



universität
wien

DISSERTATION

Systematische Mutationsanalyse des Ryanodinrezeptors 1 bei österreichischen Familien mit nachgewiesener maligner Hyperthermie Disposition

angestrebter akademischer Grad

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Alexius Kaufmann
Matrikel-Nummer: 9150977
Dissertationsgebiet (lt. Studienblatt): Mikrobiologie und Genetik
Betreuerin / Betreuer: Ass. Prof. Dr Lukas Weigl

Wien, am 04. Juni 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Die maligne Hyperthermie	10
1.1.1	Klinische Symptome einer MH-Krise	10
1.1.2	Diagnose mittels IVCT	12
1.2	Die Muskulatur	14
1.2.1	Das Muskelgewebe.....	14
1.2.2	Koppelung zwischen Erregung und Kontraktion: elektromechanische Koppelung	18
1.3	Calcium Homöostase	19
1.3.1	OFF-Signal	20
1.3.1.1	Der Na ⁺ /Ca ²⁺ Austauscher NCX	21
1.3.1.2	Die Plasmamembran Ca ²⁺ ATPase PMCA	21
1.3.1.3	Die Sarkoplasmatisch/Endoplasmatische Ca ²⁺ ATPase SERCA.....	22
1.3.2	ON-Signal: Influx	22
1.3.2.1	Store-operated channels SOCs	22
1.3.2.2	Voltage Operated Ca ²⁺ Channels VOCCs.....	23
1.3.3	ON-Signal: Release	23
1.3.3.1	Die Ca ²⁺ Freisetzungskanäle des sarcoplasmatischen Retikulums	23
1.3.4	Die Familie der Ryanodin Rezeptoren	24
1.3.5	Die Pore des RYR1	26
1.3.6	Die Evolution des RYR1	28
1.3.7	Splice-Varianten	28
1.3.8	Calsequestrin, Triadin und Junctin	29
1.3.9	Modulatoren des RYR1	31
1.3.9.1	Ca ²⁺	31
1.3.9.2	Calmodulin: ein cytoplasmatischer Ca ²⁺ Sensor	31
1.3.9.3	ATP und Mg ²⁺	32
1.3.9.4	FK506-Binding Protein FKBP12	33
1.3.10	Spezifische Testsubstanzen bzw. Aktivatoren des RYR1	34
1.3.10.1	Koffein	34
1.3.10.2	Chlorkresol (4-Chloro- <i>m</i> -cresole)	34
1.3.10.3	Halothan	35
1.4	Die MH-Krise auf zellulärer Ebene.....	36
1.5	Diagnose mittels genetischen Tests	37
2	Material-Methoden	41
2.1	Der IVCT	41
2.2	Zellkultur	43
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	46
2.3.1	Herstellung von cDNA mittels reverser Transkriptase.....	47
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
2.3.3	Sequenzierung	52
2.3.4	Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	53
2.3.4.1	Genexpressionsstudie	54
2.4	Physiologische Methoden.....	55
2.4.1	Ca ²⁺ -Imaging mit dem Calcium sensitiven Farbstoff Fura-2/AM.....	55
2.5	Verwendete Lösungen und Materialien.....	60
Ergebnisse		65
2.6	Genetisches Screening der MH „hot spot“ Regionen im RYR1	65

2.7	Sequenzierung des kompletten Ryanodin Rezeptors ausgewählter österreichischer MH-Individuen	65
2.7.1	Familie A: RYR1 Mutation p.Trp3985Arg und p.Gln3756Glu	66
2.7.1.1	Die Mutationen p.Trp3985Arg und p.Gln3756Glu.....	69
2.7.1.2	Charakterisierung von p.Trp3985Arg	72
2.7.1.3	Genexpressionsstudie	75
2.7.2	Familie B: RYR1 Mutation p.Ala612Pro	81
2.7.2.1	Gefundene Mutationen.....	83
2.7.2.2	Charakterisierung der Mutation p.Ala612Pro auf zellulärer Ebene.....	84
2.7.3	Familie C: RYR1 Mutationen p.Arg2458His, p.Arg3348Cys und p.Arg2458His+ p.Arg3348Cys.....	89
2.7.3.1	Gefundene Mutationen.....	93
2.7.3.2	Charakterisierung von p.Arg2458His, p.Arg3348Cys und p.Arg2458His+ p.Arg3348Cys	94
2.7.4	Zusammenfassung und Vergleich der erzielten Ergebnisse	103
3	Diskussion	105
3.1	Genetisches Screening:.....	105
3.2	Sequenzierung des gesamten RYR1 ausgewählter österreichischer MH Patienten	105
3.2.1	Familie A: Mutation p.Trp3985Arg	105
3.2.1.1	Sequenzanalyse	107
3.2.1.2	Sekundärstrukturanalyse der Region um Position 3985 des RYR1	111
3.2.1.3	Die “RYR and IP3R Homology“ (RHI) Region	114
3.2.1.4	Genexpressionsstudie	115
3.2.2	Familie B: RYR1 Mutation p.Ala612Pro	116
3.2.2.1	Sequenzanalyse	116
3.2.2.2	Die Region um Ala612.....	118
3.2.3	Familie C: RYR1 Mutation p.Arg2458His, p.Arg3348Cys und p.Arg2458His.p.Arg3348Cys	122
3.2.3.1	Die Missense Mutation p.Arg2458His.....	122
3.2.3.2	Die Missense Mutation p.Arg3348Cys	122
3.2.3.3	Die Mutationen p.Arg3348Cys, p.Arg2458His und p.Arg3348Cys+p.Arg2458His	125
4	Literaturliste.....	128
5	Anhang mit Publikation.....	136

Abkürzungsverzeichnis:

ACh	Acetylcholin
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine
[Ca²⁺]	Calcium Konzentration
[Ca²⁺]_i	intrazelluläre freie Calcium Konzentration
CaM	Calmodulin
CHCT	Caffein-Halothane contracture test
CICR	Ca²⁺ induced Ca²⁺ release (Ca²⁺ induzierte Ca²⁺ Freisetzung)
CK	Creatin-Kinase
CSQ	Calsequestrin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHPR	Dihydropyridine Rezeptor
DIC	Depolarisations-induzierte Ca²⁺ Freisetzung
DM	differentiation-medium (Differenzierungsmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EC	Erregung-Kontraktions-Koppelung (elektromechanische Koppelung)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal groth factor
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKBP12	12 kDa FK506-binding Protein
FKBP12.6	12.6 kDa FK506-binding Protein
Fura-2 AM	Azetomethylester des fluoreszierenden Farbstoffes Fura-2
GFP	green Fluoreszenz Protein
GM	groth-medium (Wachstumsmedium)
GST	gluthadion
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
IP₃	Inositol 1,4,5-triphosphat

IP₃R	Inositol 1,4,5-triphosphat Rezeptor
IVCT	In vitro contracture test
LZ	Leuzine Zipper
MHE	Maligne Hyperthermie Equivocal (Koffeintest oder Halothantest positiv)
MHEC	Maligne Hyperthermie Equivocal Koffein (nur Koffeintest positiv)
MHEH	Maligne Hyperthermie Equivocal Halothan (nur Halothantest positiv)
MHN	Maligne Hyperthermie Normal (Koffeintest und Halothantest negativ)
MHS	Maligne Hyperthermie Suseptible (Koffeintest und Halothantest positiv)
PSS	porcine stress syndrom
RYR1	Ryanodin Rezeptor des Skelettmuskels
RYR2	Ryanodin Rezeptor des Herz
RYR3	Ryanodin Rezeptor des Gehirns
SERCA	Sarko-Endoplasmatisches-Retikulum-Calcium-ATPase
SOCs	store-operated channels
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
VOC	Voltage operated Channel

Zusammenfassung

Mutationen im Ryanodin Rezeptor 1 (RYR1) von Skelettmuskelzellen sind die häufigste Ursache der malignen Hyperthermie (MH). Die MH ist eine genetisch bedingte Unverträglichkeit von volatilen Anästhetika und depolarisierenden Muskelrelaxantien, welche unbehandelt rasch zum Tod der anästhesierten Person führen kann. Die invasive und kostspielige MH Diagnostik mittels „*in vitro* Kontraktur Test“ (IVCT) – er basiert auf einer Muskelbiopsie – kann in bestimmten Fällen durch einen günstigeren genetischen Test ersetzt werden. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der exakten Position, sowie die erwiesene Kausalität der Mutation. Ziel meiner Dissertation ist, Mutationen im RYR1 von österreichischen Personen mit MH Disposition zu identifizieren und deren Kausalität zu beweisen.

Methoden: Bei 81 Personen mit nachgewiesener Disposition zur MH wurde ein genomisches Screening der MH „hot spot“ Regionen 1 und 2 (Exon 2, 9, 17, 39, 45, 46) auf bekannte Mutationen durchgeführt, und bei einigen Individuen, bei denen keine der häufigsten MH Mutationen nachgewiesen werden konnte, die komplette codierende mRNA bzw. cDNA des RYR1 amplifiziert und sequenziert, um eventuell neue Mutationen außerhalb der „hot spots“ zu identifizieren. Zum Nachweis der Kausalität neu gefundener Mutationen, wurden Ca^{2+} Imaging Experimente mit Fura-2/AM als Ca^{2+} sensitiven Farbstoff, und Koffein, Chlorkresol und Halothan als spezifische Testsubstanzen durchgeführt.

Resultate: Im Rahmen des genomischen Screenings konnten die Missense Mutationen p.Arg614Cys (Exon 17) bei zwei Personen und p.Arg2458Cys (Exon 46) bei einer Person nachgewiesen werden.

Bei der kompletten Sequenzierung des RYR1 von vier MHS Individuen, wurden die Mutationen p.Trp3985Arg und p.Gln3756Glu (Familie A) (Kaufmann et al. 2008), p.Ala612Pro (Familie B), p.Arg2458His und p.Arg3348His (Familie C) gefunden. Bei einem MHS Individuum konnte keine Missense Mutation im RYR1 detektiert werden. Ca^{2+} Freisetzungs-Experimente ergaben, dass alle Missense Mutationen relativ zur MHN Kontrollgruppe (außer p.Gln3756Glu, welche lediglich ein Polymorphismus ist), einen niedrigeren EC_{50} Wert für die getesteten Substanzen (außer Chlorkresol bei p.Arg3348His) aufwiesen. Weiters wurden die Missense Mutationen p.Ala400Pro und p.Arg2355Trp gefunden, welche neue Mutationen darstellen, deren funktionelle Charakterisierung jedoch noch ausständig ist.

Abstract

Missense mutations in the Ryanodine Receptor 1 (RYR1) of skeletal muscle cells are the most common cause of malignant hyperthermia (MH). MH is a genetic disorder leading to intolerance against volatile anaesthetics and depolarized muscle relaxants, which can lead to death when not treated properly. The invasive and expensive MH diagnosis via the „*in vitro* contracture test“ (IVCT) - it is based on a muscle biopsy - can be replaced in certain cases by a cheaper genomic blood test. Preconditions for this test are the knowledge of the exact position and the causality of the MH mutations. The goal of my dissertation is to identify mutations in RYR1 of Austrian individuals with MH disposition and to prove its causality.

Methods:

A genomic screening of the MH „hot spots“ regions 1 and 2 was performed to identify known mutations and the entire coded mRNA / cDNA of the RYR1 of individuals knowing not to harbour the most common MH mutations was amplified and sequenced in order to identify new mutations outside the „hot spots“. To prove the causality of the newly found mutations, I did Ca^{2+} imaging experiments with Fura-2/AM as a Ca^{2+} sensitive dye and caffeine, chlorocresol as well as halothane as specific Ca^{2+} releasing agents.

Results:

81 individuals have undergone the genomic screening. The missense mutation p.Arg614Cys (Exon 17) was identified in two persons and the p.Arg2458Cys (Exon 46) was found in one person.

The complete screening of the RYR1 of four MHS individuals showed the mutations p.Trp3985Arg and p.Gln3756Glu (family A) (Kaufmann et al. 2008), p.Ala612Pro (family B), p.Arg2458His and p.Arg3348His (family C). For one MHS individual no missense mutation within the RYR1 was identified. Ca^{2+} release experiments showed that all missense mutations (except p.Gln3756Glu which is only a polymorphism) had lower EC_{50} values for the tested substances (except chlorocresol at p.Arg3348His) when compared to the MHN control group. Furthermore the new missense mutations p.Ala400Pro and p.Arg2355Trp were found - their functional characterization has yet to be done.

1 Einleitung

Basis jedes größeren operativen Eingriffs ist die Anästhesie. Eine genetische Prädisposition verursacht - in Kombination mit halogenierten Anästhetika oder depolarisierenden Muskelrelaxantien – eine unkontrollierte und übermäßige intrazelluläre Ca^{2+} Ausschüttung, welche letztendlich zu einer krankhaften Überhitzung des Körpers führt und als maligne Hyperthermie (MH) bezeichnet wird. In den meisten Fällen kann die Ursache dieser pathologischen Ca^{2+} -Dynamik auf eine Mutation in der kodierenden Sequenz des Ca^{2+} Kanals der Skelettmuskulatur, namentlich des Ryanodin Rezeptors1 (RYR1), zurückgeführt werden. Der Begriff Mutation bezeichnet in dieser Arbeit jede vererbare Änderung in der kodierenden Sequenz eines Gens, für welche eine klinische Relevanz noch zu erbringen bzw. zu widerlegen ist. Der Begriff Polymorphismus hingegen bezeichnet hier zwar auch eine vererbare Änderung in der kodierenden Sequenz eines Gens, wobei diese klinisch aber nicht relevant ist.

Zielsetzung

Zielsetzung meiner Dissertation ist, kausale Mutationen im RYR1 Gen von Trägern der MH zu identifizieren, um in weiterer Folge das Verfahren der MH-Diagnostik zu ergänzen bzw. in manchen Fällen den IVCT durch einen genetischen Test zu ersetzen. Angehörigen von Familien in denen MH auftritt, kann in vielen Fällen mit Hilfe eines genetischen Tests, die invasive und kostspielige MH-Diagnostik, welche auf einer Muskelbiopsie basiert, erspart werden. Dieser genetische Test ermöglicht außerdem auch bei Kindern, welche nicht biopsiert werden, eine MH-Diagnose zu erstellen und somit eine lebensbedrohliche, nicht vorhersehbare MH-Krise am OP-Tisch zu verhindern.

Zwei experimentelle unterschiedliche Ansätze zum Erreichen dieser Zielsetzung wurden ausgewählt: Einerseits ein genetisches Screening, in dem nur bereits publizierten MH-Mutations „hot spots“ sequenziert und analysiert wurden, andererseits eine vollständige Sequenzierung der codierenden Region des RYR1 ausgewählter Personen mit Prädisposition zur MH. Familien, in denen viele Angehörige sich einem IVCT unterzogen haben, wurden bevorzugt. Während beim genetischen Screening genomische DNA aus dem Blut benützt werden kann, erfordert eine vollständige Analyse des RYR1 eine reverse Transkription der

spezifischen messenger RNA (mRNA), welche aus primären Muskelzellkulturen isoliert wurde. In Hinblick auf ein in Zukunft umfassenderes Verständnis der MH wurde ein Pilotprojekt durchgeführt mit dem Ziel die Expressionsraten verschiedener Gene von MHS (p.Trp3985Arg) und MHN Muskelzellen zu vergleichen.

1.1 Die maligne Hyperthermie

Die maligne Hyperthermie ist eine autosomal dominante Prädisposition der Skelettmuskulatur, bei welcher Triggersubstanzen eine unkontrollierte und übermäßige Ca^{2+} -Freisetzung ins Myoplasma verursachen. Die Prävalenz liegt je nach Autor zwischen 1:50.000 bis 1:100.000 (Nelson and Flewelling 1983) und 1:2.000 bis 1:3.000 (Monnier et al. 2002), wobei Männern häufiger betroffen sind als Frauen. Meist stellen Mutationen im RYR1 die kausale Ursache dar (MacLennan et al. 1990). Auslöser einer MH-Krise sind halogenierte Inhalationsanästhetika wie Halothan, sowie modernere Anästhetika wie Isofluran, Sevofluran (Girard et al. 2008), Desfluran. Die Applikation von depolarisierenden Muskelrelaxantien wie Succinylcholin kann ebenfalls eine MH-Episode auslösen bzw. verstärken. Opioide, Barbiturate sowie Distickstoffmonoxid (Lachgas) hingegen zählen nicht zu den Triggersubstanzen.

1.1.1 Klinische Symptome einer MH-Krise

Die Symptome einer MH-Krise können diskret (abortive Krise) bis stark ausgeprägt sein (fulminante Krise). Erste Zeichen einer MH Krise sind häufig ein Anstieg der endexpiratorischen CO_2 Konzentration, Hypermetabolismus, Abfall der O_2 Sättigung, Hypotension der Muskulatur und metabolische Azidose. Bedingt durch eine fortschreitende Rhabdomyolyse steigt der Kaliumspiegel im Blut, verursacht kardiale Arrhythmien und kann bis zum Herzversagen führen (siehe Abb.1). Der namensgebende Temperaturanstieg tritt meist erst im weiteren Verlauf einer MH Krise auf und stellt kein obligatorisches Symptom dar, ebenso wie eine generalisierte Muskelrigidität oder ein Masseterspasmus (Verkrampfung der Kiefermuskulatur). Bereits der Verdacht einer MH Krise erfordert den sofortigen Abbruch der

Anästhesie mit 95% Sauerstoff und die intravenöse Verabreichung von Dantrolen. Nicht behandelte MH Krisen können zum Tod des Patienten führen.

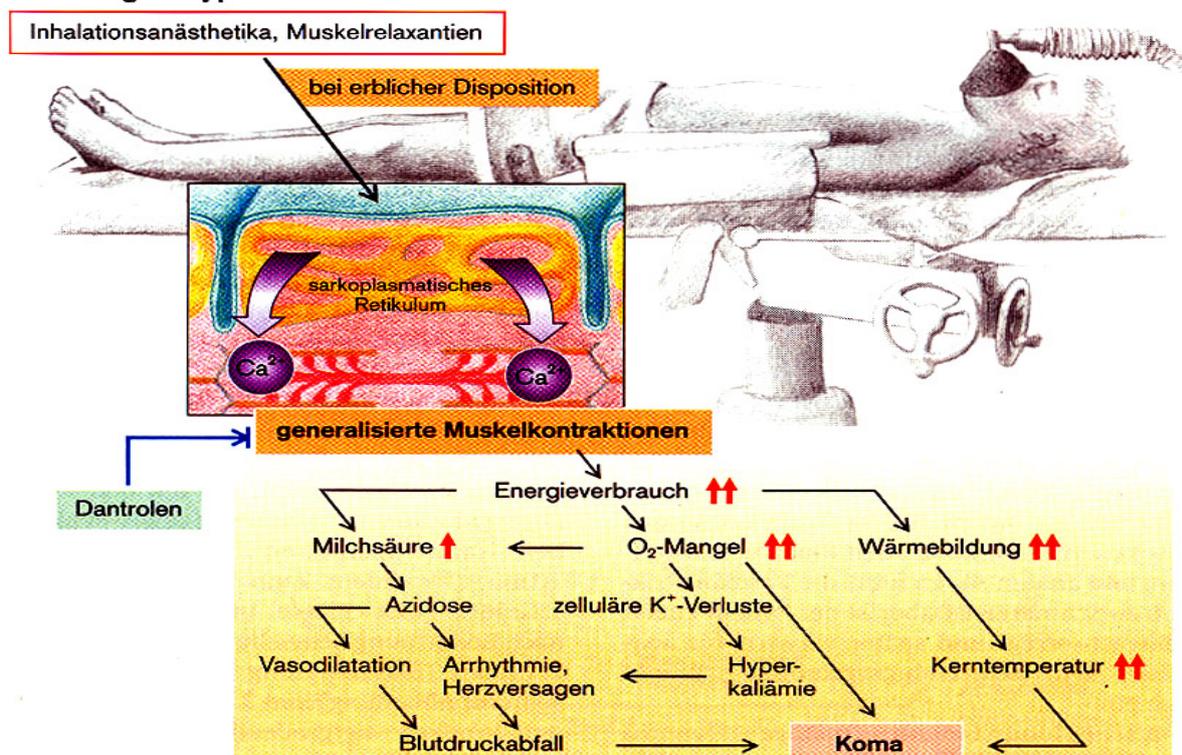


Abb. 1 Schematischer Verlauf einer malignen Hyperthermie Krise. Taschenatlas der Pathophysiologie, Georg Thieme Verlag 1998

Dantrolen

Dantrolen wurde ursprünglich von Snyder (Snyder et al. 1967) synthetisiert und schon früh wurde dessen muskelrelaxierende Wirkung beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt waren die Mechanismen welche zur MH führen noch unbekannt. Erst Mitte der 70er Jahren wurde der Zusammenhang zwischen MH und Abnormalitäten im Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) erkannt. Harrison, welcher das Schweinemodell zur Erforschung der MH entwickelte, erkannte die potentielle Nützlichkeit von Dantrolen zur Behandlung von MH (Harrison 1975). Mit der Einführung des Therapeutikums Dantrolen (Kolb et al. 1982) (Dantrium®) sank in den folgenden Jahren die Todesrate von 80% auf 10%. Obwohl viele Familien mit einer MH Prädisposition keine kausale Missense Mutation in der kodierenden Region des RYR1 haben (Levitt et al. 1991), wirkt Dantrolen trotzdem, da es intrazellulär, direkt am Calcium

freisetzenden RYR1 bindet (Aminosäure 590 und 609) (Paul-Pletzer et al. 2002) und diesen im geschlossenen Zustand blockiert. Diese direkte Wirkungsweise auf den verantwortlichen Ca^{2+} freisetzenden Kanal macht aus Dantrolen ein hervorragendes therapeutisches Mittel zur Behandlung einer MH-Krise, unabhängig der kausalen Ursache der MH Krise. Ein Nachteil von Dantrolen ist seine zeitaufwendige Präparation und Verabreichung. Einer Studie von Gerbershagen und Kollegen zufolge (Gerbershagen 2007) braucht ein Arzt ungefähr 15 min um kommerziell erhältliches Dantrium® zur IV Verabreichung herzurichten und weitere 6 min um es dem Patienten zu verabreichen, da die Konzentration von Dantrolen bei 0,33 mg/ml liegt und 5 mg/kg verabreicht werden müssen. Um kostbare Zeit in der Therapie von MH Krise zu gewinnen wird an neuen, konzentrierteren und wasserlöslicheren Formen von Dantrolen geforscht. Azumolene, ein 30-fach wasserlöslicheres Analogon von Dantrium, ist leichter zu handhaben und scheint ein vielversprechender Kandidat zu sein. (Sudo et al. 2008).

1.1.2 Diagnose mittels IVCT

Die meisten Träger einer MH-Prädisposition haben keinerlei klinische Symptome im täglichen Leben und die vorhandene Prädisposition bleibt im Verborgenen. Selbst komplikationslos überstandene Narkosen in der Vergangenheit sind kein absoluter Beweis, dass ein Patient nicht Träger einer MH-Prädisposition ist. Obwohl bei vielen MH-Patienten ein konstant leicht erhöhter Kreatin Kinase (CK) Wert nachweisbar ist, stellt dieser keinen zuverlässigen Parameter dar. Erst wenn im Rahmen einer Operation ein Verdacht auf MH protokolliert wird, wird dem Betroffenen und dessen Familie ein IVCT zur Abklärung nahe gelegt. Das Wissen um die Suszeptibilität eines Patienten vor einer Anästhesie ist von entscheidender Bedeutung, da eine triggerfreie Narkose risikolos ist. Bis zum heutigen Tag, ist der IVCT die zuverlässigste Methode, um den MH-Status eines Individuums zu bestimmen, wenn die kausale Mutation nicht bekannt ist. Der Nachteil ist, dass er eine invasive und kostspielige Methode darstellt und die Rekonvaleszenz des Patienten 1 bis 2 Wochen dauern kann. Trotz dieser Nachteile gilt der IVCT als das Standardverfahren der MH Diagnostik.

Europäisches und nordamerikanisches Protokoll zur Diagnose der malignen Hyperthermie: ein Vergleich

Unabhängig von einander wurde ein nordamerikanisches und ein europäisches Protokoll standardisiert, welches sich in einigen Punkten unterscheidet. Ein Vergleich der Kriterien zur Erstellung einer Diagnose ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Während das europäische Protokoll eine Sensitivität von 99% und eine Spezifität von 94% hat (Ording et al. 1997), erreicht das nordamerikanische Protokoll eine Spezifität von 78% und eine Sensitivität von 97% (Allen et al. 1998). Die „European Malignant Hyperthermia Group“ EMHG wurde 1983 gegründet um ein einheitliches, standardisiertes *in vitro* Verfahren zu entwickeln, welches sich auf die Untersuchungen und Beobachtungen von W. Kalow, B.A. Britt (Kalow W 1970) und F.R. Ellis (Ellis 1971) stützen. Sie entdeckten, dass Muskelbündel von MH-Patienten schon bei geringen Konzentrationen von Koffein oder Halothan sich kontrahieren, wohingegen Muskelbündel von gesunden Personen bei diesen Konzentrationen keine Kontraktur zeigten. Anhand dieser Experimente entwickelte die EMHG ein standardisiertes *in vitro* Kontraktur-Test (IVCT) Protokoll, welches in den europäischen Testzentren angewandt wird. Auch die nordamerikanischen Testzentren standardisierten ihr Protokoll zur Durchführung des IVCTs. Tabelle 1 zeigt einen Vergleich dieser beiden Protokolle (Larach and for the North American Malignant Hyperthermia Group 1989).

Diagnose	IVCT: europäisches Protokoll	CHCT: nordamerikanisches Protokoll
MHS	Kontraktur ≥ 2 mN bei 2% Halothan <u>und</u> Kontraktur ≥ 2 mN bei 2 mM Koffein	Kontraktur ≥ 7 mN bei 3% Halothan <u>oder</u> Kontraktur ≥ 3 mN bei 2 mM Koffein
MHE	Kontraktur nur bei Halothan – MHEH - oder nur bei Koffein MHEC	Kontraktur zw. 2 -7 mN bei 3% Halothan
MHN	Keine anhaltende Kontraktur > 2 mN weder bei Halothan noch bei Koffein	Keine signifikante Kontraktur Oder Kontraktur ≤ 5 mN bei Halothan 3% Oder Kontraktur ≤ 3 mN bei 2 mM Koffein
	2 Muskelbündeln pro Testsubstanz	3 Muskelbündeln pro Testsubstanz

Tab. 1 Vergleich des europäischen (IVCT) und nordamerikanischen (CHCT) Protokolls zur Diagnose der malignen Hyperthermie.

Der IVCT als diagnostisches Verfahren am Wiener Allgemeinen Krankenhaus

Von 1983 bis Mitte 2008 wurden im Wiener Allgemeinen Krankenhaus 1188 IVCTs durchgeführt, wobei 615 weiblich und 573 männlich Personen getestet wurden. In 45% der Fälle wurde die Diagnose MHS, MHEH oder MHEC gestellt. Obwohl mehr Frauen als Männer getestet wurden, sind nur 41% der positiv getesteten Personen weiblich, wohingegen 59% männlich sind. Somit sind Männer häufiger Träger der Prädisposition zur MH als Frauen. Die Tabelle 2 fasst diese Daten in absoluten Zahlen zusammen.

