten-Marker als flankierende Marker eingesetzt. Später kamen, aufgrund verbesserter genetischer Karten noch andere Marker hinzu. Diese zusätzlichen Marker sollten helfen, das fragliche Intervall einzuengen, bzw. dienten sie als Ersatz für andere nichtinformativ Marker und sind nicht zuletzt methodisch einfacher. Einige Familien wurden auch mit Markern von Chromosom 14 im Bereich des MYH7-Gens, des von Fananapazir et al. (1993) postulierten CCD-Locus 2, untersucht. Die Reihenfolge der Marker beruht auf der genetischen Karte von Généthon (Dib et al., 1996) sowie hauptsächlich auf der physikalischen Karte des LLNL (Ashworth et al., 1995; siehe auch nächstes Kap.).

Die Abbildungen 4.1.2.2 bis 4.1.2.11 zeigen die Stammbäume der CCD-Familien mit den rekonstruierten Haplotypen für Chromosom-19 und -14 Mikrosatelliten Marker. Bei der Rekonstruktion sollten so wenig Rekombinationen wie möglich eingeführt werden, v.a. Doppel-Crossover sind in den relativ kleinen genetischen Intervallen äußerst unwahrscheinlich und daher nicht zu erwarten.

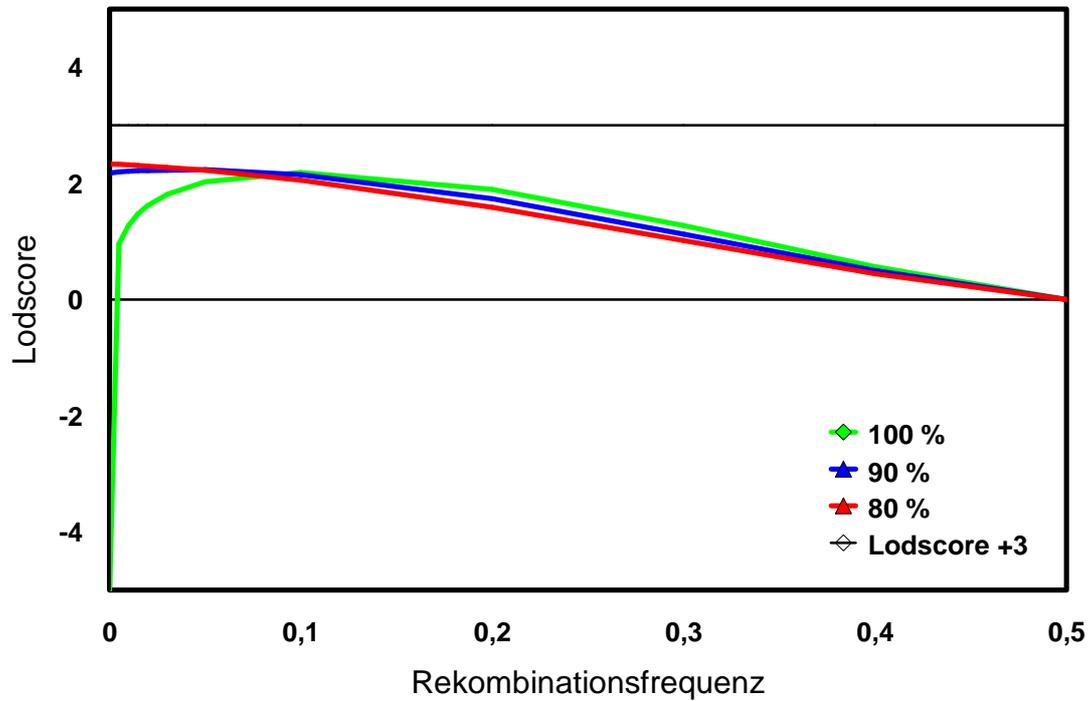
Bis auf drei Ausnahmen sind alle untersuchten Familien mit einer Koppelung des CCD-Phänotyps zu Chromosom 19, zum Intervall D19S191-D19S190, vereinbar. Für einen statistisch signifikanten Beweis sind jedoch die einzelnen Familien zu klein. Eine

Linkage-Berechnung kann daher für eine Einzelfamilie nur einen Anhaltspunkt über mögliche Koppelung geben. Tabelle 4.1.2.1 zeigt die Gesamt-Lodscores für die untersuchten Marker von Chromosom 19. Für einige Marker im *RYRI*-Gen Intervall ergibt sich ein statistisch signifikanter Lodscore ($Z > 3$), der höchste errechnete Wert beträgt 4,09 für den distal flankierenden Marker D19S190, das entspricht einem Likelihood-Verhältnis von $>10,000 : 1$ für Koppelung : freie Rekombination. Der jeweils höchste Lodscore ($Z_{\max.}$) wird aber nicht bei $\theta = 0$ erreicht, da das Vorliegen einer Rekombination unter den gegebenen Linkage-Parametern zu einem Lodscore von $-\infty$ für $\theta = 0$ führt. Die Lodscores für die Marker D19S220 und D19S223 sind nur deshalb nicht $-\infty$, weil diese Marker in der Familie CCD06, bei der eine Rekombination vorliegt, nicht typisiert wurden.

In Abb. 4.1.2.1 sind die Daten aus Tab. 4.1.2.1 für D19S191 und D19S190 nochmals grafisch aufgetragen, zusätzlich die Lodscore-Kurven für eine Penetranz von 90 und 80 %. Die Grafik zeigt, daß sobald die Penetranz kleiner als 100 % wird, $Z_{\max.}$ bei $\theta = 0$ erreicht wird. Der Lodscore für D19S191 liegt knapp unter der Signifikanzschwelle von 3, bei der die Wahrscheinlichkeit für Koppelung 1000 mal größer ist als die Wahrscheinlichkeit für freie Rekombination. Nimmt man eine reduzierte Penetranz des CCD-Phänotyps an, wofür auch die klinischen Daten sprechen, dann ergibt sich aus der Abbildung 4.1.2.1, daß das wahrscheinlichste Intervall für die Lokalisierung des CCD-Gens, das Intervall D19S191 - D19S190 ist. Sollte bei Individuum III:4 der CCD-Familie 06 eine echte Rekombination vorliegen, d.h. der Proband ist nicht Träger des CCD-Allels, sollte das Gen außerhalb dieses Intervalls liegen, proximal oder distal flankierend.

Eine angenommene Genfrequenz von 0,005 für das CCD-Gen bei den Linkage-Analysen (Tab. 4.1.2.1) ist sicherlich eine Übertreibung gegenüber der realen Genfrequenz, Berechnungen mit verschiedenen, willkürlich gewählten Frequenzen ergaben jedoch, daß die Genfrequenz über mehrere 10er Potenzen hinweg keinen Einfluß auf die Lodscores hat (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus Gründen der Vereinfachung und um "härtere" Daten zu erhalten wurde die Neumutationsrate auf 0 gesetzt, was zur Folge hat, daß bei einem vorhandenen Cross-Over der Lodscore für $\theta = 0$ den Wert $-\infty$ annimmt. Würde man die Neumutationsrate >0 setzen, so wäre der Effekt auf die Lodscore-Kurve ähnlich wie die Erniedrigung der Penetranz in Abb. 4.1.2.1

Zweipunkt-Koppelungsanalyse CCD und D19S191



Zweipunkt-Koppelungsanalyse CCD und D19S190

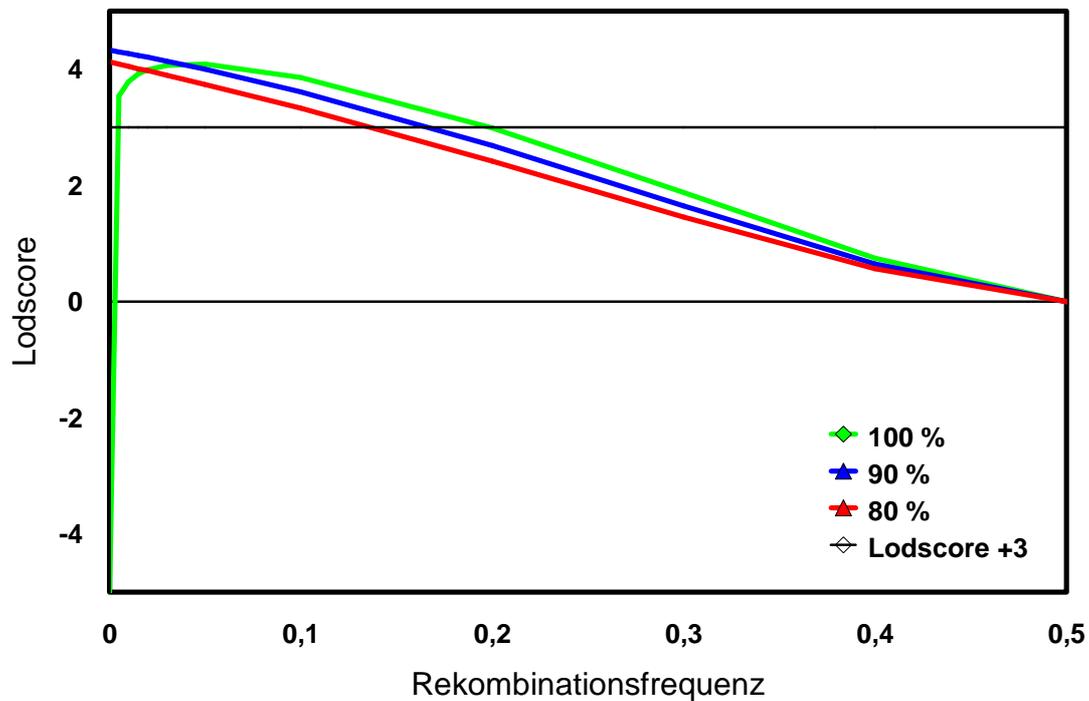


Abb. 4.1.2.1 Zweipunkt-Lodscores für CCD und die Mikrosatelliten-Marker D19S191 (oben) und D19S190 (unten), mit drei verschiedenen Penetranzen berechnet.

In der Familie CCD01 ergibt die Linkage-Analyse für einige Marker auch schwach negative Lodscores. Wie die Abb. 4.1.2.2 zeigt, hat der gesunde Bruder II:2 denselben Haplotyp wie der CCD-Patient II:3. Dies könnte auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein: genetische Heterogenität der Central Core Disease, II:2 als ein asymptomatischer Überträger für CCD oder eine Neumutation bzw. ein Keimzellmosaik bei II:3 für die (unbekannte) CCD-Mutation. Schließlich gilt es zu beachten, daß die elterlichen Genotypen (I:1 und I:2, Abb. 4.1.2.2) nur zum Teil erschlossen werden können und die rekonstruierten Haplotypen für II:2 in der präsentierten Form falsch sein könnten. Die Wahrscheinlichkeit hierfür wird jedoch mit zunehmender Zahl untersuchter Marker geringer werden.

In den Familien CCD02, 03, 04 und 05 segregiert CCD komplett mit den Chromosom 19-Markern, wie schon bei der Rekonstruktion der Haplotypen deutlich wird: die Betroffenen haben den schwarz dargestellten CCD-Haplotyp, während nicht-betroffene Verwandte diesen Haplotyp nicht haben (Abb. 4.1.2.2 - 4.1.2.4).

Die CCD-Familie 06 ist eine der wenigen, bei der neben der klinischen und histologischen Untersuchung auf CCD auch der MH-Status der Mitglieder bekannt ist. Diese Familie könnte man in eine Reihe stellen mit den bereits beschriebenen Familien, die keine komplette Korrelation zwischen CCD- und MHS-Phänotyp zeigen (Islander et al., 1995; Fagerlund et al., 1996). In der Familie ist die Veranlagung zur Malignen Hyperthermie gekoppelt zu Chromosom 19, darüber hinaus ist sie die einzige hier untersuchte CCD-Familie, bei der eine Mutation im *RYR1*-Gen gefunden wurde (s. Abb. 4.3.1.1). Zwar haben alle Kinder des Überträgers (II:3, Abb. 4.1.2.5) denselben paternalen Haplotypen geerbt, jedoch konnten bei einem Geschwister (III:4) keine cores in der Muskelbiopsie nachgewiesen werden. Bei einem Bruder (III:3) wurde ein erhöhter CK-Wert gefunden, der aber nicht weiter untersucht wurde, so daß dessen Phänotyp mit 0 (unbekannt) in die Koppelungsberechnung mit einging, während III:4 als gesund klassifiziert wurde und damit ein formalgenetischer Ausschluß vorliegt.

Familie 08 ist wieder eindeutig gekoppelt zu Chromosom 19 (Abb. 4.1.2.6), ebenso der rechte Zweig des Stammbaumes von Familie 09 (Abb. 4.1.2.7). Da bei den Personen des linken Zweiges auch eine neuromuskuläre Erkrankung diskutiert wurde, jedoch keine genauen klinischen Daten vorliegen, wurden auch Marker von Chromosom 14 in dieser Familie typisiert (Abb. 4.1.2.8). Die Linkage-Analyse ergibt für beide Chromosomen je einen maximalen Lodscore von 0,90 bei $\theta = 0$, so daß auch eine Koppelung zu Chromosom 14

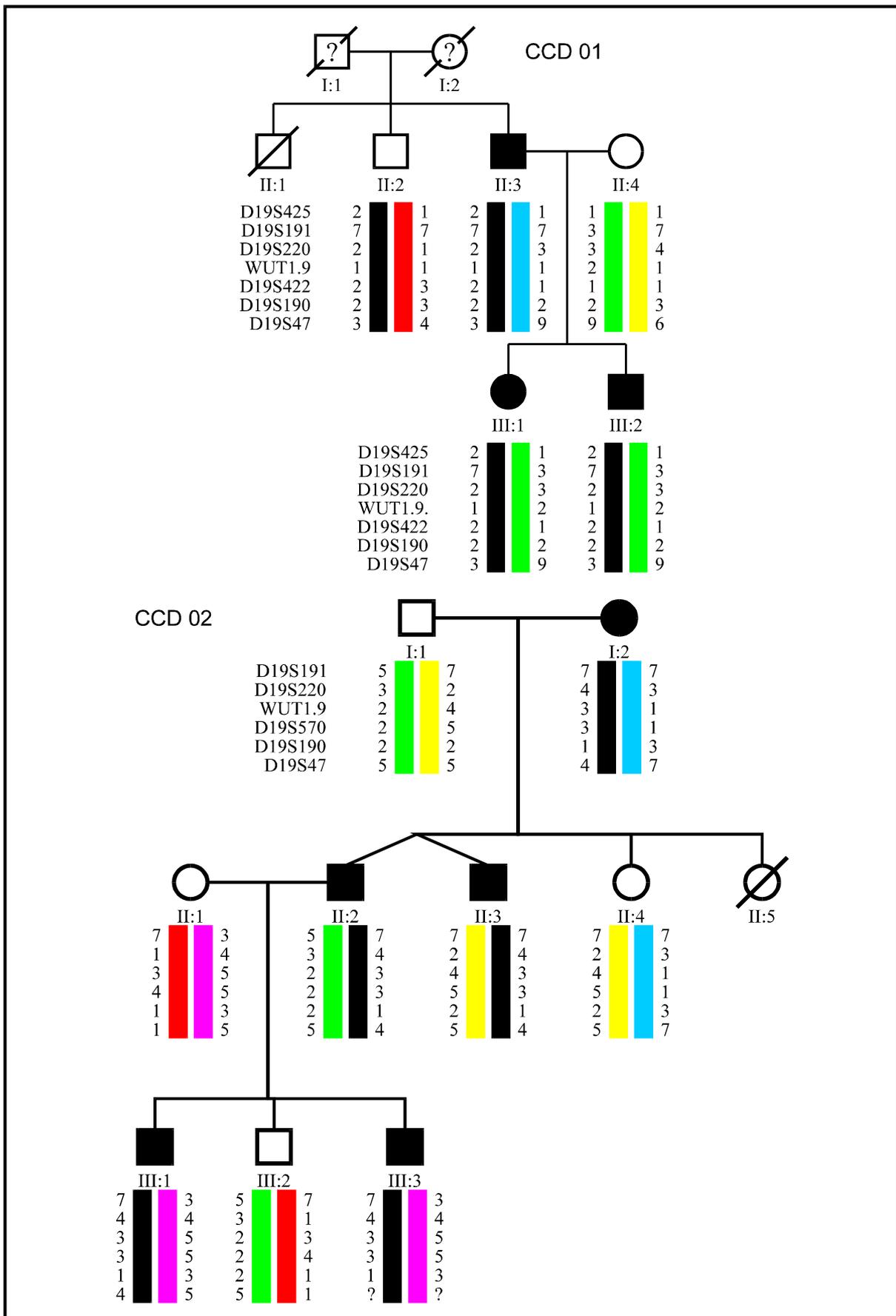


Abb. 4.1.2.2 Stammbäume der CCD-Familien 01 und 02 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 19.

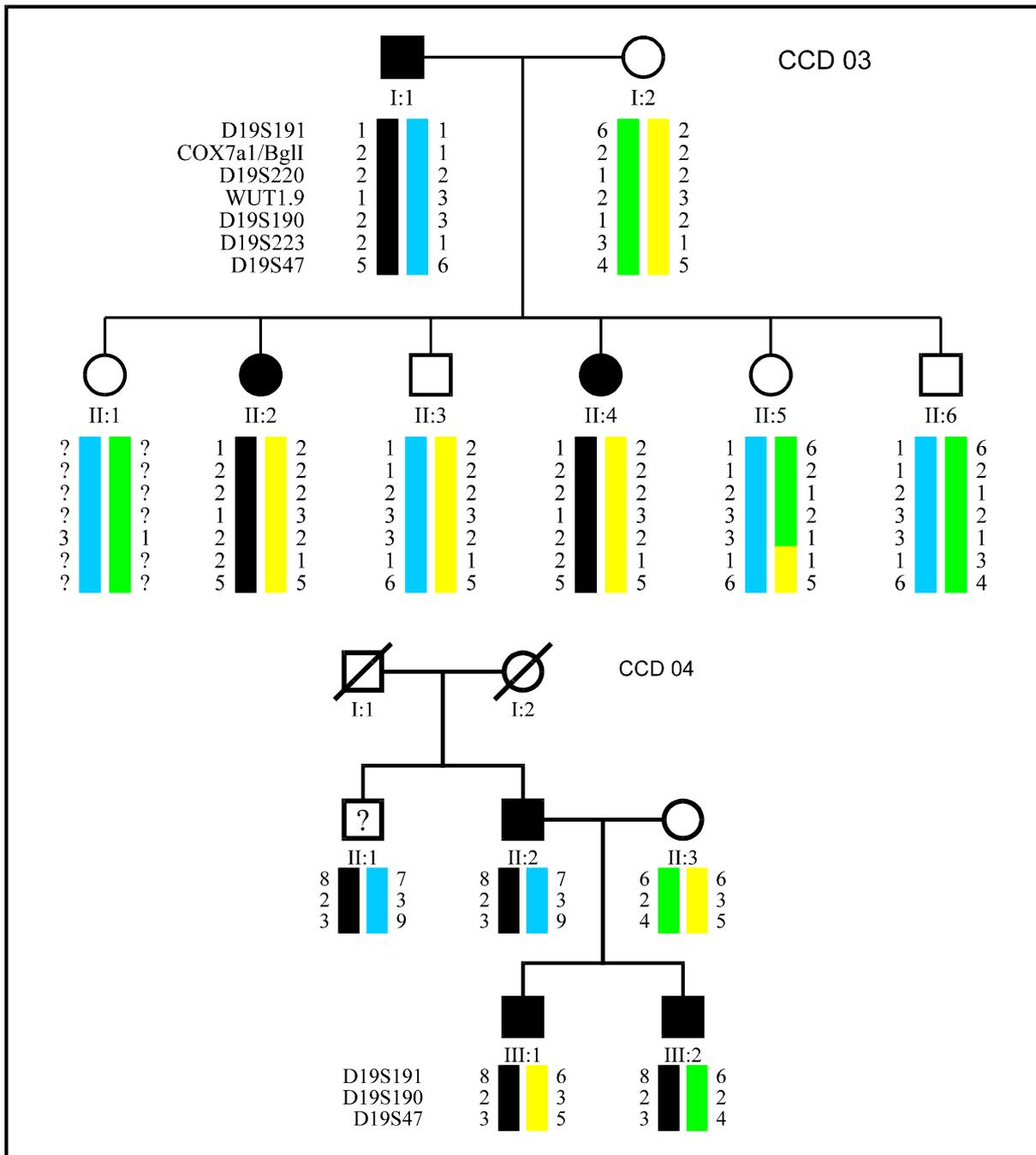


Abb. 4.1.2.3 Stammbäume der CCD-Familien 03 und 04 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 19.

denkbar ist. Möglicherweise entspricht der rote Haplotyp von II:1 dem schwarzen von II:3 (Abb. 4.1.2.8), dann wäre die Erkrankung zum MYH7-Gen gekoppelt, aber mit der Ausnahme der Person III:2, die einen anderen väterlichen Haplotyp hat. Sollte die Erkrankung zum Chromosom 19 gekoppelt sein, so liegt entweder eine Rekombination zu dem CCD-Locus bei II:1 oder II:3 vor, oder in den beiden Seitenzweigen segregieren phänomenologisch ähnliche, aber genetisch verschiedene Erkrankungen. Eine endgültige Beurteilung ist bestenfalls nach

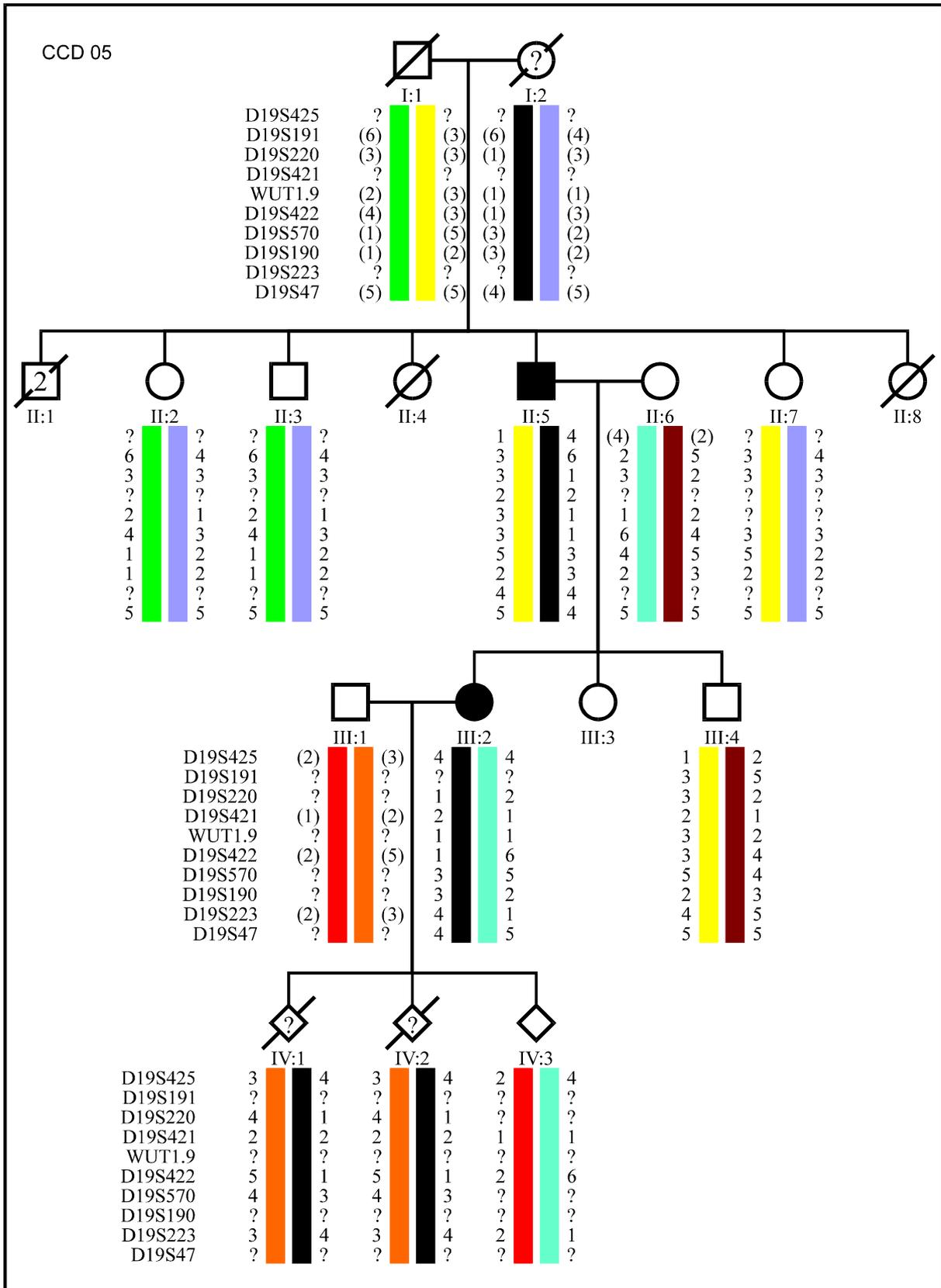


Abb. 4.1.2.4 Stammbaum der CCD-Familie 05 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 19.

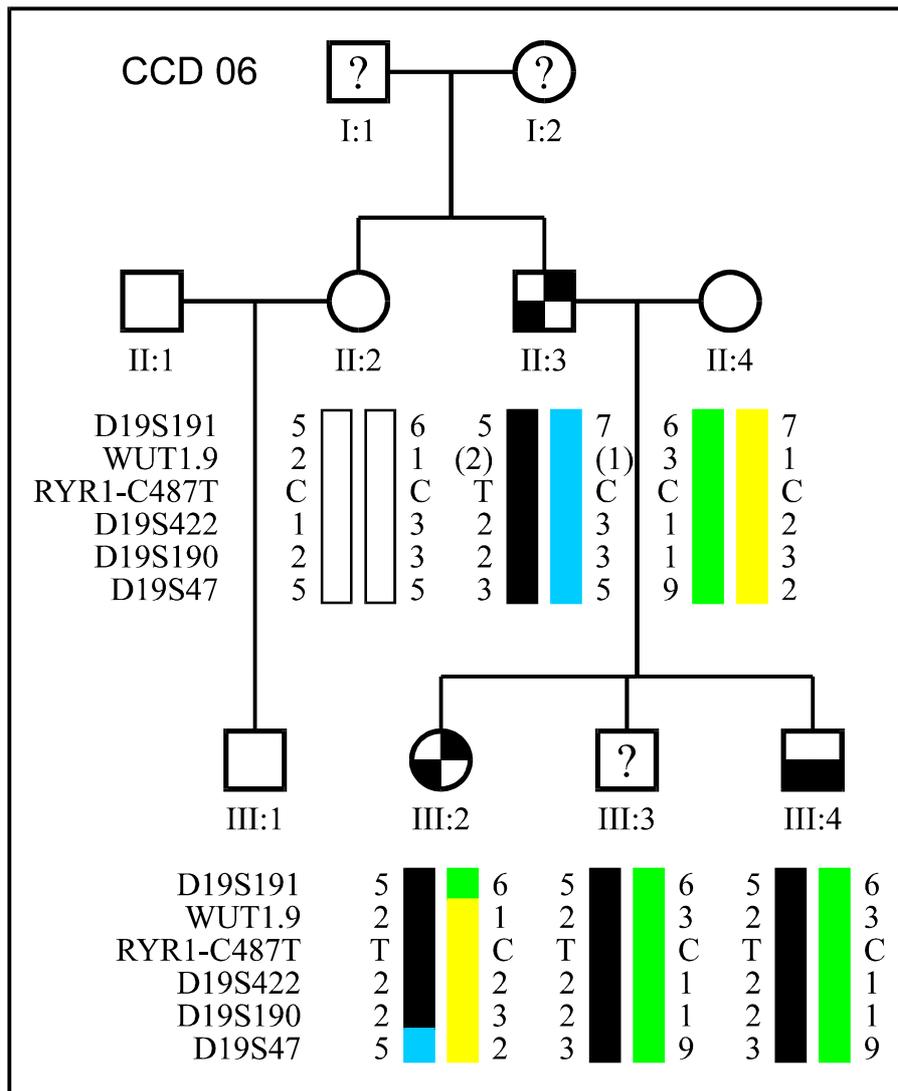


Abb. 4.1.2.5 (oben) Stammbaum der CCD-Familie 06 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 19. Zusätzlich zu den Mikrosatelliten-Markern wurde die in dieser Familie segregierende RYR1-Mutation C487T eingezeichnet.

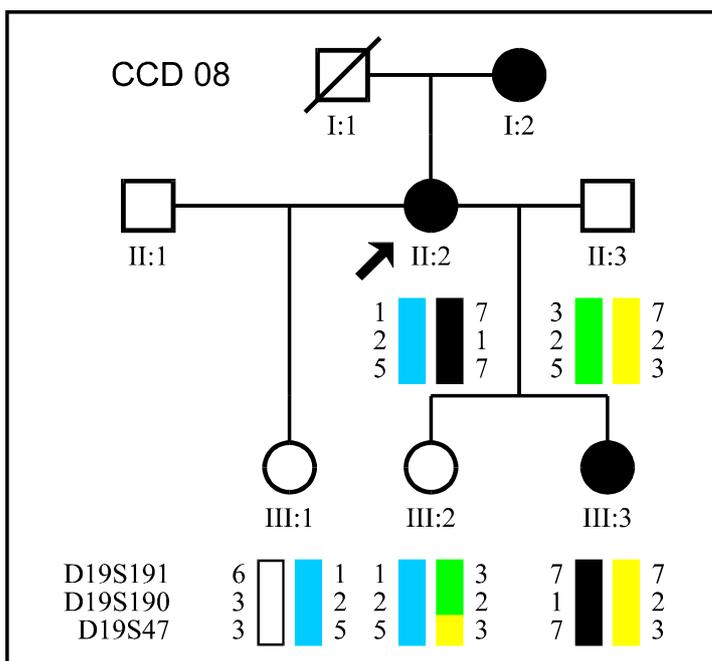


Abb. 4.1.2.6 (links) Stammbaum der CCD-Familie 08 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 19.

θ	0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
Marker							
D19S191	-°	-2,8	-1,44	-0,89	-0,39	-0,15	-0,04
D19S220	-°	-1,4	-0,72	-0,44	-0,19	-0,08	-0,02
WUT1.9	-°	-2,8	-1,44	-0,89	-0,39	-0,15	-0,04
RYR1	0	0	0	0	0	0	0
D19S223	-°	-2,8	-1,44	-0,89	-0,39	-0,15	-0,04
D19S47	-°	-2,8	-1,44	-0,89	-0,39	-0,15	-0,04

Tab. 4.1.2.2 Zweipunkt Lodscores ($Z(\mathbf{q})$) für CCD-Familie 10. Für vier Chromosom 19-Marker wurde ein statistisch signifikanter Ausschluß erzielt (in Fettschrift). Die Parameter für die Linkage-Berechnung sind wie in Tab. 4.1.2.1.

θ	0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
Marker							
D14S721	-°	-1,4	-0,72	-0,44	-0,19	-0,08	-0,02
D14S50	-°	-1,7	-1	-0,7	-0,4	-0,22	-0,1
D14S283	-°	-2,8	-1,44	-0,89	-0,39	-0,15	-0,04
TCRD	-°	-1,11	-0,44	-0,19	0,01	0,07	0,06
MYH7.2	-°	-1,11	-0,46	-0,23	-0,08	-0,05	-0,05
MYH7	-°	-0,81	-0,19	0,02	0,12	0,09	0,03
D14S54	0,6	0,59	0,54	0,47	0,32	0,17	0,05
D14S49	-°	-0,81	-0,19	0,02	0,12	0,09	0,03

Tab. 4.1.2.3 Zweipunkt Lodscores ($Z(\mathbf{q})$) für CCD-Familie 10 mit Markern von Chromosom 14. Die Parameter für die Linkage-Berechnung sind in Tab. 4.1.2.1 angegeben.

genauerer klinischer Diagnose möglich, aber derzeit nicht zu erwarten, da die Patienten einer Muskelbiopsie nicht zustimmen.

Die CCD-Familie 10 ist nicht gekoppelt zu Chromosom 19, wie die Abb. 4.1.2.9 sowie die Tab. 4.1.2.2 zeigt.