Gesamtzahl der getesteten Personen 1188		
Diagnose	Weiblich 615	Männlich 573
MHN	397	258
MHS	103	177
MHEH	76	108
MHEC	39	30

Tab. 2 IVCT Diagnosen von 1983 bis 2008 in absoluten Zahlen

1.2 Die Muskulatur

Der Fortbewegungsapparat des Menschen kombiniert Knochen, Gelenke und Skelettmuskulatur zu einem System, welches ihm ermöglicht, sich im Raum zu bewegen.

1.2.1 Das Muskelgewebe

Das Muskelgewebe stellt kein Gewebe im strengeren Sinn dar, denn eine Vielzahl von verschiedenen Zellen wie Bindegewebszellen, Blutgefäße, Fettzellen, Nervenzellen und Muskelzellen bilden das Muskelgewebe.

Es werden 3 Formen von Muskelgewebe unterschieden: die Glatte Muskulatur, die Skelettmuskulatur und die Herzmuskulatur. All diesen verschiedenen Muskelzelltypen ist

gemein, dass sie kontraktile Zellstrukturen, die Myofibrillen beinhalten. Myofibrillen sind Bündeln aus Mikrofilamenten die ihrerseits aus Aktinfilamenten (6-8 nm Ø) und Myosinfilamenten (12-17 nm Ø) bestehen (siehe Abb.2).

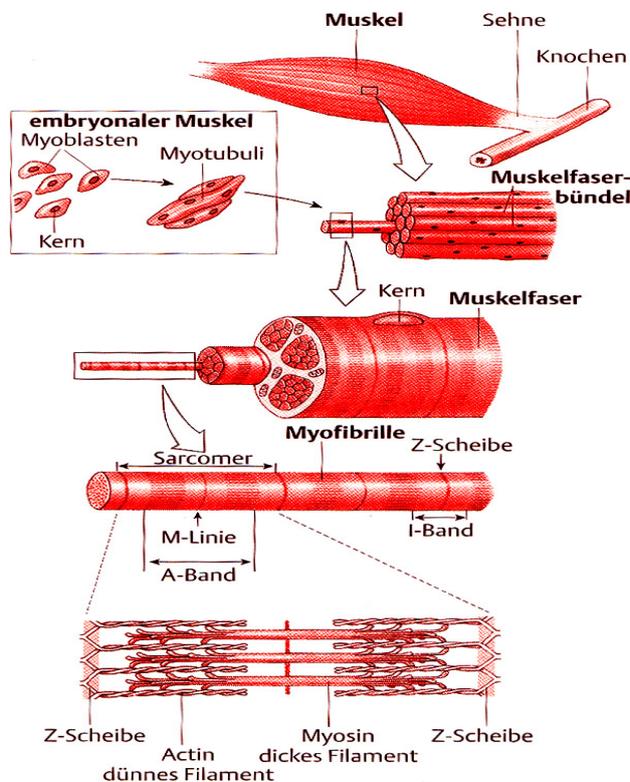


Abb. 2 Aufbau des Muskels (Eckert, Tierphysiologie, 4te Auflage)

Während der Kontraktion hanteln sich die Aktinfilamente entlang der Myosinfilamente und erzielen so eine Verkürzung des Muskelbündels.

Die Muskelfasern

Histologisch können zwei Typen von Muskelfasern unterschieden werden. Der Muskelfaser Type I wird als roter Muskel bezeichnet, da er durch einen hohen Myoglobingehalt, eine hohe Mitochondrienzahl und eine Vielzahl an Blutgefäßen eine starkrote Färbung aufweist. Er kontrahiert langsam. Seine ausgeprägte Fähigkeit rasch ATP über oxidative Phosphorylierung zu generieren, verleiht diesem Muskel eine hohe Ausdauer gegenüber lang andauernder Muskelaktivität.

Dem gegenüber steht der Muskelfasertyp II, welcher sich durch geringeren Myoglobingehalt, Mitochondrienanzahl und Blutkapillaren auszeichnet. Kennzeichnend für diesen Muskelfaser Typ II ist seine rasche Kontraktionsfähigkeit. ATP wird über anaerobe

metabolische Prozesse generiert, wodurch viel Laktat im Körper freigesetzt wird und der Muskel rasch ermüdet.

Die Skelettmuskelzelle

Die Skelettmuskelzellen sind zylinderförmige, langgestreckte, vielkernige kontraktile Zellen, welche durch Verschmelzung einer Vielzahl von Vorläuferzellen, den einkernigen Myoblasten, hervorgehen. Ontogenetisch stammen diese Zellen vom Myotomen ab, dem mittlerem Keimblatt oder Mesoderm. Der Durchmesser beträgt 10 bis 100 μm , wobei die Länge mehrere Zentimeter erreichen kann. Die zahlreichen Zellkerne liegen dicht unter dem Sarkolemm. Im Sarkoplasma befinden sich mehrere hundert bis tausend Myofibrillen. Die morphologische und funktionelle Grundeinheit des kontraktiven Apparates bzw. der Myofibrillen stellt das Sarkomer dar. Zwischen den Myofibrillen befindet sich eine Vielzahl von Mitochondrien, welche die wichtigsten Orte zur Bereitstellung der Energie in eukaryotischen Zellen sind.

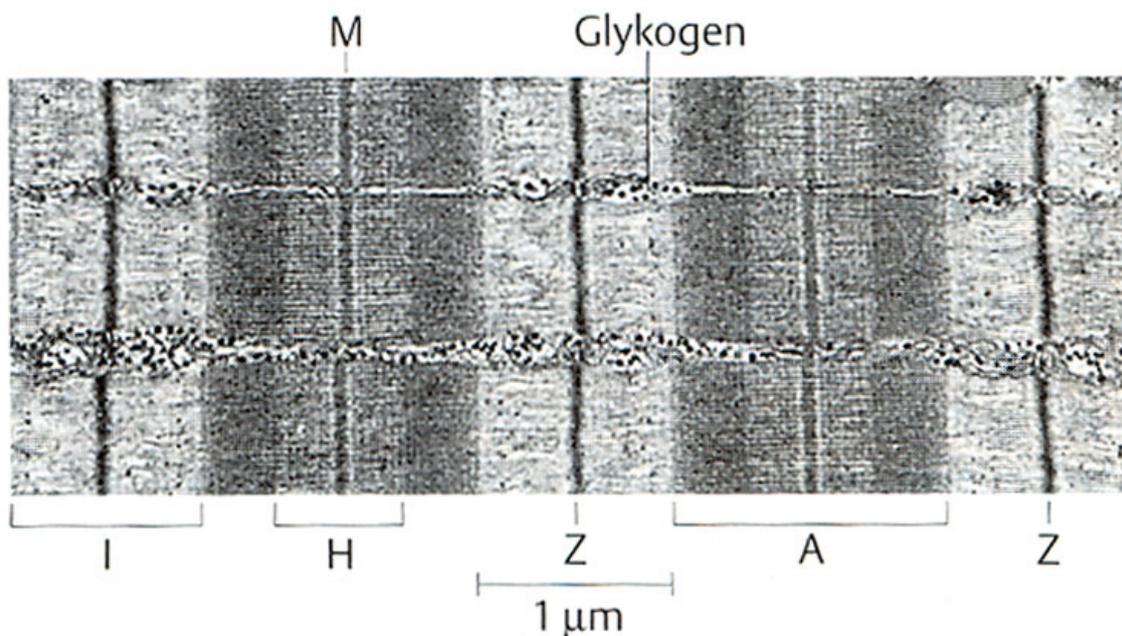


Abb. 3 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines quergestreiften Muskels im Längsschnitt (Eckert, Tierphysiologie, 4te Auflage). Deutlich zu sehen, sind die parallel angeordneten Myofibrillen und die Sarkomere, welche durch die schmalen, dunklen, zur Myofibrille senkrecht verlaufende Z-Banden abgegrenzt sind.

Das T-tubuläre System und das sarkoplasmatische Retikulum

Das T-tubuläre System ist ein weit verzweigtes Röhrensystem, welches die einzelnen Muskelfibrillen netzartig umspannt. Es entsteht ontogenetisch durch Invagination der Muskelzellmembran, bildet mit dem extrazellulären Raum eine Einheit und stellt somit ein Bindeglied zwischen der Oberflächenmembran und den Muskelzellen dar. Ein Aktionspotential (AP), welches sich über die Zellmembran ausbreitet, wird über das T-tubuläre System in die Tiefe der Muskulatur geleitet. Dort übermitteln spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} Kanäle dem sarkoplasmatischen Retikulum das Eintreffen eines APs, welches mit einer intrazellulären Ca^{2+} Freisetzung reagiert.

Das intrazelluläre Membransystem des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), welches eine spezialisierte Form des endoplasmatischen Retikulums darstellt, umspannt die einzelnen Sarcomere einer jeden Muskelzelle. Sie dienen der Speicherung und Freisetzung von Ca^{2+} in der Zelle. Abbildung 4 zeigt einen Längsschnitt durch eine Region, welche aufgrund ihrer dreigeteilten Erscheinungsbilder im Elektronenmikroskop als Triaden bezeichnet werden.

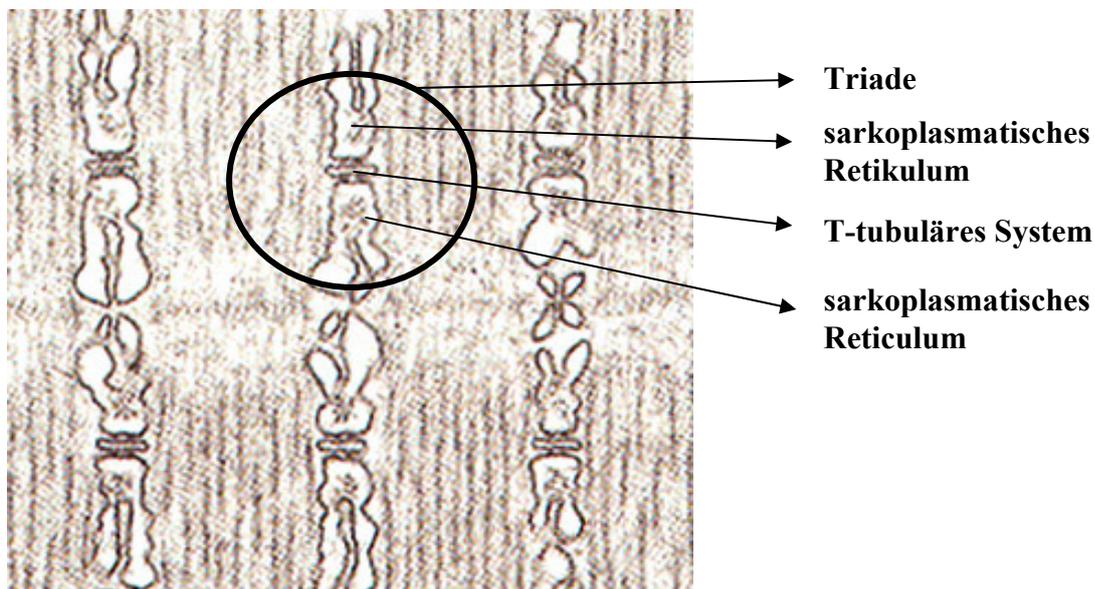


Abb. 4 Längsschnitt durch eine Skelettmuskelzelle, welche die Apposition des sarkoplasmatischen Retikulums mit dem T-tubulärem System zeigt. Eine Region, in der SR und T-tubuläres System aufeinander treffen, ist eingekreist. (nach C. Franzini-Armstrong Springer Verlag, 2005)

In dieser Region treten die terminalen Zisternen des SR zweier aneinandergrenzender Sarcomere in engen Kontakt mit dem T-tubulärem System. Der Spalt zwischen diesen

Strukturen wird von der zytoplasmatischen Domäne eines in der Membran des SR befindlichen Ca^{2+} Freisetzungskanal überbrückt, der aufgrund seiner Affinität zu dem Alkaloid Ryanodin und seinem Vorkommen in der Skelettmuskulatur, Ryanodinrezeptor 1 (RYR1) genannt wird.

1.2.2 Koppelung zwischen Erregung und Kontraktion: elektromechanische Koppelung

Unter elektromechanischer Koppelung wird der verbindende Prozess zwischen Aktionspotential (AP) und Muskelkontraktion verstanden.

Ein AP trifft in den Endigungen eines Motoaxons ein (Abb. 5, Punkt 1) und verursacht die Ausschüttung des Neurotransmitters Acetylcholin in den synaptischen Spalt. Acetylcholin bindet an postsynaptische Rezeptorproteine (nikotische Rezeptoren) und Na^+ Ionen strömen in die Muskelzelle (Abb. 5, Punkt 2). Dieses synaptische Potential kann ein Alles oder Nichts AP auslösen, welches von der Endplatte ausgehend die gesamte Membran der Muskelfaser erregt. Über das T-tubuläre System – eine Einstülpung des Sarcolemm – gelangt das AP auch tief in die Muskelfaser und löst im spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} Kanäle oder Dihydropyridin-Rezeptor (DHP-Rezeptor), eine Konformationsänderung aus. Nun interagiert der DHP-Rezeptor direkt mit dem RYR1 und aktiviert diesen (Marty et al. 1994). Der RYR1, welcher in die Membran des SR integriert ist, entlässt nun aus seinem Speicher eine Vielzahl von Ca^{2+} Ionen, welche sich ins Myoplasma ergießen (Abb. 5, Punkt 3). Diese rasche Ca^{2+} Ausschüttung aus dem SR in das Zytoplasma der Muskelzelle bewirkt einen rasanten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Durch die Bindung von Ca^{2+} an Troponin wird die andauernde Hemmung der Querbrückenanhftung am Actinmolekül aufgehoben, die Querbrücken heften sich an Actin (Abb. 5, Punkt 4), sodass Actin und Myosinfilamente ineinander gleiten: der Muskel kontrahiert (Abb. 5, Punkt 5).

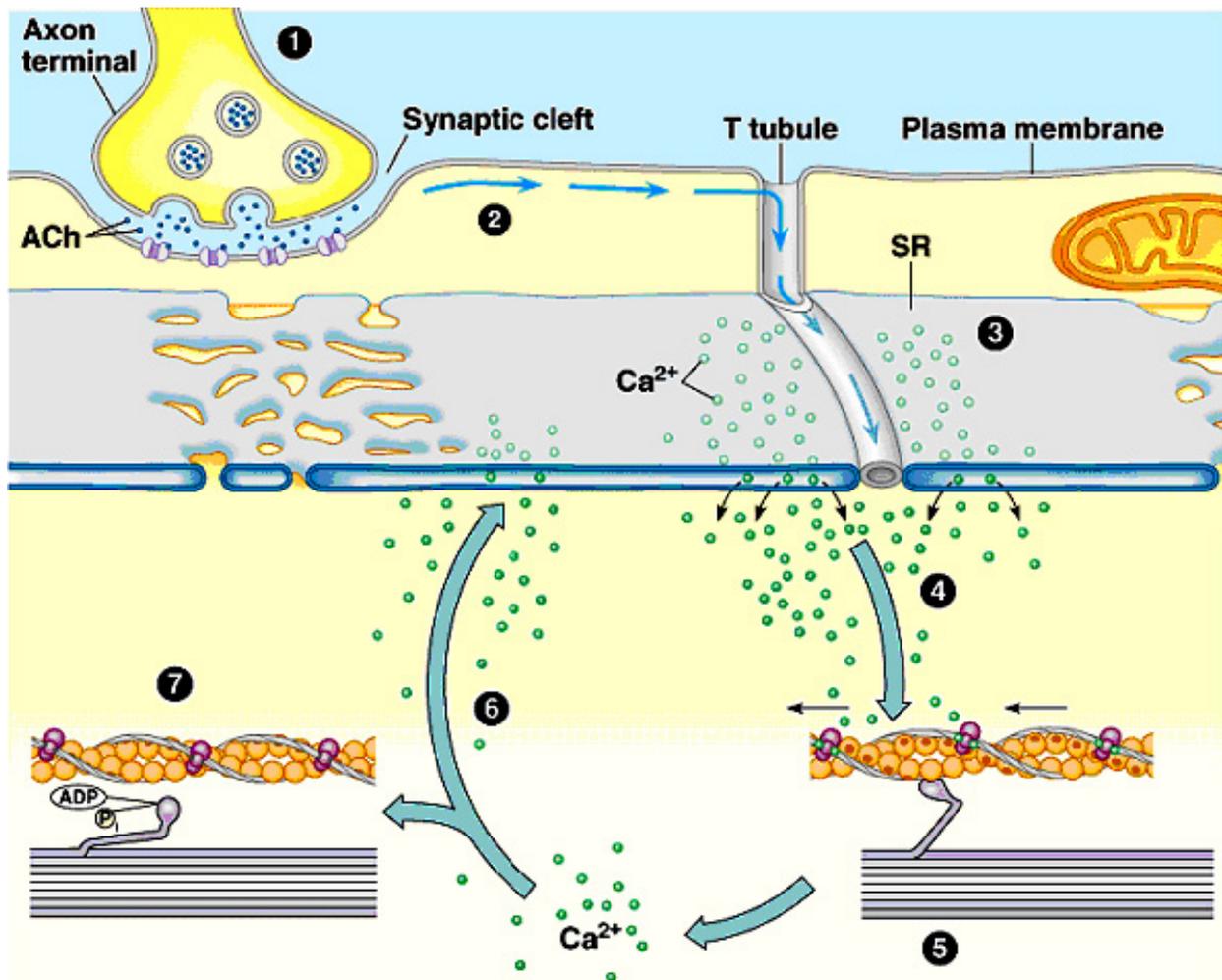


Abb. 5 Vom AP zur Muskelkontraktion: die elektromechanische Koppelung (aus Pearson Education, Inc., B. Cummings 2002)

Damit der Muskel sich auch wieder entspannt, wird nun aktiv Ca^{2+} mittels der Ca^{2+} ATPasen in das SR zurückgepumpt (Abb. 5, Punkt 6) und das katalytische Zentrum des Myosinkopfes hydrolysiert ATP zu ADP. Die freigesetzte Energie wird als Konformationsänderung im Myosinkopf gespeichert und die Querbrücken lösen sich vom Actinfilament: der Muskel entspannt sich (Abb. 5, Punkt 7).

1.3 Calcium Homöostase

Calcium ist das am meisten vertretene Metall im menschlichen Körper: Es macht 2% der gesamten Körpermasse aus. Einerseits wird Ca^{2+} als $CaPO_4$ in den menschlichen Knochen gebunden, andererseits stellen Ca^{2+} Ionen einen „second messenger“ dar, welche eine

entscheidende Rolle in vielen biologischen Prozessen spielen (Bootman et al. 2001) (Berridge 1997). Der temporäre Konzentrationsanstieg des Ca^{2+} , sowie dessen Verteilung innerhalb der Zelle stellen Signale dar, welche von spezifischen zellulären Proteinen dekodiert werden um die Informationen zur Regulation von physiologischen Prozessen zu vermitteln. Sehr früh in der Evolution entwickelten sich bereits Ca^{2+} Transportsysteme, Ca^{2+} Pumpen und Ca^{2+} Kanäle in der Plasmamembran. Parallel mit der Entwicklung von intrazellulären Zellkompartimenten, welche als Ca^{2+} Speicher dienten, entwickelten sich auch spezialisierte intrazelluläre Ca^{2+} Kanäle, welche eine abgestufte zeitliche und örtliche Ca^{2+} Freisetzung ermöglichten.

In der entspannten Muskelzelle liegt die myoplasmatische $[\text{Ca}^{2+}]$ zwischen 60 nM und 100 nM, während im extrazellulären Raum sowie im Lumen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) eine freie $[\text{Ca}^{2+}]$ von ungefähr 1 mM vorzufinden ist. Dieser hohe Konzentrationsgradient ermöglicht eine differenzierte spatio-temporale Kontrolle der Ca^{2+} -Dynamik, welche durch Ca^{2+} -Kanäle, Transportsysteme und Ca^{2+} Pumpen bewerkstelligt wird und eine der Grundvoraussetzungen der Muskelkontraktion darstellt.

Die intrazellulären Ca^{2+} Dynamik wird im Wesentlichen durch 3 Mechanismen bewerkstelligt:

- 1- den Ca^{2+} Efflux
- 2- den Ca^{2+} Influx
- 3- die Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern

Ungeachtet der Herkunft des myoplasmatischen Ca^{2+} , findet man in der Literatur die Terminologie „On-signal“ für eine Zunahme, und „Off-signal“ für die Abnahme der myoplasmatischen $[\text{Ca}^{2+}]$.

1.3.1 OFF-Signal

Das zur Muskelkontraktion benötigte Ca^{2+} wird fast gänzlich vom SR – einem spezialisierten intrazellulären Ca^{2+} Speicher - in das Myoplasma freigesetzt. Damit die Muskulatur sich wieder entspannen kann, muss nun das reichlich im Myoplasma vorhandene Ca^{2+} wieder aktiv in das SR zurück gepumpt werden. Dieser aktive Prozess wird von $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschern

NCX, den sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen (SERCA), und den plasmatischen Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) bewerkstelligt.

1.3.1.1 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher NCX

Die wesentliche Rolle des NCX ist Ca^{2+} über das Sarkolemm aus dem Myoplasma in den extrazellulären Raum zu exportieren. Dieser Mechanismus spielt eine noch bedeutendere Rolle in der Herzmuskulatur, in der das Triggercalcium fast gänzlich aus dem extrazellulären Raum stammt und in diesen wieder zurück gepumpt werden muss. Zwar besitzt der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher eine geringe Affinität zu Ca^{2+} (K_m über $1 \mu\text{M}$), hat aber dafür eine hohe Effizienz bzw. Auspumprate ($2000 \text{Ca}^{2+} \cdot \text{s}^{-1}$). Diese Eigenschaft ermöglicht dem NCX rasch eine große Menge an Calciumionen in den extrazellulären Raum zu befördern und somit die „ Ca^{2+} Spitze“ wegzupumpen.

1.3.1.2 Die Plasmamembran Ca^{2+} ATPase PMCA

Die PMCA katalysiert unter Verbrauch von ATP den Transport von Ca^{2+} gegen seinen elektrochemischen Gradienten über die Plasmamembran in den extrazellulären Raum. Sie wird durch Mg^{2+} und Ca^{2+} aktiviert und hat eine Größe von 130 kDa (Guerini et al. 1998; Strehler and Zacharias 2001). In allen Säugetierzellen wurden PMCAs gefunden. Sie werden von 4 verschiedenen Genen codiert, welche über alternatives Splicing über 20 verschiedene Isoformen ergeben. PMCA bindet Calmodulin, besitzt eine hohe Affinität für Ca^{2+} ($K_m = 0,5 \mu\text{M}$) und unterstützt die SERCA bei der rasche Entfernung der Ca^{2+} Ionen aus dem Myoplasma in den extrazellulären Raum.

1.3.1.3 Die Sarkoplasmatisch/Endoplasmatische Ca^{2+} ATPase SERCA

Die SERCA ist in der Membran des SR lokalisiert und katalysiert den Transport von 2 Ca^{2+} Ionen pro ATP Molekül aus dem Myoplasma in das sarkoplasmatische Retikulum. Zwei verschiedene Isoformen – SERCA1 und SERCA2 - werden in der adulten Skelettmuskulatur exprimiert. SERCA1 ist die Hauptform, welche im adulten, schnell kontrahierenden „fast twitch“, Typ2 Muskel vorkommt. SERCA 2 hingegen, wird hauptsächlich in langsam kontrahierenden - „slow twitch“ Muskel – exprimiert (Brandl et al. 1987). Die Hauptaufgabe dieser Ca^{2+} Pumpen ist die Wiederaufnahme der im Myoplasma befindlichen Ca^{2+} Ionen in das SR. Diese Funktion verleiht ihnen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} Homöostase in Skelettmuskelzellen. Eine Entspannung der Muskulatur kann nur bewerkstelligt werden, wenn die intrazelluläre Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) unter 10^{-4} mM sinkt. Dieser Prozess erfordert eine schnelle und spezifische Wiederaufnahme des ausgeschütteten Ca^{2+} in das SR. Durch ihre hohe Affinität für Ca^{2+} ($K_m = 0,1 \mu\text{M}$), sowie ihre hohe Dichte in der Membran des SR, kann sie diesen Anforderungen gerecht werden: 90% der SR-Membranproteine sind SERCA-Proteine und ermöglichen eine rasche Wiederaufnahme der Ca^{2+} Ionen in das SR. Diese hohe Anzahl ist notwendig, da ihre Effizienz bzw. Ca^{2+} Auspumprate relativ gering ist. Ein Protein, welches sich auf der luminalen Seite des SR befindet, erleichtert ihr die Wiederaufnahme des im Myoplasma befindlichen Ca^{2+} : Calsequestrin (CSQ). CSQ kann eine hohe Anzahl von Ca^{2+} Ionen binden und somit den elektro-chemischen Gradienten gegen den die SERCA arbeiten muss, deutlich herabsetzen.

1.3.2 ON-Signal: Influx

1.3.2.1 Store-operated channels SOCs

Die SOCs sind Kanäle, welche sich im Sarkolemm der Skelettmuskelzellen befinden. Sie öffnen wenn die intrazellulären Calciumspeicher sich geleert haben und erlauben extrazellulärem Calcium die Membran zu passieren und die Speicher wieder zu füllen. Der molekulare Mechanismus zur Aktivierung der SOCs als Antwort auf die Entleerung der Calciumspeicher konnte 2008 von Stiber geklärt werden. Er konnte zeigen, dass Myotuben

ohne funktionelles „stromal interaction molecule 1 (STIM1), ihre SOCs nicht aktivieren können und schnell ermüden. Knock-out Mäuse ohne diesen Ca^{2+} Sensor sterben perinatal. (Stiber et al. 2008).

1.3.2.2 Voltage Operated Ca^{2+} Channels VOCCs

Diese Klasse von Ca^{2+} Kanälen reagiert auf Änderungen des Membranpotentials durch Öffnen ihrer Poren für divalente Kationen und lassen diese in die Zelle eindiffundieren. Sie übersetzen somit ein elektrisches Signal in ein „second messenger“ Signal. Die VOCCs werden in L, N, P/Q, R und T-Typen unterteilt. Die L-Typ „long lasting“ Kanäle werden durch Phosphorylierung moduliert, während die N, P/Q und R-Typen durch G-Proteine moduliert werden. Der DHPR ist der Hauptrepräsentant dieser spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanäle im Skelettmuskel und befindet sich in der Membran des T-tubulären Systems.

1.3.3 ON-Signal: Release

1.3.3.1 Die Ca^{2+} Freisetzungskanäle des sarcoplasmatischen Retikulums

In der Membran des sarcoplasmatischen Retikulums befinden sich 2 Familien von Ca^{2+} Kanälen: die Ryanodin Rezeptoren (RYR) und die Inositol 1,4,5-triphosphat Rezeptoren (IP3R). Obwohl die RYR mit 560 kD pro Untereinheit mehr als doppelt so groß wie die IP3R sind, weisen sie eine Sequenzidentität von über 30% auf. Beiden gemein ist ihr homotetramerer Aufbau, eine ausgedehnte zytoplasmatische N-terminale Domäne, eine zentrale modulatorische Region sowie eine porenbildende C-terminale Domäne. Beide Familien besitzen 3 Isoformen. Ein Aminosäurevergleich zwischen diesen beiden Ca^{2+} Kanälen zeigt eine hohe Homologie in den Regionen zwischen AS 466-643 und 2187-2364 des RYR1, sowie in der C-terminalen Regionen welche die porenbildende Domäne ist (Bhat et al. 1997). Da bis heute keine Röntgenkristallstrukturanalyse des RYR1 vorliegt, basiert die 3-Dimensionale Rekonstruktion des Rezeptors auf Hydrophathie-Profilen, ortsspezifischer

Antikörpermarkierung, Markierung mit hydrophoben Sonden, 3-D Kryo-EM und Homologisierung mit K^+ Kanälen (Samsø et al. 2005).

1.3.4 Die Familie der Ryanodin Rezeptoren

Die Ryanodin Rezeptoren verdanken ihren Namen ihrer Affinität zum Alkaloid Ryanodin (Jenden and Fairhurst 1969), welches ursprünglich aus der Pflanze *Ryania speciosa* isoliert wurde und als Insektizid gedacht war. Rasch jedoch wurde seine paralyisierende Wirkung auf die Muskulatur erkannt. Dieses Alkaloid bindet an und moduliert den Rezeptor (Zucchi and Ronca-Testoni 1997).

Die Ryanodin Rezeptor Isoformen

Die Familie der humanen Ryanodin Rezeptoren umfasst 3 Isoformen, welche auf distinkten Chromosomen lokalisiert sind. Die humane chromosomale *RYR1* Sequenz liegt am proximalen langen Arm des Chromosoms 19 (Zorzato et al. 1990), während *RYR2* sich auf Chromosom 1 und *RYR3* sich auf Chromosom 15 befindet. *RYR1* kommt hauptsächlich in den terminalen Zysternen des SR der Skelettmuskulatur vor, sowie in Purkinje-Zellen und Leukozyten, während *RYR2* in der Herzmuskulatur zu finden ist. *RYR3* wird stark in den frühen Entwicklungsstadien der Skelettmuskulatur exprimiert, aber in dessen späteren Entwicklungsstadien nur mehr mäßig exprimiert (Tarroni et al. 1997). Im Gehirn hingegen wird es in allen Entwicklungsstadien stark exprimiert. Tabelle 3 fasst dies zusammen. Knock-out Experimente an Mäusen haben gezeigt, dass *RYR1* und *RYR2* essentielle Gene sind, da Mäuse, denen diese Gene fehlten, perinatal starben (Takeshima et al. 1998). Mäuse hingegen, denen *RYR3* fehlte, waren lebensfähig und wiesen keine offensichtlichen pathologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur auf (Takeshima et al. 1996).

Ein Sequenzvergleich der *RYR* untereinander zeigt eine Sequenzhomologie von 66% zwischen *RYR1* und *RYR2*, von 67% zwischen *RYR1* und *RYR3* und von 70% zwischen *RYR2* und *RYR3*. Außerdem konnten auf jedem *RYR1* Monomer 3 Domänen identifiziert werden, welche für den *RYR1* charakteristisch sind. Man nimmt an, dass diese Regionen, D1 (Aminosäure 4254-4631), D2 (Aminosäure 1342-1403) und D3 (Aminosäure 1872-1923) des *RYR1* spezifische regulatorische Funktionen des Ca^{2+} Kanals tragen.

Rezeptor	Ensemble ID	Chromosom	Vorkommen	Länge in Aminosäuren
RYR1	180901	19.q13.1	Skelettmuskel	5038
RYR2	180902	1q42.1-q43	Herzmuskel	4967
RYR3	180903	15q14-q15	Gehirn, Skelettmuskulatur	4870

Tab. 3: Vergleich der verschiedenen Ryanodinrezeptoren

Allen 3 Isoformen gemein sind eine große N-terminale cytoplasmatische Domäne, welche beim RYR1 aufgrund ihres elektronenmikroskopischen Erscheinungsbildes als „Fuß-Struktur“ beschrieben wird, sowie eine kurze C-terminale transmembranäre Domäne, welche den eigentlichen Ca^{2+} Kanal bildet.

Im Gegensatz aber zu RYR2 und RYR3, interagiert RYR1 direkt mit dem DHPR. Beim Eintreffen eines APs über die Plasmamembran, erfährt die $\alpha 1$ Untereinheit des DHPR eine Konformationsänderung, welche durch direkte Interaktion mit dem RYR1 diesen aktiviert und eine Ca^{2+} Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bewirkt. Die Regionen des RYR1, welche in diese Interaktion involviert sind, konnten identifiziert werden: Aminosäure 1635-2636 und Aminosäure 2659-3720 des RYR1 interagieren mit der $\alpha 1$ Untereinheit des DHPRs (Aminosäure 720-765) (Nakai et al. 1998; Protasi et al. 2002).

Beide Rezeptoren bilden somit einen stabilen makromolekularen Komplex mit einer präzisen Anordnung, wobei jeder zweite homotetramere RYR1 mit vier DHP-Rezeptoren assoziiert ist (Block et al. 1988). Man geht davon aus, dass diese alternierende Apposition durch sterische Hinderung bedingt ist, die es verhindert, dass angrenzende RYR1 sich ebenfalls mit DHPR assoziieren können (siehe Abb.6). Versuche an Muskelzellen von RYR1 Knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass diese zu keiner Kontraktion bei elektrischer Stimulation mehr fähig sind. Auf subzellulärer Ebene fehlt ihnen die charakteristische Fußstruktur des RYR1 (Takeshima et al. 1995), weshalb sie als „dyspedic cells“ bezeichnet werden.

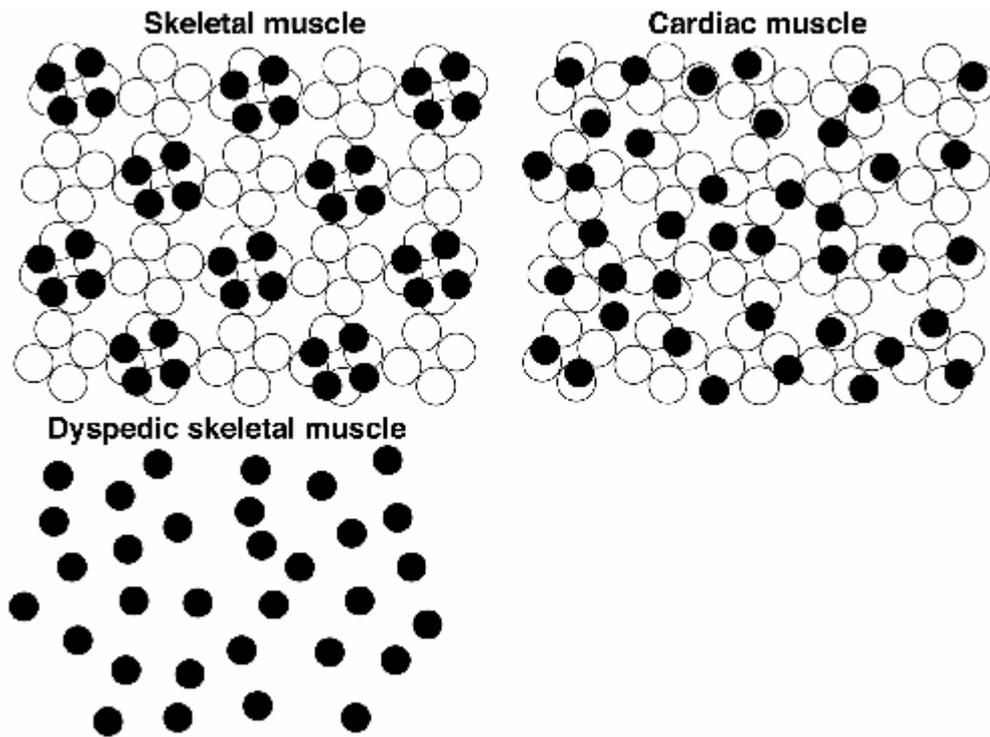


Abb. 6 zeigt einen Vergleich der Anordnung von RYR1 (weiße Kreise) und DHPR (schwarze Kreise) im Skelettmuskel, im Herzmuskel und in Muskelzellen, welche keine RYR exprimieren (Franzini-Amstrong 2004).

1.3.5 Die Pore des RYR1

Die Effizienz des RYR1 als Ca^{2+} Kanal wird durch zwei Prozesse bestimmt: Erstens die Fähigkeit zu öffnen und zu schließen als Reaktion auf einen adäquaten Stimulus, wie die Depolarisation des Sarkolemms, zweitens die Fähigkeit selektiv eine große Anzahl von Ca^{2+} Ionen pro Zeiteinheit aus dem Lumen des SR in das Sarkoplasma zu entlassen und die Erregungs-Kontraktions-Koppelung auszuführen.

Ein einzelner RYR1 besteht aus 4 identischen Monomeren, wobei jede dieser Untereinheiten aus 5038 Aminosäuren besteht. Als Ionenkanal, welcher in der Phospholipidmembran des SR eingebettet vorliegt, müssen transmembranäre Regionen eine Pore bilden, welche es den Ca^{2+} Ionen ermöglichen, selektiv und schnell ins Sarkoplasma zu gelangen. Es herrscht Einigkeit darüber, dass sich die porenbildenden Domänen des RYR1 am C-terminalen Ende befinden, da bei der Deletionsmutante $\Delta 183-4008$ (Bhat et al. 1997) eine Ionenkanal-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Noch nicht eindeutig geklärt, ist die Anzahl an TM Regionen

welche sich im RYR befinden. Während Takeshima et al., von 4 TM Regionen pro Monomer ausgeht (Takeshima et al. 1989), postuliert Du et al., und Brandt et al., 10 (Du et al. 2002) (Brandt et al. 1992) und Zorzato et al., 12 solcher Regionen pro Monomer (Zorzato et al. 1990) (siehe Abb. 7).

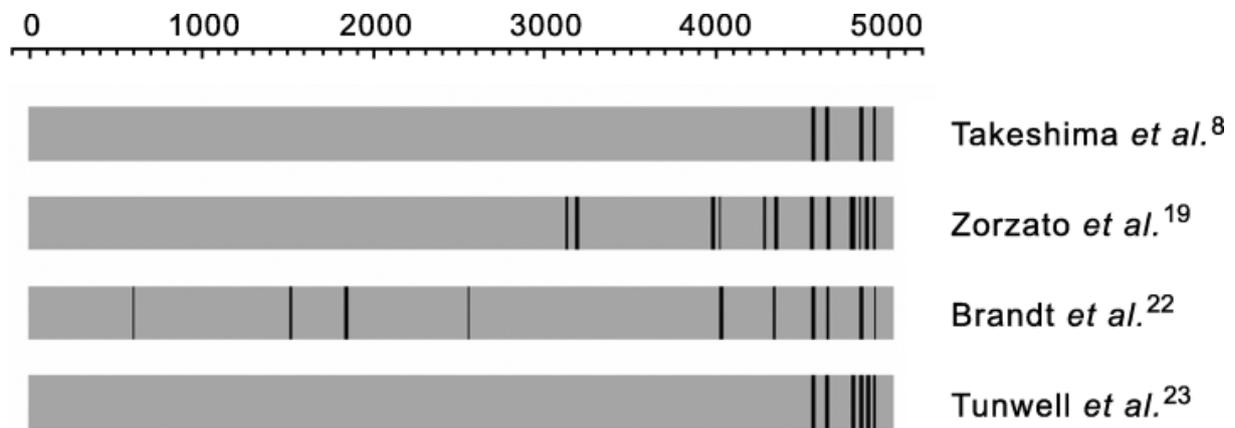


Abb. 7 Modelle der Lage der transmembranären Regionen im RYR1. Die grau dargestellten horizontalen Balken stellen die lineare Aminosäuresequenz eines RYR1 Monomers dar, die schwarzen Querbalken die hypothetischen transmembranären Regionen (Angela F Dulhunty 2003).

Mutationen im Bereich der Pore des RYR1 sind oft schwerwiegend, und können zu einem „leaky channel“, einem undichten Ca^{2+} Kanal führen, welcher eine Erhöhung der Calciumkonzentration im Sarkoplasma bewirkt (José R. López 1985), (Monnier et al. 2000) und die Ursache einer langsam fortschreitenden Myopathie ist, welche als Central Core Disease (CCD) bezeichnet wird. Die erhöhte Calciumkonzentration im Myoplasma wird im submembranärem Bereich durch die Plasmamembranpumpen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher ausgeglichen, im Zentrum (the core) aber persistiert sie. Die in den Muskelzellen reichlich vorhandenen Mitochondrien versuchen diesem Phänomen entgegen zu steuern, indem sie übermäßig Ca^{2+} aufnehmen. Die Überladung mit Ca^{2+} schädigt und zerstört letztendlich diese Organellen. Eine Konsequenz daraus ist, dass im Zentrum der Zelle keine oxydative Aktivität mehr nachweisbar ist, und keine Mitochondrien anzutreffen sind. In histologischen Schnittpräparaten ist zu erkennen, dass diese Areale sich meist entlang der gesamten Länge der Muskelfaser erstrecken. Kompensatorische Effekte wie Proliferation des SR und der transversalen Tubuli sind charakteristisch. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Muskelzellen zeigen außerdem eine Desorganisation des kontraktilen Apparates, welche bis zu dem totalen Verlust der myofibrillären Anordnung führen kann. Die typische

Querstreifung im elektronenmikroskopischen Bild wirkt verwischt, verschwommen und kann sogar verschwinden. Für viele CCD Mutationen im Gen des RYR1 konnte auch eine Veranlagung zur MH nachgewiesen werden (Robinson R. and D.Carpenter 2006).

1.3.6 Die Evolution des RYR1

Im Gegensatz zu den Invertebraten wie *C.elegans* welche nur 1 RYR Gen aufweisen, besitzen niedere Vertebraten 2 RYR Isoformen – alpha und beta- welche homolog zu RYR1 und RYR3 sind. Säuger besitzen 3 verschiedene Isoformen. Alle Isoformen befinden sich auf unterschiedlichen Chromosomen und scheinen evolutiv durch Genduplikation und alternatives Spleißen entstanden zu sein, um neue Funktionen wahrnehmen zu können. Auffallend ist, dass große Abschnitte des Ryandine Rezeptors von *C.elegans* bis zum modernen Menschen konserviert sind. Diese hochkonservierten Regionen scheinen strukturelle und/oder funktionelle Schlüsseleigenschaften des Ryanodin Rezeptors zu tragen und wurden im Laufe der Evolution beibehalten.

1.3.7 Splice-Varianten

Futatsugi *et al.*, beschrieb 1995 zwei Splice-Varianten des RYR1 ASCI(-) und ASCII(-), welche in der Skelettmuskulatur der Maus vorkommen (Futatsugi et al. 1995). Die Expression dieser Splice-Varianten wird entwicklungs- und gewebsspezifisch reguliert. ASCI(-) fehlt Exon 70 bzw. die Aminosäuren 3481-3485 und ASCII(-) fehlt Exon 83 bzw. die Aminosäuren 3865-3870. Die ASCI(-) Variante repräsentiert die juvenile Form des RYR1, welche im Laufe der Muskelzellentwicklung von der ASCI(+) Variante abgelöst wird. Interessanterweise repräsentiert die ASCI(-) Variante die Hauptform, welche in primären humanen Muskelzellkulturen exprimiert wird. Im adulten Muskel gehören nur mehr 30% der RYR1 dieser Variante an. Ähnlich verhält es sich mit der ASCII(-) Variante, welche ebenfalls nur postnatal auftritt und später im Adultus nur mehr 10% der exprimierten RYR1 ausmacht. Studien an transgenen Mäusen, welche nur die ASCI(-) Variante exprimieren, zeigen das pathologische Bild der Myotonischen Dystrophie Typ1, welche eine Muskelschwäche

verursacht (Futatsugi et al. 1995). Einzelkanalmessungen zeigen eine deutliche Herabsetzung der Öffnungswahrscheinlichkeit und der Öffnungsdauer des Rezeptors.

1.3.8 Calsequestrin, Triadin und Junctin

Der RYR1 bildet mit Calsequestrin, Triadin und Junctin (Tab. 4) eine quartäre Struktur an der luminalen Seite der terminalen Cisternen des SR. Eine wesentliche Aufgabe dieses Komplexes ist die Bindung, Speicherung und Abgabe von Ca^{2+} über den RYR1. Triadin und Junctin sind integrale Membranproteine mit einer kurzen amino-terminalen Domäne im Zytoplasma und einer langen geladenen carboxylterminalen Domäne im Lumen des SR. Sie binden und stabilisieren Calsequestrin im Lumen des SR (siehe Abb.8).

Symbol	CASQ1	TRDN	Junctin-ASPH
RefSeq mRNA	NM_001231.3	NM_006073	NM_004318
Protein	NP_001222.2	NP_006064	Q12797
Chromosom Location	1q21	6q22-23	8q12.1
GeneID	844	10345	444

Tab.4 Lokalisierung und genetische Referenzen für Calsequestrin, Triadin und Junctin

Eine der Hauptaufgaben von Calsequestrin besteht in der Bindung von Ca^{2+} Ionen: es besitzt eine moderate Bindungsaffinität ($K_D = 100 \mu\text{M}$) und eine hohe Bindungskapazität (50 mol Ca^{2+} /mol CSQ) (Franzini-Armstrong et al. 1987).

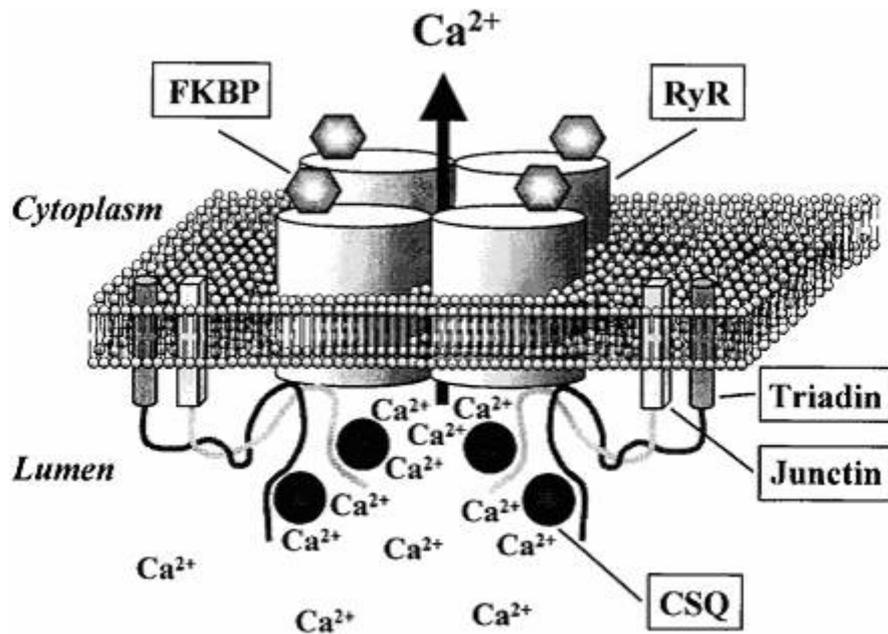


Abb. 8 Schematische Darstellung des quartären Komplexes um RYR1
 (www.med.uc.edu/kranias/calsequestrin.htm)

Durch diesen Mechanismus wird der Konzentrationsgradient gegen den die Ca^{2+} ATPase bei der Wiederbefüllung des SR arbeiten muss, deutlich herabgesetzt. Lee JM und Mitarbeiter konnten 2004 zeigen, dass Triadin direkt mit einer luminalen Schleife des RYR1 interagiert, welche sich von Aminosäure 4860 bis 4917 erstreckt und zwischen TM8 und TM10 (gemäß dem 12 TM-Modell von Zorzato) befindet (Lee et al. 2004). Durch Mutageneseexperimente konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der negativ geladenen Aminosäuren Asp⁴⁸⁷⁸ Asp⁴⁹⁰⁷ oder Glu⁴⁹⁰⁸ gegen Alanin die Interaktion zwischen RYR1 und Triadin aufhebt (Goonasekera et al. 2007). Diese Aminosäuren scheinen essentiell für die Bindung von Triadin am RYR1 zu sein. Triadin selbst bindet über ein KEKE-Motiv an den RYR1, welches von Aminosäuren 200 bis 232 verläuft und aus alternierend angeordneten positiv und negativ geladenen Aminosäuren besteht. Charakteristisch bei diesem Motiv ist die alternierende Abfolge von Lysin und Glutaminsäure.

1.3.9 Modulatoren des RYR1

1.3.9.1 Ca^{2+}

Ca^{2+} stellt den wichtigsten physiologischen Modulator des RYR1 dar. [3H]Ryanodin Bindungsversuche zeigen, dass niedrige zytoplasmatische $[\text{Ca}^{2+}]$ (1-10 μM) den Rezeptor aktivieren, wohingegen hohe Ca^{2+} Konzentrationen (1-10 mM) den Rezeptor inhibieren. Ein Erklärungsmodell für diesen biphasischen Effekt des Ca^{2+} geht von einer Bindungsdomäne mit hoher Ca^{2+} Affinität aus, welche den Ca^{2+} Kanal aktiviert, und einer Bindungsdomäne mit geringer Ca^{2+} Affinität, welche den Rezeptor inhibiert. Im Gegensatz zu RYR2 und RYR3, welche homogen auf die zytoplasmatische Ca^{2+} Konzentration reagieren, ist die Antwort der einzelnen RYR1 unterschiedlich: während manche bereits von geringen $[\text{Ca}^{2+}]$ aktiviert werden, aktivieren andere erst bei höheren $[\text{Ca}^{2+}]$. Studien belegen, dass die intraluminale $[\text{Ca}^{2+}]$ den Ca^{2+} Freisetzungskanal moduliert (Sitsapesan and Williams 1995) (Tripathy and Meissner 1996). Calsequestrin, welches ein Ca^{2+} bindendes Protein im SR darstellt und über Protein-Protein Interaktion mit dem RYR1 in Verbindung steht, dient dem RYR1 als Ca^{2+} Sensor und moduliert über diese Funktion die Aktivität des Ca^{2+} Freisetzungskanals (Beard et al. 2005). Der molekulare Mechanismus dieser Interaktion ist noch nicht geklärt, insbesondere die Frage, ob diese Regulation direkt oder über die SR Proteine Triadin und Junctin verläuft.

1.3.9.2 Calmodulin: ein cytoplasmatischer Ca^{2+} Sensor

Der Effekt von Calmodulin auf den RYR1 zeigt sich abhängig von der myoplasmatischen $[\text{Ca}^{2+}]$: bei nanomolaren Ca^{2+} Konzentration aktiviert Calmodulin den Ca^{2+} Kanal, wobei mikromolaren Konzentrationen inhibierend wirken (Fruen et al. 2000). Calmodulin selbst tritt in zwei Formen auf: apoCaM (ohne gebundenes Ca^{2+}) und Ca^{2+}CaM (mit gebundenen Ca^{2+}). Elektronenmikroskopische Studien (Wagenknecht et al. 1994) zeigen, dass die Bindungsstellen für CaM sich am zytoplasmatischen Abschnitt des RYR1 befinden. Beide Formen haben eine sich überlappende Bindungsstelle am RYR1 zwischen Aminosäure 3614 und 3643 (Sencer et al. 2001). Einzelkanalmessungen (Smith et al. 1989) belegen, dass die inhibierende Wirkung von Ca^{2+}CaM sich in der Herabsetzung der Öffnungsdauer des Rezeptors widerspiegelt. Da auch in Abwesenheit von ATP Ca^{2+}CaM eine inhibierende

Wirkung entfaltet, ist eine direkte inhibierende Wirkung von Ca^{2+}CaM auf den RYR1 wahrscheinlich. Sencer et al., konnten zeigen, dass diese Ca^{2+}CaM - Bindungsstelle auch mit der alpha 1 Untereinheit des DHPR interagieren kann und auf diese Weise die Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR während der EC-Koppelung limitiert (Sencer et al. 2001).

1.3.9.3 ATP und Mg^{2+}

Studien an Skelettmuskelzellen haben gezeigt, dass ATP ein starker Aktivator des RYR1 ist. Um eine maximale Aktivierung des RYR1 zu erzielen, ist das Vorhandensein von ATP und Ca^{2+} notwendig. Meissner et al., konnten zeigen, dass bei allen untersuchten Ca^{2+} Konzentrationen der EC_{50} Wert für Adeninnukleotide sich im millimolaren Bereich bewegt (Meissner et al. 1986). So konnte in Einzelkanal Messungen gezeigt werden, dass millimolare Konzentrationen von Adeninnukleotiden und mikromolare $[\text{Ca}^{2+}]$ die Öffnungswahrscheinlichkeit (P_o) des Ca^{2+} Freisetzungskanals deutlich erhöhen, wobei besonders die Öffnungsdauer betroffen war. Bindungsexperimente haben gezeigt, dass der RYR1 deutlich sensibler gegenüber ATP reagiert als sein kardialer Gegenspieler RYR2 (Michalak et al. 1988; Zimanyi and Pessah 1991). Sequenzmotivanalysen haben mögliche Bindungsstellen für ATP identifiziert, welche das Motiv GXGXXG tragen (Aminosäure 2-7, 699-704, 1195-1200, 2264-2269, 2370-2375, 4449-4457 und 4602-4607) (Takeshima et al. 1989).

Die Rolle von Mg^{2+} ist hingegen eine inhibierende. Mg^{2+} konkurriert mit Ca^{2+} um die gleichen Bindungsdomänen am RYR1. In zahlreichen Ca^{2+} Freisetzungsexperimenten konnte die inhibierende Wirkung von Mg^{2+} auf die Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Freisetzung (CICR) gezeigt werden (Kirino and Shimizu 1982), (Kirino et al. 1983), (Meissner 1994)). Ebenso zeigten Einzelkanalmessungen, dass millimolare $[\text{Mg}^{2+}]$ die Öffnungswahrscheinlichkeit drastisch herabsetzten (Rousseau et al. 1986). In Skelettmuskelzellen wird die Mg^{2+} -Inhibierung durch Depolarisation moduliert. Die Depolarisation, welche vom DHPR auf den RYR1 übertragen wird, reduziert die Affinität des RYR1 gegenüber Mg^{2+} um das 10-fache (Lamb and Stephenson 1994).

1.3.9.4 FK506-Binding Protein FKBP12

FKBP12 Proteine assoziieren mit RYR1 und RYR3, wohingegen RYR2 mit FKBP12.6 assoziiert. Jeder Ryanodin Rezeptor bindet vier dieser Proteine, wobei jedes Monomer eine Bindungsstelle besitzt (siehe Abb.9). Es gibt einen Konsensus darüber, dass FKBP12 den Rezeptor stabilisiert bzw. ein Entfernen des Proteins eine destabilisierende bzw. aktivierende Wirkung auf den Rezeptor hat (Ahern et al. 1994). Ebenso konnten Reiken und Mitarbeiter zeigen, dass die Phosphorylierung von Ser2843 eine Freisetzung von FKBP12 bewirkt und den RYR1 aktiviert (Reiken et al. 2003). FKBP12 Knock-out-Mäuse sterben bereits im embryonalen Stadium, wobei Anomalien in der Herzmuskulatur und im Nervensystem gefunden wurden, jedoch die Skelettmuskulatur eine normale Entwicklung aufwies (Shou et al. 1998). Untersuchungen von Marx und Mitarbeitern legen nahe, dass FKBP12 eine synchronisierende Wirkung auf benachbarte RYR haben könnte. Diese Synchronisierung würde ein simultanes Öffnen und Schließen benachbarter RYR koordinieren (Marx et al. 1998). Wie dieses Protein gleichzeitig den Rezeptor stabilisieren und die Aktivität benachbarter RYR synchronisieren kann, ist Gegenstand vieler Untersuchungen.