Die beiden flankierenden Marker D19S191 und D19S223 sowie der Marker WUT1.9 im Kandidatenintervall ergeben einen Lodscore von -2,8 für die Koppelung von CCD zu den Chromosom 19-Markern. Damit ist die Signifikanzschwelle von -2 für die Ablehnung der

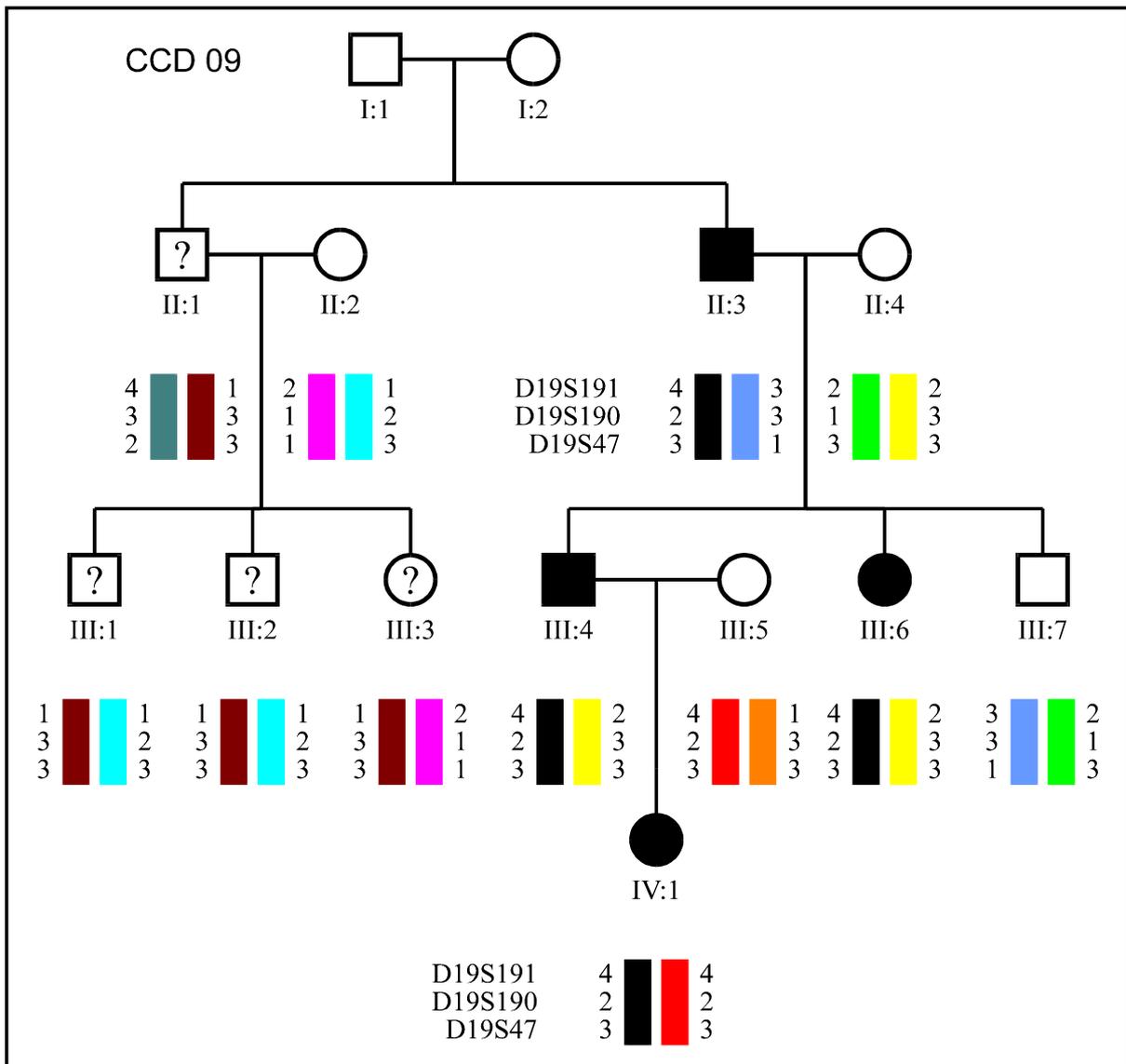


Abb. 4.1.2.7 Stammbaum der CCD-Familie 09 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 19.

Hypothese Koppelung deutlich unterschritten, die Erkrankung segregiert in dieser Familie nicht mit dem *RYRI*-Intervall. Der Mikrosatelliten-Marker im *RYRI*-Gen (Couch et al., 1991) ergibt durchweg einen Lodscore von 0, da die für die Segregation von CCD entscheidenden Personen I:2 und II:2 homozygot für diesen Marker sind (s. Abb. 4.1.2.9) und damit die ganze Familie nicht informativ ist.

Abb. 4.1.2.10 zeigt die rekonstruierten Haplotypen für die Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 14, die in dieser Familie typisiert wurden. Auch dieser Chromosomenabschnitt ist nicht komplett gekoppelt zu dem CCD-Phänotyp in dieser Familie (s. Tab. 4.1.2.3 und Abb. 4.1.2.10). Der Marker D14S54 liefert einen schwach positiven maximalen Lodscore von 0,6 bei einem $\theta = 0$. Dies beruht auf der Homozygotie von II:2 für diesen Marker (Abb. 4.1.2.10),

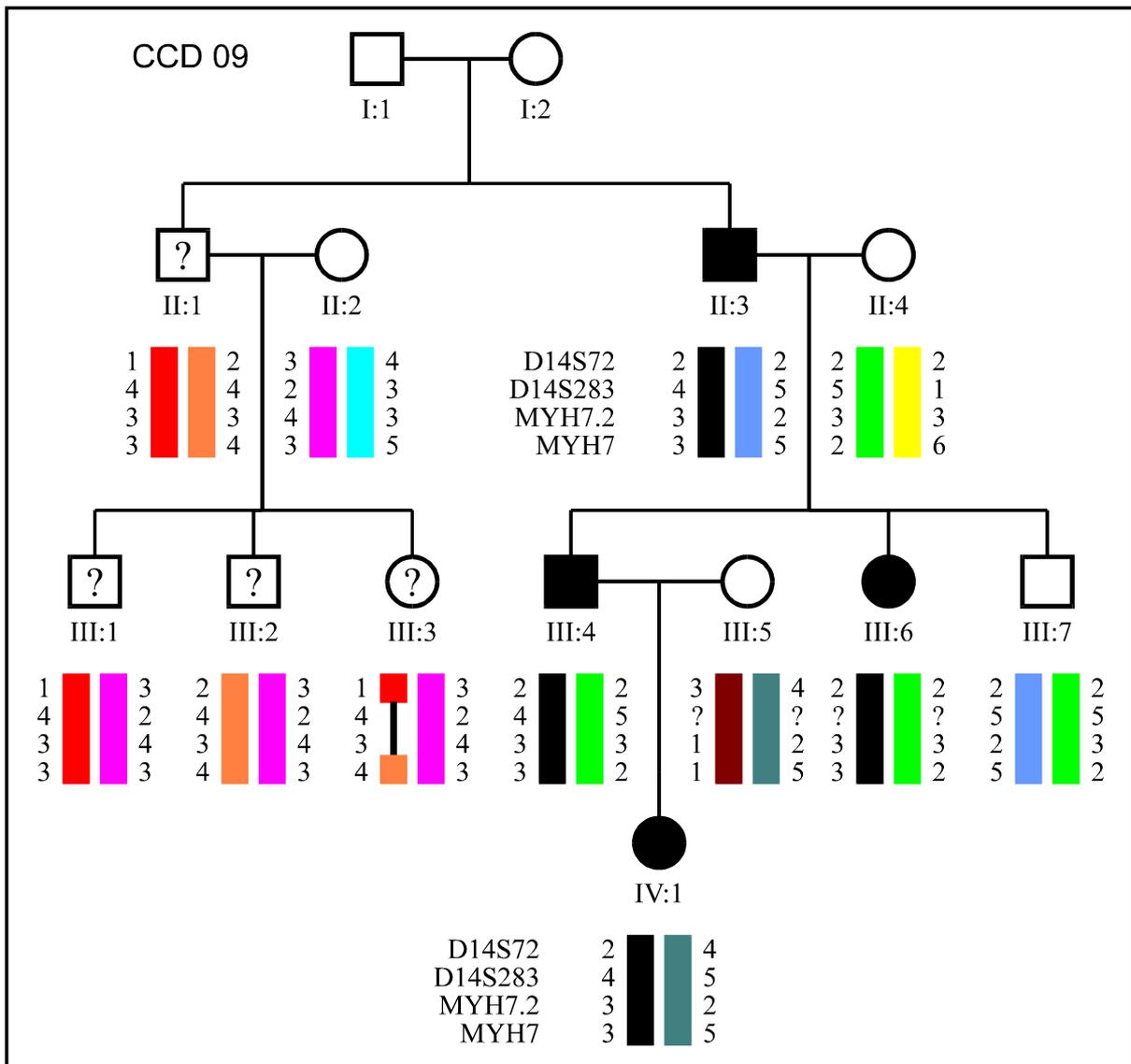


Abb. 4.1.2.8 Stammbaum der CCD-Familie 09 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 14.

da mit gleicher Wahrscheinlichkeit das großväterliche Allel "1" an die Generation III weitergegeben worden sein kann wie das großmütterliche. Die Analyse der Haplotypen zeigt aber, daß sowohl der gesunde Proband III:1 als auch der Patient III:2 den Haplotyp der betroffenen Großmutter geerbt haben. Der CCD-Locus ist daher formal von diesem Intervall ausgeschlossen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei III:1 um einen (bisher) asymptomatischen Träger von CCD handelt, da kein histologischer Befund des Probanden vorliegt. In diesem Falle ergäbe sich ein Z_{\max} von 1,2 bei $\theta = 0$ und es läge Koppelung zwischen CCD und dem Chr. 14-Intervall vor, wenn auch nicht statistisch beweisbar, da $Z_{\max} < 3,0$.

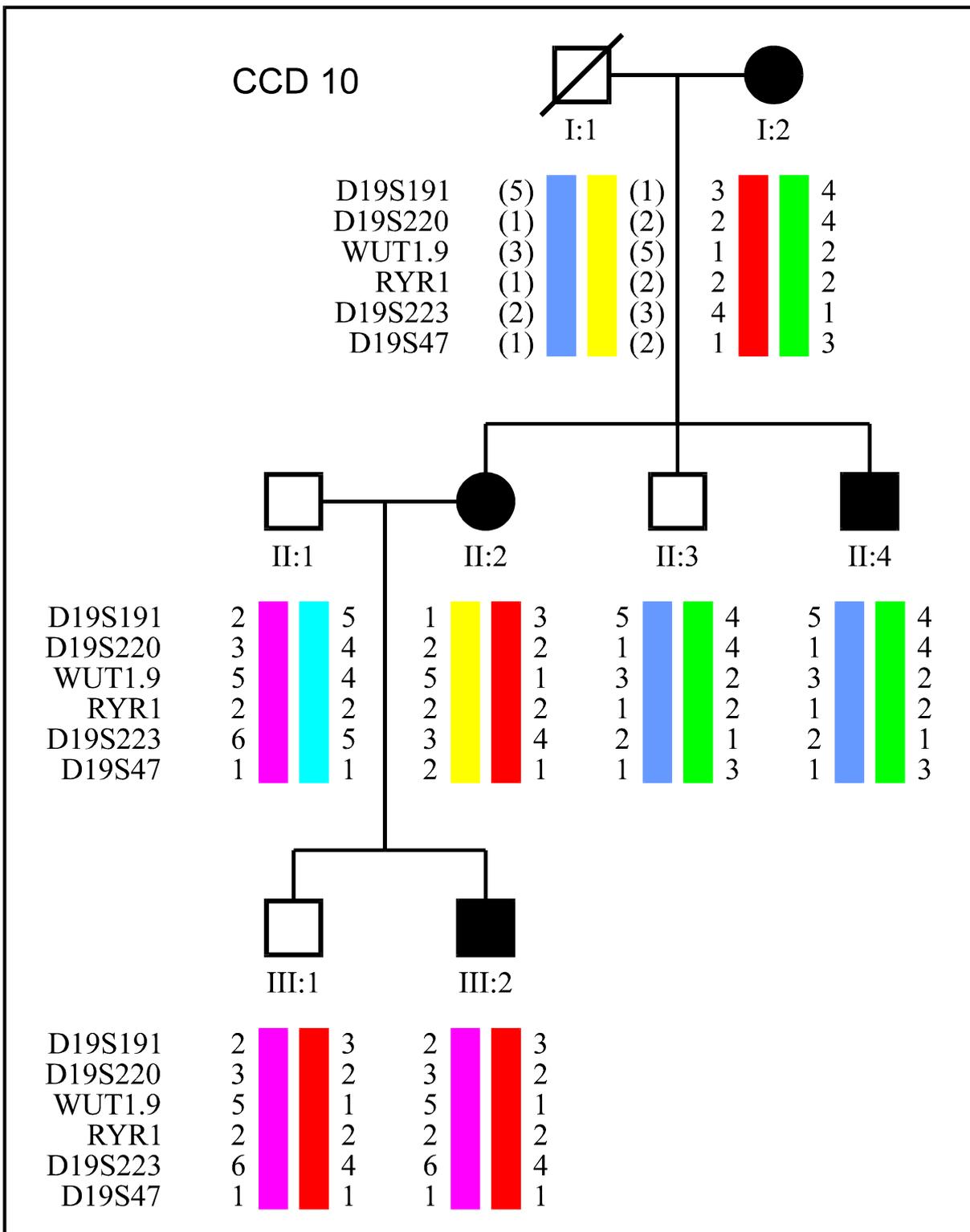


Abb. 4.1.2.9 Stammbaum der CCD-Familie 10 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 19.

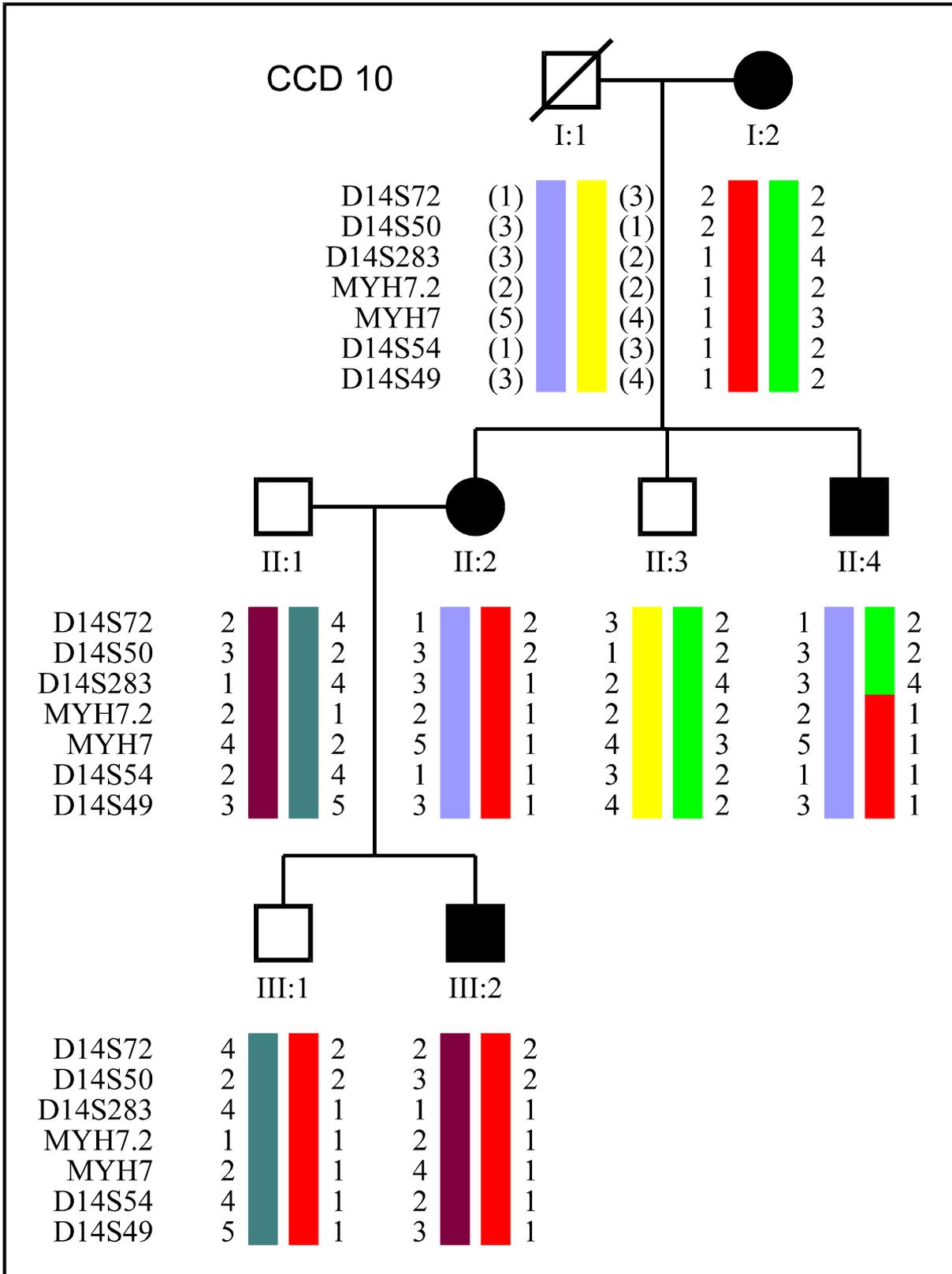


Abb. 4.1.2.10 Stammbaum der CCD-Familie 10 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 14.

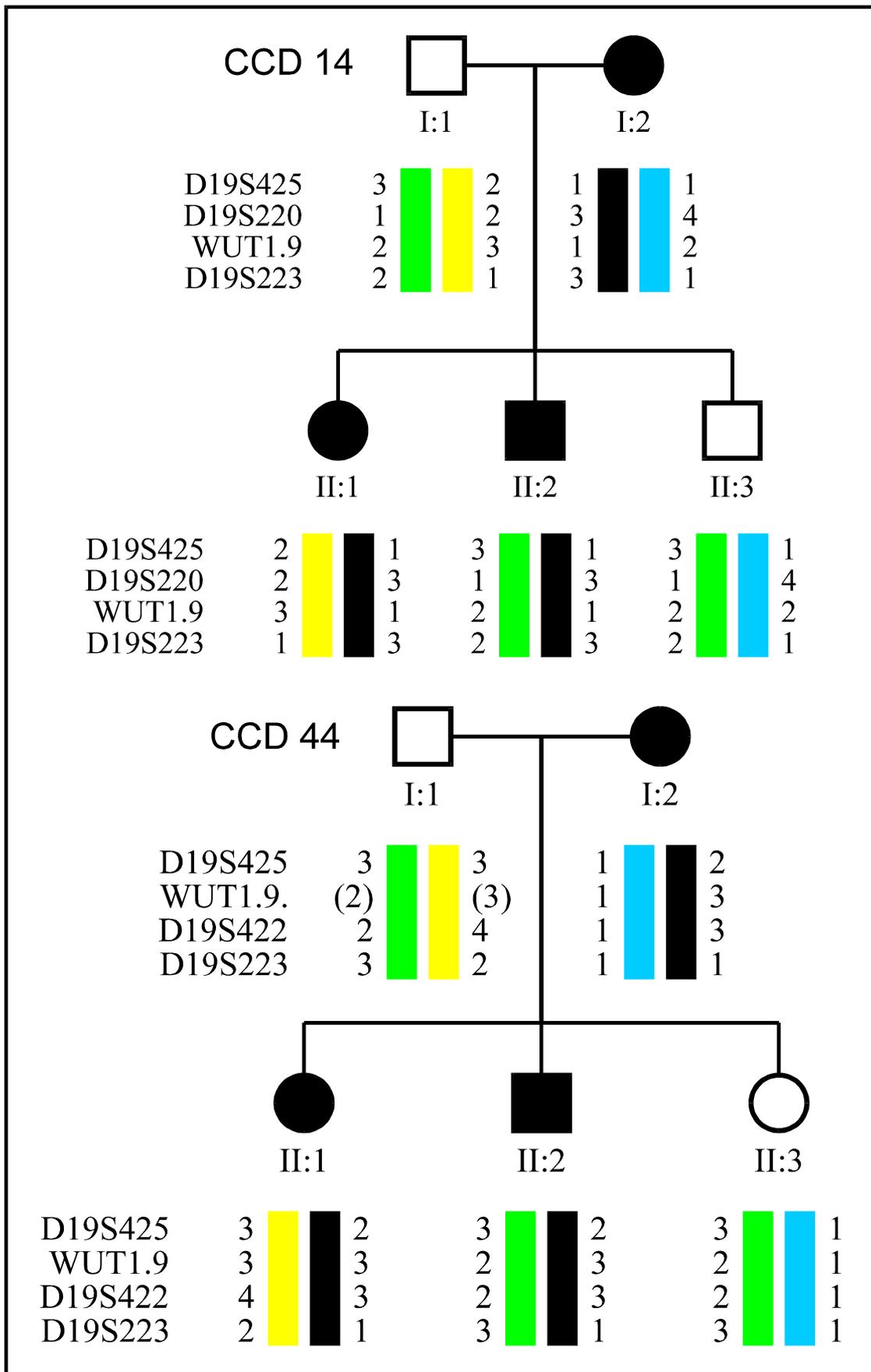


Abb. 4.1.2.11 Stammbaum der CCD-Familien 14 und 44 mit Haplotypen für Mikrosatelliten-Marker von Chromosom 19.

Die CCD-Familien 14 und 44 sind wiederum eindeutig gekoppelt zum *RYR1*-Intervall (Abb. 4.1.2.11).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die genetische Feinkartierung mit diesen Familien keine weitere Einengung des Kandidatenintervalls für die Central Core Disease zuläßt. Nach wie vor gilt das Intervall D19S191-D19S190 als kleinster gemeinsamer genetischer Nenner der CCD-Familien. Jedoch kamen seit der genetischen Kartierung der CCD (Haan et al., 1990; Kausch et al., 1991) eine Reihe von neuen Mikrosatelliten-Markern und nicht zuletzt, WUT1.9 hinzu, die methodisch einfacher durchzuführen sind als die anspruchsvolleren Trinukleotidrepeats. Somit wäre eine feinere Kartierung des CCD-Locus mit den entsprechenden Familien möglich. Da aber die erwarteten Rekombinationen um so seltener werden, je kleiner der genetische Abstand ist, ist das Intervall D19S191-D19S190 möglicherweise schon so klein, daß man mehrere Dutzend Meiosen untersuchen muß, um überhaupt noch eine Rekombination zu finden.

Die Koppelungsanalysen in den hier untersuchten Familien belegen, daß die CCD in den meisten Fällen zu Chromosom 19 gekoppelt ist. Die Homogenität der CCD scheint nicht in Frage zu stehen, da die gefundenen Ausnahmen von einer vollständigen Koppelung auch anderweitig begründet werden können. Zudem darf nicht außer Acht gelassen werden, daß differentialdiagnostisch ähnliche Erkrankungen, wie z.B. die Nemaline Myopathie, eine CCD vortäuschen können. Eine autosomal dominante (*NEM1*) sowie eine rezessive Form (*NEM2*) der Nemalinen Myopathie wurden auf Chromosom 1 bzw. 2 kartiert (Laing et al., 1992; Wallgren-Pettersson et al., 1995).

Im Fall der Familie 10 scheint der einzige Unterschied zur klassischen CCD lediglich in der kardialen Involvierung in Form einer hypertrophen Cardiomyopathie zu bestehen. Stellt man diese Familie in den Zusammenhang mit den Arbeiten von Fananapazir (1993), so scheint die Existenz einer selteneren Sonderform der CCD mit Cardiomyopathie immerhin möglich. Über die Koppelung zu dem *MYH7*-Locus auf Chromosom 14 kann anhand der kleinen Familien jedoch kein Beweis erbracht werden.

4.1.3 STS-Kartierung von Chromosom 19 YACs und Cosmiden

Ausgehend von der jeweils verfügbaren genetischen Karte (Dib et al., 1996) des Kandidatenintervalls für CCD sollte versucht werden, diese genetischen Marker in die physikalische Karte des LLNL (Ashworth et al., 1995) zu integrieren. Da die genetische Karte, aufgrund der beschränkten Anzahl untersuchter Familien, nur eine Auflösung von einigen centiMorgan hat, war für einige der im vorigen Kapitel benutzten Marker die genaue Reihenfolge unklar. Zudem schien es vorteilhaft, die technisch aufwendigeren Marker D19S191 und D19S190 durch einfachere Dinukleotid-Marker aus der Généthon Kollektion zu ersetzen. Für den Fall, daß man den CCD-Locus durch genetische Rekombinationen genauer hätte eingrenzen können, ist es natürlich wichtig, die Reihenfolge der Marker zu kennen.

Neben den bei Rouquier et al. (1993) beschriebenen Cosmiden und YACs der *RYRI*-Genregion, kamen noch die zusätzlichen YACs Y8, Y9 und Y10 zum Einsatz. In einer früheren Version der LLNL-Karte schien es, als ob mit diesen 3 YACs das Intervall D19S191-D19S190 komplett repräsentiert sei. Spätere Kartenversionen sowie die STS-Analyse zeigten jedoch, daß auch hier noch Lücken vorhanden sind.

Die Ergebnisse der STS-Kartierung mit den YACs zeigt Tab. 4.1.3.1, sowie Abb. 4.1.3.1, die Ergebnisse der Cosmid-Kartierung zeigt Tab. 4.1.3.2. Bei der Interpretation der Ergebnisse gilt es zu bedenken, daß die Abb. 4.1.3.1 aufgrund der jetzt aktuellen Karten erstellt wurde. Als die Arbeit begonnen wurde, waren die Karten jedoch nicht so detailliert, einige Loci fehlten oder waren anders positioniert. Da natürlich die Kartierungsarbeiten des LLN-Labors und von Généthon weiter liefen, sind diverse Überschneidungen unvermeidlich. Im Großen und Ganzen stimmt die gefundene Orientierung der Marker zwischen genetischer und physikalischer Karte überein. In Abb. 4.1.3.1 wurde die aktuelle Version der physikalischen Karte des LLNL der genetischen Karte von Généthon gegenübergestellt. In dunkelviolett sind die vorhandenen Ressourcen eingetragen: die YACs Y2-4 und Y8-10, das *RYRI* Cosmid-Contig, sowie die beiden Cosmide 25368 und 28874. Die dünnen schwarzen Linien zeigen die Lokalisierung der Marker jeweils in beiden Karten, die dünnen olivfarbenen Linien das entsprechende Ergebnis für die hier vorgestellte, eigene Analyse.

Eine auffällige Diskrepanz zu der LLNL-Karte betrifft den Marker D19S208, der direkt neben D19S191 liegt. Eigentlich würde man erwarten, daß der YAC-Klon Y8 positiv ist für diese beiden Marker, da er für D19S425 (in der Karte am gleichen Locus wie SCN1B) positiv ist.

Möglicherweise ist der Klon in irgendeiner Weise rearrangiert oder deletiert, andererseits wäre nach der genetischen Karte die Orientierung von D19S208 und D19S425 invertiert.

YAC STS	Y8 (751e12)	Y9 (757f7)	Y2 (I101f4)	Y3 (I112d1)	Y4 (I65c1)	Y10 (761d1)
D19S893	+	-	-	-	-	-
D19S569	+	-	-	-	-	-
D19S425	+	-	-	-	-	-
D19S208	-	-	-	-	-	-
D19S224	-	-	-	-	-	-
D19S220	-	-	-	-	-	-
D19S228	-	-	-	-	-	-
D19S421	-	-	-	-	-	-
WUT1.9	-	-	+	+	-	-
RYR1-922			-	+	-	-
G1021A			-	+	-	-
RYR1 Ex17	-	-	-	+	-	-
RYR1 Ex39	-	-	-	+	-	-
RYR1 Ex45	-	-	-	+	-	-
RYR1-CA	-	-	-	-	+	-
D19S422			-	-	+	
D19S570	-	-	-	-	+	-
D19S881	-	-	-	-	+	-
D19S876	-	-	-	-	-	-
D19S417	-	-	-	-	-	-
D19S190	-	-	-			-
D19S223	-	-	-	-	-	-

Tab. 4.1.3.1 Ergebnisse der STS-PCRs mit 6 CEPH-YACs von Chromosom 19. Die YACs Y2, Y3 und Y4 sind in dem RYR1 Cosmid/YAC-Contig von Rouquier et al. (1993) beschrieben. In Klammern die CEPH-Bezeichnung des jeweiligen YACs, +: PCR-Produkt vorhanden, -: kein PCR-Produkt, leer. nicht analysiert.

Der YAC-Klon Y9, der die Lücke zwischen den beiden Cosmid-Contigs (*RYR1* und *COX6b/7a*, *CANPS*) überspannen sollte, ist negativ für alle getesteten Marker. Entsprechend dem Maßstab der Karte sollte der YAC eine Größe von ca. 2 Mb haben, in der PFGE-Analyse ergab sich jedoch eine Größe ca. 400 kb. Das könnte ein Indiz sein, daß die Lücke zwischen den Contigs kleiner ist, als es der Kartenmaßstab andeutet.

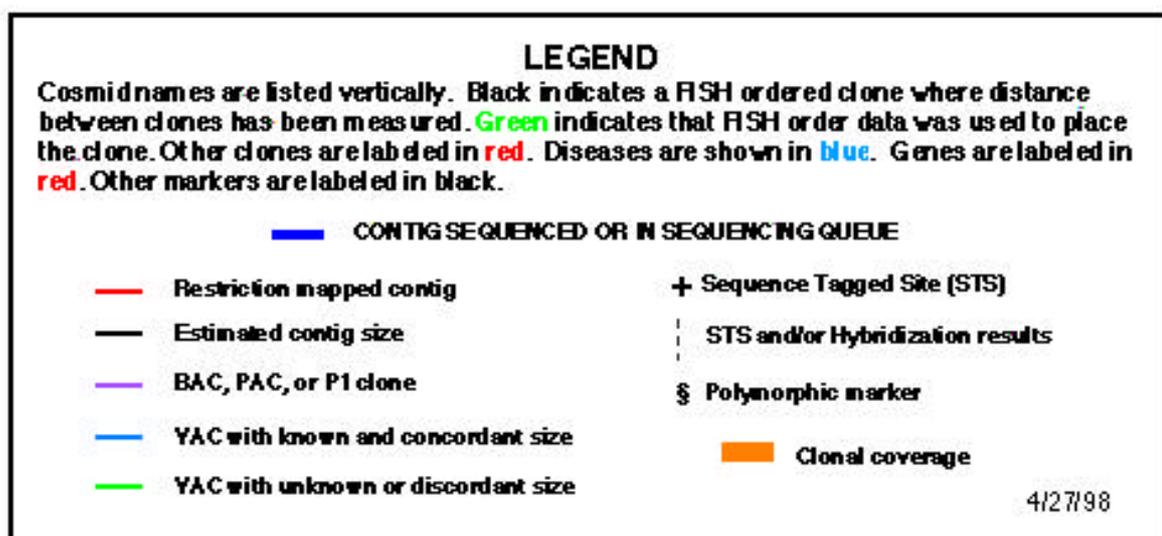
Cosmid \ STS	15	16	17	18	19	20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	21	22	23	
D19S208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D19S224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D19S220	-			-		-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	
D19S228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D19S421	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
WUT1.9			-	-	+	+	+	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G1021A											-	+	-	+	-	-	-	-	-	-				
RYR1-922													-	-	+	-	-	-	-	-				
RYR1 Ex17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RYR1 Ex39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
RYR1 Ex45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
RYR1-CA*													-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
D19S422*																			-	-	-	-	+	+
D19S570	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D19S881	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D19S876	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D19S417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D19S223	-			-		-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	

Tab. 4.1.3.2 Ergebnisse der STS-PCRs mit dem *RYR1* Cosmid-Contig von Rouquier et al. (1993). Die Cosmide sind in der Orientierung *cen-tel* von links nach rechts angeführt. Das 5'-Ende von *RYR1* liegt in Cosmid 6, das 3'-Ende in Cosmid 14. Die Mutation *G1021A* liegt in Exon 11, die Sequenz *RYR-922* in Exon 17. *: siehe auch Abb. 4.1.1.3.

Der Vergleich der genetischen Karte mit der physikalischen legt nahe, daß das *RYRI*-Gen sowie die flankierenden Bereiche noch einige weitere Mikrosatelliten-Marker enthalten könnten. Lediglich D19S422 konnte jedoch in das letzte Cosmid des *RYRI*-Contigs kartiert werden (s. Abb. 4.1.1.3, Wolz et al., 1996), sowie D19S570 und D19S881 in das überlappende YAC Y4. Somit wird das *RYRI*-Gen auf der 5'-Seite von WUT1.9 als nächstem Marker flankiert und von D19S422 auf der 3'-Seite. Der in der LLNL-Karte angegebene Marker D19S421 konnte trotz mehrfach durchgeführter PCR nicht in den 5'-Bereich von *RYRI* eingeordnet werden, obwohl die Darstellung nahelegt, daß er in dem Cosmid-Contig enthalten sein sollte. Auch in den beiden YACs, die die Region überlappen, konnte er nicht gefunden werden.

Das Ergebnis mit den Primern für die Mutation G1021A erscheint zunächst verwirrend, da zwar die Cosmide 6 und 8 positiv sind, das Cosmid 7 jedoch nicht. Falls es sich nicht um eine Kontamination der DNA-Präparation handelt, könnte es auch daran liegen, daß das Cosmid 8 als instabil beschrieben wurde und direkt neben einer nicht klonierbaren Sequenz liegt (Rouquier et al., 1993). Möglicherweise ist der Klon intern deletiert, enthält jedoch Teil-Sequenzen von den Cosmiden 6 und 8.

Die Reihenfolge der Marker in den Tabellen 4.1.3.1 und 4.1.3.2 ist also eine Kombination der LLNL-Karte mit den eigenen STS-PCR Ergebnissen, während die genetische Karte lediglich als Ausgangspunkt diente.



Original Legende zu der physikalischen Karte von Chromosom 19q des Lawrence Livermore National Laboratory in der Abb. 4.1.3.1 (s. nächste Seite).