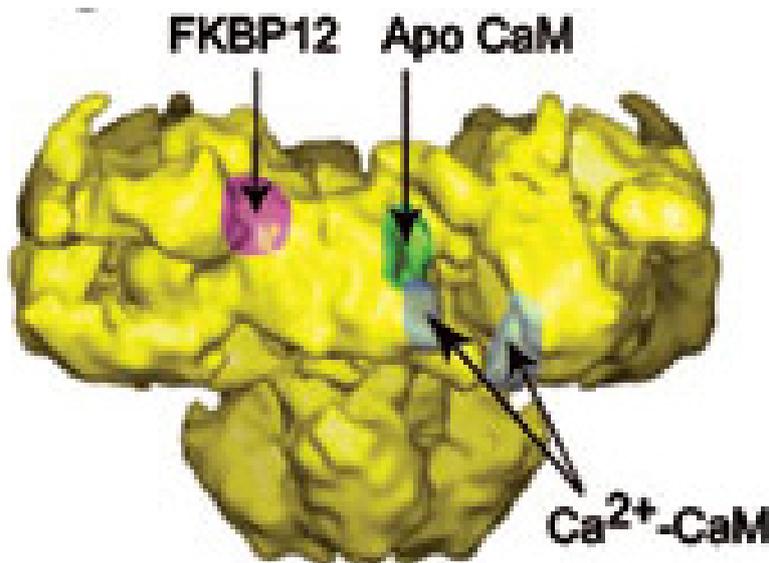


Abb. 9 Rekonstruktion des RYR1 mit Angabe der Bindungsstellen für FKBP12 und Apo-CaM bzw. Ca²⁺-CaM (Samsó et al. 2005).

1.3.10 Spezifische Testsubstanzen bzw. Aktivatoren des RYR1

1.3.10.1 Koffein

Koffein ist eine wichtige Testsubstanz zur Abklärung der MH Prädisposition. Bereits 1968 konnten Lüttgau und Oeliker den aktivierenden Effekt von Koffein auf die Skelettmuskulatur von Fröschen zeigen (Lüttgau HC 1968). Der zugrunde liegende Mechanismus konnte jedoch mit dem damaligen Wissensstand nicht entschlüsselt werden. Erst Rousseau et al., konnten 1988 zeigen, dass der RYR1 durch Koffein direkt aktivierbar ist (Rousseau et al. 1988). Die Bindungsdomäne für Koffein am RYR1 konnte dennoch bis heute nicht identifiziert werden. Die porenbildende Domäne des RYR1 befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins. Untersuchungen an einer Deletionsmutante $\Delta 183-4006$, welche nur aus dieser porenbildende Domäne bestand zeigten, dass obwohl ein funktioneller Ca^{2+} Freisetzungskanal gebildet wurde, dessen Aktivierbarkeit durch Koffein ausblieb (Bhat et al. 1997). Bhat et al., vermuteten daher, dass die Bindungsdomäne für Koffein bzw. die regulatorische Domäne der Ca^{2+} Freisetzung durch Koffein sich zumindest zum Teil im N-terminalen Abschnitt des Rezeptors befindet. Die Wirkungsweise von Koffein scheint Konzentrationsabhängig zu sein: in niedrigen Konzentrationen (2 mM) erhöht Koffein die Affinität der Ca^{2+} -Bindungsdomäne des RYR1, womit die Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Freisetzung (CICR) verfrüht einsetzt, wohingegen höhere Koffeinkonzentrationen eine direkte Wirkung auf den RYR1 zu haben scheinen (Franzini-Armstrong and Protasi 1997). Obwohl der Wirkungsmechanismus von Koffein auf den RYR1 noch nicht restlos geklärt ist, ist diese Testsubstanz ein wichtiges Werkzeug, um die Funktion des Ca^{2+} Freisetzungskanals in Muskelzellen zu studieren (Herrmann-Frank et al. 1999).

1.3.10.2 Chlorkresol (4-Chloro-*m*-cresole)

Chlorkresol kann im IVCT ergänzend zu Koffein und Halothan Anwendung finden (Gilly et al. 1997). Auf zellulärer Ebene wirkt Chlorkresol bzw. 4-Chloro-*m*-cresol als spezifischer Aktivator des RYR1 (Jacobson et al. 2006). Bei dem Versuch mögliche ATP-Bindungsmotive zu identifizieren, stellten Du et al., fest, dass die RYR1 Mutationen p.Gly2370Ala, p.Gly2373Ala, und p.Gly2375Ala eine Verringerung der Sensitivität des RYR1 gegenüber

den Testsubstanzen Chlorkresol und Koffein bewirkten (Du et al. 2001). Er folgerte daraus, dass diese Aminosäuren Bestandteil einer Koffein und Chlorkresol Bindungsdomäne sind. Zwei Jahre später konnten aber Fessenden et al., die Aktivierungsdomäne von Chlorkresol auf einen 173 Aminosäuren langen Abschnitt am RYR1 einschränken, welcher sich von Aminosäure 4007 bis 4180 erstreckt (Fessenden et al. 2003) um weitere drei Jahre später zwei AS zu identifiziert, welche für die Aktivierung durch Chlorkresol essentiell sind: Gln4020 und Lys4021 (Fessenden et al. 2006). Die Bindungsdomäne von Chlorkresol vermutet Fessenden aber in einer Region von Aminosäure 4025 bis 4041, welche ein hydrophobes Segment bildet und ursprünglich von Zorzato als mögliche transmembrane Helix (M2) beschrieben worden ist (Zorzato et al. 1990).

1.3.10.3 Halothan

Halothan, welches zu den MH-Triggersubstanzen gehört, wird sowohl im IVCT als Testsubstanz als auch auf zellulärer Ebene zur Diskriminierung zwischen MHS und MHN Zellen verwendet (Tong et al. 1997; Censier et al. 1998). Die endogenen Modulatoren Ca^{2+} , ATP und Mg^{2+} beeinflussen den Effekt von Halothan auf den RYR1 maßgeblich (Diaz-Sylvester et al. 2008). So konnten Diaz-Sylvester et al., zeigen, dass die Bindung von Halothan an RYR1 nicht genügt um diese zu aktivieren. Wie $[\text{H}^3]$ Bindungsversuche gezeigt haben, müssen einerseits die Rezeptoren sich im offenen Zustand befinden, und andererseits Ca^{2+} und ATP in ausreichender Konzentration vorhanden sein, um eine Halothan induzierte Ca^{2+} Freisetzung beobachten zu können. Viele MH Mutationen zeigen ein erhöhtes Ruhecalcium auf und inaktivieren nicht vollständig bei niedrigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (≤ 100 nM) (Yang et al. 2003). Diese erhöhte RYR1 Aktivität bildet mit der erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der oft beobachteten reduzierten Mg^{2+} Inhibierung (Owen et al. 1997) einen synergetischen Effekt, welcher letztendlich zu einer pathologischen Halothan induzierten Ca^{2+} Freisetzung führen könnte.

1.4 Die MH-Krise auf zellulärer Ebene

Auf zellulärer Ebene erhöhen MH Triggersubstanzen wie Halothan die Öffnungswahrscheinlichkeit und die Öffnungsdauer des RYR1. Die unkontrollierte und erhöhte Ca^{2+} Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, bewirkt eine Kettenreaktion von Ereignissen, welche zu einer Kontraktur der gesamten Skelettmuskulatur führen kann. Der entscheidende Mechanismus zur Wiederherstellung der Ca^{2+} Homöostase, wird von den Energie verbrauchenden Ca^{2+} Pumpen bewerkstelligt. Die Ca^{2+} ATPase ist zahlreich in der Membran des SR vertreten und versucht das im Übermaß im Myoplasma vorhandene Ca^{2+} zurück in das SR zu pumpen. Dieser energieaufwendige und exotherme Mechanismus kann im Falle einer MH-Krise trotzdem die Ca^{2+} Homöostase nicht wieder herstellen, da sich der Ca^{2+} Freisetzungskanal RYR1 im offenen Zustand befindet, und nicht mehr schließt. Der erhöhte energetische Verbrauch bedingt zunächst nicht nur eine verstärkte aerobe Glykolyse (oxidative Energiegewinnung), und somit einen hohen Sauerstoffverbrauch, sondern stellt wie der Ca^{2+} ATPase Pumpmechanismus eine stark exotherme Reaktion dar. In Summe erhöhen diese exothermen Reaktionen die Körperkerntemperatur drastisch (siehe Abb.10). Das durch die verstärkte aerobe Glykolyse im Übermaß entstehende CO_2 , wird zunächst über die Atmung ausgeschieden. Die rasch verbrauchten Sauerstoffreserven fördern eine anaerobe Glykolyse, welche eine Laktatazidose (Glykogen wird über Glykose-6-Phosphat zu Pyruvat und in späterer folge zu Laktat abgebaut) und in späterer Folge in Summe eine metabolische Azidose bedingen. Die charakteristische Dauerkontraktur des Muskels wird zwar hauptsächlich vom hohen myoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegel bedingt, aber die reduzierte Verfügbarkeit von ATP erschwert zusätzlich die Lösung der Myosinquerbrückenbindung. Die Verkrampfung der Muskulatur hat außerdem zur Folge, dass die Muskulatur versorgenden Gefäße verengt werden. Die Folge ist eine einsetzende Rhabdomyolyse, welche einerseits über eine Kaliumfreisetzung zu Herzrhythmusstörungen führt, andererseits über die Freisetzung von Myoglobin eine Myoglobinurie und die Gefahr eines Nierenversagens mit sich bringt.

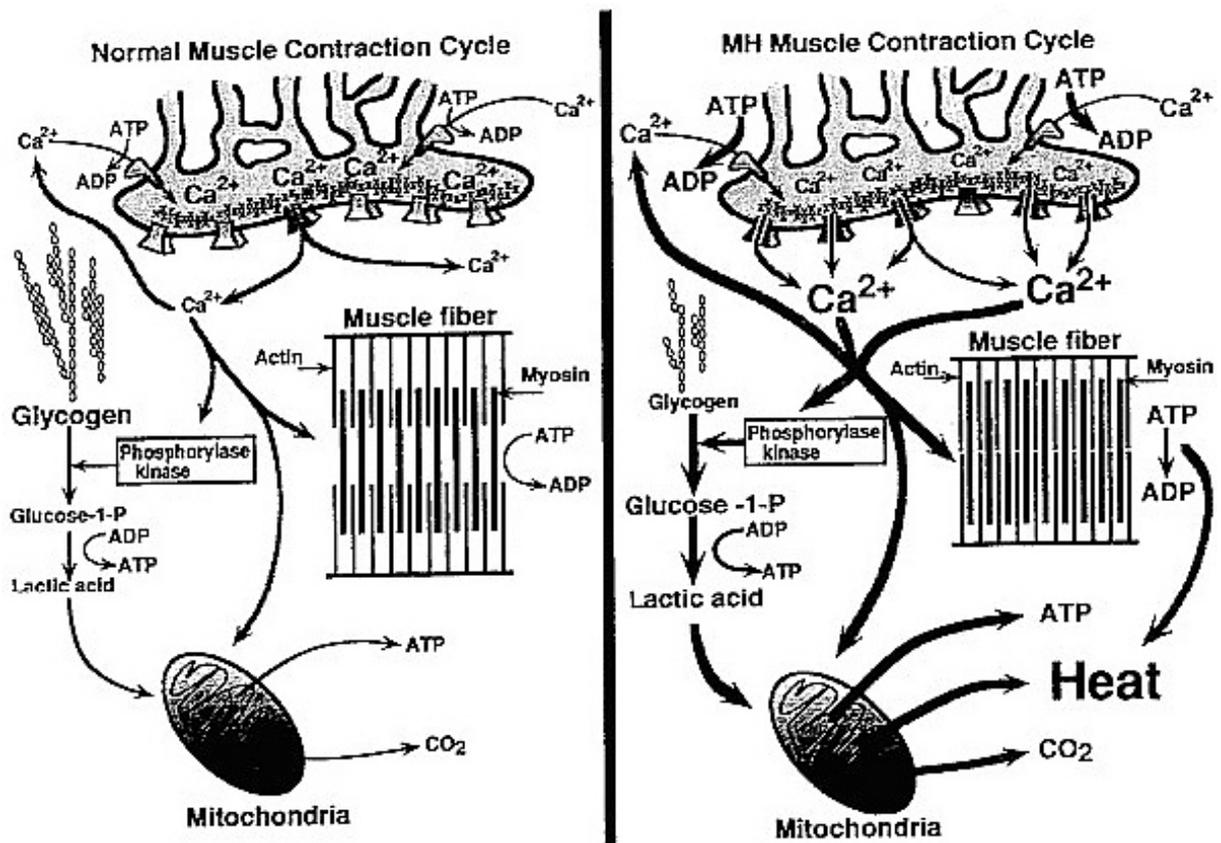


Abb. 10 Schematischer Verlauf einer malignen Hyperthermie Krise auf zellulärer Ebene (MacLennan and Phillips 1992)

1.5 Diagnose mittels genetischen Tests

Um einen genetischen Test in der MH Prävention einsetzen zu können, müssen bezüglich der spezifischen Mutation drei Kriterien erfüllt werden, welche ihre Kausalität beweisen (www.emhg.org):

1. eine genetische Charakterisierung
2. eine funktionelle Charakterisierung
3. die Publikation der Resultate in einer wissenschaftlichen Zeitschrift

Die genetische Charakterisierung beinhaltet eine Beschreibung der spezifischen Mutation auf DNA sowie auf Protein Ebene, wobei der Aspekt der evolutionären Konservierung der

betroffenen Aminosäure im Tierreich, deren Änderung in Ladung und Polarität und die eventuell damit verbundene Strukturveränderung des Proteins im Vordergrund stehen.

Die funktionelle Charakterisierung sieht eine rekombinante *in vitro* Expression des mutierten Proteins in einem definierten genetischen System vor (HEK293-Zelllinie oder Myotuben von Knock-out Mäusen), wobei die durch spezifische Testsubstanzen ausgelöste Ca^{2+} Freisetzung fluorometrisch gemessen wird.

Alternativ kann eine funktionelle Charakterisierung auch in Myotuben stattfinden, welche von den betroffenen Mutationsträgern stammen (primäre Muskelzellkultur aus Biopsimaterial), wobei auch hier wiederum die durch spezifische Aktivatoren des RYR1 (wie z.B. Koffein, Chlorkresol und Halothan) ausgelöste Ca^{2+} Freisetzung gemessen werden muß. Bei diesen Experimenten sollten Zellen von mindestens zwei nicht verwandten Individuen mit der gleichen Mutation verwendet werden.

Eine Publikation der erarbeiteten Daten in einer wissenschaftlichen Zeitschrift garantiert die Qualität und den Zugang der experimentellen Daten.

Obwohl eine Vielzahl an Mutationen im RYR1 beschrieben wurden, konnten bis zum heutigen Tage lediglich 29 Mutationen diese Kriterien erfüllen und werden von der EMHG als kausale MH Mutationen anerkannt (siehe Tab.5).

Liste der kausativen maligne Hyperthermie Mutationen im RYR1

Nummer	Exon	Nukleotid	Aminosäure austausch	Diagnose	Referenz
1	2	c.103T>C	p.Cys35Arg	MHS	(Lynch et al. 1997)
2	6	c.497C-T	p.Arg163Cys	MHS,CCD	(Quane et al. 1993)
3	6	c.488G-T	p.Arg163Leu	MHS	(Nicole Monnier 2005)
4	9	c.742G-A	p.Gly248Arg	MHS	(Gillard et al. 1992)
5	11	c.1021G-A	p.Gly341Arg	MHS	(Quane et al. 1994) (Quane et al. 1994)
6	12	c.1209C-G	p.Ile403Met	MHS,CCD	(Quane et al. 1993)
7	14	c.1565A-C	p.Tyr522Ser	MHS,CCD	(Quane et al. 1994)

8	15	c.1654C-T	p.Arg552Trp	MHS	(Keating et al. 1997)
9	17	c.1840C-T	p.Arg614Cys	MHS	(Gillard et al. 1991)
10	17	c.1841G-T	p.Arg614Leu	MHS	(Quane et al. 1997)
11	39	c.6487C-T	p.Arg2163Cys	MHS	(Manning et al. 1998)
12	39	c.6488G-A	p.Arg2163His	MHS,CCD	(Manning et al. 1998)
13	39	c.6502G-A	p.Val2168Met	MHS	(Manning et al. 1998)
14	40	c.6617C-T	p.Thr2206Met	MHS	(Manning et al. 1998)
15	40	c.6617C-G	p.Thr2206Arg	MHS	(Brandt et al. 1999)
16	44	c.7048G-A	p.Ala2350Thr	MHS	(Sambuughin et al. 2001)
17	44	c.7124G-C	p.Gly2375Ala	MHS	(Wehner et al. 2003)
18	45	c.7282G-A	p.Ala2428Thr	MHS	(H. Rueffert 2002)
19	45	c.7300G-A	p.Gly2434Arg	MHS	(Keating et al. 1994)
20	45	c.7304G-A	p.Arg2435His	MHS,CCD	(Zhang et al. 1993)
21	46	c.7360C-T	p.Arg2454Cys	MHS	(Brandt et al. 1999)
22	46	c.7361G-A	p.Arg2454His	MHS	(Barone et al. 1999)
23	46	c.7372C-T	p.Arg2458Cys	MHS	(Manning et al. 1998)
24	46	c.7373G-A	p.Arg2458His	MHS	(Manning et al. 1998)
25	100	c.14387A-G	p.Thr4796Cys	MHS,CCD, NM	(Monnier et al. 2000)
26	100	c.14477C-T	p.Thr4826Ile	MHS	(Brown et al. 2000)
27	101	c.14512C-G	p.Leu4838Val	MHS	(Oyamada et al. 2002)
28	101	c.14582G-A	p.Arg4861His	CCD	(Monnier et al. 2001)
29	102	c.14693T-C	p.Ile4898Thr	CCD,MHS	(Lynch et al. 1999)

Tab. 5 Liste der anerkannten MH Mutationen im RYR1 (www.emhg.org).

Obwohl in den meisten Fällen eine Mutation im RYR1 die kausale Ursache der MH darstellt, wurden im Laufe der Jahre auch weitere Genloci beschrieben, welche in Verbindung mit dieser Prädisposition stehen (siehe Tabelle 6).

	Gen Symbol	Gen Name	Sequenz- Accession	Locus
MHS1	RYR1	Ryanodin rezeptor	JO 5200	19q13.1
MHS2	SCN4A	Na ⁺ -Kanal	154275	17q11.2-q24
MHS3	CANA 2D1	DHPR- Untereinheit	114204	7q21-q22
MHS4	unbekannt		%600467	3q13.1
MHS5	CACNA1S	DHPR- Untereinheit- alpha-1S- Calciumkanal-	114208 L33789 NM 000069	1q32
MHS6	unbekannt	unbekannt	601888	5p: D5S419- D5S398

Tab. 6 Auflistung aller bekannten Genloci, in denen kausale MH Mutationen auftreten können

Diese Heterogenität der MH Veranlagung – es wurden insgesamt 6 Genloci beschrieben, welche mit einer MHS Diagnose segregieren können – erschwert die Entwicklung eines einfachen genetischen Tests.

2 Material-Methoden

2.1 Der IVCT

Der IVCT wurde vom Personal der klinischen Abteilung für Spezielle Anästhesie und Schmerztherapie am Wiener Allgemeinen Krankenhaus gemäß dem Protokoll der EMHG durchgeführt (MH Unit Vienna, Austria; Prof. H. Gilly, Prof. A. Michalek).

Dem Patienten wurden im Rahmen einer Muskelbiopsie mehrere Muskelbündel mit einer Länge von 15 bis 25 mm, einer Stärke von 2 bis 3 mm, und einem Gewicht von 100 bis 200 mg aus dem Musculus vastus lateralis entnommen. Diese Muskelbündel wurden in weiter folge den Testsubstanzen Koffein und Halothan ausgesetzt um deren Kontrakturverhalten zu bestimmen.

Ein einzelnes Muskelbündel wurde in einem isometrischen Kraftaufnehmer eingespannt, und dieser in eine carboxygenierte Krebs-Ringerlösung getaucht um die Vitalität des Muskelbündels über längere Zeit zu gewährleisten. Abbildung 11 zeigt den schematischen Aufbau der Apparatur zur Durchführung des IVCT. Das Reaktionsbad wurde konstant auf 37°C gehalten. Zunächst wurde das Muskelbündel mit 2 mN vorgespannt und über die Ringelektroden elektrisch stimuliert. Nach einer nochmaligen langsamen Vorspannung auf 150% der initialen Länge des Muskelbündels wurde die optimale Einzelreizamplitude von 1 g bzw. 10 mN - generiert durch elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,2 Hz - erreicht. Anschließend wurden die Testsubstanzen dem Versuchsbad zugesetzt.

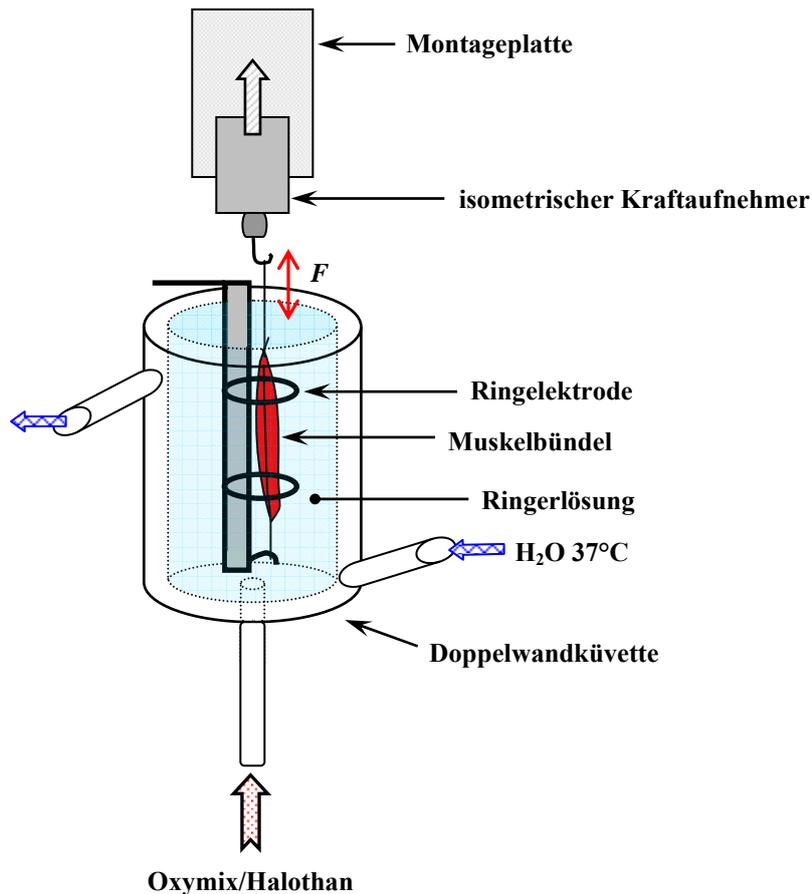


Abb.11 Schematischer Aufbau der Apparatur zur Durchführung des IVCTs

Das Protokoll der EMHG sieht insgesamt zwei Tests vor, die jeweils zweimal durchgeführt werden. Ein Test benutzt Koffein, der zweite Test Halothan als Testsubstanz. Beide Substanzen sind spezifische Aktivatoren des RYR1. Der Koffeintest wurde kumulativ durchgeführt. Die Koffeinkonzentration im Versuchsbad wurden schrittweise wie folgt erhöht: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 und 4,0 mM. Die Konzentrationserhöhung erfolgte alle 3 Minuten bzw. nach Erreichen einer maximalen Spannung. Während des gesamten Testes wurden über einen Schreiber das Kontraktions- (elektrische Stimulation über die Ringelektroden) und das Kontrakturverhalten des Muskels protokolliert und die gewonnenen Daten digitalisiert und gespeichert. Der Halothantest erfolgte in ähnlicher Weise, nur wurde Halothan – da es ein volatiles Anästhetikum ist – dem konstant einperlenden Sauerstoff beigemischt, welcher den Muskel in der Ringerlösung umspült. Die niedrigste Koffein bzw. Halothankonzentration, welche einen Kontrakturanstieg um mindestens 2 mN bewirkte wurde als Schwellenkonzentration bezeichnet. War die Schwellenkonzentration niedriger oder gleich 2,0 mM Koffein und 0,44 mM (2% v/v) Halothan, wurden beide Tests als positiv gewertet und der/die PatientIn wurde als MH suszeptibel (MHS) eingestuft. Bei ihm/ihr darf nur eine

triggerfreie Narkose durchgeführt werden. War nur einer der beiden Tests positiv, dann lautete die Diagnose MH-Equivocal Halothan (MHEH) - wenn der Halothantest positiv war - oder MH-Equivocal Koffein (MHEC) – wenn nur der Koffeintest positiv war. Nur wenn beide Tests – sowohl mit Halothan als auch mit Koffein – negativ ausgefallen, wurde die Diagnose MH-Normal (MHN) gestellt. Aus Gründen der Patientensicherheit werden MHEH sowie MHEC Patienten wie MHS behandelt – also keine Narkose mit möglichen MH triggernden Narkotika durchgeführt, da ein erhöhtes Risiko bei dieser Patientengruppe nicht auszuschließen ist.

2.2 Zellkultur

Präparation primärer humaner Skelettmuskelzellen

Steril präparierte Skelettmuskelzellfragmente (200-300 mg Biopsiematerial) wurden in HBSS überführt und zu einer primären humanen Skelettmuskelzellkultur aufbereitet. Auf ein steriles Uhrglasschälchen wurden ca. 3 ml HBSS vorgelegt und das Gewebe mittels Pinzette mittig im Uhrglasschälchen platziert. Unter dem Mikroskop wurden mit Hilfe von 2 Pinzetten Blutgerinnseln, Bindegewebe und Fettzellen vom Muskel entfernt. Der gesäuberte Muskel wurde nun mit zwei Skalpellens in kleine, feine Stücke (ca. 1 mm³) zerschnitten, diese in einen sterilen Erlenmeyerkolben mit Magnetrührer überführt und 15 ml kollagenase- und trypsinhaltige Dissoziationslösung zugesetzt. Der sterilen Erlenmeyerkolben wurde mit einer Folie verschlossen und auf einen Magnetrührer für 30 bis 60 min in den Brutschrank bei 37°C und 2,5% CO₂ gestellt. Die kollagenase- und trypsinhaltige Dissoziationslösung löste nun den Zellverband enzymatisch auf. Anschließend wurde mit einer engmundigen Glaspipette die Gewebssuspension 10-mal auf- und abgezogen um mechanisch die Gewebdissoziation zu beschleunigen. Entscheidend ist die Freisetzung der Satellitenzellen, welche in späterer Folge die primäre humane Muskelzellkultur bilden. Nur die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, die noch unvollständig dissoziierten Gewebstücke verblieben im Erlenmeyerkolben. Zur Inhibierung der enzymatischen Reaktion wurde die doppelte Menge an PBS + 20% Serum der Zellsuspension zugesetzt. Der Ansatz wurde anschließend mit 200 g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Satellitenzellen in Waschmedium resuspendiert. Zellen, die sich noch immer im Gewebverband befanden, wurden einem weiteren Verdauungsschritt unterworfen, anschließend mit der Zellsuspension aus dem ersten

Schritt vereint, 5 min bei RT mit 200 g abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 10 ml Waschlösung resuspendiert und durch ein 70 µm Zellsieb filtriert. Die Zellsuspension wurde 5 min bei RT mit 200 g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in Wachstumsmedium resuspendiert. Pro 100-200 mg Ausgangsmaterial wurde eine 25 cm² Zellkulturflasche angelegt. Die Zellkulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37°C und 2,5% CO₂ für mehrere Tage inkubiert bis eine Konfluenz von 70-80% erreicht wurde (Brinkmeier et al. 1993).

„Passagieren“ von Skelettmuskelzellen

Nachdem die Satellitenzellen den Boden der Zellkulturflasche zu 70 – 80% bedeckten, wurde das Nährmedium (GM) abgesaugt, mit HBSS gespült und Trypsin EDTA (1 ml / 10 cm²) zum Lösen bzw. Abheben der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zugegeben. Das Ablösen und Abkugeln der Zellen wurde unter dem Mikroskop überwacht. Durch seitliches Klopfen an die Zellkulturflasche könnte dieser Vorgang beschleunigt werden. Nachdem sich über 90% der Zellen abgelöst hatten, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe der doppelten Menge an Waschlösung inhibiert. Der Ansatz wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 5 min bei RT und 200 g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml Waschlösung (80% RPMI und 20% Serum) resuspendiert. Die Zellzahl wurde im Mikroskop mittels einer Bürkert-Türk Zählkammer bestimmt, die Zellen mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen/cm² erneut in Zellkulturflaschen ausgelegt und bei 37°C, 2,5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Einfrieren von primären humanen Muskelzellen

Nach Abzentrifugation der Zellen bei 200 g (siehe „Passagieren von Muskelzellen) und Zellzahlbestimmung (Bürkert-Türk Zählkammer), wurden die Zellen mit Einfrierlösung (9 Teile Wachstumsmedium und 1 Teil DMSO) resuspendieren, in ein Kryoröhrchen überführt und auf -80°C eingefroren. Nach 48 Stunden wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff (-196°C) transferiert und dort aufbewahrt.

Auftauen von primären humanen Muskelzellen

Eine Muskelzellsuspension, welche zuvor in flüssigem Stickstoff eingefroren war, wurde im Wasserbad solange aufgetaut, bis nur mehr ein kleiner Eisklumpen sichtbar war. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Waschmedium resuspendiert und 5 min bei 200 g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Wachstumsmedium resuspendiert, in Zellkulturflaschen ausgelegt und bei 37°C und 2,5% CO₂ inkubiert.

Differenzierung von primären humanen Muskelzellen

Nachdem die Myoblasten eine Konfluenz von ungefähr 75% erreicht hatten, wurde das Wachstumsmedium durch ein Differenzierungsmedium ersetzt. Da das Differenzierungsmedium kein FCS beinhaltete, konnten nun die Muskelzellen ausdifferenzieren. Bei diesem Vorgang verschmelzen eine Vielzahl von Myoblasten zu vielkernigen, kontraktilen Myotuben, welche sich durch ihre charakteristische Form (siehe Abb.12) im Lichtmikroskop von Myoblasten unterscheiden lassen.

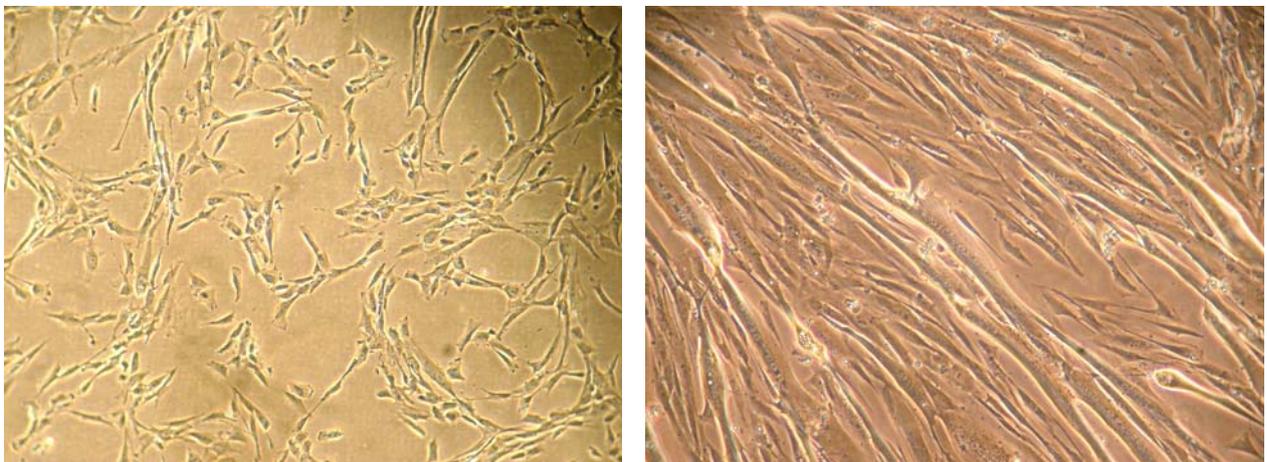


Abb.12 Undifferenzierte (links) und differenzierte (rechts) primäre Skelettmuskelzellen im Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung.

Stimulation von Skelettmuskelzellen

Um zu ergründen, ob primäre humane Skelettmuskelzellen von MHN und MHS (p.Arg3985Trp) Individuen eine unterschiedliche Genexpression aufweisen, wurden die

Zellen in Standard 4-Well Zellkulturplatten gezüchtet, um in Folge mittels Real-Time PCR deren Genexpression zu vergleichen. *In vivo* ist die Hauptaufgabe von Muskelzellen die Kontraktion/Relaxation. Da Skelettmuskelzellen bei adäquaten nervösen Stimuli eine Kontraktion zeigen, wurden diese Bedingungen *in vitro* durch elektrische Stimulation simuliert. Mit Hilfe des „C-Pace Cell Cultur Stimulator“ (Ion Optix Corporation) können ausdifferenzierte Skelettmuskelzellen mit einer Spannung von bis zu +/- 40V, einer Impulsfrequenz von einem Impuls/100s (0.01Hz) bis 10 Impulse/s (10 Hz) und einer Impulsdauer von 0,4 bis 25 ms stimuliert werden.

MHN Zellen wurden mit 25 V, 0,5 Hz und einer Impulsdauer von 8,6 ms 72 Stunden stimuliert bevor die RNA extrahiert wurde. Während der Studie mussten die experimentellen Parameter – Impulsfrequenz und Stimulationsdauer – für MHS Zellen geändert werden, da diese sich vom Boden der Zellkulturflasche lösten und abstarben. MHS Zellen wurden daher mit 25 V, 0,1 Hz und einer Impulsdauer von 8,6 ms 48 Stunden stimuliert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

DNA-Isolation

„DNA Isolation Kit for Mammalian Blood“ (Roche Applied Science, Austria)

Zur Durchführung siehe Arbeitsanleitung.

Kurzbeschreibung:

Das Blut stellt ein komplexes Gemisch aus Zellen, Proteinen und Metaboliten dar. Bei der überwiegenden Mehrheit der Zellen im Blut handelt es sich um reife Erythrozyten, welche keinen Zellkern besitzen. Nur die Gruppe der Leukozyten (Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten) besitzen Kerne und somit genomische DNA, welche extrahiert wurde.

Das Prinzip ist folgendes:

Lyse und Entfernung der Erythrozyten

Lyse der Leukozyten mittels starken anionischen Detergens

Protein Präzipitation

DNA Isolation mittels Ethanol-fällung

Elution in Tris/EDTA (TE)-Puffer

RNA-Isolation

„peqGOLD RNA Pure“ (peqLab Biotechnologie GmbH, Austria).

Zur Durchführung siehe Arbeitsanleitung.

Kurzbeschreibung:

Nachdem die Muskelzellen in der Zellkulturflasche homogenisiert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert wurden (Phenol Guanidinisocyanat-hältige Lösung), wurde durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation eine Auftrennung des Lysats in 3 Phasen bewirkt. Die wässrige obere Phase enthielt die RNA, die mittels Isopropanol gefällt wurde. Die Elution erfolgt mit DEPC-behandeltem H₂O. Die RNA Konzentration wurde mittels Photometer (OD_{260 nm}) bestimmt.

2.3.1 Herstellung von cDNA mittels reverser Transkriptase

„SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Austria)

Zur Durchführung siehe Arbeitsanleitung.

Kurzbeschreibung:

Total-RNA, welche zuvor aus Muskelzellen isoliert und in DEPC-H₂O verdünnt wurde, dient als Matrize. Zur cDNA-Synthese des RYR1 wurden sowohl Oligo(dt)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen, Austria) als auch der Gen-spezifische Primer R15103 (VBC, Austria) (siehe Tabelle 7) benutzt. Diese hybridisieren an die RNA-Matrize und ermöglichen der reversen Transkriptase – eine RNA abhängige DNA Polymerase - die Synthese eines zur RNA komplementären cDNA-Stranges. Anschließend wurde eine RNase H Behandlung durchgeführt, welche den RNA Strang des Hybridmoleküls abbaut. Die RYR1 cDNA lag nun in einzelsträngiger Form vor und konnte anschließend als Matrize für nachfolgende PCRs verwendet werden.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine enzymatische Reaktion bei der Nukleinsäurefragmente *in vitro* vervielfältigt bzw. amplifiziert werden. Tabelle 6 listet die einzelnen Komponenten eines PCR Ansatzes auf.

Reagens	Volumen in μl	Konzentration
ddH ₂ O	34,25 - 38,75	
10x Taq Puffer	5	100 mM Tris-HCl, pH 8,3 ; 500 mM KCl
MgCl ₂	1-4	6,25-25 mM
dNTPs	1	Je 10 mM
5' Primer	1,5	10 pmol/ μl
3' Primer	1,5	10 pmol/ μl
AmpliTaq [®]	0,25	5 U/ μl
DNA	1-2	100-200 ng/ μl

Tab. 7 PCR (50 μl) Reaktionsansatz

Primer zur Amplifikation spezifischer RYR1 Exons aus genomischer DNA

Die Angaben für MgCl₂ und Glycerin gelten für 50 μl PCR-Ansätze

Exon 2: forward: 5' - gcagtatttggtatccgggc -3'

reverse: 5' - gcacctcttcagacteccag -3'

Annealing T°: 66°C- 3 μl MgCl₂

Länge des Exons 2: 120 bp; Länge des PCR-Produkts: 278 bp

Exon 9: forward: 5' - ggagctgaacccttgacttca -3'

reverse: 5' - tctgtcctcccagcctgc -3'

Annealing T°: 65°C – 4 µl MgCl₂

Länge des Exons 9: 75 bp; Länge des PCR-Produkts: 183 bp

Exon 11: forward: 5` - gctcccctgctaaacaca -3`

reverse: 5` - cctggactcaagcgattctc -3`

Annealing T°: 65,5°C – 3 µl MgCl₂

Länge des Exons 11: 165 bp; Länge des PCR-Produkts: 279 bp

Exon 17: forward: 5` - gccacatcttatcccgatgc -3`

reverse: 5` - gggagaggggttgagagggttc -3`

Annealing T°: 63°C – 3 µl MgCl₂

Länge des Exons 17: 134 bp; Länge des PCR-Produkts: 303 bp

Exon 39: forward: 5` - cctgcatggtgctccaag -3`

reverse: 5` - gtaaggggaagggcggtg -3`

Annealing T°: 67°C – 3 µl MgCl₂

Länge des Exons 39: 274 bp; Länge des PCR-Produkts: 338 bp

Exon 45: forward: 5` - tgctccccaaccaccc -3`

reverse: 5` - gcctgcctcccttcccatc -3`

Annealing T°: 65 – 4 µl MgCl₂ mit 15% Glycerin (7,5 µl)

Länge des Exons 45: 109 bp; Länge des PCR-Produkts: 182 bp

Exon 46: forward: 5` - tgcccctctccctccctctac -3`

reverse: 5` - gcatactccttcgccaagtcc -3`

Annealing T°: 65°C – 3 µl MgCl₂

Länge des Exons 46: 121 bp; Länge des PCR-Produkts: 184 bp

Exon 67: forward: 5` - tttgggagtcgggctgggaacg -3`

reverse: 5` - atcacgatggggctggaggacg -3`

Annealing T°: 71°C – 3 µl MgCl₂

Länge des Exons 67: 241 bp; Länge des PCR-Produkts: 409 bp

Exon 87: forward: 5` - tgctcccagggtccctg -3`

reverse: 5` - gggctcgaacctgagcgag -3`

Annealing T°: 63°C – 4 µl MgCl₂

Länge des Exons 87: 105 bp; Länge des PCR-Produkts: 125 bp

Exon 92: forward: 5` - gagagaaaggagatgagaggagc -3`

reverse: 5` - tcctccgtgcctgagtctg -3`

Annealing T°: 67°C– 3 µl MgCl₂

Länge des Exons 92: 77 bp; Länge des PCR-Produkts: 301 bp

DHPR: forward: 5` -cttgggtgctgacctgtcctgtt-3`

reverse: 5` - gatcagacattttctcctgggg -3`

Annealing T°: 60°C, 2 µl MgCl₂ (Monnier et al. 1997)

Primer zur Amplifikation der gesamten kodierenden Sequenz des RYR1

	Primer Name	Primer Orientierung: 5' - 3'
1	F -12	gacctcgacatcatgggtga
2	R 453	gctgggtgcatggtccacca
3	F 649	cacgtcctccgcctctttcat
4	R 1222	gccattggtgctgtggatcat
5	F 1486	tacaccactgctcccacttt
6	R 2277	ccgttgatgcggaaggagatg
7	F 2203	cacctctggccccctgaagac
8	R 2842	gttgctcctccgccttctc
9	F 2770	tctggggagacgctcaagact
10	R 3378	cggtgcccattgaagacatag
11	F 3277	gcagtcaccacaggcgagatg
12	R 4006	gcggcgcaggttttcgtagtc
13	F 3880	gtccagttcaccagcacttc
14	R 4593	ccattggctgtaaaggtcatt
15	F 4523	tcagccacacggacctgtca

16	R 5162	cactttcgaggtggatgctgatgag
17	F 5114	cactgcgcgcaggctactatg
18	R 5576	tcacatcctcatcgccaaaga
19	F 5539	accctgctggtgatgggcat
20	R 6183	cggtgcccagggtggtctc
21	F 6103	gatcaagacctgctggcacact
22	R 6784	gccactgttctccagcaggta
23	F 6696	ctgccgcttctctgctattt
24	R 7414	gaggctgatgatgccacaag
25	F 7364	ccatcctccgctccctgtg
26	R 8047	aaagatgcccagaagagttc
27	F 7987	aacttcggggtcacctcaga
28	R 8603	gggacagggtaacagcactaa
29	F 8528	cacaaagtcccagacctatg
30	R 9255	tcagggcctgacttcatcact
31	F 9181	gccccagctgtggtaactg
32	R 10129	ctcctcctcggacaccacct
33	F 9445	cagcaccagttcggagatgac
34	R 9790	tgtgtagcgggcacctgactc
35	F 9919	gtcacctctgaccacctcaact
36	R 10684	ctttccctgaagggtgaaggtt
37	F 10613	cccgttacgccctgaaagaca
38	R 11249	agacctcaacctcctcttca
39	F 11160	cctgtacatggcctatgctgata
40	R 11959	tgcgtccataggcgactgt
41	F 11877	ggtgttcaacagcctcactga
42	R 12679	agcctcgccgcctcgttca
43	F 12357	cgaaatgatcaactgccaagagttc
44	R 13101	accaggccgcccgaacag
45	F 13069	ctgctctggggctcgtgttc
46	R 13526	cccattctcggcatcggtttct
47	F 13395	gcccacaccgagggtctc
48	R 14009	ttaccaggggcacctgagac

49	F 13921	gaaccgcccctgcggtgtctg
50	R 14919	tgcggtgtcgtatcaaagtag
51	F 14474	gcaccatcctgtcctctgtca
52	R 15173	gggcttgctgtgagaataagg

Tab. 8 Sequenzen der spezifischen Primer zur Amplifikation der kompletten mRNA bzw. cDNA des RYR1: F steht für forward , R für reverse (McCarthy 2000).

2.3.3 Sequenzierung

Die Methode beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger und wurde von der Firma Ibl (Vienna, Austria) übernommen. Für die Sequenzierung wurden die PCR Produkte mittels Invisorb Spin PCRapid Kit (Invitek) aufgereinigt und in Aqua dest. gelöst. Die für die Sequenzierung benötigten spezifischen Primer wurden auf eine Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt, wobei pro Sequenzierung 1-2 μl Primer und 2-5μl PCR Produkt verwendet wurden.

Die zu sequenzierenden DNA Fragmente wurden über eine Einschritt-PCR (ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) chemisch mit verschiedenen Farbstoffen markiert. Dünne Silizium Kapillaren gefüllt mit einem Polymer ermöglichten in einer Elektrophorese die Auftrennung der markierten DNS Fragmente entsprechend ihrer Größe. Die migrierenden DNA Fragmente wanderten durch eine Detektionszelle, in der ein Laser die Farbstoffe anregte. Die emittierte Fluoreszenz wurde von einem Detektor registriert, digitalisiert und von der „DNA-Sequencing Analysis Software“ in ein 4 Farben Elektropherogramm übersetzt. Auf der Y-Achse wurden die spezifische Farbstoffintensität und auf der X-Achse die Zeit darstellt. Jedes Signal konnte einem farbstoffmarkierten dideoxy-Nukleotid zugeordnet werden. Die Ausprägung und die Position der „peaks“ wurden herangezogen um die Sequenz des DNA-Fragmentes zu ermitteln. Alle Elektropherogramme wurden einzeln Korrektur gelesen und mit der Datenbank von NCBI verglichen.

2.3.4 Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen Polymerase Ketten Reaktion, ermöglicht aber über eine Quantifizierung der entstehenden DNA-Moleküle einen Rückschluss auf die initial eingesetzte cDNA bzw. mRNA Menge. Mit Hilfe dieser Methode kann die Expression (auf RNA Niveau) unterschiedlicher Gene in verschiedenen Zellpopulationen bestimmt und verglichen werden.

Beschreibung der Methode

Ein qRT-PCR Lauf besteht – wie eine herkömmliche PCR - aus ungefähr 35 bis 40 sich wiederholenden Zyklen (Denaturierung, Hybridisierung, Elongation). Im Unterschied zur klassischen PCR, befindet sich im Reaktionsgemisch ein fluoreszierender Farbstoff, welcher in die entstehenden DNA Fragmente interkaliert und Fluoreszenzstrahlung emittiert. Diese Fluoreszenzstrahlung wird von einem Detektor registriert, wobei die Zunahme der emittierten Strahlung mit der Zunahme der amplifizierten DNA korreliert.

In den ersten Zyklen ist diese Fluoreszenzstrahlung noch unter der Nachweisschwelle, ab dem fünften bis siebenten Zyklus aber, ist sie proportional zum neu synthetisierten PCR-Produkt. In dieser exponentiellen Phase sind die Detektionsbedingungen optimal und eine Quantifizierung ist möglich. Ab einer Zykluszahl zwischen 30 und 35 werden die Reaktionsbedingungen suboptimal und eine Quantifizierung ist nicht mehr möglich. Nach abgelaufener qRT-PCR wird zur Qualitätskontrolle eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität des Produktes zu bestimmen.

Auswertung der qRT-PCR

Die Auswertung einer qRT-PCR erfolgt über eine relative Quantifizierung, bei der die Genexpression eines Zielgens auf ein oder mehrere „housekeeping gens“ (HKG) bezogen werden. Die HKG dienen als Referenzgene und sollten in ihrer Expression konstant bleiben, unabhängig von Zellzyklusphase oder experimentellen Bedingungen. Sie dienen der Normierung der Resultate und gleichen Variationen in der Menge an eingesetzter RNA aus.

Diese Normalisierung der Expressionsergebnisse ermöglicht einen Vergleich zwischen verschiedenen Zellpopulationen oder Behandlungsgruppen.

Berechnung und Vergleich der Genexpression verschiedener Zellpopulationen

Als Maß für die Quantifizierung der RNA-Initialmenge wird der sog. Ct-Werte (threshold-cycle) oder Schwellenwert-Zyklus für jedes Gen herangezogen. Dieser Ct-Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei dem das spezifische Fluoreszenzsignal signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Obwohl jedes Gen in einem anderen PCR-Zyklus diesen Schnittpunkt erreicht, haben alle Proben eines qRT-PCR Laufes gemein, dass sie beim Erreichen dieser Schwellenkonzentration die gleiche Menge an neu synthetisiertem PCR Produkts beinhalten. Die relative Expression des untersuchten Gens wird über die „delta-delta Ct-Methode“ bestimmt ($\Delta\Delta Ct$ -Methode). Hierzu wird zuerst der Ct-Wert des „housekeeping gen“ (HKG) vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta Ct = Ct\text{-Zielgen} - Ct\text{-HKG}$). Nach dieser Normierung, wird der ΔCt -Wert des Zielgens der Versuchsgruppe vom ΔCt -Wert des Zielgens der Kontrollgruppe abgezogen. Dieser neue Wert wird $\Delta\Delta Ct$ -Wert genannt. Der relative Expressionsunterschied ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Ist der Expressionsunterschied <1 , handelt es sich um eine „down“ („runter“) Regulation der Genexpression, ist er >1 handelt es sich um eine „up“ bzw. Überexpression.

2.3.4.1 Genexpressionsstudie

Versuchsaufbau

MHN Muskelzellen wurden 72 Stunden mit 25 V, 0,5 Hz und einer Impulsdauer von 8,6 ms stimuliert, während MHS Muskelzellen nur 48 Stunden mit 25 V, 0,1 Hz und einer Impulsdauer von 8,6 ms stimuliert wurden. Wie bereits im Absatz „Stimulation von Muskelzellen“ erwähnt, mußten die experimentellen Parameter – Stimulationsdauer und Stimulationsfrequenz - für MHS Muskelzellen geändert werden, da diese sich vom Boden der Zellkulturflaschen lösten und abstarben. Nach Stimulation der Muskelzellen wurde die Total RNA isoliert und RNA aus jeweils vier 75 cm² Muskelzellkulturschalen zu gleichen Teilen

zusammengeführt. Insgesamt vier verschiedene „RNA-Pools“ – zwei MHS RYR1 p.Trp3985Arg und zwei MHN RYR1 Wildtyp – wurden auf diese Weise angelegt. Nach Behandlung mit DNasen waren diese „RNA-Pools“ Ausgangspunkt der „First Strand cDNA Synthesis Reaction“. Nach erfolgter cDNA Synthese wurden die RNA/DNA Hybridmoleküle mit RNasen behandelt, um einsträngige cDNA-Moleküle zu erhalten, welche nun als Matrize für die qRT-PCRs benutzt wurde.

Um ein breites Spektrum an Genen zu untersuchen, welche durch eine veränderte Ca^{2+} -Homöodynamik eine veränderte Expressionsrate aufweisen könnten, wurde der „Human cAMP/ Ca^{2+} PathwayFinder PCR Array“ von SA Bioscience (www.sabiosciences.com) ausgesucht.

2.4 Physiologische Methoden

2.4.1 Ca^{2+} -Imaging mit dem Calcium sensitiven Farbstoff Fura-2/AM

Zur Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde der dual anregbare Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM gewählt. Fura-2/AM ist als Acetomethylester apolar und daher membrangängig. In der Zelle werden die Esterbindungen durch zelleigene Esterasen gespalten, womit der Farbstoff in seiner freien, stark geladenen Form vorliegt (siehe Strukturformel in Abb.13), nicht mehr die Zellmembran passieren kann, und sich in der Zelle anreichert. Fura-2/AM wirkt als Chelator, bindet selektiv intrazelluläres Ca^{2+} ($K_d = 224 \text{ nM}$) und erfährt eine Ca^{2+} induzierte Verschiebung seines Exzitationsspektrums bei gleich bleibendem Emissionsmaximum (siehe Abb.13). Die ionenfreie Zustandsform hat eine Exzitationsmaximum von 340 nm, welche sich bei Bindung von Ca^{2+} auf 365 nm verschiebt, während das Emissionsmaximum bei 510 nm unverändert bleibt. Werden nun die Emissionsintensitäten beider Zustandsformen in Verhältnis (Ratio, R) gestellt und die Annahme getroffen, dass es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, ist die Änderung des Fluoreszenzintensitätsverhältnisses proportional zur freien $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

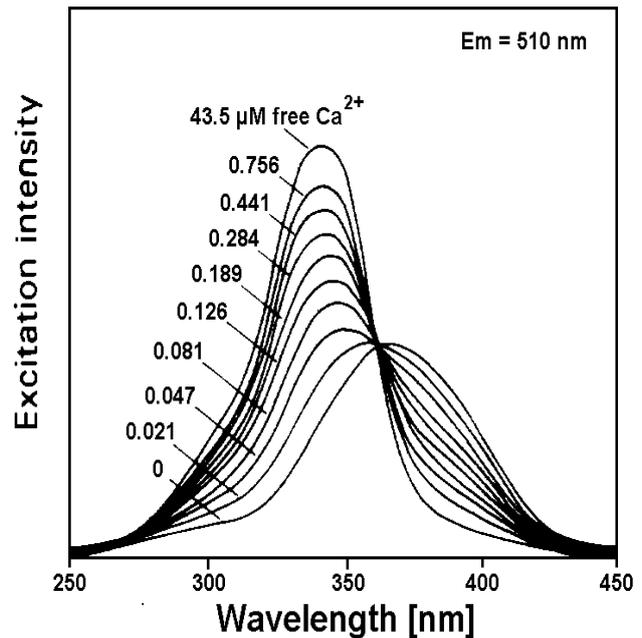
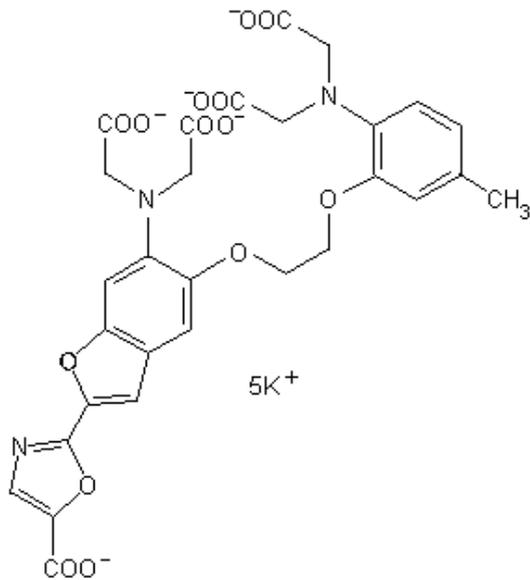


Abb. 13 Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 (links) und dessen Anregungsspektrum (rechts) bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität, gemessen bei der Emissionswellenlänge von 510 nm für Anregungswellenlängen im Bereich zwischen 250 nm und 450 nm. Fura-2 zeigt eine gegenläufige Änderung der Emissionsintensität bei den Exzitationswellenlängen 340 nm und 380 nm.