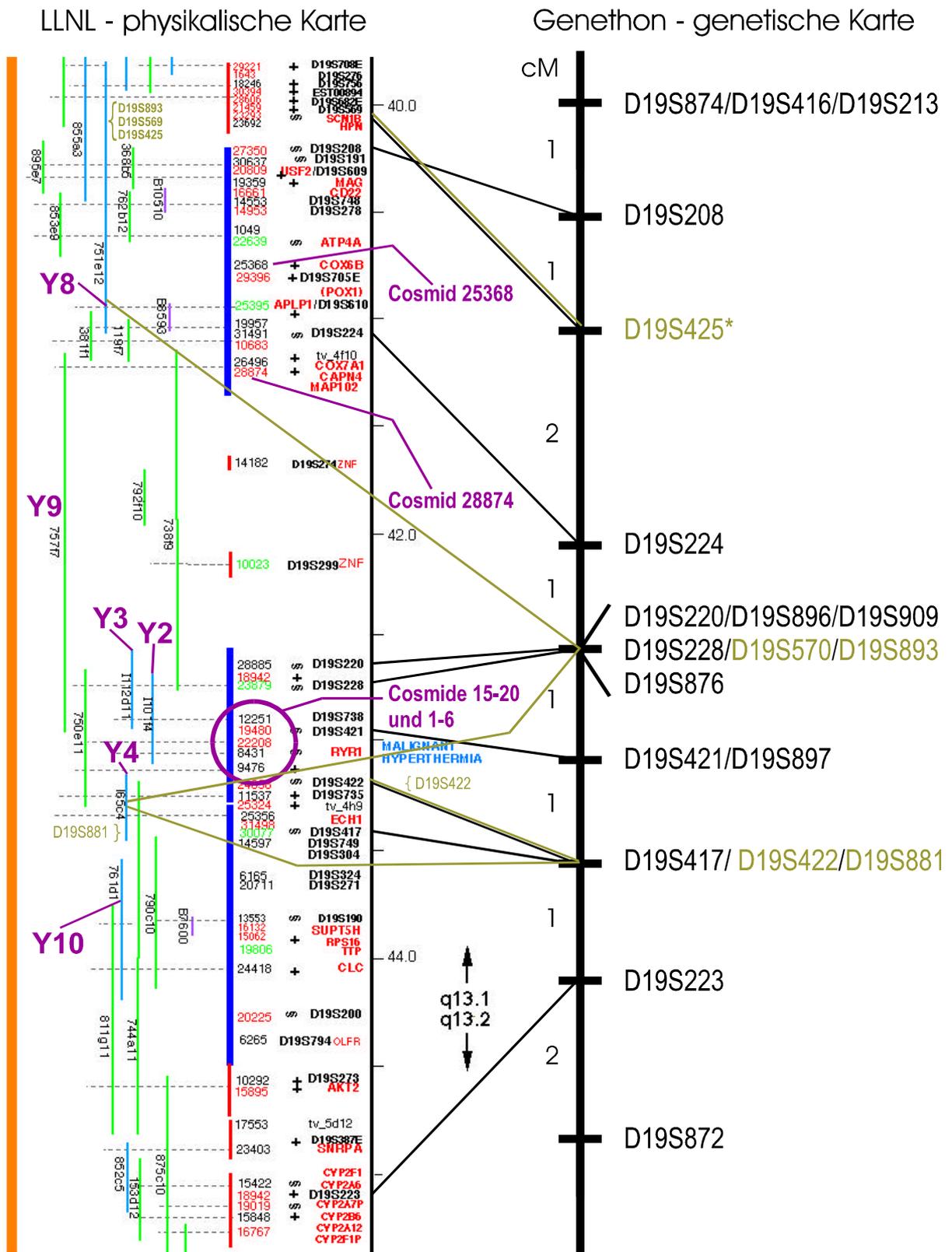


Abb. 4.1.3.1 Gegenüberstellung der physikalischen Genkarte aus dem LLNL (Version v. 27.4.98, Legende hierzu s. vorige Seite) und genetischer Koppelungskarte von Chromosom 19q13.1. Die violett markierten Klone wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die dünnen schwarzen Linien zeigen die Zuordnung von STR-Markern zu beiden Karten, die olivfarbenen Marker wurden durch STS-Kartierung dem entsprechenden Klon zugeordnet (olivfarbene Linien). *: In einer früheren Kartenversion war D19S425 auf gleicher Höhe mit SCN1B eingezeichnet.

4.2 cDNA-Selektion (gene tracking)

4.2.1 Herstellung des Muskel-cDNA Pools

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung eines Pools muskelspezifischer Transkripte wurde aus Skelettmuskel eines MHN getesteten Probanden RNA gewonnen. Diese wurde mittels eines Kassettenprimers (RXG) revers transkribiert und durch Gelfiltration der Größe nach selektiert. Abb. 4.2.1.1 zeigt das Elutionsprofil der Biogel-Säule mit ihrem charakteristischen,

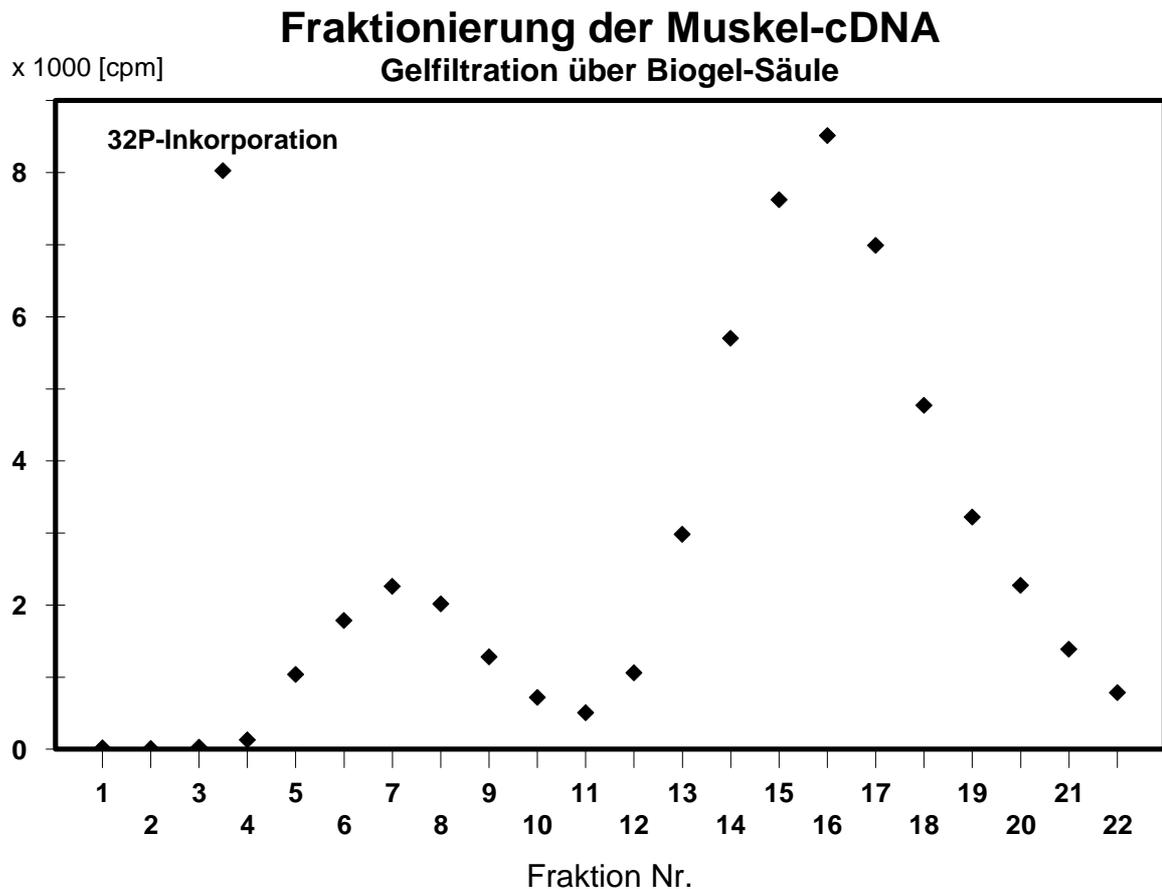
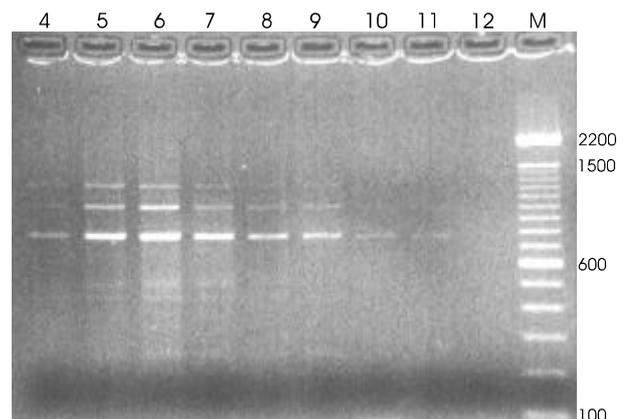


Abb. 4.2.1.1 (oben) Ergebnis der Szintillationsmessung der Muskel-cDNA Fraktionen.

Abb. 4.2.1.2 (rechts) Agarosegel der Kontroll-PCR mit Primern für das β -Glucuronidase Gen. Die Ziffern über den Geltaschen bezeichnen die Nr. der cDNA-Fraktion, die von der Biogel-Säule eluiert wurde. M = Längenstandard 100 bp-Leiter.



zweigipfeligen Verlauf. Mit der Fraktionen der selektierten Erststrang-cDNA wurde eine PCR mit Primern aus dem Glucuronidase-Gen durchgeführt. Die Abb. 4.2.1.2 zeigt das Ergebnis der PCR: die Fraktionen 4-6 ergeben eine zunehmend bessere Amplifikation und bis Fraktion 12 verschwindet das PCR-Produkt allmählich. Diese PCR dient als Kontrolle für die Präsenz seltener Transkripte, da das Glucuronidase-Gen nur mit wenigen Kopien pro Zelle abgelesen wird. Zudem ist es ein sogenanntes Haushaltsgen (Shipley et al., 1991) und damit in allen möglichen Zelltypen aktiv, da die basalen Stoffwechselfvorgänge in den verschiedenen Zelltypen gleich sind. Die Abb. 4.2.1.1 und 4.2.1.2 dienen als Maßstab für die Auswahl der Fraktionen, die schließlich zum cDNA Pool vereinigt wurden. Die Fraktionen 4-7 wurden vereinigt und nach der poly-A-tailing Reaktion für die cDNA Selektion vorbereitet.

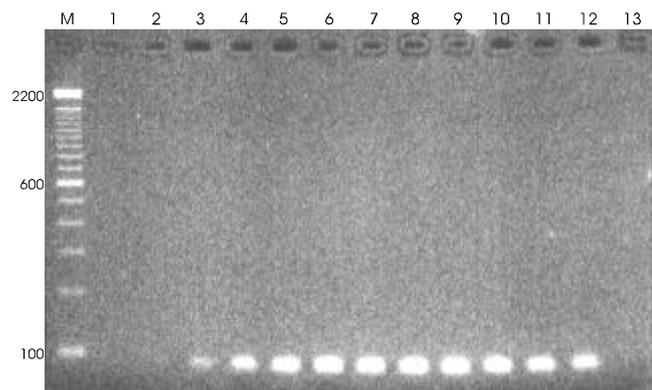


Abb. 4.2.1.3 Agarosegel mit PCR-Produkten der *RYRI-G1021A* Kontroll-PCR. Die Zahlen bezeichnen die eluierten cDNA-Fraktionen. M = Längenstandard 100 bp-Leiter.

Schließlich wurde mit der Erststrang-cDNA noch eine weitere Kontroll-PCR durchgeführt, nämlich mit den *RYRI* Primern 1001/1066. Hier ergeben die Fraktionen 3-12 ein deutliches Produkt von der erwarteten Größe (Abb. 4.2.1.3). Dies zeigt die Anwesenheit des *RYRI* Transkriptes und dient als Positivkontrolle für die cDNA-Selektion.

4.2.2 cDNA-Selektion mit Chromosom 19 YACs

Ein erster Selektionsversuch wurde mit 2 YACs aus dem *RYRI*-Contig, Y3 und Y4, durchgeführt. Nach 2 Hybridisierungsrunden wurden die eluierten cDNAs untersucht. Es zeigte sich, daß der Versuch nicht gelang, da bereits aus den beiden ersten Eluat (nach der ersten Hybridisierungsrunde) die *RYRI*-Kontrolle mit den Primern 1001/1066 nicht mehr zu amplifizieren war. Wie in Tab. 4.1.3.1 gezeigt, ist der YAC Y3 in der STS-PCR positiv für diese Primer. Außerdem wurde eine PCR mit dem Kassettenprimer RXG durchgeführt, um die eluierten cDNAs zu amplifizieren. Die PCR ergab identische Bandenmuster für die unterschiedlichen YACs, bei erfolgreicher Selektion hätte man Unterschiede erwarten müssen.

4.2.3 cDNA-Selektion mit Chromosom 19 Cosmiden

Für die Selektion mit Cosmiden wurde das von Rouquier et al. (1993) beschriebene Cosmid-Contig in zwei Ansätze aufgeteilt: ein Test-Contig mit den Cosmiden auf der 5'-Seite des *RYR1* Gens (15-20 und 1-5) und ein Kontroll-Contig mit Cosmiden des *RYR1*-Gens und der 3' flankierenden Region (6-23; s. Abb. 2.1.6.3). Die Aufteilung in zwei getrennte Contigs bot sich an, um die Selektionsbedingungen besser zu kontrollieren. In beiden Ansätzen sollten muskelspezifische Transkripte dieser genomischen Regionen angereichert werden, im Test-Contig sollte man jedoch keine *RYR1*-cDNA finden (negative Kontrolle), im Kontroll-Contig hingegen schon (positive Kontrolle), da diese Cosmide nahezu das komplette *RYR1*-Gen enthalten. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt mit jeweils zwei Hybridisierungsrunden. Die eluierten cDNAs wurden in mehreren Versuchen in verschiedene Plasmidvektoren kloniert. Zur Analyse wurden die Klone entweder unmittelbar sequenziert oder nach einer Hybridisierung mit COT1-DNA ausgewählt und schließlich sequenziert. Die Größe der Inserts bewegt sich im Rahmen von ca. 150 - 750 bp. Die Ergebnisse der cDNA-Selektion sind zusammengefaßt in Tab. 4.2.3.1.

Insgesamt wurden 328 cDNA-Klone aus beiden Ansätzen isoliert, wovon 42 sequenziert wurden. Erstaunlicherweise enthielten nahezu alle Klone des Test-Contigs repetitive Sequenzen und zwar hauptsächlich (26/29) aus der Familie der alphoiden Satelliten-DNA.

	Test-Contig	Kontroll-Contig
Anzahl isolierter cDNA Klone	216	112
davon sequenziert:	29	13
Alu-repetitive DNA	2	3
Alphoide Satelliten DNA	26	0
Ryanodin Rezeptor cDNA	0	6
Nicht-repetitive DNA, unspezifische Hybridisierung	0	2
Nicht-repetitive DNA, spezifische Hybridisierung	0	2
Klonierungsvektor	1	0

Tab. 4.2.3.1 Ergebnisse der Muskel-cDNA-Selektion mit Chromosom 19 Cosmiden. Die meisten Klone kamen für eine Sequenzierung nicht in Frage, da sie ein starkes Hybridisierungssignal zu humaner COT1-DNA zeigten und sehr wahrscheinlich repetitive DNA enthalten.

Offensichtlich wurden durch die Hybridisierung mit COT1-DNA die meisten anderen Repeat-Klassen detektiert und somit gar nicht ausgewählt für die Sequenzierung. Allerdings ist die Herkunft der Satelliten DNA nicht leicht erklärbar, da diese üblicherweise nur in Centromernähe lokalisiert ist und die Cosmide sowie der ganze Chromosomenabschnitt 19q13.1 weit vom Centromer entfernt sind. Die Tabelle zeigt, daß immerhin fast die Hälfte (6/13) der ausgewählten, nicht-repetitiven Klone des Kontroll-Contig Transkripte der Positivkontrolle, nämlich des Ryanodinrezeptorgens sind. Zwei weitere Klone aus diesem Ansatz sind nicht-repetitiver Natur und weisen keine Homologie zu bekannten Sequenzen auf, wie sich aus der Abfrage der dbEST- und GenBank-Datenbank (Altschul et al., 1990) ergibt. In einer Southern Hybridisierung zu *Eco* RI verdauter Cosmid DNA sollten diese Klone zurückkartiert werden, jedoch fand sich nur eine unspezifische Hybridisierung zu vielen Banden, inklusive derer des Cosmid-Vektors. Es handelt sich um cDNA Moleküle, die entweder vollkommen unspezifisch gebunden haben, oder aber aufgrund einer Sequenzhomologie z.B. mit der Vektorsequenz.

Die beiden Klone GT#4/C6 und GT#4/E6 (Abb. 4.2.3.1), die aus dem Kontroll-Contig selektiert wurden, sind identisch und die einzigen, die ein spezifisches Hybridisierungsmuster zu den Cosmiden zeigen. Abb. 4.2.3.2 zeigt die Rückhybridisierung des Klons auf den genomischen Ursprung, das Cosmid 9318 (=Cosmid 22; vgl. Abb. 2.1.6.3). In mehreren Experimenten wurde versucht, die komplette cDNA-Sequenz zu ermitteln. Hierzu wurden PCRs mit Primern aus der Sequenz des cDNA-Klons GT#4/C6 in Kombination mit λ GT10- bzw. λ GT11-Primern, spezifisch für die Klonierungsstelle des Phagenvektors, durchgeführt, um ein Produkt zu erhalten aus einer Skelettmuskel-cDNA Bank sowie einer Universal-cDNA Bank (Quickscreen von Clontech). Keine der getesteten Kombinationen ergab jedoch spezifische und reproduzierbare Banden.

	1				50
GT#4/C6	GGTCGGGAGG	GAGGGTGAGC	TGGAATGGTG	GATAATGGGA	GAGAGGTTCC
	51				100
	TTTAGGAAAA	TGAAAGTCTC	ATTAGAAAGG	GAATGCGTAA	TGGATAGACT
	101				150
	GAGAAAGGAA	TTTGAGGAGG	GGGTGCTGGC	TCCTGGAGGT	GCAGTCCCGG
	151		167		
	GACTGGAGAG		CGTGTAG		

Abb. 4.2.3.1 Sequenz des durch cDNA Selektion gewonnenen Klons GT#4/C6.

Parallel dazu wurde versucht, Cosmid-fragmente, die die Sequenz von GT#4/C6 enthielten, zu klonieren. Es wurde ein *Sau* 3A-Fragment-Klon mit dem entsprechenden Insert identifiziert und sequenziert. Leider zeigte sich, daß der Klon nur die Sequenz von GT#4/C6 zwischen zwei *Sau* 3A-Schnittstellen enthielt und somit keine neue Information hinzugewonnen wurde. Allerdings hätte eine erfolgreiche Sequenzierung der flankierenden Region wenig erbracht, solange die komplette cDNA-Sequenz von GT#4/C6 nicht zur Verfügung steht.

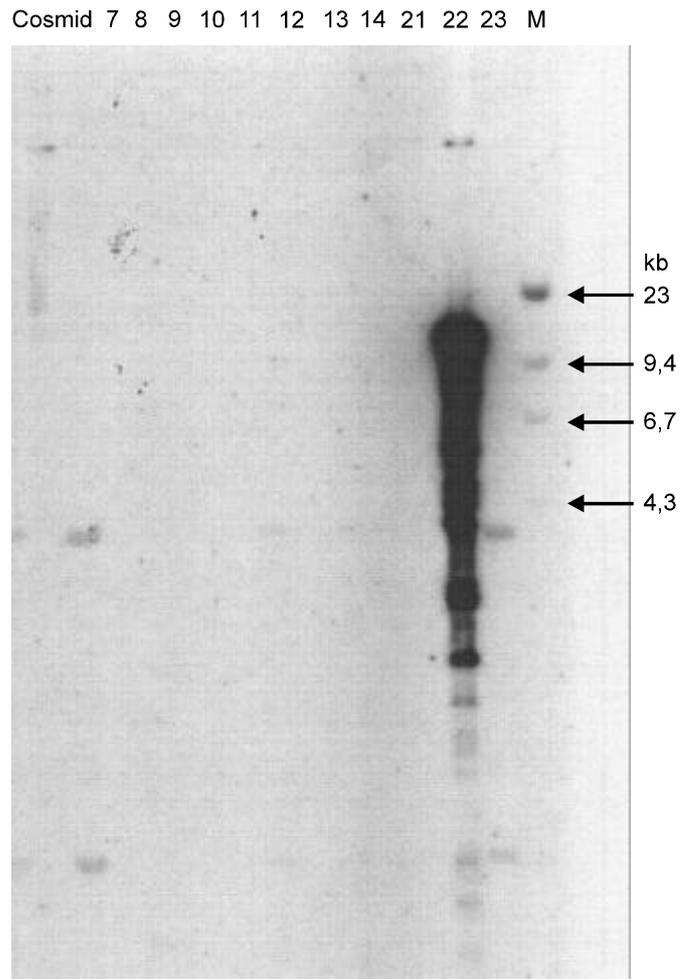


Abb. 4.2.3.2 Autoradiographie einer Southern Hybridisierung mit GT#4/C6-DNA als Sonde. Auf den Filter wurde ein *Eco* RI-Verdau von Cosmiden des RYR1-Cosmid-Contigs aufgetragen. Der Verdau des Cosmids 22 ist nur partiell, weshalb mehrere Banden detektiert werden. M = Größenmarker I/HindIII.

4.3 Mutationsanalyse von CCD-Patienten in Kandidatengen

Für die Mutationsanalyse der verschiedenen Kandidatengene wurde DNA von einem Patienten aus jeder Familie, in der Regel auch der Indexpatient dieser Familie, untersucht (Pfeile in Abb. 3.1.1 u. Abb. 3.1.2).

4.3.1 Das Gen für den sarkoplasmatischen Calciumkanal (Ryanodinrezeptorgen, *RYR1*)

4.3.1.1 Die MHS-Mutationen

Schon kurz nach der Beschreibung des *RYR1*-Gens als Kandidat für die Veranlagung zur Malignen Hyperthermie (MacLennan et al., 1990, McCarthy et al., 1990) wurde eine erste Mutation in diesem Gen gefunden, bald darauf weitere Mutationen, die in MH-Familien mit der Disposition zur MH segregierten. Die Trennung in MHS- und CCD-Mutationen ist nicht so strikt wie sie hier erscheint, wurde aber wegen der gestellten Thematik beibehalten. Aufgrund der Assoziation zwischen CCD und MHS sind praktische alle CCD-Mutationen auch MH-Mutationen, andererseits wären auch Fälle denkbar, in denen bei vorliegender

Mutation	Aminosäure-Substitution	Referenz	Frequenz	Nachweis	Anzahl Patienten
G1021A	Gly341Arg	Quane et al., 1994 Alestrom et al., 1995	6 %	PCR-RFLP	31
C1840T	Arg614Cys	Fuji et al., 1991	4 %	PCR-RFLP	42
C6487T	Arg2163Cys	Manning et al., 1998 b	4 %	SSCP, PCR-RFLP	38
G6502A	Val2168Met	Manning et al., 1998 b	7 %	PCR-RFLP	39
G7303A	Gly2435Arg	Keating et al., 1994 Philips et al., 1994	4 %	PCR-RFLP	41
C7372T	Arg2458Cys	Manning et al., 1998 a	4 %	PCR-RFLP	39
G7373A	Arg2458His	Manning et al., 1998 a	4 %	PCR-RFLP	38

Tab. 4.3.1.1 *RYR1*-Mutationen, die wiederholt bei MH-Familien gefunden wurden. Die Spalten bezeichnen die Mutation auf DNA-Ebene, auf Proteinebene, die Quelle, die Häufigkeit der Mutation unter europäischen MHS-Patienten (Manning et al., 1998 b) die Nachweismethode sowie die Anzahl hier untersuchter CCD-Patienten.

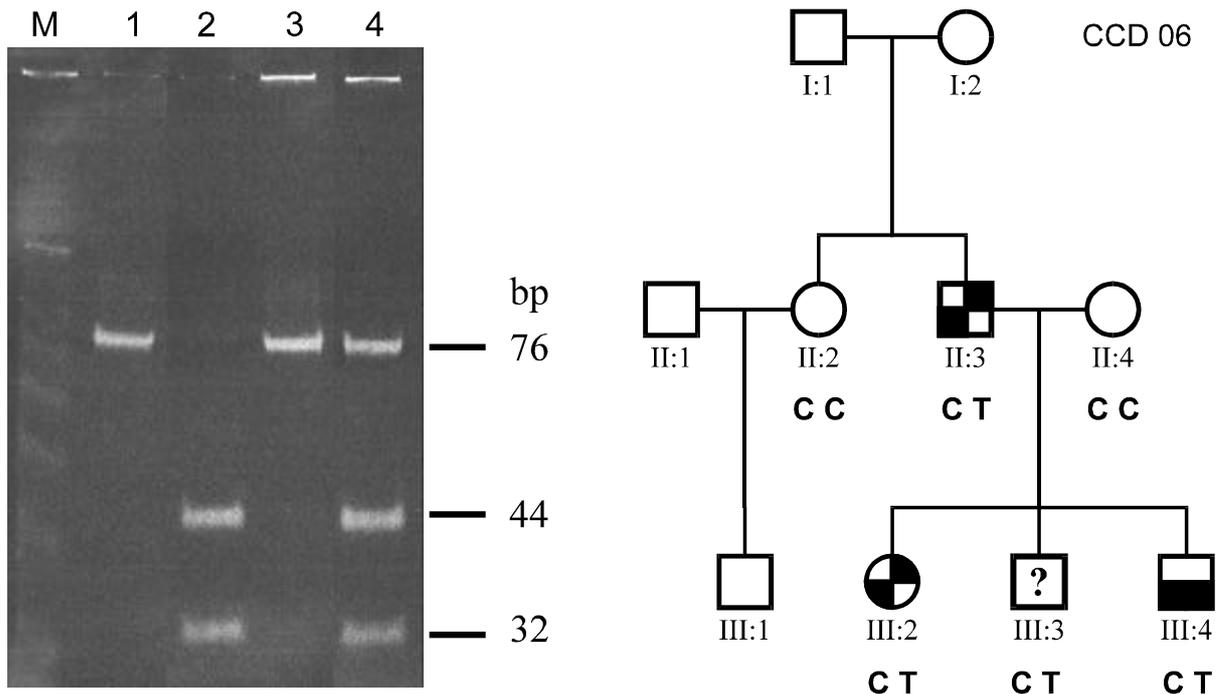


Abb. 4.3.1.1 links: Polyacrylamidgel (20 %) mit PCR-Produkten von II:2 (Spuren 1 und 2) sowie von II:3 (Spuren 3 und 4) für die C487T-Mutation. Spuren 2 und 4: BstU I Verdau, M = Marker 10 bp-Leiter. Symbole: II:3 und III:2: MHS und CCD, III:3 möglicherweise betroffen (MHS und/oder CCD), III:4 MHS, aber keine CCD.

MHS-Mutation eine CCD mit keinen oder nur geringen Symptomen nicht erkannt wurde. Tab. 4.3.1.1 zeigt die beschriebenen Mutationen, die bei den CCD-Patienten untersucht wurden. Keine der genannten Mutationen wurde unter der entsprechenden Anzahl untersuchter Patienten gefunden. Zum Vergleich wurden in der Tabelle die Häufigkeiten unter den europäischen MHS-Patienten (Manning et al., 1998 b), die auf *RYR1*-Mutationen untersucht wurden, angegeben. Bei der Interpretation dieser Zahlen muß allerdings die genetische Heterogenität der MHS berücksichtigt werden. Die Häufigkeiten dieser Mutationen beziehen sich auf ein Kollektiv von MHS-Patienten, das nicht nur die zu Chromosom 19 gekoppelten Familien umfaßt, so daß der erwartete Anteil an MHS-Patienten mit *RYR1*-Mutationen höher ausfällt als die gefundenen Häufigkeiten.

4.3.1.2 Die CCD-Mutationen

Die Mutation C487T, entsprechend einem Austausch Arginin für Cystein in Position 163 des Ryanodin Rezeptors, wurde von Quane et al. (1993) beschrieben. Sie segregiert in einer CCD-Familie italienischer Herkunft sowie in zwei weiteren MHS-Familien. Abb. 4.3.1.1 zeigt das Nachweisprinzip sowie das Ergebnis für CCD Familie 06, bei der die Mutation erstmals nachgewiesen wurde. Der Nachweis erfolgt durch einen PCR-RFLP: durch die Mutation

verschwindet eine *Bst*U I-Schnittstelle im PCR-Produkt, der homozygote Wildtyp wird komplett verdaut (Spur 2), während bei heterozygot vorliegender Mutation neben den Spaltprodukten ein ungespaltenes Allel zurückbleibt (Spur 4). Die Mutation wurde in keiner anderen der 40 untersuchten Familien gefunden. Die CCD-Familie 06 ist bei Quane et al. beschrieben. Darüber hinaus taucht die Mutation auch bei 2 % der europäischen MHS-Familien auf (Manning et al., 1998 b).

In der genannten Arbeit von Quane et al. wurde eine weitere *RYR1*-Mutation beschrieben, C1209G, die zu einem Austausch Ile403Met führt. Sie wurde bei zwei betroffenen Geschwistern in einer italienischen CCD-Familie gefunden. Die Mutation konnte bei keinem der 40 untersuchten Indexpatienten nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Mutation basiert ebenfalls auf einem PCR-RFLP: beim homozygoten Wildtyp erfolgt die komplette Spaltung eines 92 bp großen PCR-Produkts in zwei Fragmente von 63 und 29 bp, während bei heterozygoten Trägern der Mutation ein nicht verdautes Allel erhalten bleibt (Abb. 4.3.1.2).

Die von Quane et al. (1994) beschriebene Mutation A1565C, die zu einer Substitution Tyr522Ser führt, wurde in einer einzigen französischen Familie gefunden. Zwei der drei MHS-Patienten in dieser Familie hatten auch die histologischen Merkmale einer Central Core Disease. Das Vorhandensein der Mutation wurde mit der SSCP-Methode untersucht. Bei keinem der 43 untersuchten Patienten wurde ein verändertes Bandenmuster gefunden.

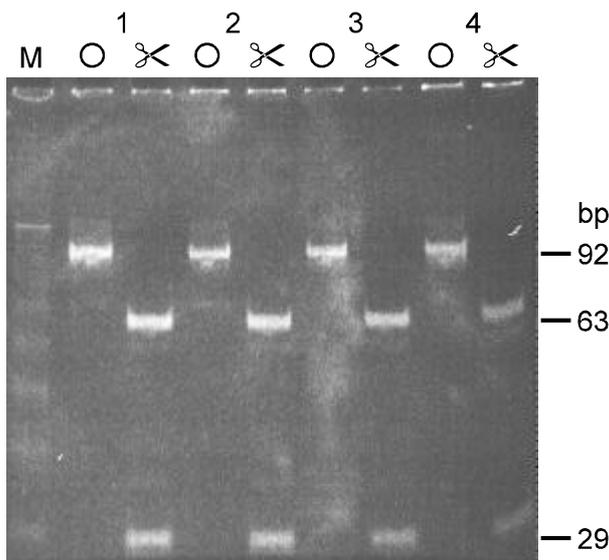


Abb. 4.3.1.2 Polyacrylamidgel (10%) mit PCR-Produkten für die Suche nach der *RYR1*-Mutation C1209G bei 4 CCD-Patienten. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt. ○: PCR-Produkt, ✂: *Mbo* I-verdautes PCR-Produkt, M = Marker 10 bp Leiter.

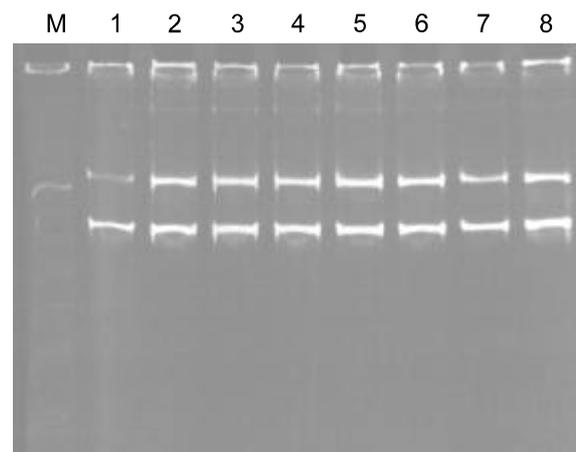


Abb. 4.3.1.3 Polyacrylamidgel mit *Hga* I-verdautes PCR-Produkten (115, 95 bp) von 8 CCD-Patienten für die Suche nach der *RYR1*-Mutation G7307A. M = Marker 10 bp-Leiter.

Eine weitere *RYRI*-Mutation in einer CCD-Familie wurde von Zhang et al. (1993) entdeckt. In einer großen kanadischen Sippschaft von 130 Mitgliedern cosegregiert die Mutation G7307A (Arg2436His) mit dem MH-Phänotyp sowie mit CCD, allerdings haben zwei Träger der Mutation lediglich die Veranlagung zu MH und keine CCD. Im Falle einer Mutation geht eine *Hga* I-Schnittstelle in einem 210 bp großen PCR-Produkt verloren, nur 50 % der Moleküle werden zu zwei Fragmenten von 115 und 95 bp restringiert (Abb. 4.3.1.3). Auch diese Mutation konnte bei keinem der 40 untersuchten Patienten nachgewiesen werden.

Insgesamt erwies sich die Suche nach Mutationen im *RYRI*-Gen bei den Patienten als unergiebig. Gründe hierfür sind zum Einen die Seltenheit mancher Mutationen, sowie andererseits die Größe des *RYRI*-Gens. Durch die Analyse wurden nur einige wenige Nukleotide des Gens untersucht, so daß natürlich keineswegs ausgeschlossen werden kann, daß die Patienten Mutationen in einem nicht untersuchten Bereich der 15 kb großen *RYRI*-Boten-RNA haben. Andererseits wurde ein Großteil der beschriebenen Mutationen in der N-terminalen Hälfte des Moleküls und dort wiederum vorrangig in zwei Exons, 39 und 45, gefunden.

Es ergeben sich damit in der vorliegenden Arbeit keine Anhaltspunkte für eine Involvierung des *RYRI*-Gens in die Ätiologie der Central Core Erkrankung. Der Beweis steht jedoch aus, solange nicht Mutationen wenigstens im N-terminalen Bereich des Gens komplett ausgeschlossen werden können, was angesichts der Zahl der Exons keine leichte Aufgabe darstellt. Zudem ist die genomische Struktur des *RYRI*-Gens erst vor kurzem publiziert worden (Philips et al., 1996).