Das Verhältnis der Emissionsintensität beider Zustandsformen ist von der intrazellulären Konzentration des Farbstoffes somit unabhängig. Die freie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde durch folgende Formel nach (Grynkiewicz et al. 1985) ermittelt:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot \beta \cdot \frac{(R - R_{\min})}{(R - R_{\max})}$$

- K_d Dissoziationskonstante von Fura-2 mit 224 nM,
- β Fluoreszenzquotient bei 380 nm zwischen Ca^{2+} freier und Ca^{2+} gebundener Form
- R Ratio, Fluoreszenzquotient aus 340 nm und 380 nm
- R_{\min} Fluoreszenzquotient 340/380 bei Abwesenheit von Ca^{2+}
- R_{\max} Fluoreszenzquotient 340/380 bei sättigender $[\text{Ca}^{2+}]$

Die Fura-2 Imaging Experimente wurden aufgezeichnet und „offline“ ausgewertet. Die untersuchten Muskelzellen wurden in der Imagingsoftware als „region of interest“ (ROI) und ein zellfreier Hintergrund als „background“ definiert. Anschließend wurde die

Hintergrundintensitäten beider Wellenlängen von jenen der ROI abgezogen und daraus die 340/380 Ratio gebildet. Aus diesen Werten wurde mittels der Gleichung von Grynkiewicz die $[Ca^{2+}]_i$ der untersuchten Muskelzellen errechnet.

Kalibrierung

Um die zuvor beschriebene Gleichung von Grynkiewicz den spezifischen Versuchsbedingungen anzupassen, mußten in einem Kalibrierungsexperiment die spezifischen Werte für R_{min} , R_{max} und β ermittelt werden. Zur Ermittlung von R_{min} wurde die extrazelluläre $[Ca^{2+}]$ durch EGTA (5 mM) auf ein Minimum reduziert und durch Zugabe von Ionomycin (5 μ M) die Zellmembran für Ionen permeabilisiert bis ein Gleichgewichtszustand zwischen extra- und intrazellulärem Raum bei einem pH von 7,4 erreicht wurde. R_{min} ergab sich dann aus dem Fluoreszenzverhältnis von 340 nm/380 nm.

Für die Ermittlung von R_{max} wurde CaCl (10mM) dem experimentellen Ansatz in Überschuss zugegeben womit das intrazelluläre Fura-2 vollständig mit Ca^{2+} gesättigt wurde. R_{max} ergibt sich dann wie R_{min} aus dem Quotienten der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und 380 nm. Die Kalibrierungsexperimente ergaben einen R_{min} Wert von 0,22, einen R_{max} Wert von 3,18 und einen Wert für β von 4,9.

Vorbereitung der Zellen für das Ca^{2+} -Imaging

Primärkulturzellen wurden auf 10 cm² große Glasplättchen (mit Nitriersäure vorbehandelt und mit Matrigel (BD Bioscience) beschichtet) mit einer Dichte von ca. 5000 bis 7000 Zellen/cm² ausgelegt und im Brutschrank bei 37°C und 2,5% CO₂ inkubiert. Nach 2 bis 7 Tagen erreichten die Zellen eine Konfluenz von 50 bis 70%, welche für die Ca^{2+} -Imaging Technik nicht überschritten werden sollte, da bei jeder Messung ein zellfreier Hintergrund notwendig ist.

Laden der Zellen mit dem Farbstoff Fura-2 AM

50 μ g des Fluorophors wurden in 50 μ l DMSO gelöst und auf zehn 1.5 ml Reaktionsgefäße zu je 5 μ l (5 μ M) aliquotiert. Zum Laden der Zellen mit Fura-2/AM wurde ein Aliquot mit 2 μ l

(0,002%) Pluronic F127 vermischt und mit 1 ml NT aufgefüllt und gevorgetext. Ein mit differenzierten Muskelzellen bewachsenes Glasplättchen wurde in einer Petrischale mit dem zellpermeablen Farbstoff für 30 min bei 37°C und 2,5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Petrischale mit 2 ml NT aufgefüllt und für 20 min bei 37°C und 2,5% CO₂ nachinkubiert. Das Glasplättchen wurde in eine Perfusionskammer mit einem Kammervolumen von ca. 500 µl eingesetzt, welche eine gleichmäßige Perfusion von ungefähr 1 ml/min ermöglichte. Die Kammer wurde in die Halterung auf den Objektisch eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon Diaphot 300) fixiert. Mit einem 40x Ölimmersionsobjektiv wurden die Zellen für die anschließenden Experimente ausgesucht. Es wurde darauf geachtet, dass auch ein zellfreier Hintergrund im Sichtfenster vorhanden war, welcher eine Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz ermöglichte.

Herstellung der Halothan Lösungen

Halothan ist ein volatiles Anästhetikum, schwer löslich in Wasser, gut löslich im lipophilen Lösungsmittel DMSO, besitzt eine Dichte von 1,87 g/ml und ein Molekulargewicht von 197,38 g/mol. Da Halothan durch Kunststoffe diffundiert, wurden zur Herstellung der Lösungen wie auch zur Aufbewahrung der Halothanlösungen nur Utensilien aus Glas oder PTFE (= Teflon®) verwendet. Besonderes Augenmerk wurde bei der Herstellung von Stammlösungen auf ein zügiges Arbeitstempo gelegt, da Halothan leicht flüchtig ist (Kp= 50,2°C). Sowohl die Stammlösung wie auch alle Arbeitslösungen wurden täglich neu vorbereitet.

In Abbildung 14 ist die Strukturformel von Halothan wiedergegeben.

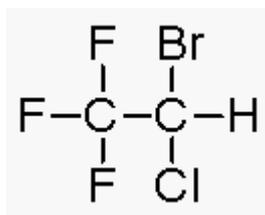


Abb. 14 Strukturformel von 2-Brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan (Halothan)

Die Vorbereitung von Halothanlösungen wurde in zwei Stufen durchgeführt: zuerst wurde eine Stammlösung von Halothan in DMSO mit einer Konzentration von ca. 20 mM hergestellt, anschließend wurden die Arbeitslösungen durch Zugabe von errechneten Mengen an Stammlösung in Normaltyrode erzeugt.

Um eventuelle Verluste bei der Herstellung der Lösungen, die durch die extrem hohe Flüchtigkeit von Halothan entstehen können zu berücksichtigen, wurde bei der Vorbereitung der Lösungen die zugegebene Menge durch Einwiegen bestimmt und die Arbeitslösung jeweils kurz vor den Experimenten zubereitet.

Statistik

Die in Ca^{2+} Imaging Experimente ermittelten Daten wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung der experimentell ermittelten Daten, wurde mittels *t-Test* die Signifikanz des Unterschiedes zwischen den untersuchten Gruppen überprüft. Alle angegebenen Mittelwerte werden mit Standardfehler \pm S.E.M angegeben. Daten, welche keiner Normalverteilung entsprachen, wurden mittels Mann-Whitney Test auf Sigifikanz des Unterschiedes untersucht, wobei statt den Mittelwerten die Medianwerte herangezogen wurden und die Verteilung mittels Quantilen bzw. den Percentiellen $Q_{.25}$ und $Q_{.75}$ angegeben wurden. Bei gemischten Datensätzen (ein Teil Normalverteilt, ein anderer nicht Normalverteilt) wurden alle Daten mittels Mann-Whitney Test auf Sigifikanz des Unterschiedes untersucht.

2.5 Verwendete Lösungen und Materialien

Zellkultur

Material	Unternehmen	Standort
Trypsin-EDTA, Glutamax, Penicilin, Strptomycin, Gentamicin, und Amphotericin B	GIBCO	Wien, Austria
Trypsin	Roch	Wien, Austria
Fibronectin	BD Bioscience	Bedford, MA
Matrigel	BD Bioscience	Bedford, MA
Standard Materialien	Sigma Aldrich GmbH	Wien, Austria

Tab. 9 Auflistung der verwendeten Lösungen und Materialien.

Wachstumsmedium GM	
Ham´s F12 ergänzt mit	
15%	FCS
10 ng/ml	EGF
400 ng/ml	Dexamethason
0.5 mg/ml	Fetuin
0.5 mg/ml	BSA
200 ng/ml	Insulin
7 mM	Glucose
4 mM	Glutamax
200 u/ml	Penicillin
200 µg/ml	Streptomycin
0.5 µg/ml	Amphotericin B

Tab. 10 Verwendete Wachstumsmedien (Anne Baroffio 1993)

Differenzierungsmedium DM	
DMEM ergänzt mit	
5%	Horse Serum
4 mM	glutamax
0.1 µg/ml	gentamycin

Tab. 11 Verwendete Differenzierungsmedien (Anne Baroffio 1993)

Waschlösung
20% Serum
80% RPMI bzw. DMEM

Tab. 12 Waschlösung

Dissoziationslösung für Muskelgewebe
5,4 mM KCl
25 mM Glukose
25 mM Saccharose
50 mg/l Gentamycin
2,5 mg/ml Trypsin
220 U/ml Collagenase Typ II
0,1% BSA
pH= 7,4

Tab. 13 Dissoziationslösung

Molekularbiologie

Kits

„DNA Isolation Kit for Mammalian Blood“ (Firma Roche Applied Science)

„peqGOLD RNA Pure“ (Firma peqLab Biotechnologie GmbH).

„SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Austria)

qRT-PCR-Kit: APHS 066 „Human cAMP/Ca²⁺ PathwayFinder PCR Array“
(www.sabioscience.com)

Verwendete Geräte

Gelelektrophorese: BioRad Power Pac 300

Geldokumentation: Vibert Commat TCP-20-M

Printsystem: Mitsubishi P91

PCR Maschine: Eppendorf Mastercycler Gradient

Real-Time: Eppendorfer RealPlex

Verwendete Materialien

Verwendete Zellkulturmedien und Material	
Nanophotometer	Implen GmbH, München, Deutschland
Imagingsystem	Visitech Software: QC2000 Monochromator CCD Kamera Nikon Fluoreszenzmikroskop Diaphot 300
C-Pace Cell Cultur Stimulator	Ion Optix Corporation
Seren und Medien für die Zellkultur wurden von PAA (Linz, Austria) bezogen	

Tab. 14 Material und Software für die Ca²⁺ Imaging Experimente, Zellstimulation und DNA bzw. RNA Konzentrationsmessungen.

Verwendete Medien für Ca²⁺ Imaging Experimente

Normaltyrode: NT		
Endkonzentration	Stocklösungen	auf 1000ml
5.6 mM	1M D(+)-Glucose	5.6 ml
137 mM	3 M NaCl	45.7 ml
5.4 mM	3 M KCl	1.8 ml
2.2 mM	0.4 M NaHCO ₃	5.5 ml
1.1 mM	0.1 M MgCl ₂	11.0 ml
0.4 mM	1 M NaH ₂ PO ₄	0.4 ml
10 mM	0.5 M HEPES/Na ⁺	20.0 ml
1.8 mM	1 M CaCl ₂	1.8 ml
Mit 3 M NaOH auf pH= 7.4 einstellen		

Tab. 15 Zusammensetzung einer Normaltyrode

Normaltyrode: NT Ca²⁺ = 0		
Endkonzentration	Stammlösungen	auf 1000ml
5.6 mM	1M D(+)-Glucose	5.6 ml
137 mM	3 M NaCl	45.7 ml
5.4 mM	3 M KCl	1.8 ml
2.2 mM	0.4 M NaHCO ₃	5.5 ml
1.1 mM	0.1 M MgCl ₂ ·6H ₂ O	11.0 ml
0.4 mM	1 M NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.4 ml
10 mM	0.5 M HEPES/Na ⁺	20.0 ml
0.5 mM	0.1 M EGTA	2.5 ml
Mit 3 M NaOH auf pH= 7.4 einstellen		

Tab. 16 Zusammensetzung einer Normaltyrode ohne Ca²⁺

HK		
Endkonzentration	Stammlösung	auf 500 ml
5.6 mM	1 M D(+)-Glucose	2.8 ml
80.4 mM	3 M NaCl	13.4 ml
60 mM	3 M KCl	10 ml
2.2 mM	0.5 M NaHCO ₃	2.2 ml
1.1 mM	0.1 M MgCl ₂	1.1 ml
0.4 mM	1 M NaH ₂ PO ₄	0.2 ml
10 mM	0.5 M HEPES/Na ⁺	10.0 ml
0.5 mM	0.1 M EGTA	2.5 ml
Mit 3 M NaOH auf pH= 7.4 einstellen		

Tab. 17 Zusammensetzung einer Lösung mit hoher Kalium Konzentration

Ergebnisse

2.6 Genetisches Screening der MH „hot spot“ Regionen im RYR1

Ziel dieses genetischen Screenings war es, anerkannte MH Mutationen bzw. Deletionen im RYR1 aufzuspüren und den betroffenen Familien einen genetischen Test anzubieten. Der genetische Nachweis einer anerkannten MH Mutation, ermöglicht die Erstellung einer MH-Diagnose ohne invasiven und kostspieligen IVCT.

Von rund 70 MHS-Individuen wurde die genomische DNA aus dem Blut isoliert, mittel PCR die RYR1 Exons 2, 9, 17, 39, 45 und 46 amplifiziert, sequenziert und mit Datenbanken von NCBI verglichen. Tabelle 18 zeigt eine Zusammenfassung dieser systematischen Sequenzierung und Analyse.

RYR1-Exon	Mutation im Nukleotid	betroffene Aminosäure	Anzahl der nachgewiesenen Mutationen	Anzahl der sequenzierten Individuen n
2	0	0	0	n = 72
9	0	0	0	n = 76
17	c.1840 C>T	p.Arg614Cys	2	n = 73
39	0	0	0	n = 75
45	0	0	0	n = 77
46	c.7372 C>T	p.Arg2458Cys	1	n = 81

Tab. 18 Resultate des genetischen MH Screenings im Überblick

2.7 Sequenzierung des kompletten Ryanodin Rezeptors ausgewählter österreichischer MH-Individuen

Der RYR1 von 4 verschiedenen Repräsentanten österreichischer MH Familien wurde gänzlich, sowie von 3 weiteren partiell sequenziert, da finanzielle Engpässe keine gänzliche Sequenzierung zuließen. Die im Rahmen der partiellen Sequenzierung identifizierten

Missense Mutationen - p.Ala400Pro und p.Arg2355Trp- wurden nicht charakterisiert und werden in dieser Arbeit nicht weiter behandelt. Bei der gänzlichen Sequenzierung des RYR1 konnte bei einem von vier MHS Individuen keine Missense Mutation entdeckt werden.

2.7.1 Familie A: RYR1 Mutation p.Trp3985Arg und p.Gln3756Glu

Fallbeschreibung und Stammbaum der Familie A

Im Rahmen einer Adenotomie erhielt die Patientin (A-III:1) – ein 6 jähriges Kind - eine Allgemeinanästhesie, welche eine MH-Krise auslöste. Nach Narkosebeginn mit O₂, N₂O (70%), Isoflurane sowie Suxamethoniumchlorid (Lysthenon®, 40mg i.v.), kam es zu einer Tachykardie mit einer Herzfrequenzen von bis zu 252/min, auffällig vergrößerten, nicht lichtreaktiven Pupillen und einer Rigidität der Kiefermuskulatur (Masseterspasmus). Die Skelettmuskulatur war hypoton, jedoch konnte weder ein respiratorischer CO₂ Anstieg festgestellt werden, noch eine Temperaturerhöhung. Die Narkose wurde mit 100% O₂ abgebrochen und ein Verdacht auf eine MH-Krise wurde protokolliert. Nach 4 Stunden wurde ein Kreatin Kinase (CK) Wert von 11000 U/l gemessen, welcher nach 24 Stunden auf 16700 U/l anstieg. Nach 36 Stunden zeigte sich der CK-Wert rückläufige mit 8600 U/l.

Da es sich bei der Indexpatientin um ein Kind handelte und somit ein IVCT nicht in Frage kam, unterzog sich ihr Vater (A-II:2) und in weiterer Folge seine 3 Geschwister (A-II:4; A-II:5; A-II:6) einem IVCT. Der Stammbaum der Familie A ist in Abbildung 15 wiedergegeben

Stammbaum der Familie A

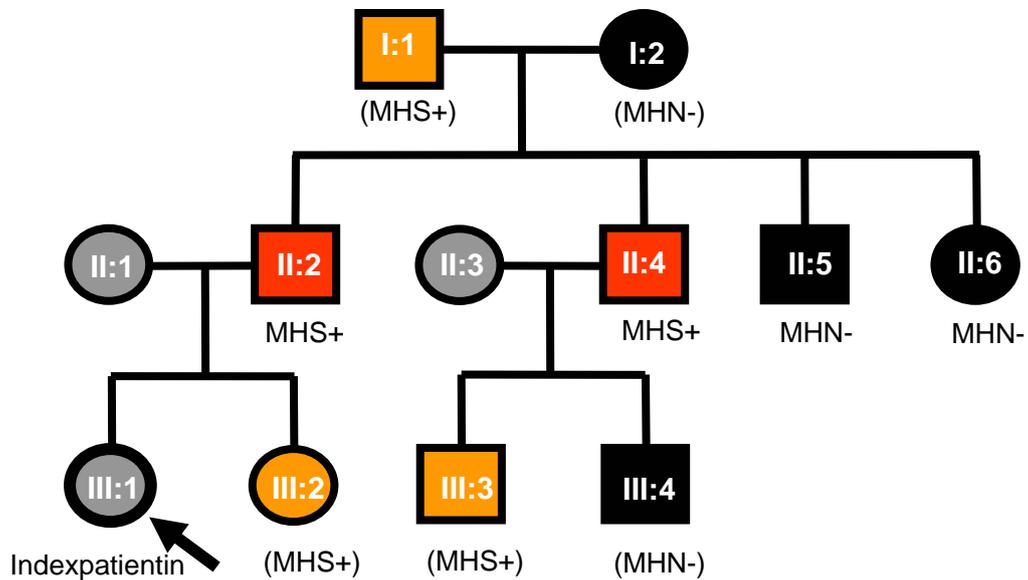


Abb. 15 Stammbaum der Familie A und Segregation der Missense Mutation p.Trp3985Arg. Die Familienmitglieder A-II:2, A-II:4, A-II:5 und A-II:6 haben sich einem IVCT unterzogen und sind rot (im Falle einer MHS Diagnose) bzw. schwarz (im Falle einer MHN Diagnose) dargestellt. Die in Klammer angegebenen Verdachtsdiagnosen wurden auf genetischer Basis erstellt: diese Familienmitglieder haben sich keinem IVCT unterzogen. Die komplette codierende mRNA bzw. cDNA des RYR1 wurde von Familienmitglied A-II:2 sequenziert.

Die IVCT Diagnose

In Abbildung 16 ist die Halothan-IVCT Kurve des Vaters (A-II:2) der Indexpatientin dargestellt. Bereits die geringste Halothankonzentration – 0,11 mM respektive 0,5 Vol% - erzeugt eine deutliche Kontraktur des Muskels von über 2 mN bzw. 0,2 g.

IVCT-Halothan p.Trp3985Arg

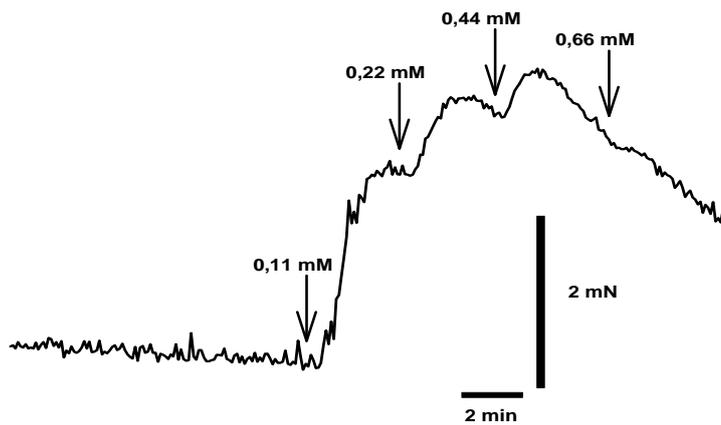


Abb. 16 IVCT mit Halothan als Testsubstanz: Die Kurve zeigt das Kontrakturverhalten des Muskels; die Pfeile geben den Zeitpunkt der Zugabe von Halothan an. 0,11 mM entsprechen 0,5% Halothan.

Die Testsubstanz Koffein bestätigte den Verdacht, dass der Patient eine Prädisposition zur malignen Hyperthermie besitzt. Bereits 1,5 mM Koffein verursachen eine Kontraktur von über 2 mN bzw. 0.2 g, womit eine Prädisposition zur malignen Hyperthermie gegeben ist.

IVCT-Koffein-p.Trp3985Arg

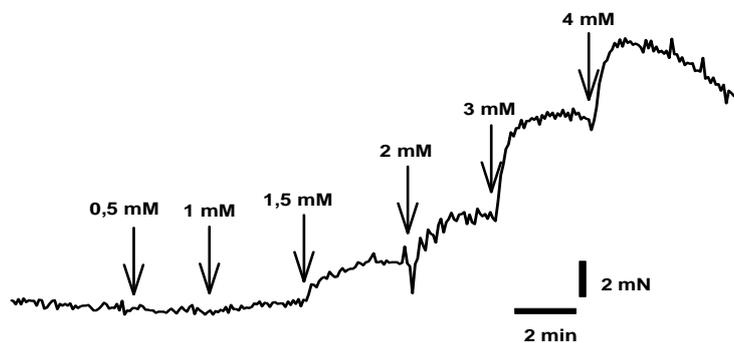


Abb. 17 IVCT mit Koffein als Testsubstanz: die Pfeile geben den Zeitpunkt der Zugabe von Koffein an.

Im Rahmen der Muskelbiopsie wurde bei den Patienten der CK Wert bestimmt, welcher bei beiden MHS Individuen leicht erhöht war (A-II:2 mit 127 U/l und A-II:4 mit 209 U/l; normal bis 80 U/l) im Vergleich zu den MHN Individuen dieser Familie (A-II:5 mit 76 U/l und A-II:6 mit 42 U/l).

2.7.1.1 Die Mutationen p.Trp3985Arg und p.Gln3756Glu

Die komplette cDNA des RYR1 wurde amplifiziert und sequenziert. In Tabelle 19 sind die gefundenen Mutationen aufgelistet. Die meisten dieser Mutationen befinden sich an der dritten Stelle des Aminosäuren kodierenden Codons und bewirken keinen Aminosäureaustausch (stille Mutationen). Zwei Mutationen betreffen hingegen die erste Position im aminogenen Codon und führen zu einem Austausch der betroffenen Aminosäuren. Diese Missense Mutationen - p.Gln3756Glu und p.Trp3985Arg - befinden sich in Exon 79 respektive Exon 87 der genomischen Sequenz des RYR1. Die Mutation p.Gln3756Glu wird - obwohl ein Austausch der Aminosäure stattfindet - nicht als kausale MH-Mutation angesehen, sondern als Polymorphismus eingestuft, da sie nicht mit der IVCT Diagnose MHS segregiert und auch bei MHN Individuen auftritt (Brown et al. 2000). Die korrespondierende Aminosäure im Ryanodin Rezeptor des Schweins ist ebenfalls eine Glutaminsäure, womit sich der Verdacht erhärtet, dass es sich hier lediglich um eine klinisch nicht relevante Variante handelt.

betroffenes Exon	Position in der cDNA (1=ATG)	Triplett (wt)		Triplett A-II:2	Aminosäure
		Ref	Seq:		
			NM_000540.1		
Exon 7	594	CUG		CUA	Leu 198
Exon 15	1668	TCG		TCA	Ser 556
Exon 19	2286	CCT		CCC	Asp 762
Exon 24	2943	ACA		ACG	Thr 981
Exon 24	2979	AAC		AAT	Asn 993
Exon 26	3456	ATC		ATT	Ile 1152
Exon 49	7872	CGC		CGT	Arg 2624

Exon 50	7977	ACG	ACA	Thr 2659
Exon 51	8118	ATT	ATC	Ile 2706
Exon 51	8190	GAT	GAC	Asp 2730
Exon 53	8337	GAG	GAA	Glu 2779
Exon 55	8589	AGT	AGC	Ser 2863
Exon 62	9186	CCA	CCG	Pro 3062
Exon 79	11266	CAG	GAG	p.Gln3756Glu
Exon 85	11754	ACT	ACA	Thr 3918
Exon 87	11953	TGG	CGG	p.Trp3985Arg
Exon 98	14256	ACA	ACC	Thr 4752

Tab. 19 Auflistung aller Mutationen, welche in der cDNA des Familienmitglieds A-II:2 gefunden wurden. Die Nummerierung erfolgt nach der humanen RYR1 cDNA Sequenz mit der Zugangsnummer Ref Seq: NM_000540.1 wobei +1 dem A des Translations Initiations Codons ATG entspricht. Angeführt werden das betroffene Exon, die Position in der cDNA, die betroffene Base im Basentriplett und der höchstwahrscheinlich hervorgerufene Aminosäureaustausch mit Angabe der Position im Protein.

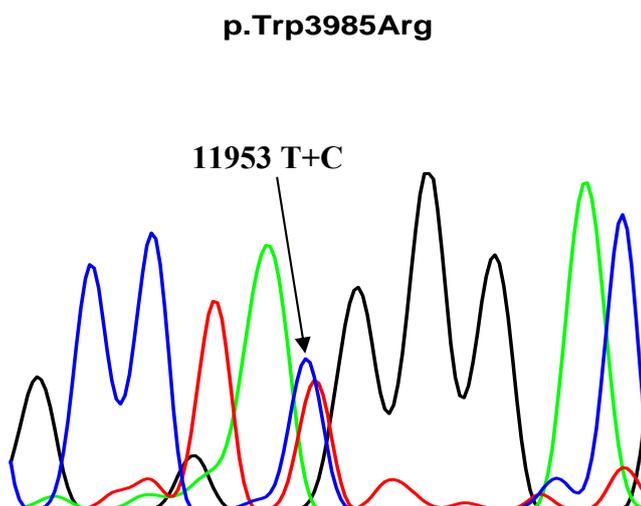


Abb. 18 Elektropherogramm mit Angabe der Position der Transition von Thymin (rot) zu Cytosin (blau). Der Pfeil zeigt die Position 11953 der cDNA, welche mit 2 Signalen belegt ist, da es sich um eine heterozygote Mutation handelt.

Um die Segregation der gefundenen Missense Mutation zu analysieren, wurden die entsprechenden Exons anderer Familienmitglieder direkt aus genomischer DNA amplifiziert und anschließend sequenziert. Tabelle 20 stellt die aus dem IVCT hervorgegangenen Diagnosen der 4 Familienmitglieder dem Vorhandensein oder Fehlen der Missense Mutationen p.Gln3756Glu und p.Trp3985Arg gegenüber.