4.3.2 Das Gen für die α -Untereinheit des Myosins (MYH7)

In zwei der untersuchten CCD-Patienten wurde neben den klassischen CCD-Symptomen auch eine hypertrophe Cardiomyopathie diagnostiziert, darunter der Indexpatient der Familie CCD10, die nicht zu Chromosom 19 gekoppelt ist. DNA von diesem Patienten wurde an Hr. Prof. Vosberg weitergeleitet zur kompletten Analyse des MYH7-Gens auf Chromosom 14, das 40 Exons umfaßt. Bisher wurden keine Mutationen gefunden. Die DNA des 2. Patienten wurde auf die vier von Fananapazir (1993) beschriebenen MYH7-Mutationen, G256E, R403Q, G741R sowie L908V untersucht. Auch bei diesem Patienten konnten die vier Mutationen nicht nachgewiesen werden. Für eine mögliche Ursache von MYH7-Mutationen als Auslöser einer CCD wurden damit keine stützenden Befunde erhoben. Dies steht auch im

Einklang damit, daß die Arbeit Fananapazirs (1993) nicht unumstritten ist und ein Zusammenhang zwischen hypertropher Cardiomyopathie und CCD von anderen bisher nicht beobachtet wurde (McKenna, zitiert in OMIM #117000).

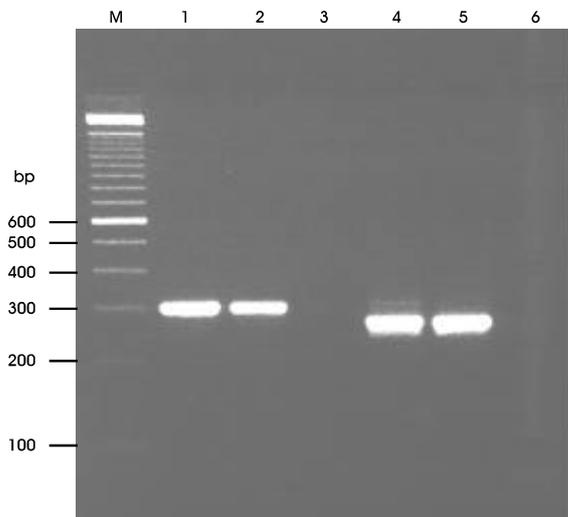


Abb. 4.3.3.1 PCR mit *COX6b* (1,2) und *COX7a-cDNA* (4,5) Primern, als Matrize diente Skelettmuskel-RNA. Spuren 3 und 6: Leerwert.

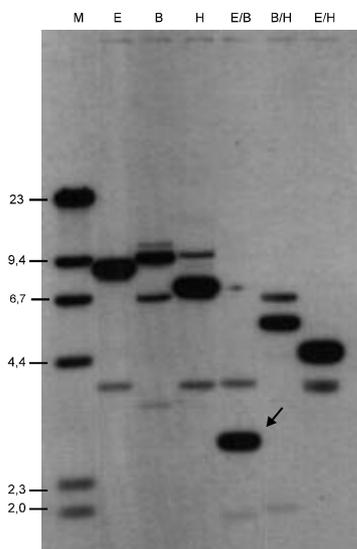


Abb. 4.3.3.2 Southern-Hybridisierung von Cosmid 25368, verdaut mit den Enzymen *EcoRI* (E), *BamHI* (B) und *HindIII* (H) sowie die entsprechenden Doppelverdaus. Als Sonde diente ein 300 bp großes *COX6B* cDNA PCR-Produkt. Der Pfeil verweist auf das ca. 5 kb große *EcoRI/HindIII*-Fragment, das subkloniert werden sollte. M = Marker (I/*HindIII*), Größenangaben in kb.

4.3.3 Das Gen für Cytochrom c Oxidase Untereinheit VIb (*COX6B*)

Von Beginn der Arbeit an wurde in Datenbanken und den aktuellen LLNL-Karten auch nach anderen bekannten Genen im CCD-Intervall D19S191-D19S190 gesucht, die als mögliche Verursacher der Zentralfibrillen-Myopathie in Frage kommen könnten. Das Gen für die Cytochrom c Oxidase Untereinheit VIb (*COX6B*) kartiert relativ nahe am Marker D19S191, centromerwärts vom *RYR1*-Gen (Ashworth et al., 1995; Abb. 4.1.3.1). Eine mögliche Involvierung dieses Gens ergibt sich aus der Tatsache, daß verschiedene Formen von mitochondrialer Myopathie oder Encephalomyopathie (Leigh's Syndrom) durch eine Defizienz der Cytochrom c Oxidase verursacht werden können (Minchom et al., 1983). Der Gendefekt kann sowohl im mitochondrialen Gen einer der großen COX-Untereinheiten I - III, als auch in einem nukleären Gen einer der restlichen zehn Untereinheiten liegen (Possekkel et al., 1995; Tiranti et al., 1995; Keightley et al., 1996). Im Gegensatz zur weiter unten beschriebenen Untereinheit VIIa, ist COX VIb ubiquitär exprimiert.

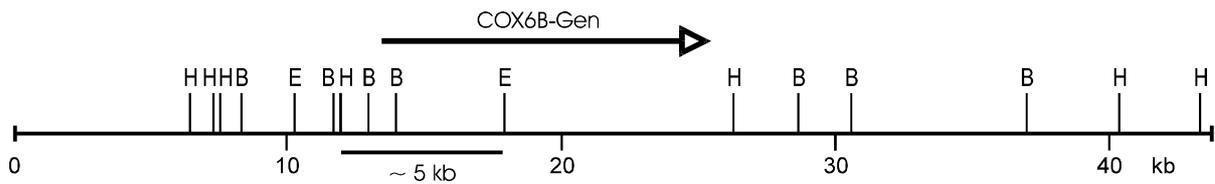


Abb. 4.3.3.3 Restriktionskarte des Cosmids 25368 mit Schnittstellen für die Enzyme *EcoR* I (E), *BamH* I (B) und *Hind* III (H). Der Pfeil gibt die ungefähre Lage und Orientierung des *COX6B*-Gens an. Der Strich darunter kennzeichnet das für die Subklonierung vorgesehene *Eco*/*Hind*-Fragment.

Die cDNA-Sequenz des *COX6B*-Gens wurde von Taanman et al. (1989) beschrieben, darüber hinaus ist die Sequenz des letzten Exons (Taanman et al., 1991) sowie ein kurzer Abschnitt der 5'-UTR (Kato et al., 1994) bekannt gewesen. Da von den meisten Patienten nur genomische DNA vorhanden ist, war für die Mutationsanalyse die Kenntnis der Exon-Intron Struktur des Gens erforderlich.

Zunächst wurden Primer für die Amplifikation der cDNA hergestellt. Mit den Primern *COX6*-cDNA-F (TGGCGGAAGACATGGAGACC) und -R (GGAGAAGGATGGAGGACAGAGG) gelang es, das vorausgesagte 300 bp Fragment aus Skelettmuskel-cDNA zu amplifizieren (Abb. 4.3.3.1). Das Cosmid 25368, das das *COX6B*-Gen (Ashworth et al., 1995) beherbergt, wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I, *BamH* I und *Hind* III verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, geblotted und die Membran mit der amplifizierten cDNA-Sonde hybridisiert (Abb. 4.3.3.2). Ein starkes Hybridisierungssignal wurde von einem ca. 5 kb großen *Eco* RI/*Hind* III-Fragment hervorgerufen, so daß versucht wurde, dieses Fragment in einen Bluescript-Vektor zu klonieren. Trotz mehrfacher Versuche gelang dies nicht.

Eine Hybridisierung derselben Membran mit menschlicher *COT1*-DNA erlaubte die Konstruktion einer Restriktionskarte (Abb. 4.3.3.3).

Ein Versuch, genomische Fragmente mittels PCR aus verschiedenen cDNA-Primern und genomischer DNA als Matrize zu amplifizieren, gelang nicht, obwohl die codierende Sequenz nur 261 bp lang ist und das Gen somit nicht allzu groß sein konnte.

Das PCR-generierte cDNA-Fragment wurde als Sonde in Southern Hybridisierungen von genomischer Patienten-DNA benutzt, um eventuell vorhandene Mutationen zu detektieren. Das Nachweissystem würde allerdings nur größere Deletionen oder Insertionen entdecken und keine Substitutionen oder Insertionen/Deletionen von wenigen Basenpaaren. Es wurden Membranen mit *Taq* I-, *Bgl* II-, *Sac* I- und *Msp* I-verdauter DNA der CCD-Familien 01, 02 und 03 hybridisiert (s. Abb. 4.3.3.4). Dabei wurden keine veränderten Fragmente gefunden, so

daß man annehmen kann, daß, wenn das *COX6B*-Gen für CCD verantwortlich wäre, es sich um missense-Mutationen oder Veränderungen von wenigen Basen-paaren handeln müßte. Die cDNA- Sonde hybridisiert nicht exklusiv zum *COX6B*-Gen, da dieses einige Pseudo- gene besitzt (Carrero-Valenzuela, 1991). Da der Bereich, in dem das Cosmid 25368 kartiert, höchste Priorität im Sequenzierprogramm des Lawrence Livermore Labors hatte und somit

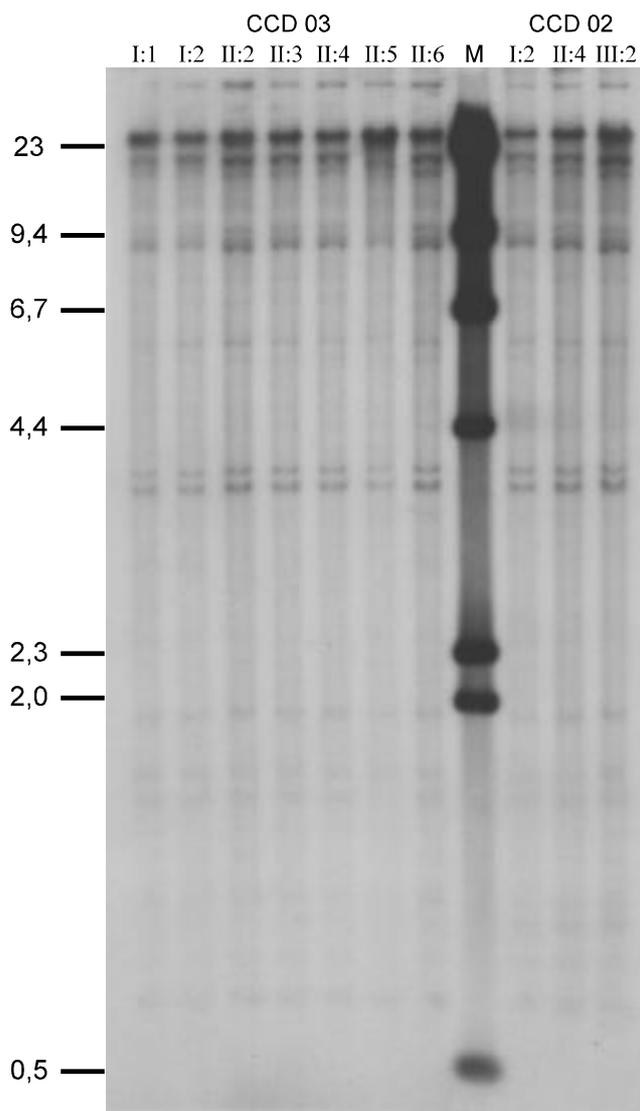


Abb. 4.3.3.4 Southern-Hybridisierung von *COX6B* cDNA zu *Bgl II*-verdauter genomischer DNA von CCD-Patienten. oben: Stammbaum Identifikation (s. Abb. 3.1.1), M = Marker *I/Hind III*, Fragmentgröße in kb.

abzusehen war, daß die Sequenz des Gens in naher Zukunft zugänglich sein würde und da z.B. das *COX7A*-Gen ein besserer Kandidat schien, wurde dieses Projekt nicht weiter verfolgt. Mittlerweile wurde durch das LLNL ein 105 kb Cosmid-Contig (GenBank Eingangs-Nr. g2098573) sequenziert, das das komplette *COX6B*-Gen enthält. Das Gen erstreckt sich über 11 kb genomische DNA (Abb. 4.3.3.3) und ist in 4 Exons organisiert, das 1. Exon ist nicht codierend. Angesichts der Größe des Gens konnte eine konventionelle PCR kein Produkt liefern.

4.3.4 Das Gen für Cytochrom c Oxidase Untereinheit VIIa (*COX7A1*)

4.3.4.1 Genomische Organisation des Gens *COX7A1*

Bereits zu Beginn der Arbeit war aus den Kartierungsarbeiten des Lawrence Livermore Labors (Ashworth et al., 1995) bekannt, daß das Gen für die Cytochrom c Oxidase Untereinheit VIIa-M (*COX7A1*) in das CCD Kandidatenintervall D19S191-D19S190 kartiert (s. Abb. 4.1.3.1). Dieses Gen schien ein guter Kandidat, der als Verursacher der CCD in Frage käme, da es sich zum Einen um eine Skelett- und Herzmuskelspezifische Untereinheit eines mitochondrialen Enzyms (Taanman et al., 1992) handelt, zum Anderen einige der Symptome von CCD an mitochondriale Myopathien erinnern. Die cDNA-Sequenz des *COX7A1*-Gens ist bereits 1992 publiziert worden (Arnaudo et al., 1992), die genomische Struktur war jedoch unbekannt. Vor der Untersuchung der Familien auf Mutationen in diesem Gen mußte daher die Organisation des Gens aufgeklärt werden.

Aus der physikalischen Karte von Chromosom 19 des LLNL ging hervor, daß das Cosmid 28874 das *COX7A1*-Gen enthalten könnte. Ausgehend von der publizierten cDNA-Sequenz wurden PCR-Primer hergestellt, die Start- und Stopcodon des Gens enthielten, um mittels PCR den codierenden Anteil der mRNA aus Skelettmuskel-RNA zu amplifizieren. Abbildung 4.3.3.1 zeigt ein Agarosegel mit dem PCR-Produkt, das der erwarteten Größe von 270 bp

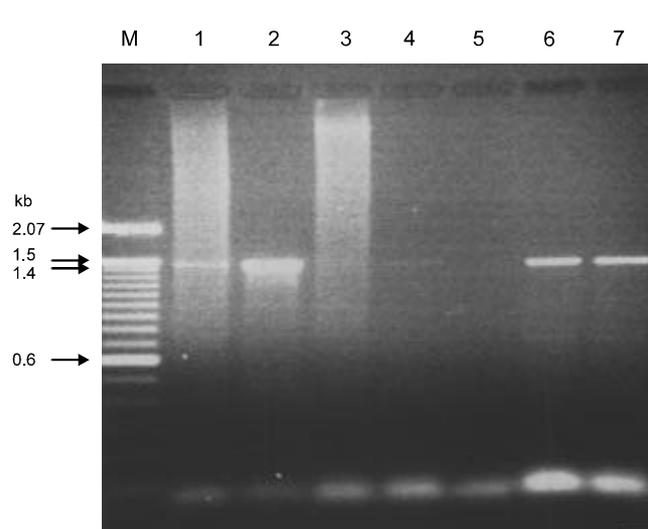


Abb. 4.3.4.1 PCR mit *COX7a*-cDNA Primern. Als Matrizen-DNA wurde menschliche genomische DNA, sowie DNA von Cosmid 28874 eingesetzt. 1 und 3: genomische DNA, 2, 4, 6 und 7: Cosmid 28874, 5: Leerwert, M = Marker 100 bp Leiter. Die Ansätze 1, 2, 6 und 7 enthielten 3 % Formamid. Bei den Ansätzen ohne Formamid ist die Amplifikation wesentlich schwächer.

entspricht und die *COX7A1*-cDNA darstellt. Da das Transkript des Gens relativ klein ist, lag es nahe, die cDNA-Primer für eine PCR mit der Cosmid-DNA zu benutzen (Abb. 4.3.4.1). Es gelang, ein spezifisches Produkt von 1.45 kb Größe zu amplifizieren. Ein Ansatz mit humaner, genomischer DNA zeigte ebenfalls ein schwaches Produkt derselben Größe, so daß man annehmen konnte, daß es sich um das Gen für COX VIIa-M handelt. Das PCR-Produkt aus Ansatz 7 (Abb. 4.3.4.1) wurde kloniert und mehrere Klone sequenziert. Aus dem Vergleich

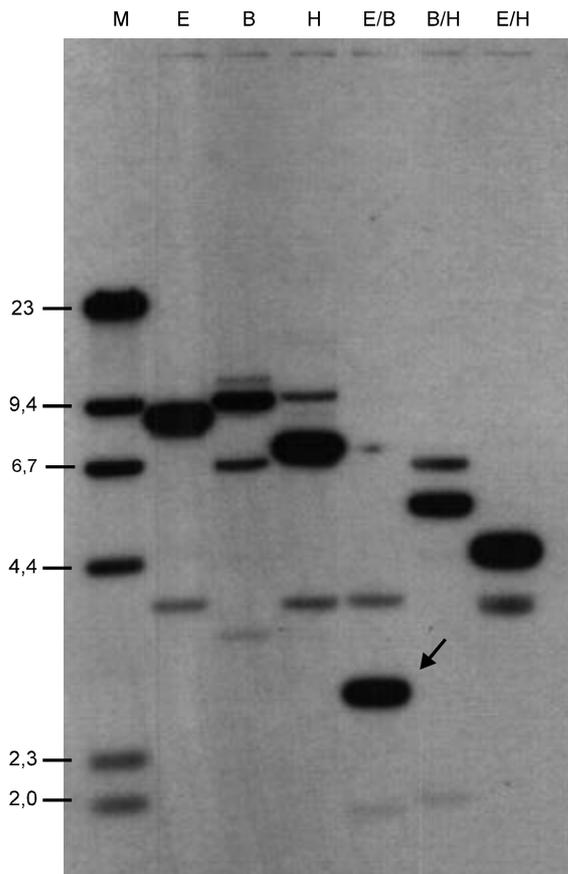


Abb. 4.3.4.2 Southern-Hybridisierung von *COX7a* cDNA zu *EcoR* I (E), *BamH* I (B) und *Hind* III (H)-verdauter DNA von Cosmid 28874. M = Marker I/*Hind* III, Fragmentgrößen in kb.

zwischen der Consensus-Sequenz der Klone und der publizierten cDNA-Sequenz konnte die genomische Kernsequenz des *COX7A1*-Gens abgeleitet werden (s. Abb. 4.3.4.4). Die flankierenden Sequenzen, v.a. die für eine Promotoranalyse wichtige 5'-UTR, mußte jedoch mit anderen Methoden gewonnen werden.

Das Cosmid 28874 wurde deshalb mit verschiedenen Enzymen verdaut und die DNA auf eine Nylonmembran transferiert. Das 270 bp cDNA PCR-Produkt wurde als radioaktiv markierte Sonde benutzt und mit der auf der Membran immobilisierten Cosmid-DNA hybridisiert (Abb. 4.3.4.2). Die cDNA-Sonde erkennt ein 2.9 kb *EcoR* I/*BamH* I-Fragment, dessen Subklonierung trotz mehrfacher Versuche nicht gelang. Die Membran wurde mit COT1-DNA hybridisiert

und eine Restriktionskarte des Gens erstellt (Abb. 4.3.4.3).

Als Alternativprotokoll zur Isolierung der flankierenden Sequenz bot sich die Inverse PCR an. Hierzu wurden 50 ng Cosmid-DNA in einem relativ großen Volumen verdaut, religiert und anschließend eine PCR durchgeführt mit Primern, die zur 5' und 3'-UTR des Gens hin orientiert waren. Die PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Die genaue Analyse der Sequenzen ergab, daß die PCR-Produkte nicht einem religierten Cosmid-Fragment

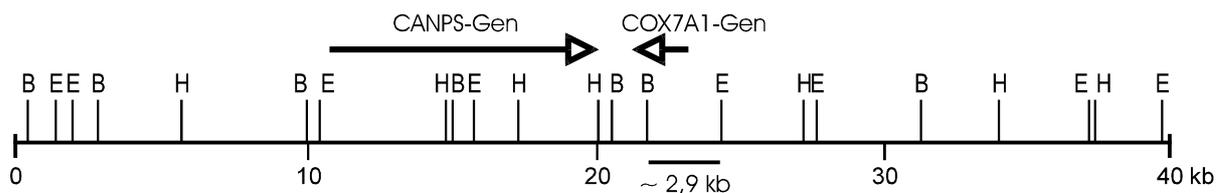


Abb. 4.3.4.3 Restriktionskarte des Cosmids 28874 mit Schnittstellen für die Enzyme *EcoR* I (E), *BamH* I (B) und *Hind* III (H). Der Pfeil gibt die ungefähre Lage und Orientierung (Leserichtung 5' ⇨ 3') der *CANPS*- und *COX7A1*-Gene an. Der Balken unter der Karte kennzeichnet das für die Subklonierung vorgesehene *Eco/Bam*-Fragment.

entstammten, da einer der verwendeten PCR-Primer im Produkt nicht vorgefunden wurde. Vermutlich entstanden die PCR-Produkte durch spezifisches Priming auf einer Seite und

```

caacgcctta tgcgtttcct cactctcaca taccagcggc aggagagatc cggggaggag -328
tgcactgccc cggcggaat ctccaaaaat ctgcaaaaat gtattccctg gtaccgcttt -268
gggctccggt gggaccaagc gaaattccga gaccgaaacg gatgcgcgct gcggcccagg -208
gtgctgggtct ggaccgcctc ctccgtggtg gacgaatccg aggagcagga ctccccgcaa -148
cccagcccca gcccagccc Th1/E47 cagccccgcc gcgtcccag ctgtcactgc cgcagcgggt -88
ggggcctggg gttcctggac Sp1 agaggaggac tacgcgtgtc MyoD cttgggcGGA GAAGGGAGGT -28
GACTCCGGCG GAAGAGGACA AGGCAGAAATG CAGGCCCTTC GGgtgaggcc cccatgggct 33
gggccggagc cccccaccca NRF-2 gaaaaccccg ccctaatacg cgactctcca agtgcccccg 93
catctagggc cttggaacgt gagccacctt cagggcctgg gactccccgc Nkx-2.5 taaacagcct 153
gggtcccttc ccccacaatc cactcttcgg agacaactgg ggacccccac cccggcccaa 213
agccccgggt ttgaacttga catctcggga acccttaaca ctggcctcac cgggecttc 273
tcaggcagcc tggacgctcc cggggacctc cattccggtc cccacgttcc cgggacctgg 333
tttctcctt ttaatccagg aaaccctccc ccaacaaaaa tctcaggact taggcccccc 393
agaacaaagt ctttctgggt cctctccctt ccaggaccct ctaggcagcc cggtcacccc 453
caggccagac tccagggcga gtcccctccc aaccagctg gcagttegeg ggtaacagaa 513
tccaagctat taccctcctc gcctttggga cgctcgctag ggatggggct gtccccacgt 573
ccaggcctca gagagcgggg tcccacttca ggacaccctt ccaggtgctt ccaatacccg 633
cccacctccc accccgcagG TGTCCCAGGC GCTGATCCGC TCCTTCAGCT CCACCGCCCG 693
GAACCGCTTT CAGAACCGAG TGCGCGAGAA ACAGAAGCTC TTCCAGgtgg ggggtcgggg 753
ggggtgggga tccgacgcgc cagccgggag cgcgccgagc cggggcaggc ggggcgcgct 813
ctaaggagca gccagcacc ctttctcatc agacaccccc acatccagGA GGACAATGAC 873
ATCCCGTTGT ACCTGAAGGG CGGCATCGTT GACAACATCC TGTACCGAGT GACAATGACG 933
CTGTGTCTGG GCGgtgagcg cagggcccgt ctgggctgcy ggggaggcgg ggctggacc 993
agagtaagag gtggctggtt tctgggcagg actgaccagg atctgggttg ggggttggcg 1053
tttaggaagg gggtcgagta ctgagctgga gctcaggcct gcagggaggg gagtaactag 1113
ggtttgggct cttgtcccag gacgggggct gggttagtgg tggggctgag gccagggagg 1173
agtccggggag aaagctccca gccctctag atcaaagcca ggtggcttta caataggagt 1233
ccaatctggg aagggagctg gaggccgaac tagagctggg gtccaggctg ggaaccaggg 1293
agcctgaagg cctgtcaaaa gcctgggatg tccagggagg ggattaggtc tcattctgtc 1353
tccaacgctt cccctttcta gGCACTGTCT ACAGCTTGTA CTCCCTTGGC TGGGCCTCCT 1413
TCCCAGGAA TTAAGACCAA GAAGCCTGGG GGCCTGAGAG ACTTGAACAA GTGTCAATAA 1473
ACGCTGGCCT CTgtgtgtgt ctgtgtttgt gtccaccct cccccacaa gccatcctc 1533
ccaccagcca gggatctctc ccctgtggac tgcccactgc cccagcct cgggtgctca 1593
tgctggacca gggatactcc tag 1653

```

Abb. 4.3.4.4 Sequenz des COX7A1-Gens (Wolz et al., 1997; eingereicht bei GenBank unter Eingangs-Nr. U81254). Introns sind in Kleinbuchstaben gedruckt, Exons in Großbuchstaben und codierende Sequenzen in fetten Großbuchstaben. Die Polyadenylierungsstelle ist unterstrichen. Einige mutmaßliche Erkennungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind mit einem Pfeil unterstrichen, der die Orientierung der Bindungsstelle angibt.

unspezifisches Mispriming des Gegenprimers. Der Vergleich zwischen diesen Sequenzen und der Sequenz des bekannten Gens für COX VIIa-H des Rindes (Seelan & Grossman, 1992) ergab jedoch für die Teilsequenz eines Klon eine signifikante Homologie mit dem 3'-Ende des Gens, so daß angenommen werden kann, daß dieser Klon das 3'-Ende des humanen *COX7A1*-Gens beinhaltet. Um das wichtigere 5'-Ende zu erhalten, wurde schließlich eine Direktsequenzierung der Cosmid-DNA durchgeführt. Damit konnte die Sequenz von *COX7A1* um 350 bp in Richtung der 5'-UTR verlängert werden (Abb. 4.3.4.4).

Charakterisierung des *COX7A1*-Gens: Die codierende Sequenz des Gens für die COX-Untereinheit VIIa-M (*COXA1*) erstreckt sich über ca. 1,5 kb genomische DNA und ist in 4 Exons organisiert (Wolz et al., 1997). Die Größe der Exons sind in Tab. 4.3.4.1 angegeben, die Introns haben eine Größe von 637, 122 und 428 bp. Alle Spleißstellen gehorchen der AG/GT-Regel (Mount, 1982).

Zur Bestimmung der Transkriptionsinitiationsstelle wurde eine Reverse Transkriptionsreaktion ("primer extension") mit einem IRD-markierten cDNA-Primer durchgeführt und das Produkt auf einem Licor DNA-Sequenziergerät aufgetrennt. Dieser Versuch erbrachte jedoch keine eindeutigen Ergebnisse, daher wurde die humane EST-Datenbank bei GenBank abgefragt mit der 341 bp langen *COX7A1* cDNA-Sequenz (Arnaudo et al., 1992). Es wurden 86 EST-Klone mit einer signifikanten Homologie gefunden, wovon die meisten aus Skelettmuskel-, einige aus Herzmuskel-RNA stammten. Sechs dieser Klone waren länger als das publizierte 5'-Ende der cDNA. Je zwei Klone beginnen bei Position -55, zwei bei -58 und je einer bei -52 und -71 bezogen auf das Startcodon (s. Abb. 4.3.4.4). Die von Arnaudo et al. (1992) durchgeführte Northern-Hybridisierung der *COX7A1* cDNA zu Skelettmuskel-RNA

zeigte ein deutliches Signal bei 420 bp.

Insgesamt kann man hieraus schließen, daß die Transkription des Gens mindestens zwischen -58 und -52 bp beginnt, die genaue Stelle jedoch nicht angegeben werden kann. Die Transkriptionsinitiationsstelle des homologen Gen des Rindes liegt bei -46 bp, jedoch kann die Existenz eines nicht-translatierten Exons bei beiden Genen nicht ausgeschlossen werden (Seelan

Exon Nr.	Größe/bp	codierend/bp
1	>55	15
2	86	86
3	84	84
4	111	52

Tab. 4.3.4.1 Größen der *COX7A1*-Exons in Basenpaaren. Die 2. Spalte gibt den codierenden Anteil des Exons an (ohne 5'/3'-UTRs).

& Grossman, 1992). Sowohl in allen EST-Klonen als auch in den Klonen der genomischen DNA wurde an der 1. Position der cDNA-Sequenz ein "C" statt des von Arnaudo et al. (1992) publizierten Adeninnukleotids gefunden, die Sequenz weist hier offensichtlich einen Fehler auf.

Die Organisation der Exons scheint in keinem Zusammenhang mit den funktionellen Domänen zu stehen. Die Transmembrandomäne wird durch die Exons 3 und 4 codiert, die mitochondriale Importsequenz durch das Mini-Exon 1 und einen Teil von Exon 2 (s. Abb. 4.3.4.6). Im Gegensatz dazu wird die Importsequenz des menschlichen Gens für COX Vb von einem einzigen Exon codiert (Lomax et al., 1991). Seelan und Grossman (1992) nahmen an, daß die Prozessierung der Präsequenz von *Bt*-COX7AH in 2 Schritten verläuft, jedoch stimmt die Position der 1. Schnittstelle (nach Aminosäure 13) auch nicht mit den Exongrenzen überein.

Der GC-Gehalt des Gens ist mit einem Durchschnitt von 63,5 % relativ hoch, die 5'-UTR weist einen überdurchschnittlichen GC-Gehalt auf, während das Intron 2 auf einer Strecke von 75 bp einen GC-Gehalt von sehr hohen 85 % hat. Bei den GC-reichen Sequenzen handelt es sich um sogenannte CpG-Inseln, da hier das Dinukleotid "GC" der vom GC-Gehalt her erwarteten Häufigkeit entspricht, während es im restlichen Genom relativ selten ist. Dies ist leicht zu überprüfen durch die Suche nach Erkennungsstellen für bestimmte, selten schneidende Restriktionsenzyme. *COX7A1* besitzt drei *Bss*HI-Erkennungsstellen (GCGCGC) und neun für *Bst*UI (CGCG). Eine GC-reiche 5'-UTR und das Vorkommen von CpG-Inseln sind Charakteristika von Haushaltsgenen, was der Eigenschaft von *COX7A1* als einem Gen für die Untereinheit eines mitochondrialen Enzyms gerecht wird. Da es sich um eine gewebsspezifische Isoform handelt und die Expression des Gens zudem im komplexen Hintergrund zweier Genome steht, stellt sich die Frage nach der Regulation des Gens.

Analyse potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen: Die komplette genomische Sequenz des *COX7A1*-Gens wurde benutzt für die Abfrage einer Transkriptionsfaktor-Datenbank (Quandt et al., 1995). Als Parameter für die Abfrage wurde ein Ähnlichkeitskoeffizient für die Kernsequenz ("core similarity") von 1.0 und für die Matrix von 0.85 verwendet. Es wurden keine für gewebsspezifisch exprimierte Gene typische TATA- oder CCAAT-Boxen in der 5'-nicht-translatierten Region gefunden. Erkennungsstellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 wurde sowohl in der 5'-UTR als auch im Intron 1 (Abb.

4.3.4.4), sowie weiter stromabwärts gefunden. Die Hexanukleotid- Tandem-Wiederholung von CCCCAG unmittelbar aufwärts der ersten Sp1-Sequenz könnte als multiple Sp1-Bindungsstelle fungieren. Zwischen den beiden Sp1-Stellen wurde eine potentielle MyoD-Erkennungssequenz (Lassar et al., 1989) identifiziert, die als Skelettmuskelpromotor dienen könnte. Da Herzmuskelzellen kein MyoD produzieren (Davis et al., 1987), muß für die spezifische Expression eine andere Promotorsequenz benutzt werden. Hierfür käme der Transkriptionsfaktor Nkx-2.5 (auch CSX genannt) in Frage, da die Expression von Nkx-2.5

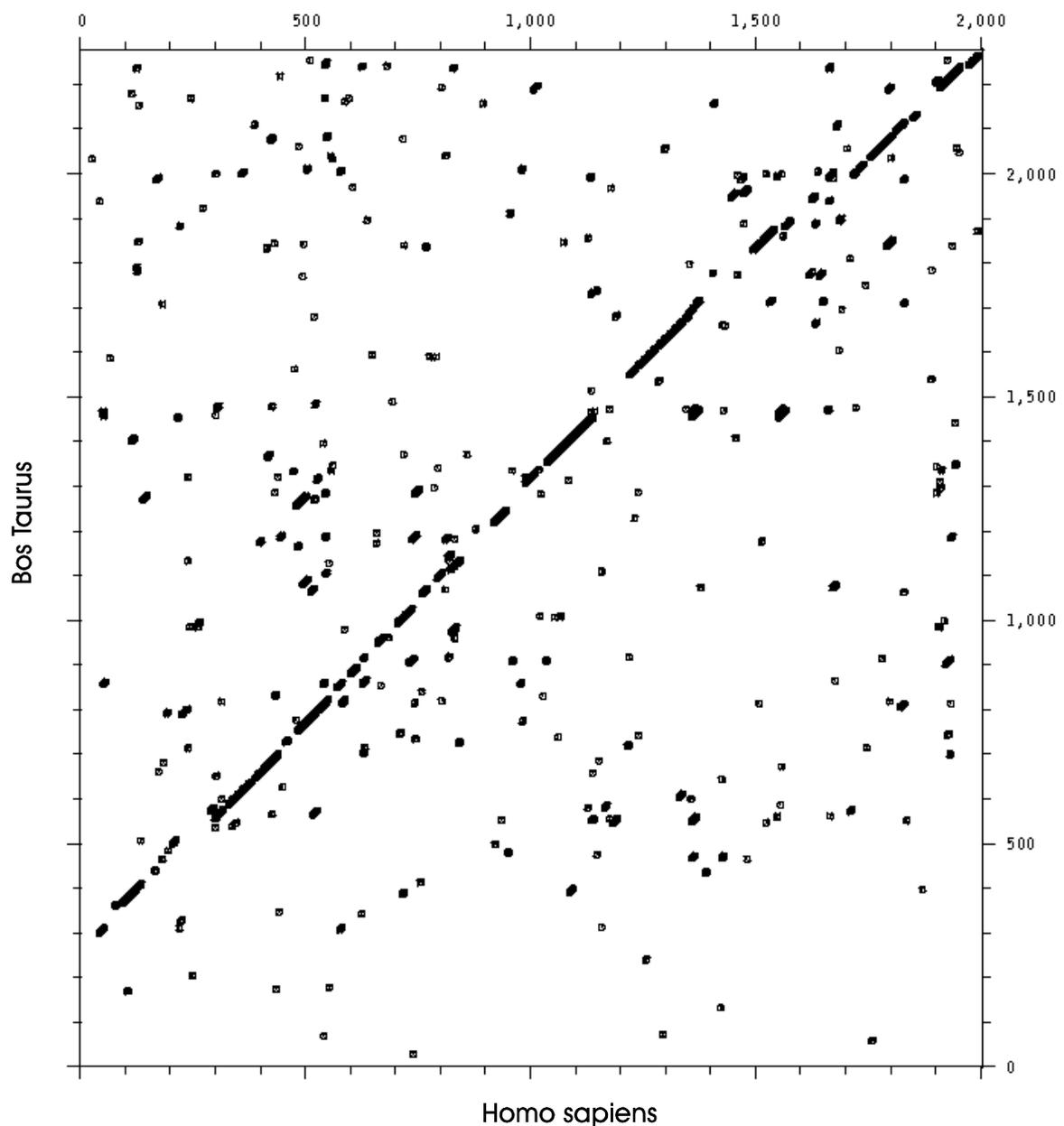


Abb. 4.3.4.5 Dotplot-Diagramm der beiden COX7AH/M-Gene. Die Sequenzen wurden mit der Dotplot-Funktion des GCG-Pakets mit einer Fenstergröße von 21 Nukleotiden analysiert (Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.)

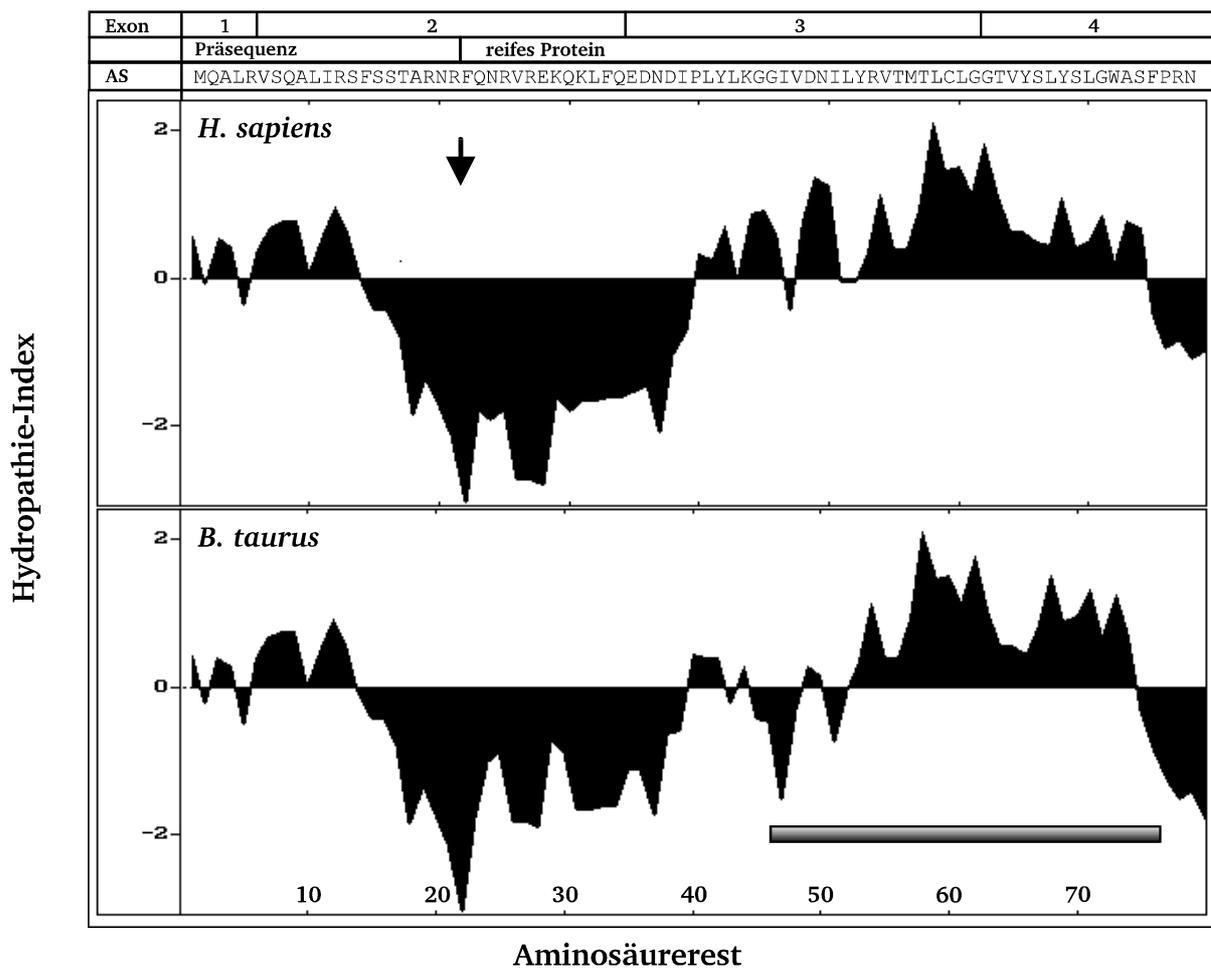


Abb. 4.3.4.6 Hydropathie-Diagramm und Organisation der Domänen des humanen *COX7A1*-Gens. Der Hydropathie-Index wurde nach Kyte und Doolittle (1982) mit einer Fenstergröße von 7 Aminosäuren berechnet. Positive Indizes bezeichnen hydrophobe, negative hydrophile Regionen. Der schraffierte Balken symbolisiert die Transmembrandomäne. Der Pfeil bezeichnet die Stelle an der die mitochondriale Importsequenz abgespalten wird. AS = Aminosäuresequenz.

auf fötale und adulte Herzzellen beschränkt ist. *Nkx-2.5* ist ein Homöobox-Gen bei Maus und Mensch, das homolog ist zum *Drosophila*-Gen *tinman* (Shiojima et al., 1996). Eine mutmaßliche Erkennungssequenz für diesen Faktor liegt im Intron 1 (Abb. 4.3.4.4).

Ebenfalls in der unmittelbaren Promotorregion (Abb. 4.3.4.4) und weiter stromabwärts liegen potentielle Bindungstellen für die heterodimeren Transkriptionsfaktoren Thing1 und E47 (Th1/E47). Sie gehören zu den basischen Helix-Loop-Helix Proteinen wie die meisten anderen myogenen Faktoren auch. Die Rolle, die diese beiden Faktoren für die Genexpression von *COX7A1* spielen, ist aufgrund des komplexen Expressionsmusters (Hollenberg et al., 1995) allerdings nicht klar.

Im Gegensatz zu dem homologen Gen des Rindes, das keine NRF-1 oder NRF-2 Bindungsstellen hat (Seelan & Grossman, 1992), besitzt das humane Gen eine Erkennungssequenz für

NRF-2 (“nuclear respiratory factor”). NRF-2 ist ein aktivierender Transkriptionsfaktor für die Gene von COX IV bei der Ratte (Virbasius & Scarpulla, 1991), der β -Untereinheit der menschlichen ATP-Synthase (Ohta et al., 1990) und der Leber-Isoform der menschlichen COX VIIa-Untereinheit (Seelan et al., 1996). NRF-2 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und könnte der Faktor sein, der für die koordinierte Expression nukleär codierter Gene von mitochondrialen Enzymen der Atmungskette sorgt.

Vergleich mit dem homologen Gen des Rindes: Die genomische Struktur und Sequenz des homologen Gens *Bt-COX7AH* wurde von Seelan und Grossman (1992) publiziert. Der Vergleich der beiden Gene zeigt, daß die Exon-/Intron-Grenzen konserviert sind (Wolz et al., 1997). Die Aminosäuresequenzen differieren um eine Aminosäure (*H. Sapiens* 79, *B. taurus* 80) die im letzten Exon des Rindergens zusätzlich vorhanden ist. Die Übereinstimmung der DNA-Sequenzen beträgt über 80 % in den Exons und zwischen 60 und 71 % in den flankierenden Sequenzen und den Introns. Eine Dotplot-Analyse der beiden Sequenzen ergab keine Rearrangements wie größere Insertionen/Deletionen oder Duplikationen (Abb. 4.3.4.5). Lediglich einige kleinere Regionen divergierender Sequenzen machen sich als Lücken in der linienförmigen Anordnung bemerkbar. Die Abb. 4.3.4.6 zeigt ein Hydropathie-Diagramm der beiden Aminosäuresequenzen sowie im oberen Teil die Organisation des humanen Gens. Die Ähnlichkeit der Hydropathie-Diagramme resultiert aus der 78prozentigen Übereinstimmung der Proteinsequenz (Arnaudo et al., 1992). Die vorgeschlagene Transmembrandomäne wurde durch neuere röntgen-kristallographische Untersuchungen der Rinder-COX bestätigt (Tsukihara et al., 1996).

Pseudogene: Für die Untersuchung auf Pseudogene wurde das 1.45 kb Insert eines Plasmidklons mit der genomischen DNA von *COX7A1* radioaktiv markiert und eine Southern-Hybridisierung mit *TaqI*-verdauter genomischer DNA durchgeführt. Die Sonde erkennt zwei Banden von 1,8 und 2,1 kb. Da das Gen im Intron 3 eine Erkennungsstelle für *Taq I* enthält, kann man annehmen, daß es keine Pseudogene gibt, zumindest keine prozessierten. Im Gegensatz dazu haben die Gene anderer COX-Untereinheiten mehrere Pseudogene, z.B. COX VIIa-L des Rindes (Seelan & Grossman, 1993) sowie die humanen Untereinheiten COX VIb (Carrero-Valenzuela et al., 1991) und Vb (Lomax et al., 1991).

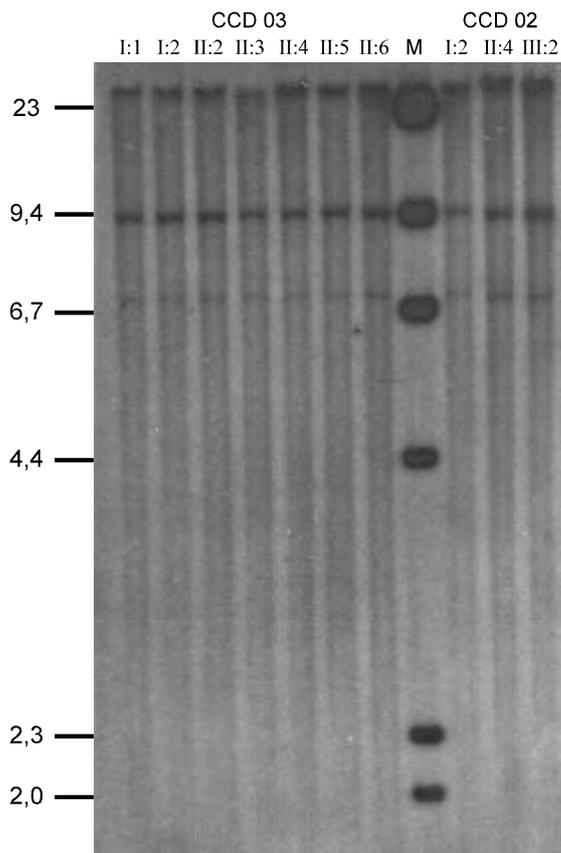


Abb. 4.3.4.7 Southern-Hybridisierung von *COX7a* cDNA zu *Sac* I-verdauter genomischer DNA von CCD-Patienten. oben: Stammbaum Identifikation (s. Abb. 3.1.1), M = Marker *I/Hind* III, Fragmentgröße in kb.

4.3.4.2 Mutationsanalyse in CCD-Familien

- Southern-Hybridisierung mit *COX7a*

cDNA: Wie für *COX6B* wurde das PCR-generierte cDNA-Fragment auch hier als Sonde für Southern Hybridisierungen von Patienten-DNA benutzt, um eventuell vorhandene Mutationen zu detektieren. Es wurden Membranen mit *Taq* I-, *Bgl* II-, *Sac* I- und *Msp* I-verdauter DNA der CCD-Familien 01, 02 und 03 hybridisiert (z.B. Abb. 4.3.4.7). Auch hier wurden keine veränderten Fragmente gefunden, so daß größere genomische Rearrangements des *COX7A1*-Gens als Ursache für die Central Core Erkrankung ausgeschlossen werden können. Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse ist einfacher als beim *COX6B*-Gen, da hier keine Pseudogene involviert sind.

- SSCP-Analyse des *COX7A1*-Gens:

Nach Aufklärung der Exon/Intron-Grenzen des Gens wurden PCR-Primer für die 4 Exons mit dem Programm "Generunner" gesucht. Für jedes Exon wurde mit der DNA von 32 CCD- Patienten eine SSCP-Analyse durchgeführt (Abb. 4.3.4.8 und 4.3.4.9). Bei einer Patientin wurde eine zusätzliche Bande entdeckt, deren Ursache eine Sequenzänderung sein könnte (Abb. 4.3.4.8). Das PCR-Produkt wurde nach fünf verschiedenen Methoden sequenziert, wobei jedoch keine veränderte Basensequenz gefunden

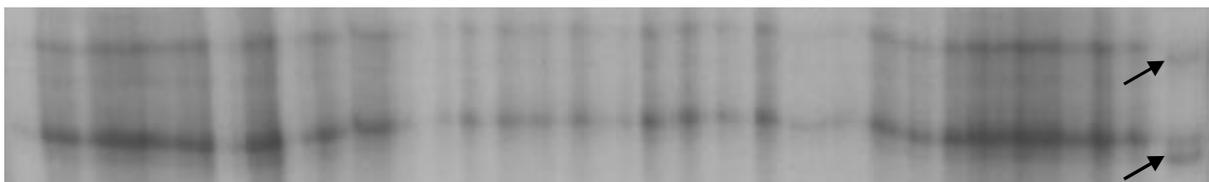


Abb. 4.3.4.8 SSCP-Analyse von Exon 1 des *COX7A1*-Gens (Polyacrylamidgel: 0,5 x MDE®). Die DNA von 32 CCD-Patienten und einer gesunden Kontrolle wurde auf Mutationen untersucht. Bei der CCD-Patientin 32 (letzte Spur, rechts) zeigen sich zusätzliche Banden, die bei allen anderen Patienten, sowie der Kontrolle fehlen (Pfeile).

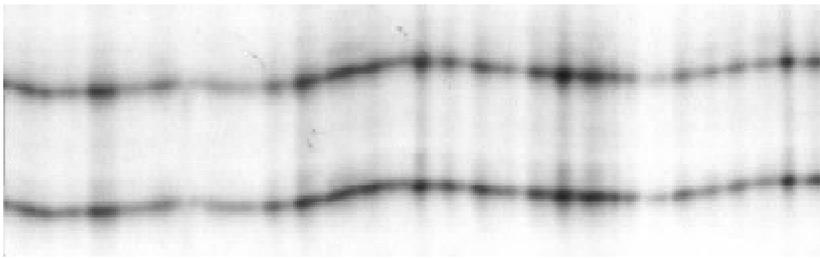


Abb. 4.3.4.9 SSCP-Analyse von Exon 4 des *COX7A1*-Gens für die CCD-Patienten 3-32 sowie eine Kontrolle (Polyacrylamidgel: 0,5 x MDE®).

wurde. Eine Wiederholung der SSCP-Analyse ergab, daß es sich möglicherweise um eine Schattenbande handeln könnte, die bei dieser DNA stärker hervortritt als bei anderen (nicht gezeigt). Bei den restlichen Exons wurden keine Verschiebungen oder zusätzlich auftretende Banden gefunden (z.B. Exon 4, Abb. 4.3.4.9).

Da in der codierenden Sequenz des *COX7A1*-Gens keine relevanten Veränderungen gefunden wurden, kann man dieses Gen als Verursacher für die Central Core Disease ausschließen. Immerhin besteht jedoch die Möglichkeit, daß etwaige Mutationen in der Promotorregion des Gens eine verringerte Menge des Genprodukts zur Folge haben könnten. Um dies nachzuprüfen, müßte man allerdings aufwendige Promotoranalysen durchführen, die den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.

4.3.5 Das Gen für die kleine Untereinheit der Ca^{2+} -aktivierten neutralen Proteasen (CANPS)

Das Gen *CANPS* bzw. *CAPN4* für die kleine Untereinheit der Calcium-aktivierten neutralen Proteasen (Calpain) wurde von Ohno et al. 1990 auf Chromosom 19 kartiert und schien ein interessanter Kandidat zu sein aufgrund seiner Funktion als Protease, die unter anderem auch verschiedene Muskelproteine hydrolysiert. Zudem ist eine andere neuromuskuläre Erkrankung, eine Form der Gliedergürtel-Muskeldystrophie (LGMD) durch Mutationen im Gen (*CAPN3*) für eine große Calpain-Untereinheit verursacht. Nachdem das *CANPS*-Gen durch das LLNL in die CCD-Kandidatenregion, in die Nähe des *COX7A1*-Gens kartiert wurde, schien es lohnenswert, die CCD-Patienten auf Mutationen in diesem Gen zu untersuchen. Um nachzuprüfen, ob das *CANPS*-Gen möglicherweise ebenfalls im Cosmid 28874 enthalten ist, wurde eine STS-PCR durchgeführt mit Primern für Exon 1 und Exon 11 des *CANPS*-Gens. Die PCR fiel positiv aus für beide Primerpaare, das *CANPS*-Gen ist also komplett im Cosmid 28874 enthalten (s. auch Abb. 4.3.4.3).

Die genomische Struktur des Gens wurde bereits 1986 durch Ohno et al. aufgeklärt. Das Gen ist in 11 Exons organisiert, das Leseraster beginnt in Exon 2 (s. Abb. 4.3.5.1). In der Datenbank (GenBank) ist die Sequenz aller Exons plus ca. 25 - 35 bp flankierende Sequenz abgelegt. Mit dieser Information wurden Primer gesucht für die Amplifikation der Exons 2 - 11 und eine SSCP-Analyse des Gens mit der DNA von 35 CCD-Patienten durchgeführt. Da das Intron 6 zu einem hohen Anteil aus repetitiver DNA besteht, mußte ein 1078 bp großes PCR-Produkt hergestellt werden, das vor der Gelelektrophorese mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt wurde, um das Exon 7 auf einer geeigneten

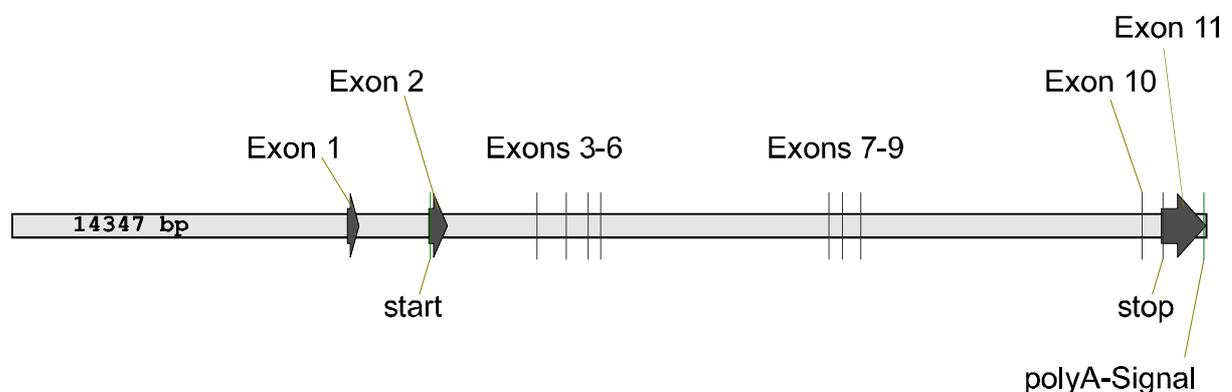


Abb. 4.3.5.1 Schematische Organisation des *CANPS*-Gens. Die Pfeile bzw. senkrechten Striche stellen Lage und Größe der Exons dar. Die dargestellte Sequenz ist Teil eines 41 kb Cosmids, das vom LLNL sequenziert wurde (GenBank Eingangs-Nr. g1905899).

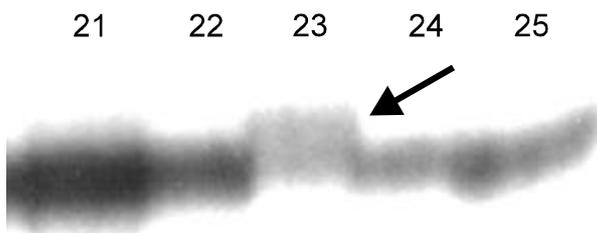


Abb. 4.3.5.2 SSCP-Analyse von Exons 2 des CANPS-Gens. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt einen Teil der CCD-Patienten. Bei CCD Patientin 23 erscheint eine zusätzliche Bande (Pfeil) über der Bande, die allen anderen Probanden gemeinsam ist.

Länge auszuschneiden. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde dann durch eine Arbeitsgruppe am Lawrence Livermore Labor ein zweites Cosmid sequenziert (GenBank Eingangs-Nr. g1905899), das ebenfalls das komplette CANPS-Gen enthält (Abb. 4.3.5.1).

Die Abb. 4.3.5.2 zeigt einen Gelausschnitt der SSCP-Analyse für das

Exon 2. Bei einer Patientin wurde eine zusätzliche Bande entdeckt, die den anderen Patienten und der Kontrolle fehlte. Die Sequenzierung des PCR-Produkts ergab eine Transversion T → A im Codon 48 des CANPS-Gens, die zu einer stillen Mutation in der 3. Position des Codons führt. Ein weiteres Beispiel (Abb. 4.3.5.3) zeigt die SSCP-Analyse des Exons 10. Hier wurden, wie bei den restlichen Exons auch, keine zusätzlichen oder verschobene Banden gefunden, die auf eine Mutation bei den CCD-Patienten hinweisen. Zur Kontrolle wurde auch die DNA von 12 Patienten mit Gliedergürtel-Muskeldystrophie amplifiziert und untersucht. Bei einem dieser Patienten wurde eine C → T Transition gefunden, die zu einer stillen Mutation in Codon 237 in Exon 9 führt.

Nachdem bei keinem der CCD-Patienten eine Mutation in den Exons 2 - 11 gefunden wurde, die zu einem veränderten Protein führen würde, kann auch das Gen für die kleine Untereinheit des Calpains als Kandidatengen für die Central Core Disease ausgeschlossen werden. Auch hier jedoch gilt die Einschränkung, daß Mutationen im Promoterbereich denkbar wären, die zu einer veränderten Expression des Gens führen würden. Bedenkt man das weite Spektrum an Zielproteinen der Calpaine, muß man fordern, daß es sich um einen muskelspezifischen Promotor handelt, da ansonsten auch andere Organsysteme betroffen sein sollten.

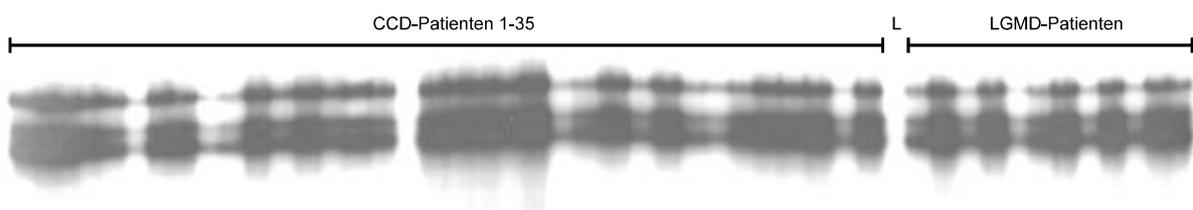


Abb. 4.3.5.3 Autoradiogramm eines Polyacrylamidgels mit PCR-Produkten von CANPS-Exon 10. Links sind die CCD-Patienten aufgetragen, rechts einige LGMD-Patienten. Bei keinem Probanden wurden veränderte Bandenmuster gefunden. L = Leerwert (keine DNA).

5. Diskussion

5.1 Genetische Kartierung

5.1.1 Charakterisierung eines neuen, hochpolymorphen Markers auf Chromosom 19q13.1

Die Abbildung 2.2.4.1 gibt in etwa den Stand der Kenntnis über die genetische Kartierung des CCD-Locus zu Beginn der Arbeit wieder. Demnach war der Locus durch die flankierenden Marker D19S191 und D19S190 eingegrenzt, jedoch innerhalb dieses Intervalls waren zunächst keine Mikrosatelliten Marker bekannt. Bei einigen der beschriebenen CCD-Familien waren einzelne Mitglieder homozygot für einen der flankierenden Marker, weshalb hier keine Information über die Koppelungsphase vorhanden ist. Um die Möglichkeit, eine eventuell vorhandene Rekombination aus dem genannten Grund zu übersehen, auszuschließen, sollten solche Familien mit einem flankierenden Mikrosatelliten-Marker untersucht werden. Auch hätte eine neu hinzugekommene Familie eine Rekombination aufweisen können, so daß auch hier die Anwendung neuer Marker erforderlich gewesen wäre.

Dies führte zur Entdeckung eines neuen, hochpolymorphen Markers, WUT1.9, im Kandidatenintervall D19S191 - D19S190. Mit einer Anzahl von 16 Allelen und einem PIC-Wert von 0,76 beinhaltet der Marker einen relativ hohen Informationsgehalt. Zwar machen die 3 häufigsten Allele zusammen eine Frequenz von 70 % aus, jedoch sind die Allelgrößen so unterschiedlich, daß in der Regel die Auftrennung auf einem einfacheren Agarosegel vollauf genügt, während "normale" Mikrosatelliten auf ein Polyacrylamidgel angewiesen sind. In den Fällen, in denen CCD-Familien mit dem Marker WUT1.9 typisiert wurden, genügte die Auftrennung auf Agarose in der Regel.

Da der Größenbereich der Allele dieses Markers für einen einfachen Dinukleotid-Mikrosatelliten-Marker viel zu groß erscheint, lag es nahe, zu vermuten, daß auch der den AC/AT-Repeat flankierenden 25 bp Minisatellitenlocus in variabler Kopienzahl vorkommt. Um dies zu untersuchen, wurden einige PCR-Produkte unterschiedlicher Allelgröße kloniert und sequenziert. Wie die Tabelle 4.1.1.1 zeigt, trägt jede Komponente des WUT1.9-Locus zu dem Polymorphismus bei, man findet eine variable Anzahl von Minisatellitenkopien, sowie eine unterschiedliche Anzahl von AT, AC sowie T's. Als Konsequenz hieraus ergibt sich die Möglichkeit, daß zwei auf einem Gel auf gleicher Höhe beobachtete Banden nicht unbedingt

dem gleichen Allel entsprechen müssen. Das hat für die Segregation der Allele in einer Kernfamilie keine Bedeutung, kann aber schon bei eingeheirateten Familienmitgliedern oder bei Koppelungsanalysen mit mehreren Familien von Belang sein. Auch die Bestimmung der Allelfrequenz wird hiervon beeinflusst, möglicherweise gibt es ein viel größeres Spektrum an Allelen, als allein aus der Größenverteilung geschlossen werden kann.

Interessant ist auch das Vorkommen eines Minisatelliten-Repeats in direkter Nähe eines Microsatelliten-Locus. Aufgrund des hohen AT-Gehalts von 68 % sowie einer Länge der Repeat-Einheiten von 25 bp, gehört dieser Repeat zur Klasse der Satelliten DNA und zur Satelliten 1-Familie (Strachan & Read, 1996). Im Bezug auf die niedrige Gesamtlänge des Repeats, bedingt durch die geringe Repeat-Anzahl (2 - 7) gehört er jedoch eher zum Typus der hypervariablen Minisatelliten-DNA. Um diesen Repeat näher zu untersuchen wurde ein Oligo mit der Sequenz der 25 bp Repeat-Untereinheit hybridisiert auf eine Membran mit verdauter genomischer DNA (Ergebnisse nicht gezeigt). Es fanden sich nur wenige schwache Hybridisierungssignale, offensichtlich kommt dieser Repeat nur in wenigen Kopien auf dem menschlichen Genom vor. Das et al. (1987) berichteten über die Entdeckung eines 37-bp Minisatelliten Elements im Intron 3 des Apo C-II Gens, der ebenfalls schwach repetitiv ist (6 Repeat-Einheiten). Der Apo C-II Minisatellit liegt in ca. 60 Kopien vor, ist jedoch beschränkt sowohl auf Chromosom 19 als auch auf die chromosomale Bande 19q13.3. Möglicherweise gehört der WUT1.9 Minisatellit auch zur Kategorie der chromosomenspezifischen Satelliten-DNA.

Mit den Markern WUT1.9 und D19S422, der das *RYRI*-Gen auf der 3'-Seite flankiert (Abb. 4.1.1.3; Wolz et al., 1996), stehen zwei hochinformativ Mikrosatelliten-Marker zur Verfügung, die das *RYRI*-Gen zu beiden Seiten flankieren und damit gut geeignet sind für Feinkartierungen von MHS- und CCD-Familien oder, allgemeiner, für Koppelungsanalysen zum Ryanodinrezeptorgen. Zwar gibt es mittlerweile eine Reihe neuer Mikrosatelliten-Marker aus der Genethon-Kollektion, die in das Intervall auf Chromosom 19q13.1 kartiert wurden (Ashworth et al., 1995; Dib et al., 1996), WUT1.9 hat jedoch den Vorteil, daß er technisch einfacher durchzuführen ist und er ist nach wie vor der Marker, der dem 5'-Ende des *RYRI*-Gens am nächsten liegt.

5.1.2 Genetische Feinkartierung von CCD-Familien

Die ersten Artikel über die genetische Kartierung der CCD erschienen 1991 von zwei Arbeitsgruppen, die nach der Kartierung der MHS und ausgehend von der klinischen und genetischen Assoziation der beiden Erbkrankheiten, die jeweiligen Familien auf eine Koppelung zu Chromosom 19q13.1 und dem Ryanodin-Rezeptor-Locus untersuchten (Haan et al., 1990; Kausch et al., 1991). Während Haan et al. in einer einzigen, großen Familie einen maximalen Lodscore (Z_{\max}) von 6,37 bei einem θ von 0,03 für den Marker D19S9 fanden, konnten Kausch et al. zwar starke Evidenz für die Koppelung erbringen, jedoch erreichte der Lodscore von 2,41 für D19S18 nicht den üblicherweise geforderten Wert von 3,0, entsprechend einem likelihood-Verhältnis von 1000:1 für Koppelung versus freie Rekombination.

Beide Arbeitsgruppen konnten schließlich eine Feinkartierung präsentieren (Schwemmle et al., 1993; Mulley et al., 1993), auf der die vorliegende Arbeit aufbaut. Mulley et al. konnten in der großen australischen CCD-Familie, die bei Byrne et al. (1982) beschrieben wurde, einen maximalen Multipoint-Lodscore von 11,8 zum *RYR1*-Locus errechnen. Der Vorteil dieser Arbeit war, daß bei einer Koppelungsanalyse mit nur einer Familie eine eventuell vorliegende Heterogenität keine Rolle spielt für die Berechnung der Koppelungswahrscheinlichkeiten. Im Gegensatz hierzu wurden in der Arbeit von Schwemmle et al. acht kleinere Familien untersucht (gegenüber drei bei Kausch et al.), so daß man hier prinzipiell bei der Kartierung mit einer möglichen Heterogenität der genetischen Ursache bei den verschiedenen Familien rechnen mußte. Der maximale Lodscore war zwar mit 4,95 deutlich niedriger, aber weit über der Signifikanzschwelle für die Annahme der Hypothese Koppelung (3,0).

In der australischen CCD-Familie wurden mehrfache Rekombinationen zu den flankierenden Markern D19S191 (proximal) und D19S190 (distal) beobachtet, das Kandidatenintervall wurde damit eindeutig eingegrenzt auf den Bereich um das Ryanodinrezeptorgen. Nach Mulley et al. (1993) umfaßt dieser Bereich ein genetisches Intervall von ca. 4 cM. Die acht Familien bei Schwemmle et al. erbrachten den maximalen Lodscore für den Marker D19S190, während die Marker des Ryanodinrezeptorgens nur ein Z_{\max} von 2,53 erreichten, was auf eine unterschiedliche Informativität der Marker zurückzuführen ist. Bis auf einen erreichten alle Marker den maximalen Lodscore bei $\theta = 0$, der Kandidatenbereich erstreckt sich über mehrere Marker. Das kleinste Intervall wird durch die beiden Marker D19S191 und D19S190 begrenzt, für die beide ein Lodscore von über 3 errechnet wurde. Nach den Angaben des

CHLC-Konsortiums beträgt die genetische Distanz zwischen D19S191 und D19S190 2,9 cM, entsprechend einer statistischen Erwartung von etwa 3 Rekombinationen unter 100 Meiosen. Ein Vergleich mit der Mikrosatelliten-Karte von Généthon ergibt ca. 5 cM für dieses Intervall (s. Abb. 4.1.3.1; Dib et al., 1996) und nach Reguigne-Arnould et al. (1996) etwa 7 cM. Das Kandidatenintervall ist daher relativ klein für eine genetische Feinkartierung, da in diesem Bereich Rekombinationen ein eher seltenes Ereignis sind. Nach Mohrenweiser et al. (1998) entsprechen in der Bande 19q13.1 etwa 1,2 cM einer Megabase genomischer DNA, woraus sich eine physikalische Größe des Kandidatenintervalls von 0,6 bis 3,2 Mb ergibt. Dies stimmt in etwa mit der physikalischen Größe des Intervalls von 2,5 Mb nach der Karte des LLNL überein, allerdings unter der Annahme, daß die Lücke zwischen den beiden Cosmid-Contigs (mit *COX6b/7a* und *CANPS* proximal und *RYRI* distal), die der YAC Y9 überspannt (Abb. 4.1.3.1), kleiner ist als der Maßstab der Karte angibt. Die physikalische Größe des Intervalls ist relevant für eine Positionsklonierung, diese gestaltet sich um so einfacher je kleiner der in Frage kommende genomische Bereich ist.