Die Hypothese, dass p.Trp3985Arg im Familienstammbaum mit den IVCT Diagnosen MHS segregiert, wurde bestätigt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass p.Gln3756Glu nicht mit den IVCT Diagnosen segregiert und somit lediglich eine klinisch nicht relevante Variante des RYR1 darstellt.

Patienten	Diagnose	p.Gln3756Glu	p.Trp3985Arg
A-II:2	MHS	Ja	Ja
A-II:4	MHS	Nein	Ja
A-II:5	MHN	Ja	Nein
A-II:6	MHN	Ja	Nein

Tab. 20 Segregation der Fehlsinmutationen p.Gln3756Glu und p.Trp3985Arg.

2.7.1.2 Charakterisierung von p.Trp3985Arg

2.7.1.2.1 Koffein

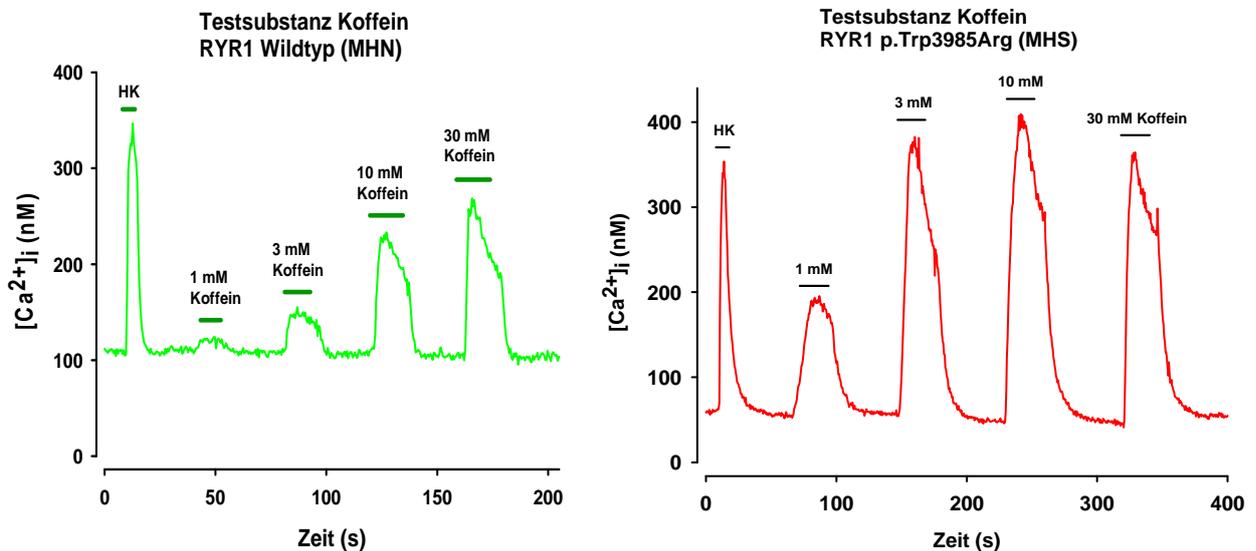


Abb. 19 Zeitverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ in Muskelzellen: repräsentative Ca^{2+} Imaging Einzelerperimente mit Fura-2/AM als Ca^{2+} sensitiven Farbstoff und Koffein als spezifischen Aktivator des RYR1. Der Zeitpunkt bzw. die Dauer der Zugabe von Koffein ist durch die Balken im oberen Bereich der Abbildung wiedergegeben. Der erste Ca^{2+} Anstieg ist in jedem Experiment durch die Applikation einer Lösung mit erhöhter Kaliumkonzentration (HK) ohne Ca^{2+} bedingt, welche nur bei erregbaren Skelettmuskelzellen eine intrazellulären Ca^{2+} Freisetzung hervorrufen. Der beobachtete intrazelluläre Ca^{2+} Anstieg ist nicht extrazellulären Ursprungs, da in dieser Lösung kein Ca^{2+} enthalten ist.

Es wurden insgesamt 28 MHS Muskelzellen mit der Mutation p.Trp3985Arg und 31 MHN Zellen in Bezug auf ihre Ca^{2+} Freisetzungseigenschaften vermessen, wobei 13 von nicht Verwandten und 18 von Verwandten stammten. Die experimentellen Daten der Ca^{2+} Freisetzung bei verschiedenen Koffeinkonzentrationen wurden mittels Hill-Gleichung gefittet und ein EC_{50} Wert von 9 mM für die nicht verwandte MHN Personengruppe, 6,9 mM für die verwandte MHN und 1,4 mM für die MHS p.Trp3985Arg Personengruppe errechnet. Abbildung 20 fasst diese experimentelle Versuchsreihe zusammen. Die Empfindlichkeit von MHS Zellen gegen Koffein ist daher 6,4 bzw. 4,9 mal höher als bei MHN-Zellen.

Konzentrations-Wirkungskurve Koffein

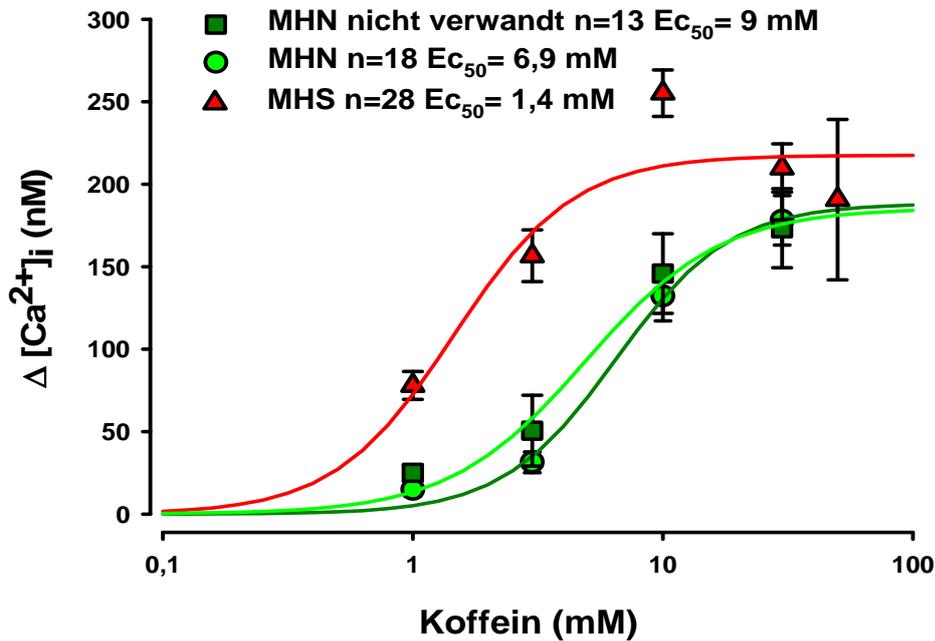


Abb. 20 Änderung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in Abhängigkeit von steigenden Koffein Konzentrationen

2.7.1.2.2 Chlorkresol

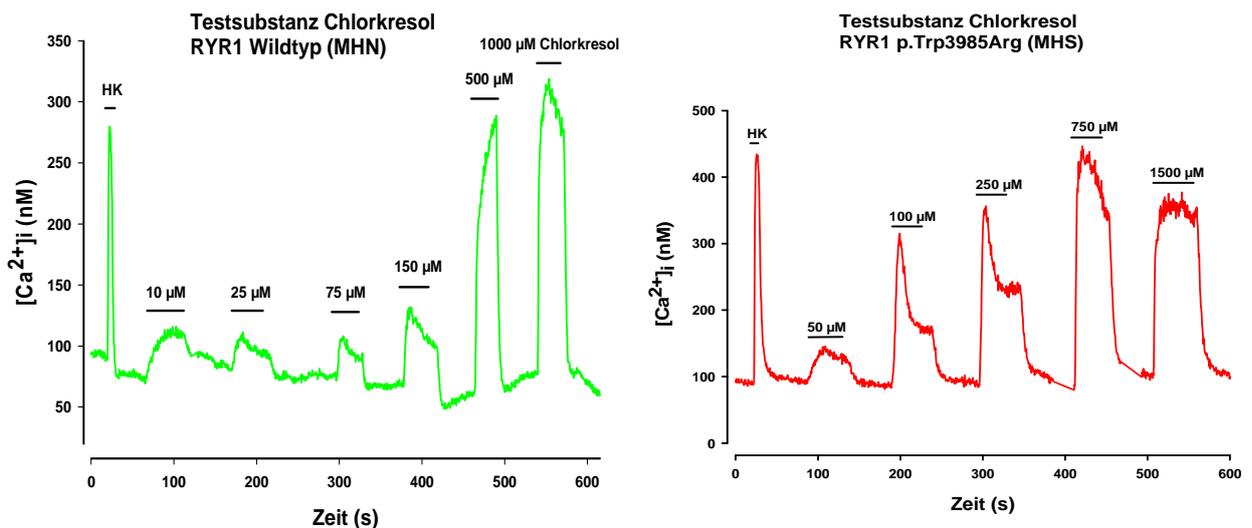


Abb. 21 Zeitverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ in Muskelzellen: exemplarisch sind repräsentative Ca^{2+} Imaging Einzelexperimente mit Fura-2/AM als Ca^{2+} sensitiver Indikator und Chlorkresol als spezifischer Aktivator des RYR1 gezeigt.

Auch für den spezifischen RYR1 Aktivator Chlorkresol wurde der EC_{50} Wert von MHS RYR1 p.Trp3985Arg mit Muskelzellen von verwandten und nicht verwandten MHN Personen verglichen.

Da die mit Chlorkresol erzielten Ergebnisse nicht einer Normalverteilung entsprachen, wurde statt dem Mittelwert der Medianwert herangezogen, welcher sich „resistenter“ gegen extrem abweichende Messwerte zeigt. Zur graphischen Darstellung sind daher die 25. und 75. Percentile angegeben.

Ein statistischer Vergleich mittels Mann-Whitney Test zeigt, dass die ermittelten EC_{50} Werte von MHS (p.Trp3985Arg) und MHN Zellen sich signifikant voneinander unterscheiden. Tabelle 21 fasst dies zusammen.

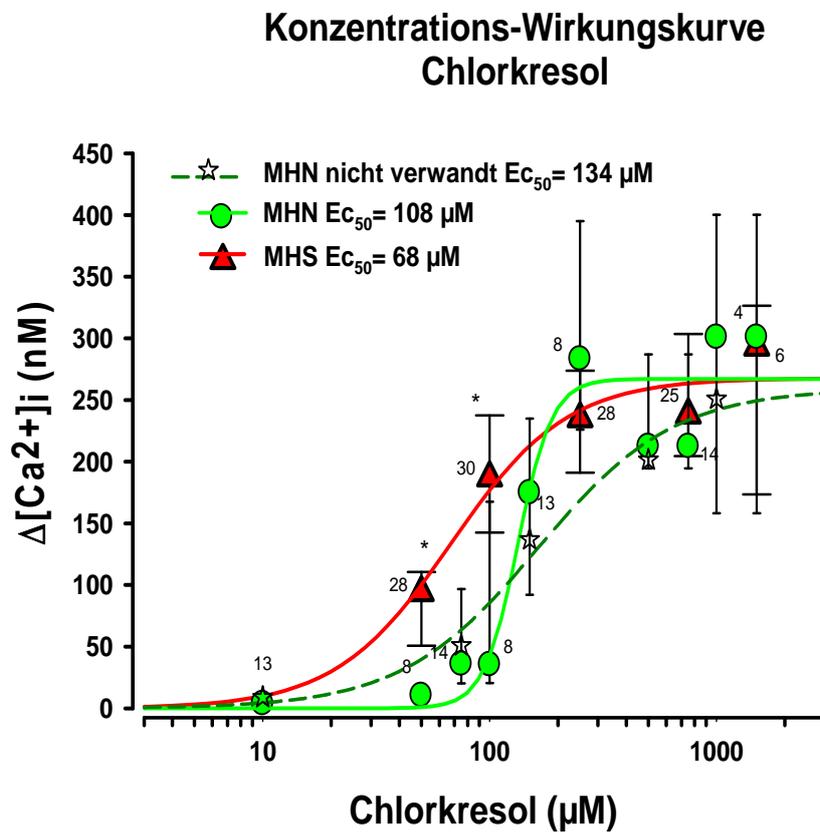


Abb. 22 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ Konzentration in Abhängigkeit von steigenden Chlorkresol Konzentrationen

RYR1	Testsubstanz	Ec ₅₀ (Medianwerte)	U	Signifikanz P	n
p.Trp3985Arg	Koffein	1,4 mM(1,1; 2) *	U =20	P <0,001	37
	Chlorkresol	68 µM (58, 83) *	U = 132	P <0,001	32
MHN	Koffein	5,7 mM (4,8; 6,8)			18
	Chlorkresol	116 µM(88; 169)			29

Tab. 21 Statistischer Vergleich der ermittelten Ec₅₀ Werte von MHS p.Trp3985Arg und MHN Zellen. Signifikante Unterschiede sind mit * bezeichnet.

Ebenso zeigt eine Analyse der maximalen Ca²⁺ Freisetzung einen signifikanten Unterschied in Bezug auf Koffein, nicht aber für Chlorkresol. Bemerkenswert ist hier, dass die maximale Ca²⁺ Freisetzung von MHS p.Trp3985Arg Zellen höher ist als die der MHN Kontrollgruppe (siehe Tab.22). Die Analyse des Ruhecalciums ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Es konnte somit kein erhöhtes Ruhecalcium bei p.Trp3985Arg Zellen festgestellt werden (Kaufmann et al. 2008).

Maximale Ca ²⁺ Freisetzung					
RYR1	Testsubstanz	Median in nM (25.;75.) Perzentil	U	P	N
p.Trp3985Arg	Koffein	232 (185, 283) *	U = 180	P = 0,006	37
	Chlorkresol	273 (218, 321)	U = 414	P = 0,605	32
MHN	Koffein	154 (131; 204)			18
	Chlorkresol	255 (190, 331)			29

Tab. 22 Statistischer Vergleich der maximalen Ca²⁺ Freisetzung von MHS p.Trp3985Arg und MHN Zellen. Signifikante Unterschiede sind mit * bezeichnet.

2.7.1.3 Genexpressionsstudie

Um ein breites Spektrum von Genen zu analysieren, welche möglicherweise in primären Muskelzellen exprimiert werden, wurde der „Human cAMP/Ca²⁺ PathwayFinder PCR Array“ von SA Bioscience (www.sabiosciences.com) ausgewählt.

Dieser qRT-PCR Kit ermöglicht die Expressionsrate von 84 Genen zu studieren, welche durch cAMP oder Ca²⁺ direkt beeinflusst werden. Diese Gene werden in drei Kategorien eingeteilt: Gene deren Promotoren ein SRE (Serum Response-Element) oder ein SRE-ähnliche Sequenzen enthalten bzw. vorgeschaltet sind, solche mit CRE (cAMP response element) enhancer Sequenzen und Gene deren Promotoren durch andere Ca²⁺ induzierte Signalkaskaden kontrolliert werden.

Tabelle 23 listet alle untersuchten Gene auf. Die Ergebnisse wurden über eine Analyse Software von SA Bioscience (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) ausgewertet. Die Gene B2M, HPRT1, RPL13A, und GAPDH wurden als Housekeeping Gene eingesetzt. Ein Ct Cut-Off Wert von 35 Zyklen wurde festgelegt: Proben, welche diese Nachweisgrenze erst nach dem 35 Zyklus erreichten, wurden als nicht nachweisbar gewertet. In drei von vier RT-Versuchen waren die genomischen Negativkontrollen positiv bzw. die Ct-Werte befanden sich zwischen den Zyklen 32 und 34. Eine Kontamination mit genomischer DNA war somit gegeben.

Refseq	Symbol	Description
NM_000684	ADRB1	Adrenergic, beta-1-, receptor
NM_001621	AHR	Aryl hydrocarbon receptor
NM_001634	AMD1	Adenosylmethionine decarboxylase 1
NM_001657	AREG	Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)
NM_001674	ATF3	Activating transcription factor 3
NM_000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
NM_001709	BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
NM_007294	BRCA1	Breast cancer 1, early onset
NM_004929	CALB1	Calbindin 1, 28kDa
NM_001740	CALB2	Calbindin 2, 29kDa (calretinin)
NM_006888	CALM1	Calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
NM_004343	CALR	Calreticulin
NM_003914	CCNA1	Cyclin A1
NM_053056	CCND1	Cyclin D1
NM_004935	CDK5	Cyclin-dependent kinase 5
NM_004936	CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
NM_000735	CGA	Glycoprotein hormones, alpha polypeptide
NM_001275	CHGA	Chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)
NM_001299	CNN1	Calponin 1, basic, smooth muscle
NM_004379	CREB1	CAMP responsive element binding protein 1

NM_183011	CREM	CAMP responsive element modulator
NM_001330	CTF1	Cardiotrophin 1
NM_001554	CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
NM_004083	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
NM_004417	DUSP1	Dual specificity phosphatase 1
NM_001964	EGR1	Early growth response 1
NM_000399	EGR2	Early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)
NM_001975	ENO2	Enolase 2 (gamma, neuronal)
NM_020996	FGF6	Fibroblast growth factor 6
NM_005252	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
NM_006732	FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
NM_002054	GCG	Glucagon
NM_005261	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
NM_000164	GIPR	Gastric inhibitory polypeptide receptor
NM_000189	HK2	Hexokinase 2
NM_002154	HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4
NM_005347	HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
NM_000586	IL2	Interleukin 2
NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
NM_002192	INHBA	Inhibin, beta A
NM_002229	JUNB	Jun B proto-oncogene
NM_005354	JUND	Jun D proto-oncogene
NM_002234	KCNA5	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5
NM_005566	LDHA	Lactate dehydrogenase A
NM_005360	MAF	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)
NM_002415	MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
NM_000615	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
NM_000267	NF1	Neurofibromin 1 (neurofibromatosis, von Recklinghausen disease, Watson disease)
NM_000625	NOS2A	Nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)
NM_000905	NPY	Neuropeptide Y
NM_006186	NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
NM_004563	PCK2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
NM_182649	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
NM_006211	PENK	Proenkephalin

NM_002616	PER1	Period homolog 1 (Drosophila)
NM_000930	PLAT	Plasminogen activator, tissue
NM_002667	PLN	Phospholamban
NM_021127	PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NM_000306	POU1F1	POU class 1 homeobox 1
NM_006235	POU2AF1	POU class 2 associating factor 1
NM_014330	PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
NM_002715	PPP2CA	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform
NM_002734	PRKAR1A	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)
NM_000948	PRL	Prolactin
NM_000963	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
NM_000321	RB1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)
NM_005621	S100A12	S100 calcium binding protein A12
NM_014624	S100A6	S100 calcium binding protein A6
NM_004057	S100G	S100 calcium binding protein G
NM_003469	SCG2	Secretogranin II (chromogranin C)
NM_005627	SGK1	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1
NM_003053	SLC18A1	Solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1
NM_000636	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
NM_003131	SRF	Serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor)
NM_001048	SST	Somatostatin
NM_001050	SSTR2	Somatostatin receptor 2
NM_003150	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
NM_001058	TACR1	Tachykinin receptor 1
NM_003239	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
NM_000360	TH	Tyrosine hydroxylase
NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1
NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
NM_003373	VCL	Vinculin
NM_003381	VIP	Vasoactive intestinal peptide
NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)
NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a
NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Tab. 23 Liste der im Rahmen der Genexpressionsstudie untersuchten Gene: Gene, deren mRNA nicht nachgewiesen werden konnten, sind blau dargestellt. Grün dargestellt sind Gene, die um mehr als das 3-fache runter reguliert wurden. Gene, deren Expressionsrate unter einer 3-fachen auf oder ab Regulierung blieben, sind schwarz dargestellt.

Zur graphischen Darstellung der Genexpressionsraten der einzelnen Gene wurden die ermittelten Ct-Werte gegeneinander aufgetragen (Abb. 23), wobei die Achsen logarithmisch scaliert sind. Diese Form der Darstellung ermöglicht eine visuelle Abschätzung der Expressionsraten, da diese in der Grafik von links unten nach rechts oben zunehmen.

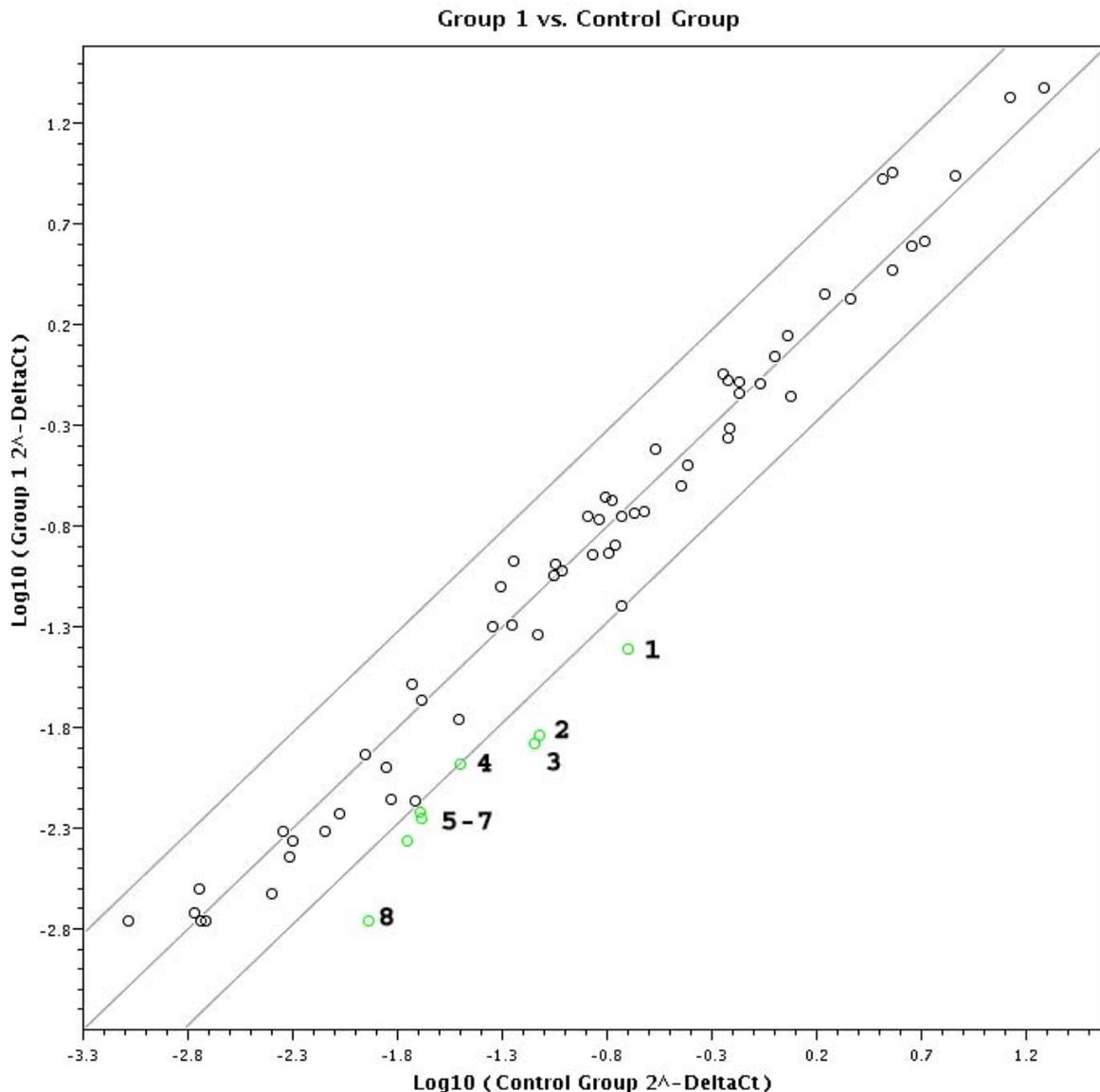


Abb. 24 Graphischer Vergleich der Genexpression von MHN und MHS (p.Trp3985Arg) Zellen. Gene, deren Expression über das 3-fache runterreguliert sind, sind grün dargestellt und

zwecks Zuordnung nummeriert. Gene, welche sich zwischen der mittleren und oberen Diagonalline befinden, zeigen eine Up Regulation bis zum 3-fachen Wert der Kontrollgruppe. Gene, welche sich zwischen der mittleren und der unteren Diagonalline befinden zeigen eine Down Regulation um das maximal 3-fache. Gene, welche sich rechts der unteren Diagonalline befinden zeigen eine Down Regulation von über dem 3-fachen Wert relativ zur Kontrollgruppe.

Die in Abbildung 23 nummerierten Gene zeigen eine Down-Regulation vom 3-fachen bis über 6-fachen relativ zur MHN-Kontrollgruppe. Tabelle 24 fasst dies zusammen.

Gruppe MHS vs. MHN Kontrollgruppe			
Position	Gen Symbole	Durschnittlicher (Ct-MHS)/(Ct-MHN)	X-fache Auf/Ab-regulierung
1	IL6	30,5 / 26,5	- 5,19
2	PTGS2	31,9 / 27,9	- 5,14
3	FOS	32,1 / 28,0	- 5,41
4	PLN	32,4 / 29,2	- 3,00
5	AREG	33,2 / 29,8	- 3,32
6	EGR1	33,3 / 29,8	- 3,71
7	CCNA1	33,7 / 30,0	- 4,06
8	NR4A2	35,0 / 30,6	- 6,66

Tab. 24 Liste der MHS (p.Trp3985Arg) Gene mit einer 3-fach bzw. über 3-fach Down Regulation.

2.7.2 Familie B: RYR1 Mutation p.Ala612Pro

Fallbeschreibung und Stammbaum der Familie B

Im Rahmen einer Allgemeinanästhesie wurde bei Patientin B-I:2 ein Verdacht auf MH protokolliert. Sie unterzog sich einem IVCT, welcher eine Prädisposition zur malignen Hyperthermie aufzeigte und die Diagnose MHS wurde gestellt. Da in dieser Familie bis zu diesem Vorfall noch nie ein Narkosezwischenfall protokolliert wurde, wurde die Patientin B-I:2 als Indexpatientin eingestuft. Die Indexpatientin ist Mutter einer Tochter und zweier Söhne, welche sich auf ärztliches Anraten einem IVCT unterzogen. Alle drei Kinder wurden aufgrund eines positiven IVCTs als MHS eingestuft. In Abbildung 24 ist der Stammbaum der betroffenen Familie B dargestellt.

Stammbaum der Familie B

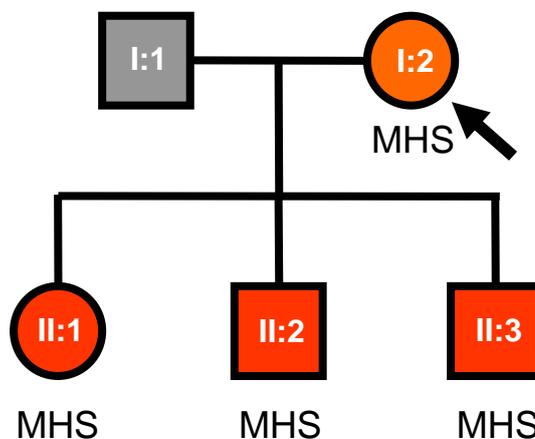


Abb. 24 Stammbaum der Familie B mit der Mutation p.Ala612Pro. Die Indexpatientin (B-I:2) ist durch einen Pfeil hervorgehoben und orange dargestellt, da nur eine IVCT-MHS Diagnose, aber keine genetischen Daten vorliegen. Die rot dargestellten Familienmitglieder (B-II:1, B-II:2, B-II:3) wurden im IVCT als MHS diagnostiziert und sind auch Träger der Mutation p.Ala612Pro. Familienmitglied B-I:1 unterzog sich weder einem IVCT, noch wurde er auf genetischer Ebene untersucht.