Ähnlich wie bei Schwemmler et al. resultieren aus der Koppelungsanalyse mit den aktualisierten, bereits bekannten, sowie den neu hinzugekommenen Familien, ziemlich unterschiedliche Lodscores in einem kleinen genetischen Intervall. Dies beruht auf der unterschiedlichen Informativität der Marker in den einzelnen Familien, außerdem wurden nicht alle Marker in allen Familien typisiert. Während bei einer, allerdings unrealistischen, Penetranz von 100 % ein formalgenetischer Ausschluß des Intervalls D19S191 - D19S190 resultiert, bleibt bei einer reduzierten Penetranz dieses Intervall als Bereich des Kandidatengens bestehen. Es zeigt sich, daß der Vorteil, den eine Koppelungsanalyse mit einer einzigen Familie bietet, nicht unbedingt durch eine zunehmende Anzahl an kleinen Familien kompensiert werden kann, da die Wahrscheinlichkeit der Heterogenität wächst. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn es differentialdiagnostisch ähnlich Erkrankungen gibt und die Patienten nicht bestmöglich diagnostiziert sind. Im Idealfall sollte zumindest die Diagnostik von ein und demselben Arzt durchgeführt werden, was bei dem vorliegenden Patientenkollektiv leider nicht der Fall ist. Realistischerweise sollte man berücksichtigen, daß die einzelnen Familien unterschiedlich gut diagnostiziert sind, z.B. ist bei einigen Patienten nicht bekannt, ob eine Muskelbiopsie entnommen wurde und eine histologische Untersuchung durchgeführt wurde. Die Muskelhistologie ist jedoch ein Kardinalkriterium bei der Diagnose der CCD, so daß man letztlich nicht ausschließen kann, daß sich unter dem Patientenkollektiv

einige Patienten mit einer differentialdiagnostisch ähnlichen neuromuskulären Erkrankung befinden. Die Frage der Heterogenität der CCD kann hier nicht abschließend beantwortet werden, es gibt jedoch kaum Indizien für mehrfache genetische Ursachen derselben Symptomatik. Die Familien, die nicht vollständig zu Chromosom 19 gekoppelt sind, können mit der reduzierten Penetranz des CCD-Gens erklärt werden. Lediglich die CCD-Familie 10 könnte einen Hinweis auf die Existenz eines 2. CCD-Gens geben, da jeweils zwei Familienmitglieder rekombinant sind bezüglich des CCD-Phänotyps, was mit der reduzierten Penetranz in solch einer kleinen Familie schwerlich zu erklären ist. Eine Koppelung zu dem CCD-Locus 2 auf Chromosom 14, der von Fananapazir et al. (1993) vorgeschlagen wurde, konnte mit dieser Familie auch nicht bestätigt werden, da sie zu klein ist für eine statistisch relevante Aussage und zudem ebenfalls eine Rekombination vorliegt. Zumindest wäre die Existenz eines 2. CCD-Locus denkbar, bei dem die Patienten zusätzlich zu einer hypertrophen Kardiomyopathie eine Central Core Disease entwickeln, die auf Mutationen im MYH7 Gen oder einem benachbarten Gen beruhen. Hier bietet sich an, ein "contiguous gene syndrome" zu vermuten, demnach wären solche Patienten von einer Mikrodeletion betroffen, die zwei benachbarte, im Muskel exprimierte Gene umfaßt und so die Kombination der Phänotypen hervorruft.

Andererseits wäre auch denkbar, daß es sich hier um eine Phänokopie handelt, weil es mehrere Wege zur Entstehung der cores gibt. Es sind z.B. cores beschrieben, die nach der Denervierung von Extremitätenmuskel auftraten (Chou et al., 1981), sowie hypoxische cores, die ihren Ursprung in einer Minderversorgung des Muskels mit Sauerstoff haben. Des weiteren sind auch verschiedene Medikamente bekannt, die diese charakteristischen Veränderungen in den Muskelfasern verursachen können. Die cores könnten also auch in manchen Fällen sekundären Ursprungs sein.

Da der MH-Status der Patienten meist nicht bekannt ist, wurde dieser auch bei der Berechnung der Koppelungsanalyse nicht berücksichtigt. Zur Zeit ist nicht klar, worauf die Assoziation der beiden Erkrankungen auf molekularer Ebene beruht, weshalb unterschiedliche genetische Modelle zu berücksichtigen wären. Die Möglichkeit eines "contiguous gene syndrome" mit dem *RYR1* Gen und einem oder mehreren, flankierenden Genen wurde durch Haan et al. ausgeschlossen. Haan et al. (1993) hatten Patienten-DNA der CCD-Familie mit Sonden aus dem 5'- und 3'-Bereich des *RYR1*-Gens untersucht und ein heterozygotes Vorliegen dieser Bereiche in der genomischen DNA gefunden.

5.1.3 STS-Kartierung von Chromosom 19 YACs und Cosmiden

Die STS-Kartierung hat aufgrund ihrer Einfachheit und Schnelligkeit rasche Fortschritte erbracht bei der Integration von genetischer und physikalischer Information, sowie bei der Erstellung von YAC- und Cosmid-Contigs (Ward & Davies, 1993). In dieser Arbeit gelang es, durch STS-Kartierung mehrere bekannte Mikrosatelliten-Marker dem YAC- und Cosmid-Contig von Rouquier et al. (1993) zuzuordnen. In die Nähe des Markers D19S191 konnten auf der 5'-Seite des *RYRI*-Gens die Dinukleotidrepeats D19S893, D19S425 und D19S569 auf den YAC Y8 kartiert werden. Im 3'-Bereich des *RYRI*-Gens konnten die Marker D19S422, D19S570 sowie D19S881 auf den YAC Y4 kartiert werden. Damit kann der methodisch aufwendige Trinukleotid-Mikrosatelliten-Marker D19S190 (Iles et al., 1992) durch diese einfacheren Dinukleotidrepeats ersetzt werden. Zwei Cosmide auf der 3'-Seite von *RYRI* (Rouquier et al., 1993) waren ebenfalls positiv für den Marker D19S422, der zusammen mit WUT1.9 auf der 5'-Seite das *RYRI*-Gen am dichtesten flankiert (Wolz et al., 1996). Insgesamt ergibt sich aus den eigenen Arbeiten sowie den Arbeiten von Généthon (Dib et al., 1996), des LLNL (Ashworth et al., 1995), des CHLC-Konsortiums (Murray et al., 1994) und von Reguigne-Arnould et al. (1995) folgende Konsensus-Anordnung von Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 19q13.1:

cen-D19S569-D19S425-D19S208-**D19S191**-D19S224-D19S220-D19S228-WUT1.9-
RYRI/CA-D19S422-D19S570-D19S881-D19S421-D19S417-**D19S190**-D19S47-D19S223.

Die genaue Reihenfolge der Marker ergibt sich letztlich aus der Sequenzierung der Cosmid- und BAC-Klone dieser Region, die derzeit am Lawrence Livermore Labor in den USA durchgeführt und wohl in wenigen Monaten abgeschlossen sein wird. Jedenfalls steht eine Reihe von Mikrosatelliten-Markern für die genetische Feinkartierung von MHS bzw. CCD-Familien zur Verfügung, die eine hochauflösende Kartierung der jeweiligen Gene erlauben, vorausgesetzt, man verfügt über die entsprechenden rekombinanten Familien.

5.2 cDNA-Selektion

Ein Hauptproblem bei der Gensuche im Rahmen eines Positionsklonierungsprojektes oder einer Kandidatengensuche ist das Auffinden codierender Sequenzen in klonierter genomischer DNA. Der Vergleich mit der sprichwörtlichen Nadel im Heuhaufen bietet sich an. Ziel ist es den Heuhaufen so klein wie möglich zu machen, ohne dabei die Nadel zu verlieren. Hierzu gibt es eine Reihe von Techniken, die aber methodisch aufwendig sind oder ein hohes Signal-Rauschen Verhältnis haben, z.B. "Exon trapping", Kartierung von CpG-Inseln, Hybridisierung von cDNAs mit genomischen Klonen oder umgekehrt, "Zoo blots" etc. (Korn et al., 1992). Eine Methode, die den Anforderungen ziemlich nahe kommt, ist die cDNA-Selektion ("direct selection") mit genomischen Klonen, bei der PCR- amplifizierte cDNAs mit genomischen Klonen hybridisiert und selektiert werden.

Ein cDNA Selektions-Experiment wurde mit YACs von Chromosom 19q13.1 durchgeführt, erbrachte allerdings keine Ergebnisse, da die Positivkontrolle in den eluierten cDNAs nicht mehr nachweisbar war. Die Gründe hierfür dürften zum Einen in der Quelle der genomischen DNA liegen; cDNA-Selektion mit YACs ist nicht so effizient wie mit anderen Klonierungssystemen, z.B. P1-Klonen oder Cosmiden, zum Anderen ist die Methode der Filterhybridisierung behaftet mit einem hohen Hintergrund. Hier wäre die Anwendung einer Flüssighybridisierung und Separation mit Magnetkügelchen ratsam gewesen (Morgan et al., 1992; Dynal Technical Handbook, 1995).

Die weiteren Experimente wurden mit Cosmiden, ebenfalls in einer Filterhybridisierung durchgeführt. Die Kontrollexperimente zeigten, daß die RNA-Isolierung und die Größenselektion erfolgreich waren und daß durch den Selektionsprozeß cDNAs angereichert wurden, die ihren genomischen Ursprung in der Region um das Ryanodinrezeptorgen haben. Es konnten einige Klone mit Teilsequenzen der Positivkontrolle, der *RYR1*-cDNA gewonnen werden, in dem Test-Contig konnte allerdings keine Transkripte angereichert werden. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, angesichts der Tatsache, daß die Region 19q13.1 eine der höchsten Gendichten im ganzen Genom aufweist. Statt dessen fand sich eine hohe Anzahl Klone mit repetitiven Sequenzen, vornehmlich *Alu*-Repeats und alphanoider Satelliten-DNA. Das menschliche Chromosom 19 wurde als überdurchschnittlich reich an *Alu*-Repeats beschrieben, möglicherweise hätte man dem Rechnung tragen müssen mit einem noch größeren Überschuß an COT1-DNA beim Hybridisieren, um repetitive Sequenzen besser abzublocken. Die

Korrelation zwischen *Alu*-Repeats und Gendichte ist schon länger bekannt (Moyzis et al., 1989). Während die meisten *Alu*-repetitiven Sequenzen offensichtlich durch die nachträgliche Hybridisierung der isolierten Klone mit COT1-DNA identifiziert werden konnten, blieb die alphanucleäre Satelliten-DNA unerkannt. In der Tat ist die Unterdrückung von "low copy" oder anderen Repeats, die spezifisch sind für bestimmte genomische Regionen, ein methodisches Problem der cDNA-Selektion, für das es bisher keine befriedigende Lösung gibt (Tagle et al., 1993).

Da mit der angewandten Methode nur Transkripte isoliert werden sollten, die im Muskelgewebe aktiv sind, besteht natürlich die Möglichkeit, daß in der Region des Test-Contigs keine muskelexprimierten Gene lokalisiert sind, oder wenn sie existieren zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung nicht oder in ungenügender Anzahl exprimiert waren. Beispielsweise konnte durch eine STS-PCR gezeigt werden, daß das Gen für die p31 Untereinheit des 26S-Proteasoms in das Test-Contig kartiert. Da das Gen auch im Muskel exprimiert wird, hätte man es in der selektierten cDNA finden sollen. Die Effizienz der Methode beträgt aber bestenfalls 40 - 50 % (Korn et al., 1992), so daß das Gen entweder nicht in der isolierten RNA vorhanden war oder bei der Selektion verloren ging.

Der Erfolg einer cDNA-Isolierung hängt von einer Reihe von Faktoren ab, dazu gehören die Komplexität des Ausgangsgewebes, der Entwicklungszustand und die Häufigkeit einer bestimmten Boten-RNA. Je komplexer ein Gewebe aufgebaut ist, desto mehr verschiedene Zelltypen sind enthalten, um so komplexer ist die resultierende RNA Mischung. Nicht alle Transkripte in einer Zelle sind gleich häufig, ca. 30 % aller Gene in einer Zelle sind mit weniger als 10 Kopien pro Zelle repräsentiert (Morgan et al., 1992). Daneben spielt auch die Komposition des 2. Hybridisierungspartners, die genomische DNA, eine Rolle. Die wichtigsten Faktoren sind die Größe der genomischen Region, die Gendichte und der Gehalt an repetitiven Sequenzen (Parimoo et al., 1991; Lovett et al., 1991).

Auf der methodischen Seite gibt es einige Parameter, die u.U. entscheidend zum Erfolg eines Experiments beitragen, hier sind vorrangig die Hybridisierungsbedingungen zu nennen (Hybridisierungsmatrix, Temperatur, Dauer, Salzkonzentration und Zusammensetzung des Puffers; Dynal Technical Handbook, 1995).

Die beiden identischen cDNA-Klone, die aus dem Kontroll-Contig isoliert werden konnten, repräsentieren wahrscheinlich einen Teil eines bisher unbekanntes Gens. Der Versuch, das Gen

aus dem Cosmid 9318, zu dem der Klon zurückhybridisiert werden konnte, zu isolieren, gelang nicht. Ein *Sau3A*-Fragment des Cosmids enthielt die Sequenz des selektierten Klons, aber es konnte keine neue Sequenzinformation hinzugewonnen werden, da die Schnittstellen von *Sau3A* die cDNA-Sequenz unmittelbar flankieren. Die Suche in GenBank ergab keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen, es ist aber nur eine Frage der Zeit bis die Sequenz des gesamten Cosmids zur Verfügung steht. Ein Grund für die erfolglose Suche der Gendatenbank könnte der Fakt sein, daß muskuläre Transkripte, zumindest solche der Skelettmuskulatur, in den Datenbanken deutlich unterrepräsentiert sind.

Mit der angewendeten Methode kann nicht zwischen echten Transkripten und prozessierten Pseudogenen unterschieden werden (Korn et al., 1992; Parimoo et al., 1991), es besteht daher prinzipiell die Möglichkeit, daß es sich bei der selektierten cDNA um ein Pseudogen handelt.

Insgesamt verlief auch die Suche nach neuen Genen aus der Region 19q13.1 ziemlich unergiebig. Zu Beginn der Arbeit gab es im Kandidatenintervall so gut wie keine Gene, die als Kandidat für CCD in Frage gekommen wären, bei den heute verfügbaren Karten und angesichts der Sequenzierarbeiten des "Human Genome Project" würde man keine neuen Transkripte mehr suchen, sondern gleich einen Kandidatengenansatz wählen.

5.3 Kandidatengene

5.3.1 Das Gen für den sarkoplasmatischen Calciumkanal (*RYR1*)

Historisch betrachtet lag es nahe, die Ursache der Central Core Disease in diesem Gen zu suchen. Die Evidenz der genetischen und klinischen Assoziation zwischen CCD und der Veranlagung zur Malignen Hyperthermie führte gleich nach der Entdeckung der Rolle des *RYR1*-Gens als einem Verursacher von MHS zur Vermutung, daß dieses Gen auch für CCD verantwortlich sei und damit wäre CCD eine allelische Variante der MHS (MacLennan et al., 1990; McCarthy et al., 1990). Weitere Evidenz ergibt sich aus dem Auffinden von Mutationen im *RYR1*-Gen bei MHS-/CCD-Familien. Mittlerweile sind fast 20 Mutationen im *RYR1*-Gen gefunden worden (Tong et al., 1997; Manning et al., 1998), die als ursächlich für die MH-Veranlagung angesehen werden. Diese Mutationen wurden entweder nur in einer einzigen Familie als eine "Privatmutation" gefunden oder gehäuft mit einer Frequenz von einigen Prozenten (Manning et al., 1998). In der Summe sind diese Mutationen bei ca. 40 % der

MH-Familien identifiziert worden, aufgrund der bestehenden Heterogenität sind jedoch nur ungefähr die Hälfte der MHS-Familien gekoppelt zu Chromosom 19 (Richter et al., 1997), so daß der größte Teil des Spektrums an *RYR1*-Mutationen bereits beschrieben ist. Lediglich fünf Mutationen wurden auch bei CCD-Patienten gefunden und in diesen Fällen lag auch gleichzeitig eine MHS in der Familie vor (Quane et al., 1993; Zhang et al., 1993; Quane et al., 1994; Manning et al., 1998). Allerdings liegen mittlerweile mehrere Berichte vor, die Ausnahmen von der Korrelation MHS-CCD-*RYR1* beschreiben. Adeokun et al. (1997) fanden eine große Familie, in der die Mutation G1021A segregiert, allerdings war die Mutation nur bei 7/12 MH-veranlagten Familienmitgliedern vorhanden. In anderen Fällen wurden Rekombinationen zwischen dem MHS- und CCD-Phänotyp in einzelnen Familien gefunden (Romero et al., 1993; Islander et al., 1995; Fagerlund et al., 1996).

Die Koppelungsanalyse und das Auffinden von Mutationen in einem Kandidatengen sind zwar starke Argumente für die ätiologische Rolle eines bestimmten Gens, wenn es jedoch, wie beim *RYR1*-Gen, lediglich "einfache" Aminosäureaustausche sind, die das Patientenkollektiv auszeichnen, fehlt der letzte Beweis in Form eines funktionalen Tests für das mutierte Gen. Richter et al. (1997) konnten für die *RYR1*-Mutation Gly2434Arg einen biochemischen Nachweis für eine erhöhte Calciumsensitivität des mutierten Rezeptors erbringen durch Bindungsstudien mit hochaffinem [³H]-Ryanodin. Das ganze Spektrum bekannter Mutationen wurde von Tong et al. (1997) getestet, indem mutierte cDNA in HEK-293-Zellen transfiziert wurde und die Sensitivität der Zellen gegenüber Calcium und Halothan photometrisch gemessen wurde mit dem fluoreszierenden Calcium-Indikator fura-2. Bis auf eine Mutation wiesen alle 17 getesteten *RYR1*-Mutationen eine signifikante Erhöhung der Calciumsensitivität auf. Damit ist der direkte Nachweis erbracht, daß diese Mutationen des Ryanodinrezeptors für die Maligne Hyperthermie-Veranlagung verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde in keiner der Familien eine der untersuchten Mutationen gefunden. Lediglich in der Familie CCD 06 segregiert die Mutation Arg163Cys, die bei Quane et al. (1993) in dieser Familie beschrieben wurde. Bemerkenswerterweise ist die Segregation jedoch nicht vollständig, sondern ein Familienmitglied mit vorhandener Mutation weist keine cores in der Muskelbiopsie auf. Zudem handelt es sich hier nicht um eine Privatmutation, da sie bei 2 % der untersuchten MH-Patienten ebenfalls gefunden wurde (Manning et al., 1998). Vermutlich ist in dieser Familie die Mutation Arg163Cys für die MH- Veranlagung verantwortlich, während die CCD auf einer anderen Ursache beruht. Denkbar wäre z.B. daß

Mutationen in einem zweiten Gen, das unmittelbar zum Ryanodinrezeptorgen benachbart ist, alleine oder in Kombination mit *RYR1* für die CCD verantwortlich ist. Ein digenetisches Modell für CCD/MHS würde gestützt durch die Tatsache, daß zwar viele CCD-Patienten eine Veranlagung zur MHS haben, umgekehrt dagegen findet man nur wenige CCD-Träger im MHS-Kollektiv. Schließlich ist mit einem monogenetischen Modell nur schwierig zu erklären, weshalb ein und dieselbe Mutation einmal eine MHS provoziert, in anderen Fällen aber eine zusätzliche oder gar ausschließliche CCD. Da durch die bekannte Heterogenität der MHS gezeigt ist, daß verschiedene Gene im Kontext der elektromechanischen Koppelung zur Entstehung des MHS-Phänotyps beitragen können, ist nicht auszuschließen, daß die MHS bei CCD-Patienten auf einem sekundären Effekt von Mutationen in einem bisher unbekanntem CCD-Gen auf Chromosom 19q13.1 beruht. Die Nachbarschaft zum MHS-Gen *RYR1* könnte dabei zufälliger Natur sein, oder das Resultat einer funktionellen Nachbarschaft im Sinne einer koordinierten Expression zweier Gene im gleichen anatomischen und/oder biochemischen Kontext.

Durch diese Arbeit wird die derzeit vorherrschende Hypothese von der Allelie der CCD mit der MHS, auf der Basis des Ryanodinrezeptorgens nicht gestützt. Die Untersuchung auf Mutationen wurde allerdings nicht systematisch für das ganze *RYR1*-Gen durchgeführt, angesichts der Größe der codierenden Sequenz von 15 kb und der enormen Anzahl von 106 Exons stellt dies auch eine methodische und finanzielle Herausforderung dar. Zumindest sollten jedoch in einem nächsten Schritt möglichst viele CCD-Patienten auf Mutationen in den Exons der beiden "hot spots" in der N-terminalen Domäne sowie im zentralen Bereich des Gens (Tong et al., 1997; Manning et al., 1998) untersucht werden, um eine Beteiligung von *RYR1* an der Entstehung der CCD zu beweisen oder zu widerlegen. Besser wäre natürlich eine komplette Untersuchung der gesamten codierenden Sequenz.

5.3.2 Das Gen für die β -Untereinheit des Myosins (MYH7, MYHCB)

Das Gen für die β -Untereinheit der schweren Myosinkette wird vorwiegend im fötalen Herzmuskel exprimiert, im adulten Herzen nur unter dem Einfluß von Streß und/oder Thyroid-Hormonen. Daneben wird es auch im quergestreiften Muskel exprimiert und zwar hauptsächlich in Muskeln, die reich sind an Typ-I Fasern (Jandreski et al., 1987), also jenem Fasertyp, der bei CCD-Patienten besonders ausgeprägt vorkommt. Das 22,9 kb große Gen kartiert auf Chromosom 14q12 und ist organisiert in 40 Exons, von denen 38 codierend sind.

Mutationen in diesem Gen sind für 40 - 50 % aller Fälle von familiärer hypertropher Kardiomyopathie (HCM, CMH1; MIM #192600) verantwortlich. Fananapazir et al. (1993) beschreiben das Vorkommen von central cores in den Skelett-Muskelbiopsien von HCM-Patienten aus sechs verschiedenen Familien. Zwei Drittel aller HCM-Patienten, die eine von vier verschiedenen MYH7-Mutationen trugen, zeigten die histologischen Anzeichen einer Central Core Disease. Allerdings zeigten nur zwei Patienten eine leichte Muskelschwäche, andere klinische Symptome fehlten völlig. Zwar war diese Arbeit von anderer Seite angezweifelt worden, jedoch berichteten auch Smith et al. bereits 1975 über das Vorkommen von central cores bei 4/11 HCM-Patienten. Demnach gibt es zwei verschiedene Gene, die im Falle einer Mutation das histologische Bild einer CCD erzeugen können, wovon eines das Gen für die ventrikuläre β -Untereinheit des schweren Myosins ist. Die klinische Symptomatik ist aber eher kardial ausgeprägt, während myoskelettäre Deformationen oder Muskelschwäche fehlen oder nur gering ausfallen.

Von den hier untersuchten Patienten kämen zwei in Frage, die diese Sonderform der CCD haben könnten, der Patient III:2 aus Familie CCD10 mit Verdacht auf Linksherzhypertrophie, sowie der Patient CCD16, bei dem der Verdacht auf eine Cardiomyopathie vorliegt. Die Mutationsanalyse des *MYH7*-Gens erbrachte keine Sequenzunterschiede, allerdings wurde keine komplette Analyse des Gens durchgeführt.

5.3.3 Das Gen für Cytochrom c Oxidase Untereinheit VIb (COX6B)

Die Cytochrom c Oxidase (COX; EX 1.9.3.1) ist ein Enzym in der Redoxkette der mitochondrialen Endoxidation und wird als "molekulare Maschine" beschrieben (Malatesta et al., 1995). Cytochrom c Oxidase ist lokalisiert in der inneren Mitochondrienmembran, wo sie den Elektronentransfer von reduziertem Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff katalysiert und dadurch zum Protonengradienten beiträgt, der zur ATP-Synthese benutzt wird (Capaldi et al., 1987). Sie besteht aus 13 Untereinheiten, die von drei mitochondrialen und zehn nukleären Genen codiert werden (Kadenbach, 1983). Die Ähnlichkeit der Symptomatik mit den differentialdiagnostisch relevanten mitochondrialen Myopathien sowie die Lokalisierung des Gens (*COX6B*) für diese Untereinheit im Kandidatenintervall auf Chromosom 19q13.1, legten die Vermutung nahe, daß ein Gen für eine COX-Untereinheit (*COX6B* oder *COX7A*, s.u.) das Gen für die CCD sein könnte. Da die genomische Struktur des Gens *COX6B* nicht bekannt war und eine Isolierung des Gens nicht gelang, blieb nur die Hybridisierung mit einer

cDNA-Sonde zur Analyse der CCD-Patienten auf Mutationen. Die Interpretation der Hybridisierungsmuster wurde erschwert durch die zahlreich vorhandenen Pseudogene der COX VIb-Untereinheit (Carrero-Valenzuela et al., 1991; Taanman et al., 1991). Es fand sich kein Hinweis auf ein größeres Rearrangement des Gens bei Patienten, so daß man allenfalls nach kleineren Mutationen im Bereich einer oder weniger Basen suchen müßte. Nachdem mittlerweile die genomische Struktur des Gens bekannt ist, kann man die Patienten-DNA auf Veränderungen in den vier Exons des Gens untersuchen.

Die Funktion der nukleären COX-Untereinheiten ist weitgehend spekulativ. Von Kadenbach et al. (1987) wurde vorgeschlagen, daß die nicht-katalytischen Untereinheiten an der Regulation der Elektronentransportrate und der Stöchiometrie der Protonenpumpe beteiligt sein sollen. Capaldi et al. (1987) vermuteten, daß die Untereinheiten VIa und VIb der energieabhängigen Calciumaufnahme und dem Import von Proteinen ins Mitochondrium dienen. Schon länger wurde vermutet, daß die nukleär codierten Untereinheiten der Anpassung an verschiedene Stoffwechsellasten dienen, wofür die Existenz von gewebespezifisch exprimierten Untereinheiten spricht. Daneben könnten die Untereinheiten auch in der Assemblierung des Holoenzym-Komplexes involviert sein (Kadenbach, 1986; Grossman & Lomax, 1997). Tsukihara et al. (1996) gelang es, das komplette Enzym bei einer Auflösung von 2,8 Å röntgenkristallographisch darzustellen. Danach ist die Untereinheit VIb kein membrandurchspannendes Molekül, wie acht der anderen nukleären Untereinheiten, sondern komplett auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert und an der Dimerisierung des Holoenzym maßgeblich beteiligt. COX VIb übt sehr wahrscheinlich auch eine suppressive, regulatorische Funktion aus, da sich nach selektivem Entfernen der Untereinheit die Aktivität der Cytochrom c Oxidase verdoppelte (Weishaupt & Kadenbach, 1992).

Die Expression der COX6B mRNA konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden, es gibt keine gewebespezifischen Isoformen. Würde es sich bei *COX6B* um das CCD-Gen handeln, so würde man Pleiotropie-Effekte erwarten und es müßte geklärt werden, warum die Symptomatik auf den myosekelettären Bereich beschränkt bleibt. Allerdings wurde auch bei Fällen von Patienten mit einer COX-Defizienz beobachtet, daß sich die Manifestation auf einige, wenige Organe erstreckte, die nicht zu den bekannten Expressionsmustern einer COX-Untereinheit paßten (Kennaway et al., 1990). Es gab also gute Gründe anzunehmen, daß COX6B ein Kandidatengen für die CCD ist, nun sind weitere Untersuchungen der

CCD-Patienten z.B. mit der SSCP- oder der DGGE-Methode erforderlich, um dieses Gen als Kandidaten zu bestätigen oder auszuschließen.

5.3.4 Das Gen für Cytochrom c Oxidase Untereinheit VIIa (COX7A1)

Von allen nukleären COX-Untereinheiten sind die cDNA-Sequenzen bekannt, die genomische Sequenz ist jedoch nur bei einer Untereinheit komplett (Vb; Lomax et al., 1991) und bei einer teilweise (VIb; Taanman et al., 1991) bekannt. In dieser Arbeit gelang es, die komplette genomische Sequenz des Gens *COX7A1* für die muskelspezifische Untereinheit der Cytochrom c Oxidase zu beschreiben, inklusive 350 bp des 5'-nichtranslatierenden Bereichs, der Promotor-Region des Gens. Die Exon-Intron-Struktur konnte ermittelt werden und es zeigte sich eine evolutionär konservierte Organisation zwischen *COX7A1* und *BTCOX7a*, dem homologen Gen des Rindes (Wolz et al., 1997). Mittlerweile wurde auch das homologe Gen der Maus kloniert (Jaradat et al., 1998), obwohl zunächst vermutet wurde, daß bei *M. musculus* diese Untereinheit nicht vorkommt (van den Bogert, 1992). Es handelt sich bei *COX7A1*, wie bei den Genen für die meisten anderen Untereinheiten auch, um ein sogenanntes Haushaltsgen. Diese sind typischerweise in CpG-Inseln lokalisiert und es fehlt eine TATA-Box für die gewebespezifische Expression. Auch die Gene anderer COX-Untereinheiten zeigen die charakteristischen Eigenschaften von Haushaltsgenen (Grossman & Lomax, 1997). Das Gen ist vermutlich eine genomische Einzelkopie (Wolz et al., 1997), wohingegen andere Untereinheiten teils mehrfache prozessierte Pseudogene besitzen (Carrero-Valenzuela et al., 1991; Lomax et al., 1991; Seelan & Grossman, 1993).

Die Suche in einer Transkriptionsfaktor-Datenbank ergab mehrere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, passend zu dem Charakter einer äußerst komplex geregelten Expression unter dem Einfluß zweier Genome, dem Status einer konstitutiven Enzyms des Energiestoffwechsels und einer gewebespezifischen Expression. Bindungsstellen für ubiquitäre Transkriptionsfaktoren belegen nochmals die Eigenschaften eines Haushaltsgens. Für die Expression des Gens in den unterschiedlichen Muskelgeweben von Herz- und Skelettmuskulatur gibt es jeweils spezifische Elemente, darüber hinaus findet sich auch eine mögliche Bindungsstelle für NRF-2, einen Faktor der bei vielen anderen mitochondrialen Enzymen die koordinierte Expression mitochondrial und nukleär codierter Gene reguliert (Grossman & Lomax, 1997). Da diese Analyse auf den Befunden einer Datenbanksuche basiert, fehlt noch der funktionelle Nachweis. Die Regulation der Expression der

COX-Untereinheiten dient als Modell für die gesamten Enzymkomplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette, die alle die Besonderheit von digenomisch codierten Untereinheiten aufweisen (Grossman & Lomax, 1997), zudem ist die COX vom biochemischen Standpunkt aus sehr interessant, da sie durch die Katalyse eines nahezu irreversiblen Prozesses den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Elektronentransports darstellt.

Von den zehn nukleär codierten Untereinheiten werden bei Säugern drei gewebespezifisch und/oder entwicklungspezifisch exprimiert, häufig sind es die Untereinheiten VIa, VIIa und VIII (Schlerf et al., 1988; Seelan & Grossman, 1991; Scheja & Kadenbach, 1992). Neben der Herz-/Skelettmuskelspezifischen H-Isoform, gibt es eine L-Isoform, die neben dem namengebenden Vorkommen in der Leber in fast allen Geweben gefunden wurde, auch in der Herz- und Skelettmuskulatur. Da die Homologie zwischen H- und L-Isoformen einer Spezies geringer ist als die Homologie sowohl zwischen den H-Isoformen als auch den L-Isoformen verschiedener Spezies, wurde vermutet, daß die Gene der beiden Isoformen durch eine Genduplikation entstanden, die vor der Radiation der Säuger geschah (Seelan & Grossman, 1993). Da die Gene der nukleären Untereinheiten relativ gut konserviert sind, kann angenommen werden, daß diese Untereinheiten eine für den jeweiligen Organismus nützliche Funktion haben. Es könnte sich hierbei um eine Feinmodulation der Enzymaktivität in Anpassung an physiologische Bedingungen bzw. an eine ökologische Nische handeln. Andererseits ist das Vorkommen der gewebespezifischen Isoformen bei verschiedenen Spezies unterschiedlich, z.B. kommt beim Menschen nur die L-Isoform der Untereinheit VIII vor oder bei der Ratte in allen Geweben nur die Untereinheit VIIa-L (Kennaway et al., 1990), so daß der evolutionäre Druck nicht so hoch sein kann. Solange die Funktion der nukleären Untereinheiten nicht aufgeklärt ist, kann man über die evolutionären Mechanismen der Untereinheitenverteilung nur spekulieren.

Neben der gewebespezifischen Expression ist bei einigen Untereinheiten auch eine entwicklungspezifische Regulation bekannt. In diesem Zusammenhang sind die Resultate von Untersuchungen über die Untereinheit VIIa relevant, die ein Umschalten von der fötalen L-Isoform zur adulten H-Isoform belegen. Tritschler et al. (1990) konnten zeigen, daß bei der gutartigen Verlaufsform der infantilen mitochondrialen Myopathie die Symptome mit Erscheinen der H-Isoform verschwanden, während bei Fällen mit der fatalen Verlaufsform die COX Untereinheiten VIIa,b dauerhaft fehlten. Mit der Verfügbarkeit der Struktur des Gens

und der genomischen Sequenz ist es nun möglich, die Ursache der mitochondrialen Myopathien auf genomischer Ebene zu untersuchen.

COX7A1 erschien aufgrund der gewebespezifischen Expression im Skelettmuskel und der Ähnlichkeit der Symptomatik mit den mitochondrialen Myopathien der ideale Kandidat für das CCD-Gen. Die Mutationsanalyse mit der SSCP-Methode sowie teilweiser Sequenzierung brachte jedoch keine Mutationen zutage. Zwar ist die Erkennungsrate der Methode limitiert auf ca. 80 %, da aber der Stichprobenumfang relativ hoch ist, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit das *COX7A1*-Gen als Verursacher der CCD ausgeschlossen werden.

5.3.5 Das Gen für die kleine Untereinheit der Ca²⁺-aktivierten neutralen

Proteasen (CANPS)

Calpaine (EC 3.4.22.17) sind intrazelluläre, neutrale Cysteinproteasen, die durch Calcium aktiviert werden (CANP, Calcium aktivierte neutrale Protease) und in den Zellen höherer Tiere vorkommen (Miyake et al., 1986). Die Calpain-Familie zählt fast zehn Mitglieder, die nach ihrem Expressionsmuster in ubiquitäre und gewebespezifische Proteine eingeteilt werden (Suzuki et al., 1995). Die beiden klassischen Calpaine 1 und 2 werden auch als μ - und m-Calpain, nach ihrem unterschiedlichen Calciumbedarf für die Aktivierung, bezeichnet und bestehen aus einer, jeweils ähnlichen, großen katalytischen (80 kDa) sowie einer identischen, kleinen regulatorischen Untereinheit (30 kDa). Die Substrate der verschiedenen Calpaine sind ein weites Spektrum an Proteinen, die häufig Membran-assoziiert sind, z.B. Cytoskelettproteine, Enzyme, Membranproteine und andere (Cytokine, Transkriptionsfaktoren, Proteine der Augenlinse, etc.; Saïdo et al., 1994). Die Funktion ist daher die eines Biomodulators, der durch eine Ca²⁺-aktivierte, limitierte Proteolyse die Aktivität oder Funktion der Substratproteine beeinflusst (Suzuki et al., 1995). Die kleine 30 kDa Untereinheit dissoziiert bei der Aktivierung des Enzyms durch Calcium ab, sie wirkt wahrscheinlich als Chaperon und erleichtert die Faltung der 80 kDa-Untereinheit (Suzuki et al., 1995).

Ins Blickfeld dieser Arbeit geriet das Gen für die kleine Untereinheit des Calpains durch die Lokalisierung auf Chromosom 19 durch Ohno et al. (1990) sowie insbesondere durch die Kartierung in das Kandidatenintervall für CCD durch das Lawrence Livermore Labor (Ashworth et al., 1995). Ein weiteres Argument für die Rolle als Kandidatengen ist die Involvierung des muskelspezifischen Calpains (Calpain 3, p94, nCL1) in eine Form der

Gliedergürtel-Muskeldystrophie (LGMD2A, Richard et al., 1995). Zwar ist das Calpain 3 nicht mit der 30 kDa-Untereinheit assoziiert, aber wahrscheinlich enthält jedes Gewebe neben spezifischen Calpainen auch ubiquitäre Formen, die jeweils unterschiedliche Aufgaben erfüllen (Sorimachi et al., 1994). Calpain I wurde im Skelettmuskel in den I- und Z-Banden lokalisiert (Yoshimura et al., 1986), jenem Ort also, an dem die regelmäßige Fasernanordnung in den cores gestört ist. Das muskelspezifische Calpain 3 enthält eine Kernlokalisierungssequenz und ist vermutlich über die Interaktion mit MyoD an der Muskeldifferenzierung beteiligt. Die beiden ubiquitären Calpaine wurden mit dem Sarcolemma assoziiert gefunden (Gopalakrishna & Barsky, 1986) und sind am normalen turn-over von Muskelproteinen beteiligt.

Die stärkste Evidenz, daß es sich bei CANPS um das CCD-Gen handeln könnte, liefern Untersuchungen über die Rolle des Ryanodinrezeptors als Substrat für Calpain. Brandt et al. (1992) konnten zeigen, daß der sarkoplasmatische Calciumkanal RYR1 durch Calpain mehrfach in einer definierten Reihenfolge hydrolysiert wird und daß sich durch die Proteolyse die Quartärstruktur nicht wesentlich ändert. Die Fähigkeit zur Ryanodin-Bindung und die Kanalfunktion bleibt erhalten (Gilchrist et al., 1992). Iino et al. (1992) schließlich fanden, daß die Proteolyse die Rate der Calcium-induzierten Calcium Ausschüttung (CICR) auf ungefähr das Doppelte erhöht. Eine erhöhte CICR-Rate wurde auch von Mickelson & Louis (1996) bei MHS-Schweinen beschrieben. Gilchrist et al. (1992) vermuten sogar eine direkte und regelmäßige Beteiligung des Calpains am Mechanismus der elektromechanischen Koppelung.

Damit stellt sich das CANPS-Gen als äußerst interessanter Kandidat für die CCD dar, weil die beschriebenen Befunde einen Mechanismus für die Assoziation zwischen CCD und MHS nahelegen. Demnach könnte eine, wie auch immer, fehlregulierte 30 kDa-Calpain-Untereinheit über die Proteolyse des Ryanodinrezeptors zur Veranlagung für die Maligne Hyperthermie führen, während die Einwirkung auf andere Substrate, Proteine der Muskulatur und des Skeletapparates, die gestörte myofibrilläre Struktur und die Skelettdeformationen erklären könnte. Aufgrund der Vielzahl der Calpain-Substrate sowie der universellen Verwendung der kleinen Untereinheit als Partner in heterodimeren Calpainen, würde man auch hier einen Pleiotropie-Effekt erwarten. Andererseits zeigt das Beispiel der Chorea Huntington, daß ein in mehreren Geweben mutiertes Protein nur in einem Gewebe einen pathologischen Effekt hervorrufen kann (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

Trotz der zahlreichen Evidenz für eine maßgebliche Rolle des CANPS-Gens an der Entstehung der CCD, lieferte die Mutationsanalyse keine Hinweise auf eine tatsächliche Involvierung. Zwar verfügt die angewendete screening Methode SSCP nur über eine Sensitivität von ca. 80 % (Hayashi & Yandell, 1993), aber die relativ große Stichprobenanzahl legt nahe, daß das Calpain nicht direkt in die Ätiologie der Central Core Disease involviert ist. Es fehlt allerdings auch hier die Analyse der Promotor-Region des Gens. Zudem erschwert die Heterogenität der CCD die Aussagemöglichkeit, weil bei einigen Familien nicht klar ist, ob bei ihnen die CCD zu Chromosom 19q13.1 gekoppelt ist.

5.3.6 Weitere Kandidatengene

- Ein cDNA-Klon aus einem cDNA-Selektionsexperiment mit dem *RYR1* Cosmid-Contig (Rouquier S., persönl. Mitteilung) zeigte eine starke Homologie zum Gen für die p31-Untereinheit des 26S Proteasoms. Mittels PCR wurde eine cDNA-Sonde für das Gen produziert und in einer Southern Hybridisierung konnte die Lokalisierung des Gens in die Cosmide 1-4 des *RYR1* Cosmid-Contigs nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Damit kartiert das Gen in der unmittelbaren 5'-flankierenden Region des *RYR1*-Gens und kann aufgrund der Lokalisation als Kandidatengen angesehen werden. Das 26S Proteasom ist ein ATP-abhängiger Multiprotein-Komplex, der ubiquitinierte Proteine verdaut und könnte im CCD-Muskel z.B. durch übermäßige Proteolyse an der myofibrillären Desorganisation beteiligt sein. Im Hinblick auf die Funktion des Proteinkomplexes gibt es allerdings weitaus geeignetere Kandidaten für die CCD.

- Mit dem Gen *RPSM12* steht neben den beiden Genen für die COX-Untereinheiten VIb und VIIa, ein weiteres nukleär codiertes Gen für ein mitochondriales Protein auf der Liste der Kandidatengene. Das Protein S12 ist ein Bestandteil der mitochondrialen Ribosomen und an der Expressionsmaschinerie für mitochondriale RNA beteiligt (Johnson et al., 1998). Shah et al. (1998) kartierten das Gen für *RPSM12* in die Bande 19q13.1, in die Nähe des Markers D19S881 und damit in die unmittelbar 3'-flankierende Region des *RYR1*-Gens. Die Evidenz ergibt sich auch hier aus der Ähnlichkeit der Symptomatik mit den mitochondrialen Myopathien sowie dem Fehlen von Mitochondrien in den core-Regionen.

- Die Lokalisierung des *SCN1B*-Gens, des Gens für die β -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals, in die Bande 19q13.1 war bereits zu Beginn der Arbeit bekannt (Makita et al., 1994), doch schien das Gen nicht als Kandidatengenen für die CCD in Frage zu kommen, da es proximal von D19S191 kartiert (s. Abb. 4.1.3.1) und damit knapp außerhalb des Kandidatenintervalls. Die Ergebnisse der genetischen Kartierung zeigen, daß möglicherweise auch ein Gen, das das Kandidatenintervall flankiert, als Kandidat in Betracht käme. Der spannungsabhängige Natriumkanal spielt eine tragende Rolle bei der Erzeugung eines Aktionspotentials im quergestreiften Muskel und in neuronalen Geweben. Makita et al. (1994) betrachten *SCN1B* als Kandidat für Krankheiten, die die Erregbarkeit von Membranen betreffen. Kürzlich wurde eine Mutation im *SCN1B*-Gen mit einer seltenen Form von Epilepsie korreliert (Wallace et al., 1998). Die α -Untereinheit *SCNA4* ist verantwortlich für hyperkalämische periodische Paralysen, Paramyotonia Congenita (Ptacek et al., 1993) und möglicherweise auch eine Ursache für Maligne Hyperthermie (Olckers et al., 1992; Moslehi et al., 1998).

- Phospholemman (*PLM*) ist ein kleines Protein aus 72 Aminosäuren, das hauptsächlich im Skelett- und Herzmuskel lokalisiert ist. Es wird auf einen Insulin- bzw. adrenergen Stimulus hin leicht phosphoryliert, was mit einer erhöhten Kontraktilität einhergeht (Presti et al., 1985a,b). Für *PLM* wurde ebenfalls eine Rolle in der elektromechanischen Koppelung postuliert, möglicherweise handelt es sich um einen Chloridkanal. Das *PLM*-Gen wurde 1997 von Chen et al. mittels FISH in die Bande 19q13.1 des menschlichen Genoms kartiert und ist damit ein genauso vielversprechendes Kandidatengenen wie das *CANPS*-Gen.

5.3.7 Ungeklärte Fragen

Nach wie vor ist es fraglich, ob das Ryanodinrezeptorgen für beide Erkrankungen, CCD und MHS, verantwortlich zeichnet. Das Beispiel *CANPS* zeigt, daß die Assoziation zwischen den beiden Symptomatiken auch ohne ein gemeinsames, ursächliches Gen erklärt werden kann.

Hilfreich bei der Aufklärung der genetischen Ursache der CCD wäre das Wissen um die genaue, biochemischen Grundlage der morphologisch erkennbaren Veränderungen der Myofibrillen, den cores. Zwar gibt es einige immunocytoologische Untersuchungen an CCD-Muskelbiopsaten, aber bisher konnte kein eindeutiges histologisches Substrat für die cores identifiziert werden. Es besteht immer noch die Möglichkeit, daß die cores sekundären Ursprungs sind.

In diesem Zusammenhang ist auch die Frage relevant, ob die CCD neurogenen Ursprungs ist oder eine echte Myopathie darstellt. Die Typ I Faserdominanz könnte auf einer fehlenden Differenzierung in der Embryonalphase oder auf einer späteren Dedifferenzierung und Konversion von Typ II-Fasern beruhen (Busby & Squier, 1998). Im Falle einer neurogenen Störung würde die Ursache der Fasertypendisproportion in einer fehlerhaften Innervierung zu suchen sein. Sollte die Krankheit neurogenen Ursprungs sein, müßte man natürlich in einem anderen Gewebe nach Kandidatengenen suchen.

Nachdem die Mutationsanalyse in den untersuchten Kandidatengenen erfolglos blieb, ist die Suche nach dem CCD-Gen nach wie vor offen. Die obige Liste zeigt, daß es eine Reihe aussichtsreicher Kandidatengene gibt, die aufgrund ihrer Funktion in die Ätiologie der Central Core Disease verwickelt sein könnten. Möglicherweise bringt die komplette Sequenzierung dieser genomischen Region weitere Kandidaten ans Licht. In dieser Hinsicht wäre es von Vorteil, wenn man das fragliche Intervall genetisch weiter eingrenzen könnte, z.B. an Hand der großen australischen CCD-Familie (Byrne et al., 1992), bei der Rekombinationen zu den flankierenden Markern D19S191 und D19S190 beobachtet wurden. Weiterhin hätte die Analyse in dieser Familie den Vorteil, daß die Heterogenität der CCD keine Rolle spielt. Es sollte also möglich sein, den Locus für die CCD auf Chromosom 19 in naher Zukunft zu finden.

6. Literatur

- Adeokun A.M., West S.P., Ellis F.R., Halsall P.J., Hopkins P.M., Foroughmand A.M., Iles D.E., Robinson R.L., Stewart A.D., Curran J.L. (1997) *The G1021A substitution in the RYR1 gene does not cosegregate with malignant hyperthermia susceptibility in a British pedigree*. Am J Hum Genet, **60**(4):833-841.
- Afifi A.K., Smith J.W., Zellweger H. (1965) *Congenital non-progressive myopathy. Central Core Disease and nemaline myopathy in one family*. Neurology, **15**:371-381.
- Alestrom A., Fagerlund T.H., Berg K. (1995) *A simple method to detect the RYR1 mutation G1021A, a cause of malignant hyperthermia susceptibility*. Clin Genet, **47**:274-275.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, **215**(3):403-410.
- Andresen E. & Jensen P. (1977) *Close linkage established between the HAL locus for halothane sensitivity and the PHI (phosphohexose isomerase) locus in pigs of the Danish Landrace breed*. Nord Vet Med, **29**(11):502-504.
- Arnaudo E., Hirano M., Seelan R.S., Milatovich A., Hsieh C.L., Fabrizi G.M., Grossman L.I., Francke U., Schon E.A. (1992) *Tissue-specific expression and chromosome assignment of genes specifying two isoforms of subunit VIIa of human cytochrome c oxidase*. Gene, **119**(2):299-305.
- Ashworth L.K., Batzer M.A., Brandriff B., Branscomb E., de Jong P., Garcia E., Garnes J.A., Gordon L.A., Lamerdin J.E., Lennon G., et al (1995) *An integrated metric physical map of human chromosome 19*. Nat Genet, **11**(4):422-427.
- Bodensteiner J.B. (1994) *Congenital myopathies*. Muscle Nerve, **17**(2):131-144.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980) *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*, Am J Hum Genet, **32**:314-331.
- Brandt N.R., Caswell A.H., Brandt T., Brew K., Mellgren R.L. (1992) *Mapping of the calpain proteolysis products of the junctional foot protein of the skeletal muscle triad junction*. J Membr Biol, **127**:35-47.
- Brillantes A.B., Ondrias K., Scott A., Kobrinsky E., Ondriasova E., Moschella M.C., Jayaraman T., Landers M., Ehrlich B.E., Marks A.R. (1994) *Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein*. Cell, **77**(4):513-23.

- Busby M. & Squier M. (1998) *Central Core Disease* in: *Neuromuscular disorders - clinical and molecular genetics*. Emery A.E. (Hrsg.), Wiley, Chichester.
- Byrne E., Blumbergs P.C., Hallpike J.F. (1982) *Central core disease. Study of a family with five affected generations*. *J Neurol Sci* , **53**(1):77-83.
- Capaldi R.A., Takamiya S., Zhang Y.-Z., Gonzalez-Halpher D, Yanamura W. (1987) *Structure of cytochrome c oxidase*. *Curr. Top. Bioenerg*, **15**, 97-112.
- Carrano A.V., Lamerdin J., Ashworth L.K., Watkins B., Branscomb E., Slezak T., Raff M., de Jong P.J., Keith D., McBride L., et al (1989) *A high-resolution, fluorescence-based, semiautomated method for DNA fingerprinting*. *Genomics*, **4**(2):129-136.
- Carrero-Valenzuela R.D., Quan F., Lightowlers R., Kennaway N.G., Litt M., Forte M. (1991) *Human cytochrome c oxidase subunit VIb: characterization and mapping of a multigene family*. *Gene*, **102**(2):229-236.
- Chou S.M., Chou T.M., Mori M. (1981) *The core 'myofibres' induced by local tetanus and tenotomy in rats*. *J Neuropathol Exp Neurol*, **40**:300.
- Couch F.J., Hogan K., McCarthy T.V., Gregg R.G. (1991): *Dinucleotide repeat polymorphism at the RYR1 locus (19q13.1)*. *Nucleic Acids Res*, **19**(18):5094.
- Davies W., Harbitz I., Fries R., Stranzinger G., Hauge J.G. (1988) *Porcine malignant hyperthermia carrier detection and chromosomal assignment using a linked probe*. *Anim Genet*, **19**(3):203-12.
- Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. (1987) *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts*. *Cell*, **51**(6):987-1000.
- Das H.K., Jackson C.L., Miller D.A., Leff T., Breslov J.L. (1987) *The Human Apolipoprotein CII Gene Sequence Contains a Novel Chromosome 19-specific Minisatellite in its Third Intron*. *J Biol Chem*, **262**(10):4787-4793.
- deJong P.J., Yokobata K., Chen C., Lohman F., Pederson L., McNinch J., Van Dilla M (1989) *Human chromosome-specific partial digest libraries in lambda and cosmid vectors*. *Cytogenet Cell Genet*, **51**:985.
- Denborough M.A. & Lovell R.R.H. (1960) *Anaesthetic deaths in a family*. *Lancet* **2**:45.
- Denborough M.A., Dennett X., Anderson R.M. (1973) *Central-core disease and malignant hyperpyrexia*. *Br Med J*, **1**(848):272-273.
- Denton R.M. & McCormack J.G. (1990) *Ca²⁺ as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues*. *Annu Rev Physiol*, **52**:451-466.

- Deufel T., Golla A., Iles D., Meindl A., Meitinger T., Schindelhauer D., DeVries A., Pongratz D., MacLennan D.H., Johnson K.J., et al (1992) *Evidence for genetic heterogeneity of malignant hyperthermia susceptibility*. Am J Hum Genet, **50**(6):1151-1161.
- deVries A. (1993) *RFLP-Koppelungsanalysen am MHS1-Locus auf Chromosom 19q12-13.1 und Mutationsanalyse am Ryanodinrezeptorgen in deutschen und österreichischen Familien mit maligner Hyperthermie*. Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Dib C., Faure S., Fizames C., Samson D., Drouot N., Vignal A., Millasseau P., Marc S., Hazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Morissette J., Weissenbach J. (1996) *A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites*, Nature, **380**(6570):152-154.
- Dubowitz V. & Roy S. (1970) *Central core disease of muscle: clinical, histochemical and electron microscopic studies of an affected mother and child*. Brain, **93**(1):133-146.
- Dynal Technical Handbook: *Biomagnetic Techniques in Molecular Biology* (1995), 2. Aufl., Dynal A.S., Oslo, Norwegen
- Eikelenboom G. & Minkema D. (1974) *Prediction of pale, soft, exudative muscle with a non-lethal test for halothane induced porcine malignant hyperthermia syndrome*. Netherland J Vet Sci, **99**:421-426.
- Ellis F.R., Harriman D.G., Keaney N.P., Kyei-Mensah K., Tyrrell J.H. (1971) *Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia*. Br J Anaesth, **43**(7):721-722.
- Ellis F.R. & Heffron J.J.A. (1985) *Clinical and biochemical aspects of malignant hyperthermia*. In: Atkinson R.S., Adams A.P. (eds.): *Recent Advances in Anaesthesia and Analgesia*. Vol. 15. New York: Churchill Livingstone, pp 173-207.
- Endo M., Tanaka M., Ogawa Y. (1970) *Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres*. Nature, **228**:34-36.
- Eng G.D., Epstein B.S., Engel W.K., McKay D.W., McKay R. (1978) *Malignant hyperthermia and central core disease in a child with congenital dislocating hips*. Arch Neurol, **35**(4):189-197.
- Ervasti J.M., Mickelson J.R., Louis C.F. (1989) *Transverse tubule calcium regulation in malignant hyperthermia*. Arch Biochem Biophys, **269**(2):497-506.
- European Malignant Hyperpyrexia Group (1984) *A protocol for the investigation malignant hyperpyrexia susceptibility*. Br J Anaesth, **56**:1267-1269.

- Fagerlund T., Islander G., Ranklev E., Harbitz I., Hauge J.G., Mogleby E., Berg K. (1992) *Genetic recombination between malignant hyperthermia and calcium release channel in skeletal muscle*. Clin Genet, **41**(5):270-272.
- Fagerlund T.H., Islander G., Ranklev-Twetman E., Berg K. (1996) *Recombination between the postulated CCD/MHE/MHS locus and RYR1 gene markers*. Clin Genet, **50**(6):455-458.
- Fardeau M. & Tomé F.M.S. (1994) *Congenital Myopathies*. in: Myology - basic and clinical. (Hrsg.: Engel A.G. & Franzini-Armstrong C.), pp 1487-1532, McGraw-Hill, New York.
- Fananapazir L., Dalakas M.C., Cyran F., Cohn G., Epstein N.D. (1993) *Missense mutations in the beta-myosin heavy-chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, **90**(9):3993-3997.
- Feinberg A.P. & Vogelstein B. (1983) *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity*. Anal Biochem, **132**(1):6-13.
- Fleischer S. & Inui M (1989) *Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling*. Annu Rev Biophys & Biophys Chem, **18**:333-364.
- Ford L.E. & Podolsky R.J. (1970) *Regenerative calcium release within muscle cells*. Science, **167**:58-59.
- Frank J.P., Harati Y., Butler I.J., Nelson T.E., Scott C.I. (1980) *Central core disease and malignant hyperthermia syndrome*. Ann Neurol, **7**(1):11-17.
- Franzini-Armstrong C. (1975) *Membrane particles and transmission at the triad*. Fed Proc., **34**:1382-1389.
- Franzini-Armstrong C. & Jorgensen A.O. (1994) *Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle*. Annu Rev Physiol, **56**:509-534.
- Fujii J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V.K., Weiler J.E., O'Brien P.J., MacLennan D.H. (1991) *Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia*. Science, **253**(5018):448-451.
- Gibson C.L. & Tuttle J.J. (1900) *Heat stroke as a postoperative complication*. Med. News (N.Y.), **77**:883-884.
- Gilchrist J.S., Wang K.K., Katz S., Belcastro A.N. (1992) *Calcium-activated neutral protease effects upon skeletal muscle sarcoplasmic reticulum protein structure and calcium release*. J Biol Chem, **267**(29):20857-20865.
- Gillard E.F., Otsu K., Fujii J., Khanna V.K., de Leon S., Derdemezi J., Britt B.A., Duff C.L., Worton R.G., MacLennan D.H. (1991) *A substitution of cysteine for arginine 614 in the*

- ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. Genomics, 11(3):751-755.*
- Gopalakrishna R. & Barsky S.H. (1986) *Hydrophobic association of with subcellular organelles compartmentalization of calpains and the endogenous inhibitor calpastatin in tissues. J Biol Chem, 261:13936-13942.*
- Greenfield J.G., Cornman T., Shy G.M. (1958) *The prognostic value of the muscle biopsy in the "floppy infant". Brain, 81:461.*
- Gronert G.A. (1980) *Malignant Hyperthermia, Anesthesiology, 53:395-423.*
- Haan E.A., Freemantle C.J., McCure J.A., Friend K.L., Mulley J.C. (1990) *Assignment of the gene for central core disease to chromosome 19. Hum Genet, 86(2):187-190.*
- Hakamata Y., Nakai J., Takeshima H., Imoto K. (1992) *Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. FEBS Lett, 312(2-3):229-235.*
- Hall L.W., Woolf N., Bradley J., Jolly D. (1966) *An unusual reaction to suxamethonium chloride. Br med J, 2:1305.*
- Hanahan D. (1983) *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol, 166(4):557-580.*
- Hartung E. (1995) *Die Bedeutung des Pflanzenalkaloids Ryanodin für die Diagnostik der Malignen Hyperthermie. Habilitationsschrift, Inst. für Anästhesiologie der Universität Würzburg.*
- Harrison G.G. (1975) *Control of malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. Br. J Anesth 47:62-65.*
- Hayashi K. & Yandell D.W. (1993) *How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mutat, 2(5):338-346.*
- Hollenberg S.M., Sternglanz R., Cheng P.F., Weintraub H. (1995) *Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. Mol Cell Biol, 15(7):3813-22.*
- Iino M., Takano-Ohmuro H., Kawana Y., Endo M. (1992) *Enhancement of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in calpain treated rabbit skinned muscle fibers. Biochem Biophys Res Commun, 185(2):713-718.*
- Ikemoto N., Ronjat M., Meszaros L.G., Koshita M. (1993) *Postulated role of calsequestrin in the regulation of Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum. Biochemistry, 28:6764-6771.*

- Iles D.E., Segers B., Heytens L., Sengers R.C., Wieringa B. (1992) *High-resolution physical mapping of four microsatellite repeat markers near the RYR1 locus on chromosome 19q13.1 and apparent exclusion of the MHS locus from this region in two malignant hyperthermia susceptible families.* Genomics, **14**(3):749-754.
- Isaacs H., Heffron J.J., Badenhorst M. (1975) *Central core disease. A correlated genetic, histochemical, ultramicroscopic, and biochemical study.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, **38**(12):1177-1186.
- Islander G., Henriksson K.G., Ranklev-Twetman E. (1995) *Malignant hyperthermia susceptibility without central core disease (CCD) in a family where CCD is diagnosed.* Neuromuscul Disord, **5**(2):125-127.
- Jandreski M.A., Sole M.J., Liew C.C. (1987) *Two different forms of beta myosin heavy chain are expressed in human striated muscle.* Hum Genet, **77**(2):127-31.
- Jaradat S.A., Ko M.S., Grossman L.I. (1998) *Tissue-specific expression and mapping of the Cox7ah gene in mouse.* Genomics, **49**(3):363-370.
- Jayaraman T., Brillantes A.M., Timerman A.P., Fleischer S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Marks A.R. (1992) *FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor).* J Biol Chem, **267**(14):9474-9477.
- Johnson D.F., Hamon M., Fischel-Ghodsian N. (1998) *Characterization of the human mitochondrial ribosomal S12 gene.* Genomics, **52**(3):363-368.
- Kadenbach B., Ungibauer M., Jarausch J., Büge U., Kuhn-Nentwig, L. (1983) *The complexity of respiratory complexes.* Trends Biochem Sci, **8**: 398-400.
- Kadenbach B. (1986) *Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organisms: hypothesis.* J Bioenerg Biomembr, **18**(1):39-54.
- Kadenbach B., Kuhn-Nentwig L., Büge U. (1987) *Evolution of regulatory enzyme: cytochrome c oxidase (complex IV).* Curr. Top. Bioenerg, **15**, 113-161.
- Kalow W. (1970) *Rigidity and malignant hyperthermia associated with anaesthesia.* Humangenetik, **9**(3):237-9.
- Kalow W., Britt B.A., Terreau M.E., Haist C. (1970) *Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia.* Lancet, **2**:895.
- Karges W.J., Gaedigk R., Dosch H.M. (1994) *Quantitative analysis of gene expression in different tissues by template-calibrated RT-PCR and laser-induced fluorescence,* PCR Methods Appl, **4**(3):154-159.

- Kato S., Sekine S., Oh S.W., Kim N.S., Umezawa Y., Abe N., Yokoyama-Kobayashi M., Aoki T. (1994) *Construction of a human full-length cDNA bank*. *Gene*, **150**(2):243-250.
- Kausch K., Lehmann-Horn F., Janka M., Wieringa B., Grimm T., Müller C.R. (1991) *Evidence for linkage of the central core disease locus to the proximal long arm of human chromosome 19*. *Genomics*, **10**(3):765-769.
- Keating K.E., Quane K.A., Manning B.M., Lehane M., Hartung E., Censier K., Urwyler A., Klausnitzer M., Muller C.R., Heffron J.J., et al. (1994) *Detection of a novel RYR1 mutation in four malignant hyperthermia pedigrees*. *Hum Mol Genet*, **3**(10):1855-1858.
- Keightley J.A., Hoffbuhr K.C., Burton M.D., Salas V.M., Johnston W.S., Penn A.M., Buist N.R., Kennaway N.G. (1996) *A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria*. *Nat Genet*, **12**:410-416.
- Kennaway N.G., Carrero-Valenzuela R.D., Ewart G., Balan V.K., Lightowers R., Zhang Y.Z., Powell B.R., Capaldi R.A., Buist N.R. (1990) *Isoforms of mammalian cytochrome c oxidase: correlation with human cytochrome c oxidase deficiency*. *Pediatr Res*, **28**(5):529-535.
- Korn B., Sedlacek Z., Manca A., Kioschis P., Konecki D., Lehrach H., Poustka A. (1992) *A strategy for the selection of transcribed sequences in the Xq28 region*. *Hum Mol Genet*, **1**(4):235-242.
- Krivosic-Horber R. & Krivosic I. (1989) *Central core disease associated with malignant hyperthermia sensitivity*. *Presse Med*, **18**(16):828-831.
- Kyte J. & Doolittle R.F. (1982) *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. *J Mol Biol*, **157**(1):105-32.
- Laing N.G., Majda B.T., Akkari P.A., Layton M.G., Mulley J.C., Phillips H., Haan E.A., White S.J., Beggs A.H., Kunkel L.M., Groth D.M., Boundy K.L., Kneebone C.S., Blumbergs P.C., Wilton S.D., Speer M.C., Kakulas B.A. (1992) *Assignment of a gene (NEM1) for autosomal dominant nemaline myopathy to chromosome 1*. *Am J Hum Genet*, **50**: 576-583.
- Larin Z., Monaco A.P., Lehrach H. (1991) *Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA*. *Proc Natl Acad Sci*, **88**(10):4123-4127.
- Lassar A.B., Buskin J.N., Lockshon D., Davis R.L., Apone S., Hauschka S.D., Weintraub H. (1989) *MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer*. *Cell*, **58**(5):823-831.

- Levitt R.C., Nouri N., Jedlicka A.E., McKusick V.A., Marks A.R., Shutack J.G., Fletcher J.E., Rosenberg H., Meyers D.A. (1991) *Evidence for genetic heterogeneity in malignant hyperthermia susceptibility*. *Genomics*, **11**(3):543-547.
- Levitt R.C., Olckers A., Meyers S., Fletcher J.E., Rosenberg H., Isaacs H., Meyers D.A. (1992) *Evidence for the localization of a malignant hyperthermia susceptibility locus (MHS2) to human chromosome 17q*. *Genomics*, **14**(3):562-566.
- Litt M. & Luty J.A. (1989) *A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene*, *Am. J. Hum. Genet.*, **44**:397-401.
- Lomax M. I., Hsieh C. L., Darras B. T. & Francke U. (1991) *Structure of the human cytochrome c oxidase subunit Vb gene and chromosomal mapping of the coding gene and of seven pseudogenes*. *Genomics*, **10**:1-9.
- Lovett M., Kere J., Hinton L.M. (1991) *Direct selection: a method for the isolation of cDNAs encoded by large genomic regions*. *Proc Natl Acad Sci* , **88**(21):9628-9632.
- MacLennan D.H., Duff C., Zorzato F., Fujii J., Phillips M., Korneluk R.G., Frodis W., Britt B.A., Worton R.G. (1990) *Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia*. *Nature*, **343**(6258):559-561.
- MacLennan D.H. & Phillips M.S. (1992) *Malignant hyperthermia*. *Science*, **256**(5058):789-794.
- MacKenzie A.E., Korneluk R.G., Zorzato F., Fujii J., Phillips M., Iles D., Wieringa B., Leblond S., Bailly J., Willard H.F., et al (1990) *The human ryanodine receptor gene: its mapping to 19q13.1, placement in a chromosome 19 linkage group, and exclusion as the gene causing myotonic dystrophy*. *Am J Hum Genet* , **46**(6):1082-1089.
- Makita N., Sloan-Brown K., Weghuis D.O., Ropers H.H., George A.L. Jr (1994) *Genomic organization and chromosomal assignment of the human voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit gene (SCN1B)*. *Genomics*, **23**(3):628-634.
- Malatesta F., Antonini G., Sarti P., Brunori M. (1995) *Structure and function of a molecular machine: cytochrome c oxidase*. *Biophys Chem*, **54**(1):1-33.
- Manning B.M., Quane K.A., Lynch P.J., Urwyler A., Tegazzin V., Krivosic-Horber R., Censier K., Comi G., Adnet P., Wolz W., Lunardi J., Muller C.R., McCarthy T.V. (1998a) *Novel mutations at a CpG dinucleotide in the ryanodine receptor in malignant hyperthermia*. *Hum Mutat*, **11**(1):45-50.

- Manning B.M., Quane K.A., Ording H., Urwyler A., Tegazzin V., Lehane M., O'Halloran J., Hartung E., Giblin L.M., Lynch P.J., Vaughan P., Censier K., Bendixen D., Comi G., Heytens L., Monsieurs K., Fagerlund T., Wolz W., Heffron J.J., Muller C.R., McCarthy T.V. (1998b) *Identification of novel mutations in the ryanodine-receptor gene (RYR1) in malignant hyperthermia: genotype-phenotype correlation*. *Am J Hum Genet*, **62**(3):599-609.
- Mauritz W., Sporn P., Steinbereithner K. (1986) *Malignant hyperthermia in Austria. I. Epidemiology and clinical aspects*. *Anaesthesist*, **35**(11):639-650.
- McCarthy T., Healy S., Lehane M., Heffron J., Farrall M., Johnson K. (1989) *Localisation of the malignant hyperthermia susceptibility locus to 19q12-13.2*. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* **45** (suppl.): A150.
- McCarthy T.V., Healy J.M., Heffron J.J., Lehane M., Deufel T., Lehmann-Horn F., Farrall M., Johnson K. (1990) *Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2*. *Nature*, **343**(6258):562-564.
- Meissner G. (1994) *Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors*. *Annu Rev Physiol*, **56**:485-508.
- Meissner G., Darling E., Eveleth J. (1986) *Kinetics of rapid Ca²⁺ release by sarcoplasmic reticulum: effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides*. *Biochemistry*, **25**:236-244.
- Meissner G., Rousseau E., Lai F.A., Liu Q.Y., Anderson K.A. (1988) *Biochemical characterization of the Ca²⁺ release channel of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum*. *Mol Cell Biochem*, **82**(1-2):59-65.
- Mickelson J.R. & Louis C.F. (1996) *Malignant hyperthermia: Excitation-Contraction Coupling, Ca²⁺ Release Channel, and Cell Ca²⁺ Regulation Defects*. *Physiol Rev*, **76**:537-592.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988) *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Res*, **16**:1215.
- MIM Nummer: #117000 (letzte Änderung 5.11.1997), Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- MIM Nummer: #145600 (letzte Änderung 29.7.1998), Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

- Minchom P.E., Dormer R.L., Hughes I.A., Stansbie D., Cross A.R., Hendry G.A., Jones O.T., Johnson M.A., Sherratt H.S., Turnbull D.M. (1983) *Fatal infantile mitochondrial myopathy due to cytochrome c oxidase deficiency*. J Neurol Sci, **60**(3):453-63.
- Miyake S., Emori Y., Suzuki K. (1986) *Gene organization of the small subunit of human calcium-activated neutral protease*. Nucleic Acids Res, **14**:8805-8817.
- Mohrenweiser H., Olsen A., Archibald A., Beattie C., Burmeister M., Lamerdin J., Lennon G., Stewart E., Stubbs L., Weber J.L., Johnson K. (1996) *Report of the third international workshop on human chromosome 19 mapping 1996*. Cytogenet Cell Genet, **74**(3):161-186.
- Mohrenweiser H.W., Tsujimoto S., Gordon L., Olsen A.S. (1998) *Regions of sex-specific hypo- and hyper-recombination identified through integration of 180 genetic markers into the metric physical map of human chromosome 19*. Genomics, **47**:153-162.
- Morgan J.G., Dolganov G.M., Robbins S.E., Hinton L.M., Lovett M. (1992) *The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes*. Nucleic Acids Res, **20**(19):5173-5179.
- Moslehi R., Langlois S., Yam I., Friedman J.M. (1998) *Linkage of malignant hyperthermia and hyperkalemic periodic paralysis to the adult skeletal muscle sodium channel (SCN4A) gene in a large pedigree*. Am J Med Genet, **76**:21-27.
- Mount S.M. (1982) *A catalogue of splice junction sequences*. Nucleic Acids Res, **10**(2):459-472.
- Mouse Genome Database (MGD) (1998), Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web (URL: <http://www.informatics.jax.org/>).
- Moyzis R.K., Torney D.C., Meyne J., Buckingham J.M., Wu J.R., Burks C., Sirotkin K.M., Goad W.B. (1989) *The distribution of interspersed repetitive DNA sequences in the human genome*. Genomics, **4**(3):273-89.
- Mulley J.C., Kozman H.M., Phillips H.A., Gedeon A.K., McCure J.A., Iles D.E., Gregg R.G., Hogan K., Couch F.J., MacLennan D.H., Haan E.A. (1993) *Refined genetic localization for central core disease*. Am J Hum Genet, **52**(2):398-405.
- Mullis K.B. & Faloona F. (1987) *Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction*. Methods Enzymol., **155**:335-350.
- Murray J.C., Buetow K.H., Weber J.L., Ludwigsen S., Scherpbier-Heddema T., Manion F., Quillen J., Sheffield V.C., Sunden S., Duyk G.M., et al (1994) *A comprehensive human linkage map with centimorgan density*. Cooperative Human Linkage Center (CHLC). Science, **265**(5181):2049-2054.

- Nelson D.L., Ledbetter S.A., Corbo L., Victoria M.F., Ramirez-Solis R., Webster T.D., Ledbetter D.H., Caskey C.T. (1989) *Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources*. Proc. Natl. Acad. Sci., **86**(17):6686-6690.
- Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. (1990) *A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells*. Nucleic Acids Res, **18**(20):6169.
- NN (1988) Central core disease. (Editorial, keine Angabe der Autorschaft) Lancet, **1**(8590):866.
- Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L. (1988) *Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction*. Genetics, **120**(3):621-623.
- Ogawa Y. (1994) *Role of Ryanodine Receptors*. Crit Rev Biochem Mol Biol, **29**(4):229-274.
- Ohta S., Tomura H., Matsuda K., Kagawa Y. (1988) *Gene structure of the human mitochondrial adenosine triphosphate synthase beta subunit*. J Biol Chem, **263**(23):11257-11262.
- Ohno S., Emori Y., Suzuki K. (1986) *Nucleotide sequence of a cDNA coding for the small subunit of human calcium-dependent protease*. Nucl Ac Res, **14**(13):5559.
- Ohno S., Minoshima S., Kudoh J., Fukuyama R., Shimizu Y., Ohmi-Imajoh S., Shimizu N., Suzuki K. (1990) *Four genes of the calpain family locate on four distinct human chromosomes*. Cytogenet Cell Genet, **53**:225-229.
- Olckers A., Meyers D.A., Meyers S., Taylor E.W., Fletcher J.E., Rosenberg H., Isaacs H., Levitt R.C. (1992) *Adult muscle sodium channel alpha-subunit is a gene candidate for malignant hyperthermia susceptibility*. Genomics, **14**: 829-831.
- Olthoff D. & Vonderlind C. (1997) *Anästhesie-unabhängige Auslösung einer tödlichen Maligne Hyperthermie-Krise*. Anaesthesist, **46**:1076-1080.
- Ørding (1985) *Incidence of Malignant Hyperthermia in Denmark*. Anaesth Analg, **64**:700-704.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989) *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms*. Proc Natl Acad Sci, **86**(8):2766-2770.
- Orlova E.V., Serysheva I.I., van Heel M., Hamilton S.L., Chiu W. (1996) *Two structural configurations of the skeletal muscle calcium release channel*. Nat Struct Biol, **3**(6):547-552.

- Otsu K., Willard H.F., Khanna V.K., Zorzato F., Green N.M., MacLennan D.H. (1990) *Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum*. J Biol Chem, **265**(23):13472-13483.
- Parimoo S., Patanjali S.R., Shukla H., Chaplin D.D., Weissman S.M. (1991) *cDNA selection: efficient PCR approach for the selection of cDNAs encoded in large chromosomal DNA fragments*. Proc Natl Acad Sci, **88**(21):9623-9627.
- Phillips M.S., Khanna V.K., De Leon S., Frodis W., Britt B.A., MacLennan D.H. (1994) *The substitution of Arg for Gly²⁴³³ in the human skeletal muscle ryanodine receptor is associated with malignant hyperthermia*. Hum Mol Genet, **3**(12):2181-2186.
- Phillips M.S., Fujii J., Khanna V.K., DeLeon S., Yokobata K., de Jong P.J., MacLennan D.H. (1996) *The structural organization of the human skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene*. Genomics, **34**(1):24-41.
- Possek S., Lombes A., Ogier de Baulny H., Cheval M.A., Fardeau M., Kadenbach B., Romero N.B. (1995) *Immunohistochemical analysis of muscle cytochrome c oxidase deficiency in children*. Histochem Cell Biol, **103**(1):59-68.
- Presti C.F., Jones L.R., Lindemann J.P. (1985a) *Isoproterenol-induced phosphorylation of a 15-kilodalton sarcolemmal protein in intact myocardium*. J Biol Chem, **260**(6):3860-3867.
- Presti C.F., Scott B.T., Jones L.R. (1985b) *Identification of an endogenous protein kinase C activity and its intrinsic 15-kilodalton substrate in purified canine cardiac sarcolemmal vesicles*. J Biol Chem, **260**(25):13879-13889.
- Ptacek L.J., Gouw L., Kwincinski H., McManis P., Mendell J.R., Barohn A.L. Jr., Robertson M., Leppert, M. F. (1993) *Sodium channel mutations in paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis*. Ann Neurol, **33**:300-307.
- Püschel F., Schubert-Thiele I., Hirth L., Benkmann H.G., Brinkmann B. (1978) *Maligne Hyperthermie in der 13. Vollnarkose*. Anaesthesist, **27**:488-491.
- Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., Werner T. (1995) *MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data*. Nucl Ac Res, **23**(23):4878-4884.
- Quane K.A., Healy J.M., Keating K.E., Manning B.M., Couch F.J., Palmucci L.M., Doriguzzi C., Fagerlund T.H., Berg K., Ording H., Bendixen D, Mortier W., Linz U., Müller C.R., McCarthy T.V. (1993) *Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia*. Nat Genet, **5**:51-55.

- Quane K.A., Keating K.E., Healy J.M., Manning B.M., Krivosic-Horber R., Krivosic I., Monnier N., Lunardi J., McCarthy T.V. (1994) *Mutation screening of the RYR1 gene in malignant hyperthermia: detection of a novel Tyr to Ser mutation in a pedigree with associated central cores*. Genomics, **23**:236-239.
- Reguigne-Arnould I., Faure S., Chery M., Mota-Vieira L., Mollicone R., Candelier J. J., Oriol R., Couillin P. (1996) *Physical Mapping of 49 Microsatellite Markers on Chromosome 19 and Correlation with the Genetic Linkage Map*. Genomics, **32**(3):458-461.
- Richard I., Broux O., Allamand V., Fougerousse F., Chiannikulchai N., Bourg N., Brenguier L., Devaud C., Pasturaud P., Roudaut C., et al (1995) *Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. Cell, **81**(1):27-40.
- Robinson R.L., Monnier N., Wolz W., Jung M., Reis A., Nuernberg G., Curran J.L., Monsieurs K., Stieglitz P., Heytens L., Fricker R., van Broeckhoven C., Deufel T., Hopkins P.M., Lunardi J., Mueller C.R. (1997) *A genome wide search for susceptibility loci in three European malignant hyperthermia pedigrees*. Hum Mol Genet, **6**(6):953-961.
- Roewer N (1991) *Maligne Hyperthermie heute*. A I N S, **26**:429-500.
- Romero N.B., Nivoche Y., Lunardi J., Bruneau B., Cheval M.A., Hillaire D., Fardeau M. (1993) *Malignant hyperthermia and central core disease: analysis of two families with heterogeneous clinical expression*. Neuromuscul Disord, **3**(5-6):547-551.
- Rouquier S., Giorgi D., Trask B., Bergmann A., Phillips M.S., MacLennan D.H., de Jong P. (1993) *A cosmid and yeast artificial chromosome contig containing the complete ryanodine receptor (RYR1) gene*. Genomics, **17**:330-340.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci, **74**(12):5463-5467.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saido T.C., Sorimachi H., Suzuki K. (1994) *Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement*. FASEB J, **8**(11):814-822.
- Scheja K. & Kadenbach B. (1992) *Nucleotide sequence of cDNA encoding subunit VIII of cytochrome c oxidase from rat heart*. Biochim Biophys Acta, **1132**(1):91-93.
- Scherer S. & Tsui L.C. (1991) *Cloning and Analysis of Large DNA Molecules*. in: Advanced Techniques in Chromosome Research (KW Adolph, Hrsg.), New York: Marcel Dekker, 33-72.

- Schlerf A., Droste M., Winter M., Kadenbach B. (1988) *Characterization of two different genes (cDNA) for cytochrome c oxidase subunit VIa from heart and liver of the rat.* EMBO J, **7**(8):2387-2391.
- Schwartz D.C., Saffran W., Welsh J., Haas R., Goldenberg M., Cantor C.R. (1983) *New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging.* Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, **47**:189-195.
- Schwartz D.C. & Cantor C.R. (1984) *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.* Cell, **37**:67-75.
- Seelan R.S. & Grossman L.I. (1991) *Cytochrome c oxidase subunit VIIa isoforms. Characterization and expression of bovine cDNAs.* J Biol Chem, **266**(29):19752-19757.
- Seelan R.S. & Grossman L.I. (1993) *Structural organization and evolution of the liver isoform gene for bovine cytochrome c oxidase subunit VIIa.* Genomics **18**:527-36.
- Schwemmler S., Wolff K., Palmucci L.M., Grimm T., Lehmann-Horn F., Hubner C., Hauser E., Iles D.E., MacLennan D.H., Muller C.R. (1993) *Multipoint mapping of the central core disease locus.* Genomics, **17**(1):205-207.
- Seelan R.S. & Grossman L.I. (1992) *Structure and organization of the heart isoform gene for bovine cytochrome c oxidase subunit VIIa.* Biochemistry, **31**(19):4696-4704.
- Seelan R.S. & Grossman L.I. (1993) *Structural organization and evolution of the liver isoform gene for bovine cytochrome c oxidase subunit VIIa.* Genomics, **18**:527-536.
- Seelan R.S., Gopalakrishnan L., Scarpulla R.C., Grossman L.I. (1996) *Cytochrome c oxidase subunit VIIa liver isoform. Characterization and identification of promoter elements in the bovine gene.* J Biol Chem, **271**(4):2112-2120.
- Shah Z.H., Migliosi V., Miller S.C., Wang A., Friedman T.B., Jacobs H.T. (1998) *Chromosomal locations of three human nuclear genes (RPSM12, TUFM, and AFG3L1) specifying putative components of the mitochondrial gene expression apparatus.* Genomics, **48**(3):384-388.
- Shiojima I., Komuro I., Mizuno T., Aikawa R., Akazawa H., Oka T., Yamazaki T., Yazaki Y. (1996) *Molecular cloning and characterization of human cardiac homeobox gene CSX1.* Circ-Res, **79**(5):920-929.
- Shibley J.M., Miller R.D., Wu B.M., Grubb J.H., Christensen S.G., Kyle J.W., Sly W.S. (1991) *Analysis of the 5' flanking region of the human beta-glucuronidase gene,* Genomics, **10**(4):1009-1018.

- Shuaib A., Paasuke R.T., Brownell K.W. (1987) *Central core disease. Clinical features in 13 patients*. *Medicine*, **66**(5):389-396.
- Shy G.M. & Magee K.R. (1956) *A new congenital non-progressive myopathy*. *Brain* **79**: 610-621.
- Smith E.R., Heffernan L.P., Sangalang V.E., Vaughan L.M., Flemington C.S. (1976) *Voluntary muscle involvement in hypertrophic cardiomyopathy. A study of eleven patients*. *Ann Intern Med*, **85**(5):566-572.
- Sorimachi H., Saido TC., Suzuki K. (1994) *New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains*. *FEBS Lett*, **343**:1-5.
- Sorrentino V., Giannini G., Malzac P., Mattei M.G. (1993) *Localization of a novel ryanodine receptor gene (RYR3) to human chromosome 15q14-q15 by in situ hybridization*. *Genomics*, **18**(1):163-165.
- Southern E.M. (1975) *Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis*, *J Mol Biol*, **98**:503-517.
- Strachan T. & Read A.P. (1996) *Molekulare Humangenetik*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.O.].
- Stubbs L., Carver E.A., Shannon M.E., Kim J., Geisler J., Generoso E.E., Stanford B.G., Dunn W.C., Mohrenweiser H., Zimmermann W., Watt S.M., Ashworth L.K. (1996) *Detailed comparative map of human chromosome 19q and related regions of the mouse genome*. *Genomics*, **35**(3):499-508.
- Suzuki K., Sorimachi H., Yoshizawa T., Kinbara K., Ishiura S. (1995) *Calpain: novel family members, activation, and physiologic function*. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **376**(9):523-529.
- Taanman J.W., Schrage C., Ponne N., Piet Bolhuis, de Vries H., Agsteribbe E. (1989) *Nucleotide sequence of cDNA encoding subunit VIb of human cytochrome c oxidase*. *Nucl Ac Res*, **17**(4):1766.
- Taanman JW, Schrage C, Bokma E, Reuvekamp P, Agsteribbe E, De Vries H (1991) *Nucleotide sequence of the last exon of the gene for human cytochrome c oxidase subunit VIb and its flanking regions*. *Biochim Biophys Acta*, **1089**(2):283-285.
- Taanman J.W., Herzberg N.H., De Vries H., Bolhuis P.A., and Van den Bogert C. (1992) *Steady-state transcript levels of cytochrome c oxidase genes during human myogenesis indicate subunit switching of subunit VIa and co-expression of subunit VIIa isoforms*. *Biochim Biophys Acta*, **1139**: (1-2) 155-62.

- Tagle D.A., Swaroop M., Lovett M., Collins F.S. (1993) *Magnetic bead capture of expressed sequences encoded within large genomic segments*. Nature, **361**(6414):751-753.
- Takeshima H., Nishimura S., Matsumoto T., Ishida H., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Ueda M., Hanaoka M., Hirose T., et al (1989) *Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor*. Nature, **339**(6224):439-445.
- Tanabe T., Beam K.G., Powell J.A., Numa S. (1988) *Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA*. Nature, **336**(6195):134-139.
- Tanahashi N., Suzuki M., Fujiwara T., Takahashi E., Shimbara N., Chung C.H., Tanaka K. (1998) *Chromosomal localization and immunological analysis of a family of human 26S proteasomal ATPases*. Biochem Biophys Res Commun, **243**(1):229-232.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) *A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes*. Cell, **72**(6):971-983.
- Tiranti V., Munaro M., Sandona D., Lamantea E., Rimoldi M., DiDonato S., Bisson R., Zeviani M. (1995) *Nuclear DNA origin of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome: genetic evidence based on patient's-derived rho degrees transformants*. Hum Mol Genet, **4**(11):2017-2023.
- Tong J., Oyamada H., Demareux N., Grinstein S., McCarthy T.V., MacLennan D.H. (1997) *Caffeine and halothane sensitivity of intracellular Ca²⁺ release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease*. J Biol Chem, **272**(42):26332-26339.
- Tritschler H.J., Bonilla E., Lombes A., Andretta F., Servidei S., Schneyder B., Miranda A.F., Schon E.A., Kadenbach B., DiMauro S. (1991) *Differential diagnosis of fatal and benign cytochrome c oxidase-deficient myopathies of infancy: an immunohistochemical approach*. Neurology, **41**(2):300-305.
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S. (1996) *The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å*. Science, **272**(5265):1136-1144.
- Virbasius, J.V. & Scarpulla, R.C. (1991) *Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene*. Mol Cell Biol, **11**(11):5631-5638.

- Vita G., Migliorato A., Baradello A., Mazzeo A., Rodolico C., Falsaperla R., Messina C. (1994) *Expression of cytoskeleton proteins in central core disease*. J Neurol Sci, **124**:71-76.
- Wallace R.H., Wang D.W., Singh R., Scheffer I.E., George A.L. Jr., Phillips H.A., Saar K., Reis A., Johnson E.W., Sutherland G.R., Berkovic S.F., Mulley J.C. (1998) *Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B*. Nat Genet, **19**(4):366-370.
- Wallgren-Pettersson C., Avela K., Marchand S., Kolehmainen J., Tahvanainen E., Hansen F.J., Muntoni F., Dubowitz V., de Visser M., Van Langen I.M., Laing N.G., Faure S., de la Chapelle A. (1995) *A gene for autosomal recessive nemaline myopathy assigned to chromosome 2q by linkage analysis*. Neuromusc Disord, **5**:441-443.
- Wallgren-Pettersson C. & Clarke A. (1997) *Congenital Myopathies in: Emery and Rimoin's Principles and practice of medical genetics*. Hrsg.: Rimoin D.L., Connor J.M., Pyeritz R.E., 3. Aufl., Churchill Livingstone, New York.
- Ward T. & Davies K.E. (1993) *The leading role of STSs in genome mapping*. Hum Mol Genet, **2**(8): 1097-1098.
- Weber J.L. & May P. (1989) *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. Am J Hum Genet, **44**:388-396.
- Weber J.L. (1990) *Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms*. Genomics, **7**:524-530.
- Wedel D.J. (1992) *Malignant hyperthermia and neuromuscular disease*. Neuromuscul Disord, **2**(3):157-64.
- Weishaupt A. & Kadenbach B. (1992) *Selective removal of subunit VIIb increases the activity of cytochrome c oxidase*. Biochemistry, **31**(46):11477-11481.
- Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.
- Wolz W., Wendelmuth U., Rouquier S., Giorgi D., Müller C.R. (1996) *A complex satellite DNA polymorphism flanking the ryanodine receptor gene (RYR1)*. Cytogenet Cell Genet, **72**(5):215-216.
- Wolz W., Kress W., Mueller C.R. (1997) *Genomic sequence and organization of the human gene for cytochrome c oxidase subunit (COX7A1) VIIa-M*. Genomics, **45**(2):438-442.
- Yerle M., Lahbib-Mansais Y., Pinton P., Robic A., Goureau A., Milan D., Gellin J. (1997) *The cytogenetic map of the domestic pig (Sus scrofa domestica)*. Mamm. Genome **8**:592-607.

- Yoshimura N., Murachi T., Heath R., Kay J., Jasani B., Newman G.R. (1986) *Immunogold electron-microscopic localisation of calpain I in skeletal muscle of rats*. Cell Tissue Res, **244**(2):265-70.
- Zhang Y., Chen H.S., Khanna V.K., De Leon S., Phillips M.S., Schappert K., Britt B.A., Browell A.K., MacLennan D.H. (1993) *A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central core disease*. Nat Genet, **5**(1):46-50.
- Zorzato F., Fujii J., Otsu K., Phillips M., Green N.M., Lai F.A., Meissner G., MacLennan D.H. (1990) *Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum*. J Biol Chem, **265**(4):2244-2256.

7. Zusammenfassung

Central Core Disease (CCD) ist eine neuromuskuläre Erkrankung aus dem Formenkreis der kongenitalen Myopathien. Die Symptomatik umfaßt eine verzögerte motorische Entwicklung, eine nicht bis schwach progrediente Schwäche der Extremitätenmuskulatur mit Betonung der distalen, unteren Gliedmaßen sowie Defekte des Skeletapparates wie Kyphoskoliosen, Kontrakturen und Fußanomalien. Die Zentralfibrillen-Myopathie, wie man die Erkrankung im Deutschen nennt, imponiert durch eine mehr oder minder regelmäßige Assoziation mit der Veranlagung zur Malignen Hyperthermie (MHS), die wiederum von Mutationen im Ryanodinrezeptorgen (*RYRI*), einem sarkoplasmatischen Calciumkanal, verursacht wird.

In genetischen Familienanalysen wurde die CCD ebenfalls zum *RYRI*-Gen auf dem Humanchromosom 19q13.1 kartiert, womit dieses Gen zum Kandidatengen für CCD avancierte. Es wurden in einigen wenigen Familien Mutationen im *RYRI*-Gen gefunden, die man für ursächlich für die Ausprägung der CCD hält. Mittlerweile häuften sich aber Hinweise, daß die CCD, ebenso wie die MHS heterogene Ursachen haben kann und damit die Rolle des *RYRI*-Gens als Kandidat für das CCD-Gen zunehmend in Frage gestellt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Feinkartierung von CCD-Familien vorangetrieben, indem neue Familien gesammelt wurden und ein neuer, zusammengesetzter Mini-/Mikrosatelliten-Marker charakterisiert wurde, der für die Feinkartierung an CCD-Familien eingesetzt werden konnte. Des weiteren wurden neuere Mikrosatelliten-Marker des Genethon-Konsortiums angewendet und die Koppelung der CCD-Familien zu Chromosom 19q13.1 konnte bestätigt werden, allerdings mit einigen Ausnahmen, so daß bei CCD ebenfalls heterogene Ursachen angenommen werden können. Ein weiteres Kandidatengen wurde mit dem MYH7-Gen für die β -Kette des schweren Myosins auf Chromosom 14 vorgeschlagen, dies konnte aber weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Um die Rolle des *RYRI*-Gens für die CCD zu eruieren wurden die häufigsten bisher bei MHS-Familien gefundenen *RYRI*-Mutationen an CCD-Patienten untersucht. Lediglich in einer CCD/MHS-Familie konnte eine bereits bekannte Mutation bestätigt werden, das *RYRI*-Gen konnte nicht als verursachendes Gen der CCD bestätigt werden, allerdings konnte nicht das komplette Gen untersucht werden, aufgrund der großen Anzahl von Exons und der Größe des Gens.

Ein zweiter Teil der Arbeit bestand in der Suche nach neuen Transkripten aus Muskelgewebe in der genomischen Region 19q13.1 mit dem Endziel der Erstellung einer Transkriptionskarte dieser Region. Hier kam die cDNA-Selektion zur Anwendung mit einer PCR-amplifizierten cDNA-Bibliothek aus Muskelgewebe sowie ein gut charakterisiertes Cosmid-Contig aus dem Bereich des *RYR1*-Gens. Es konnte lediglich ein kurzes Transkript isoliert werden, das auf den genomischen Ursprung zurückkartiert, aber es konnte nicht näher charakterisiert werden.

Der dritte Teil der Arbeit stand im Zeichen der Kandidatengensuche im betreffenden Abschnitt q13.1 des Chromosoms 19. Anhand von genetischen Karten und Gendatenbanken sollten Gene gesucht werden, die in diesen Bereich kartieren und eine Expression im Skelettmuskel aufweisen und damit als Kandidat für die CCD in Frage kommen. Es wurden zwei Gene für nukleär codierte Untereinheiten der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase untersucht. Von dem Gen, das die muskelspezifische Isoform von COX VIIa codiert, konnte die genomische Sequenz und die Exon-Intron Struktur ermittelt werden sowie eine Promotor-Analyse anhand einer Datenbanksuche durchgeführt werden. Der Vergleich mit der Sequenz des homologen Gen des Rindes ergab, daß es sich um ein evolutionär konserviertes Gen handelt mit dem typischen Eigenschaften eines Haushaltsgens.

Ein weiteres Kandidatengens stellt das Gen für die kleine Untereinheit des Calpains dar, das möglicherweise direkt in die elektromechanische Koppelung zwischen Nerv und Muskel involviert ist und mit dem Ryanodinrezeptor interagiert. CCD-Patienten wurden mit der SSCP-Methode (Single-stranded conformation polymorphism) auf Mutationen in den Exons sowohl des *COX7A1*-Gens als auch des *CANPS*-Gens untersucht. In beiden Fällen konnten keine Mutationen gefunden werden. Die Suche nach dem CCD-Gen ist also nach wie vor offen.

8. Abstract

Central Core disease (CCD) is a neuromuscular disorder belonging to the group of the congenital (structural) myopathies. The main features are delayed development of motor milestones, slowly progressing weakness of the lower limbs, as well as defects of the skeleton such as kyphoscoliosis, contractures and abnormalities of the feet. Central Core myopathy is strongly associated with susceptibility to Malignant Hyperthermia (MHS), partly caused by mutations in the gene coding for the ryanodine receptor (*RYR1*), the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum.

Linkage analysis in CCD families mapped the disease locus to the human chromosome region 19q13.1 including the *RYR1* gene, suggesting *RYR1* as a candidate gene for CCD. A few private *RYR1* mutations were found in some families suggesting to underlie the disease in these families. Recently, a growing body of evidence has shown that CCD, like MHS, may be due to heterogenous causes, raising doubt about the role of *RYR1* as a candidate for the CCD gene.

The present work contributes to the fine mapping of the disease locus by investigating more families. A new, compound mini-/microsatellite repeat was characterised in the region. This repeat and several recently described microsatellite repeat markers of the Généthon collection were applied for haplotype analysis in CCD families. Linkage to chromosome 19q13.1 was partly confirmed, although some recombinants suggest, in some cases, heterogeneity in the development of Central Core disease. Another candidate gene was proposed, the β -myosin heavy chain gene, which maps to chromosome 14; however, this could neither be confirmed nor denied within the investigated families, on the basis of linkage and mutation analysis.

In order to analyse the role of the *RYR1* gene in CCD, DNA of affected individuals was screened for the most common *RYR1* mutations found in MHS patients. Only one previously described mutation could be confirmed segregating in a family, therefore, the *RYR1* gene seems most likely not to be responsible for the disease mechanism. According to the large number of exons and the length of the gene, the analysis of the complete gene was not feasible.

The second part of the work aimed at searching for new transcripts from skeletal muscle coded by genes in the genomic region 19q13.1. Using a direct cDNA selection technique a

transcription map of this region should be established. The cDNA selection procedure used here was based on a PCR-amplified cDNA library from skeletal muscle and a cosmid contig covering the whole *RYRI* gene region. A small transcript could be isolated, which hybridises exclusively to the genomic origin, however, further characterisations were unfortunately not successful.

The third part of the work dealt with the search for other candidate genes in the genomic region 19q13.1 in public databases. Both the genomic location as well as expression in skeletal muscle were main criteria used for the selection of a possible candidate gene. Two genes for nuclear coded subunits of cytochrome c oxidase were analysed. DNA sequence and exon-intron organisation of the gene for the muscle-specific isoform of COX VIIa was established and the promoter region of the gene was analysed by database query. Comparison with the homologous bovine gene showed typical structures of a house-keeping gene which is evolutionary well conserved.

Another potential candidate was the gene of the small calpain subunit. This protein is possibly involved in excitation-contraction coupling and shows direct interaction with the ryanodine receptor. CCD patients were screened for mutations in the *COX7A1* and *CANPS* genes using SSCP (single-stranded conformation polymorphism) technique. No alterations were found in either genes. The CCD genes still have to be found.

Publikationsliste

- W. Wolz**, T. Grimm und C. R. Mueller (1992) *Konduktorinnen-Diagnostik mit (CA)_n-repeats im Dystrophin-Gen*. Medizinische Genetik, 4:44-48.
- Janocha S., **Wolz W.**, Srsen S., Srsnova K., Montagutelli X., Guenet J.L., Grimm T., Kress W., Muller C.R. (1994) *The human gene for alkaptonuria (AKU) maps to chromosome 3q*. Genomics, 7:5-8.
- Weber B.H., Vogt G., **Wolz W.**, Ives E.J., Ewing C.C. (1994) *Sorsby's fundus dystrophy is genetically linked to chromosome 22q13-qter*. Nat Genet, 7:158-161.
- Werner Wolz**, Ute Wendelmuth, Sylvie Rouquier, Dominique Giorgi and Clemens R. Müller (1996) *A complex satellite DNA polymorphism flanking the ryanodine receptor gene (RYR1)*. Cytogenet Cell Genet, 72(5):215-216.
- Alessandra Baumer, Ulrike Bernthaler, **Werner Wolz**, Holger Hoehn, Detlev Schindler (1996) *New Mutations in the ataxia telangiectasia gene*. Human Genetics, 98:246-249.
- Robinson R.L., Monnier N., **Wolz W.**, Jung M., Reis A., Nuernber G., Curran J.L., Monsieurs K., Stieglitz P., Heytens L., Fricker R., van Broeckhoven C., Deufel T., Hopkins P.M., Lunardi J., Mueller C.R. (1997) *A genome wide search for susceptibility loci in three European malignant hyperthermia pedigrees*. Hum Mol Genet, 6(6):953-961.
- Wolz W.**, Kress W., Mueller C.R. (1997) *Genomic sequence and organization of the human gene for cytochrome c oxidase subunit (COX7A1) VIIa-M*. Genomics, 45(2):438-442.
- Manning B.M., Quane K.A., Lynch P.J., Urwyler A., Tegazzin V., Krivosic-Horber R., Censier K., Comi G., Adnet P., **Wolz W.**, Lunardi J., Muller C.R., McCarthy T.V. (1998) *Novel mutations at a CpG dinucleotide in the ryanodine receptor in malignant hyperthermia*. Hum Mutat, 11(1):45-50.
- Manning B.M., Quane K.A., Ording H., Urwyler A., Tegazzin V., Lehane M., O'Halloran J., Hartung E., Giblin L.M., Lynch P.J., Vaughan P., Censier K., Bendixen D., Comi G., Heytens L., Monsieurs K., Fagerlund T., **Wolz W.**, Heffron J.J., Muller C.R., McCarthy T.V. (1998) *Identification of novel mutations in the ryanodine-receptor gene (RYR1) in malignant hyperthermia: genotype-phenotype correlation*. Am J Hum Genet, 62(3):599-609.

Lebenslauf

Name	••••• Werner Wolz
Adresse	••••• Universität Würzburg ••••• Institut für Humangenetik ••••• Biozentrum, Am Hubland ••••• 97074 Würzburg ••••• Tel: 0931 888 4061 ••••• Fax: 0931 888 4069 ••••• e-mail: weenie@biozentrum.uni-wuerzburg.de ••••• WWW: www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/ ••••• humangenetics/weenie/weenie.html
Adresse privat	••••• In der Ebene 11 ••••• 97218 Gerbrunn
Geburtsdatum	••••• 02. Februar 1963
Geburtsort; Nationalität	••••• Sachsenhausen/Wertheim; Deutsch
Familienstand/Kinder	••••• ledig/keine
Schulbildung	••••• 1969-73 Grundschule Sachsenhausen ••••• 1973-83 Dietrich Bonhoeffer Gymnasium Wertheim ••••• 06.1983 Abitur ••••• Leistungskurse: Bildende Kunst und Biologie
berufliche Tätigkeit	••••• 07.1983-12.1983 Packer, Firma Glaswerk Wertheim, Wertheim ••••• 05.1984-10.1985 Arbeiter, Haslocher Ausziehtisch- und ••••• Möbelfabrik, Hasloch
Studium	••••• Biologie Diplom, Julius Maximilians Universität Würzburg ••••• Grundstudium 1985-87: Vorlesungen und Praktika in Botanik, ••••• Zoologie, Chemie und Mathematik, ••••• Vordiplom: 1988 ••••• Hauptstudium 1988-92: Hauptfach Zoologie mit Schwerpunkt ••••• Ökologie und Angewandte Zoologie, Nebenfächer Botanik mit ••••• Schwerpunkt Experimentelle Ökologie und Geobotanik, ••••• Humangenetik und Physiologische Chemie ••••• Diplomprüfung: 1993 ••••• Diplomarbeit 1992-1993 Institut für Humangenetik, Thema: ••••• Anwendung von Mikrosatelliten als genetische Marker ••••• Abschluss Diplom Biologe ••••• Promotion 1994-1999 Institut für Humangenetik, Thema: ••••• Molekulargenetische Analyse der Central Core Disease