Da von der Indexpatientin (B-I:2) weder Biopsiematerial noch Blutproben vorhanden waren, von deren Kindern aber beides, wurde für die folgende komplette Sequenzierung des RYR1 Biopsiematerial von Familienmitglied B-II:2 verwendet.

Die IVCT Diagnose

In der Abbildung 25 und 26 sind die IVCT Kurven dieses Patienten wiedergegeben, welche eindeutig eine MH Prädisposition zeigen ebenso wie die seiner Geschwister, welche hier aber nicht dargestellt sind

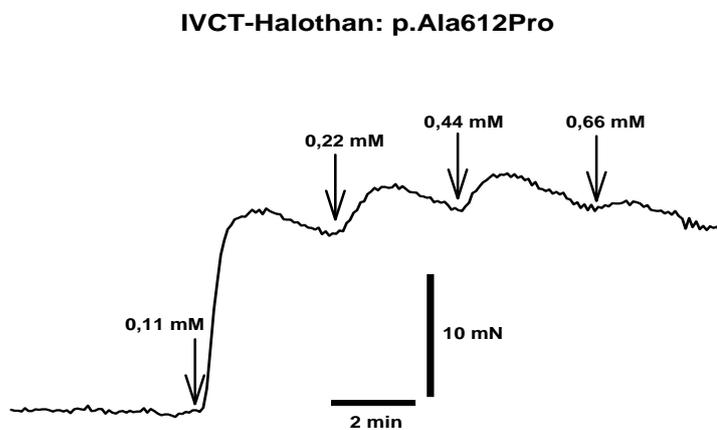


Abb. 25 IVCT des Patienten B-II:2. Die Pfeile geben den Zeitpunkt der Zugabe der Testsubstanz Halothan zum Versuchsbad an.

IVCT-Koffein: p.Ala612Pro

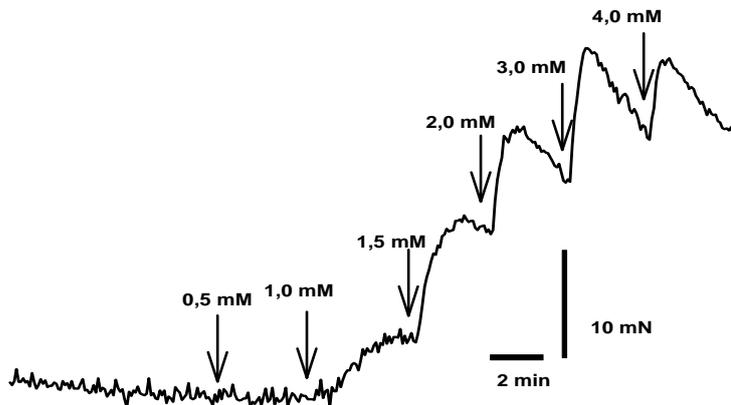


Abb. 26 IVCT des Patienten B-II:2 mit Koffein als Testsubstanz.

2.7.2.1 Gefundene Mutationen

Die komplette cDNA des RYR1 von Patient B-II:2 wurde sequenziert, ebenso wie ein Teil der α_1 Untereinheit des DHP Rezeptors (Monnier et al. 1997). Neben der Transversion in Position 1834 der cDNA des RYR1 wurden auch einige stille Mutationen entdeckt, die alle heterozygoter Natur sind. Tabelle 25 fasst die Ergebnisse dieser Sequenzierung zusammen.

betroffenes Exon	Position in der cDNS (1=ATG)	Triplett (wt) Ref Seq: NM_000540.1	Triplett B-II:2	Aminosäure
Exon 17	1834	GCT	CCT	p.Ala612Pro
Exon 24	2943	ACA	ACG	Thr 981
Exon 24	2979	AAT	AAC	Asn 993
Exon 26	3456	ATC	ATT	Ile 1152

Tab. 25 Mutationen in der cDNA des RYR1 von B-II:2. Die komplette cDNA des RYR1 wurde sequenziert. Alle Mutationen sind heterozygoter Natur. Fett gedruckt sind die ausgetauschten Basen, rot hervorgehoben die Fehlsinmmutation, welche zu einem Austausch der Aminosäure 612 von Alanin zu Prolin führt.

Eine Transversion in Position 1834 der cDNA des RYR1 von Guanin zu Cytosin, welche einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Prolin hervorruft, wurde entdeckt. Diese Mutation befindet sich im Exon 17 der genomischen DNA des RYR1. Abbildung 27 zeigt den Ausschnitt des Elektropherogramms, welcher die heterozygote Mutation beinhaltet.

p.Ala612Pro

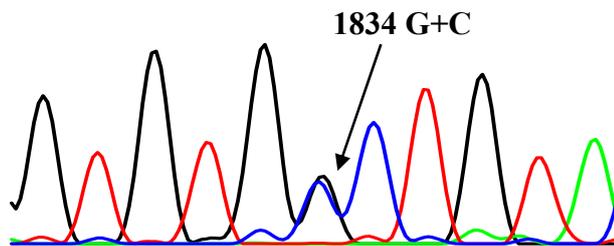


Abb. 27 Elektropherogramm mit Angabe der Position der Transversion von Guanin (schwarz) zu Cytosin (blau). Der Pfeil deutet auf die Position 1834 der cDNA, welche mit zwei Signalen belegt ist, da die Mutation heterozygoter Natur ist.

2.7.2.2 Charakterisierung der Mutation p.Ala612Pro auf zellulärer Ebene

2.7.2.2.1 Koffein

Es wurden 18 MHN und 10 MHS RYR1 p.Ala612Pro Einzelzellen vermessen. Abbildung 28 zeigt exemplarische Einzelexperimente.

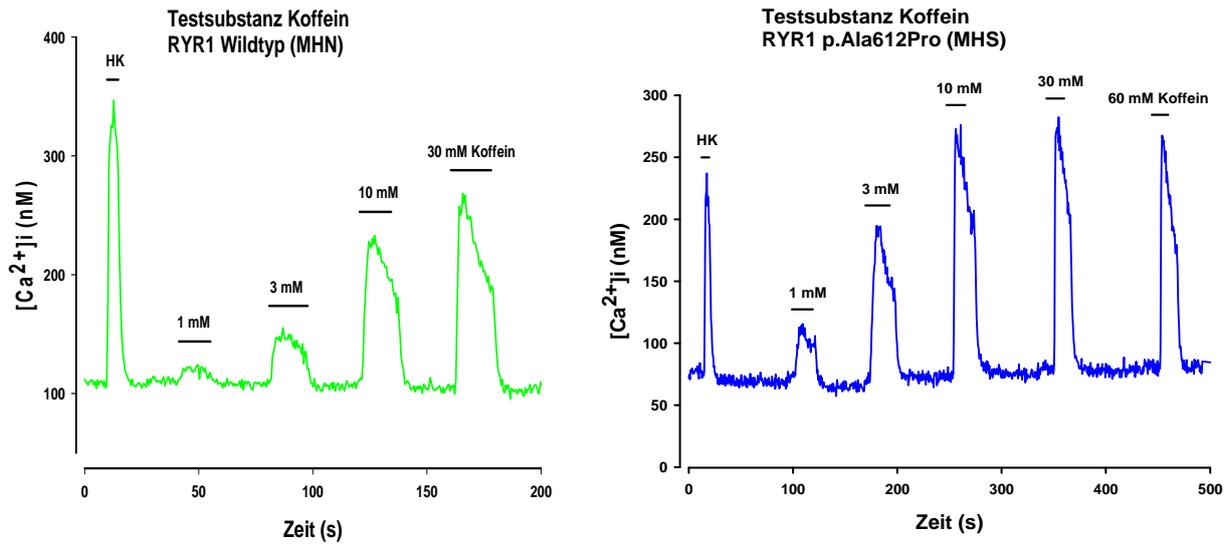


Abb. 28 Zeitverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ in Muskelzellen: exemplarische Ca^{2+} -Imaging Experimente mit Koffein als spezifischen RYR1 Aktivator: links grün einer MHN-Zelle, rechts blau einer MHS RYR1 p.Ala612Pro Zelle.

Die experimentellen Daten wurden mittels Hill-Gleichung gefittet und ein EC_{50} Wert von 1,2 mM Koffein für die MHS Zellen errechnet. Die Abbildung 29 fasst diese experimentelle Versuchsreihe zusammen.

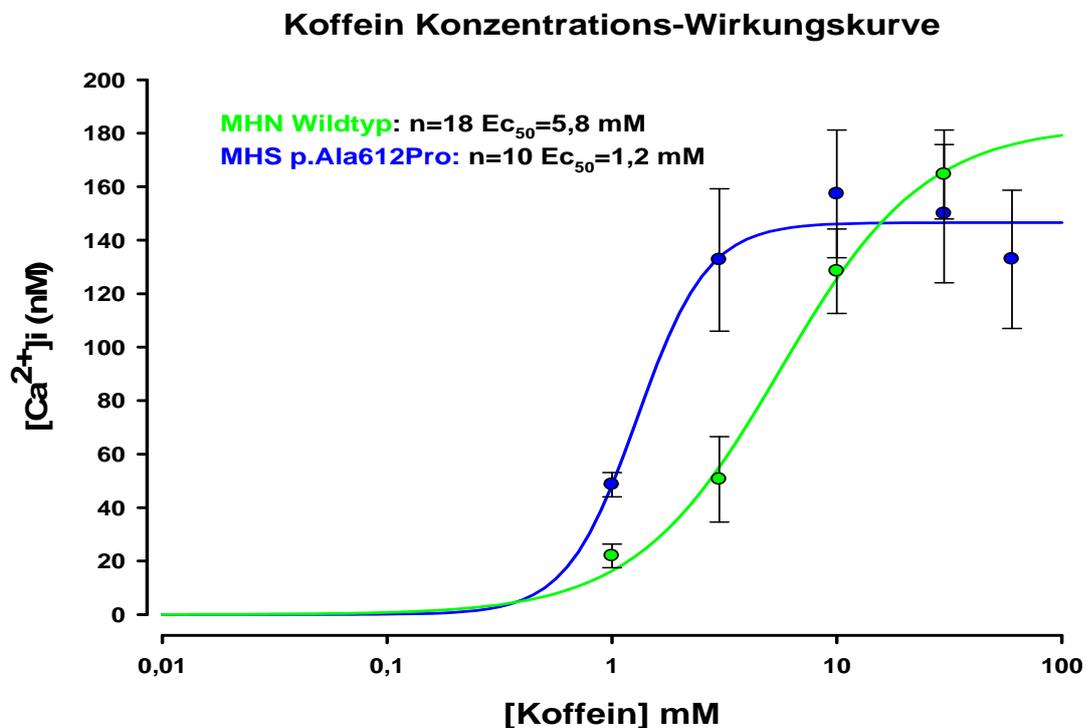


Abb. 29 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von steigenden Koffein Konzentrationen.

2.7.2.2.2 Chlorkresol

In dieser Serie von Experimenten wurden 29 MHN Zellen und 10 MHS RYR1 p.Ala612Pro Einzelzellen vermessen. Abbildung 30 zeigt exemplarisch Ca^{2+} Imaging Experimente mit einer MHN und einer MHS Zelle.

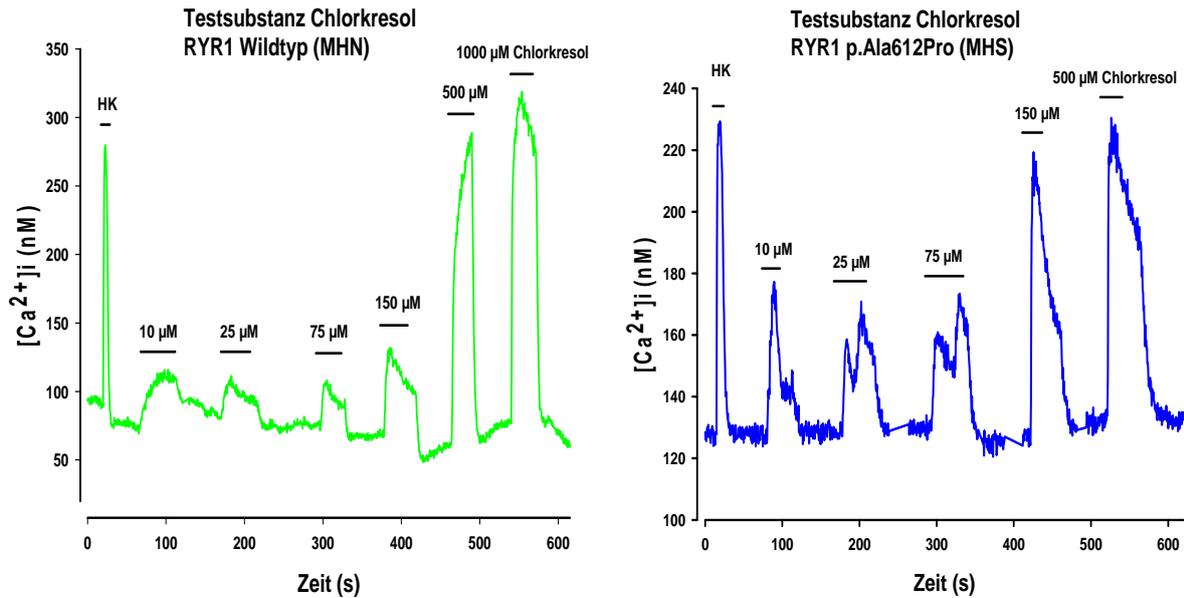


Abb. 30 Zeitverlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Muskelzellen: exemplarische Ca^{2+} -Imaging Experimente mit Chlorkresol als spezifischen RYR1 Aktivator: links grün einer MHN Zelle, rechts blau einer MHS RYR1 p.Ala612Pro Zelle.

Im Vergleich zu MHN Zellen, löst bei MHS Zellen bereits eine 3,6-fach geringere Chlorkresol Konzentration einen halbmaximale Ca^{2+} Freisetzung aus.

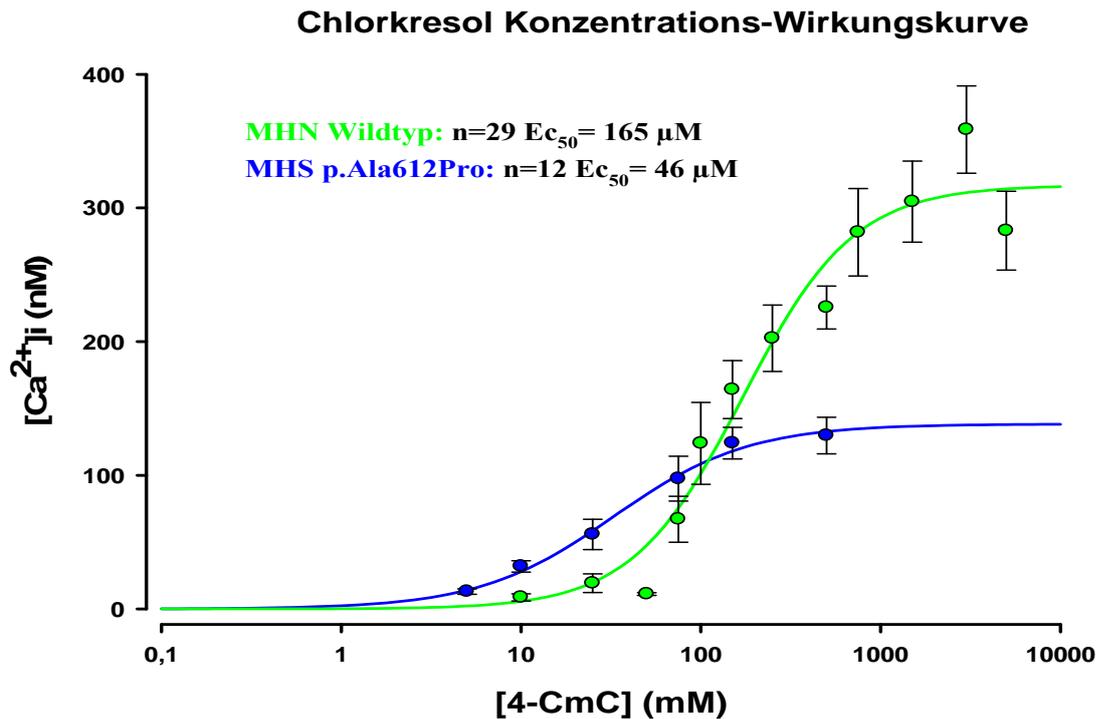


Abb. 31 Änderung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in Abhängigkeit von unterschiedlichen Chlorkresol Konzentrationen

Eine statistische Analyse zeigt, dass sich die ermittelten $E_{c_{50}}$ Werte von MHS p.Ala612Pro und MHN Zellen signifikant voneinander unterscheiden. Tabelle 26 fasst dies zusammen.

RYR1	Testsubstanz	$E_{c_{50}}$ (Medianwerte)	U	Signifikanz P	n
MHS p.Ala612Pro	Koffein	1,1 mM (1; 1,3) *	U = 2	P < 0,001	10
	Chlorkresol	45 μM (20, 60) *	U = 24	P < 0,001	12
MHN	Koffein	5,7 mM (4,8; 6,8)			18
	Chlorkresol	116 μM (88; 169)			29

Tab. 26 Statistische Vergleich der ermittelten $E_{c_{50}}$ Werte von MHS p.Ala612Pro und MHN Zellen. Signifikante Unterschiede sind mit * bezeichnet.

Ebenso zeigt eine Analyse der maximalen Ca^{2+} Freisetzung einen signifikanten Unterschied in Bezug auf Chlorkresol, nicht aber für Koffein. Die maximale Ca^{2+} Freisetzung von MHS p.Ala612Pro Zellen ist niedriger als die der MHN Kontrollgruppe (siehe Tab.27).

Maximale Ca ²⁺ Freisetzung					
RYR1	Testsubstanz	Medianwert in nM (25.;75.) Perzentil	U	P	n
MHS p.Ala612Pro	Koffein	141 (81, 215)	U = 74	P = 0,457	10
	Chlorkresol	141 (121, 168)	U = 36	P <0,001*	12
MHN	Koffein	154 (131; 204)			18
	Chlorkresol	255 (190, 331)			29

Tab. 27 Statistischer Vergleich der maximalen Ca²⁺ Freisetzung von MHS p.Ala612Pro und MHN Zellen. Signifikante Unterschiede sind mit * bezeichnet.

Die Analyse des Ruhecalciums ergab einen signifikanten Unterschied ($P \leq 0,001$) zur MHN Kontrollgruppe. Es konnte somit ein erhöhtes Ruhecalcium bei p.Ala612Pro Zellen festgestellt werden (siehe Tab.28).

RYR1	Ruhecalcium Mittelwert	\pm SEM	n
MHS p.Ala612Pro	98 nM	6,3	22
MHN	64 nM	3,6	44

Tab. 28 Statistische Analyse des Ruhecalciums von MHS p.Ala612Pro und MHN Zellen.

2.7.3 Familie C: RYR1 Mutationen p.Arg2458His, p.Arg3348Cys und p.Arg2458His+ p.Arg3348Cys

Fallbeschreibung und Stammbaum der Familie C

Im Rahmen einer Operation im Schulterbereich wurde bei dem Patienten C-II:2 (siehe Abb.31) eine Allgemeinanästhesie mit Fentanyl – einem Opioid-Analgetikum – und Propofol – einem Narkotikum - eingeleitet und mit dem Inhalationsanästhetikum Sevofluran aufrechterhalten, welches als halogeniertes Inhalationsanästhetikum eine Triggersubstanz für Patienten mit einer MH-Prädisposition darstellt. Es dauerte 50 min bis die ersten Symptome einer MH-Krise manifest wurden. Nach weiteren 15 min wurde die Diagnose maligne Hyperthermie gestellt, die Narkose mit 100% O₂ abgebrochen und eine Dantrolen Therapie mit 240 mg in 30 min eingeleitet. Der Kreatin Kinase (CK-Wert) betrug während der MH-Krise 1891 U/l, nach 5 Stunden 1244 U/l, nach 16 Stunden 2217 U/l, nach 24 Stunden 2952 U/l. Der Vorfall wurde protokolliert und dem betroffenen Patienten sowie seinen Familienangehörigen eine Abklärung mittels IVCT nahe gelegt.

Der Indexpatient (C-II:2) ist Träger von zwei Fehlsinnmutationen (siehe Tab. 22) - p.Arg3348Cys und p.Arg2458His - und wurde im IVCT MHS diagnostiziert. Sein Bruder (C-II:3), welcher auch MHS im IVCT diagnostiziert wurde, ist Träger nur einer dieser beiden Mutationen, nämlich von p.Arg2458His, welche eine von der EMHG anerkannte kausale MH Mutation ist. Die Mutter (C-I:2) des Indexpatienten hingegen wurde MHEH im IVCT diagnostiziert und ist Trägerin der Mutation p.Arg3348Cys, aber nicht von p.Arg2458His. Ihre Tochter (C-II:1) wurde nur genetisch untersucht und ist Trägerin von p.Arg3348Cys. Abbildung 32 zeigt den Stammbau der Familie C sowie die Aufteilung der beiden Mutationen auf die Familienmitglieder.

Familie C

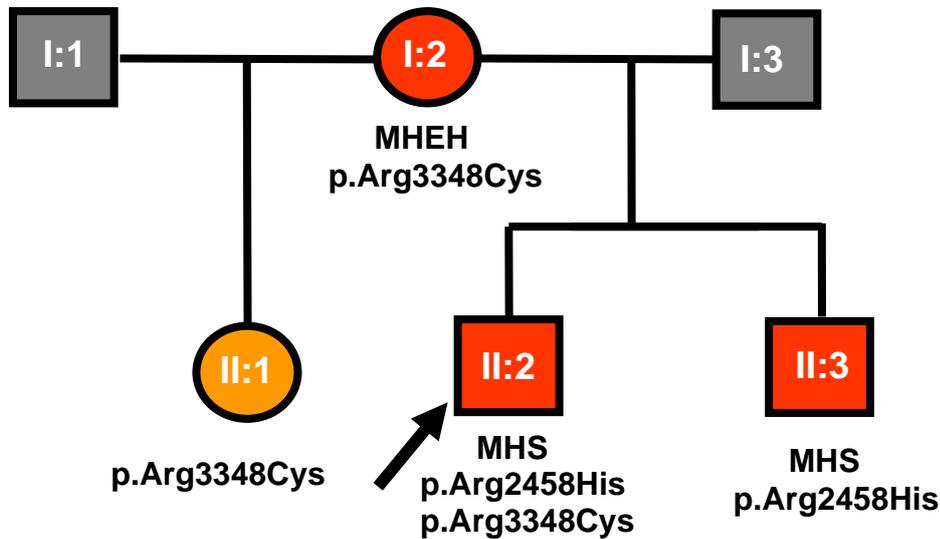
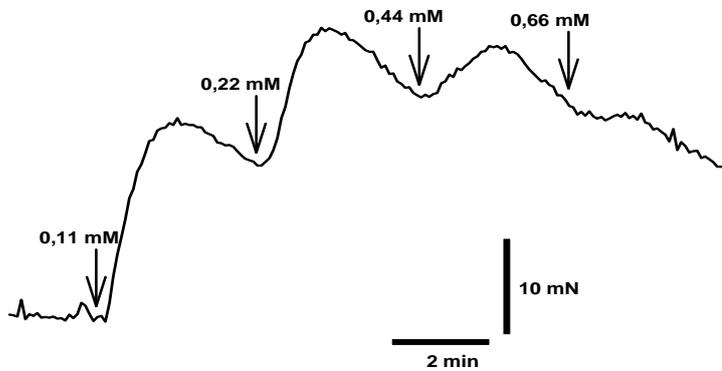


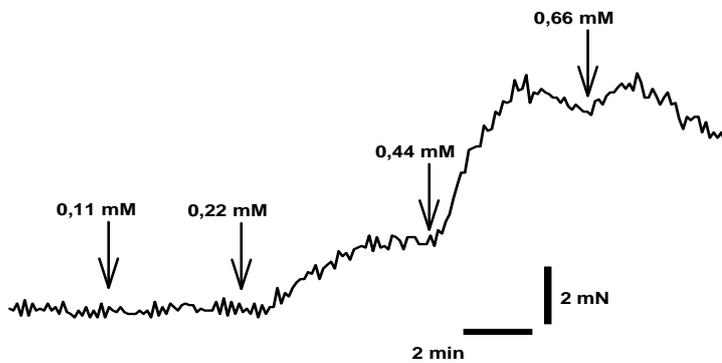
Abb. 32 Stammbaum der Familie C mit Segregation der Mutationen p.Arg2458His und p.Arg3348Cys. Rot dargestellte Familienmitglieder wurden im IVCT MHS bzw. MHEH diagnostiziert. Grau dargestellte Familienmitglieder - (C-I:1 und C-I:3) - haben sich weder einem IVCT unterzogen, noch wurden sie auf genetischer Basis untersucht. Das orange dargestellt Familienmitglied wurde nur auf genetischer Ebene untersucht und ist Träger der Mutation p.Arg3348Cys. Der komplette RYR1 des Indexpatienten (C-II:2, siehe Pfeil) wurde sequenziert und zwei Mutationen konnten nachgewiesen werden. Die Mutter, der Bruder sowie die Halbschwester des Indexpatienten sind Träger jeweils nur eine dieser beiden Mutationen.

Die IVCT Diagnosen

IVCT-Halothan von C-II:3 p.Arg2458His



IVCT- Halothan von C-II:1 p.Arg3348Cys



IVCT-Halothan von C-II:2 p.Arg2458His+Arg3348Cys

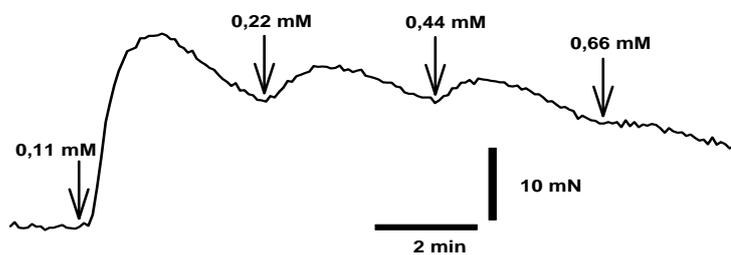


Abb. 33 IVCTs der Familienmitglieder von Familie C mit Halothan als Testsubstanz. Die Pfeile geben den Zeitpunkt der Zugabe der Testsubstanz an. 0,11 mM entsprechen 0,5% Halothan, 0,22 mM 1%, 0,44 mM 2% und 0,66 mM 3% Halothan.

IVCT mit Koffein als Triggersubstanz im Vergleich

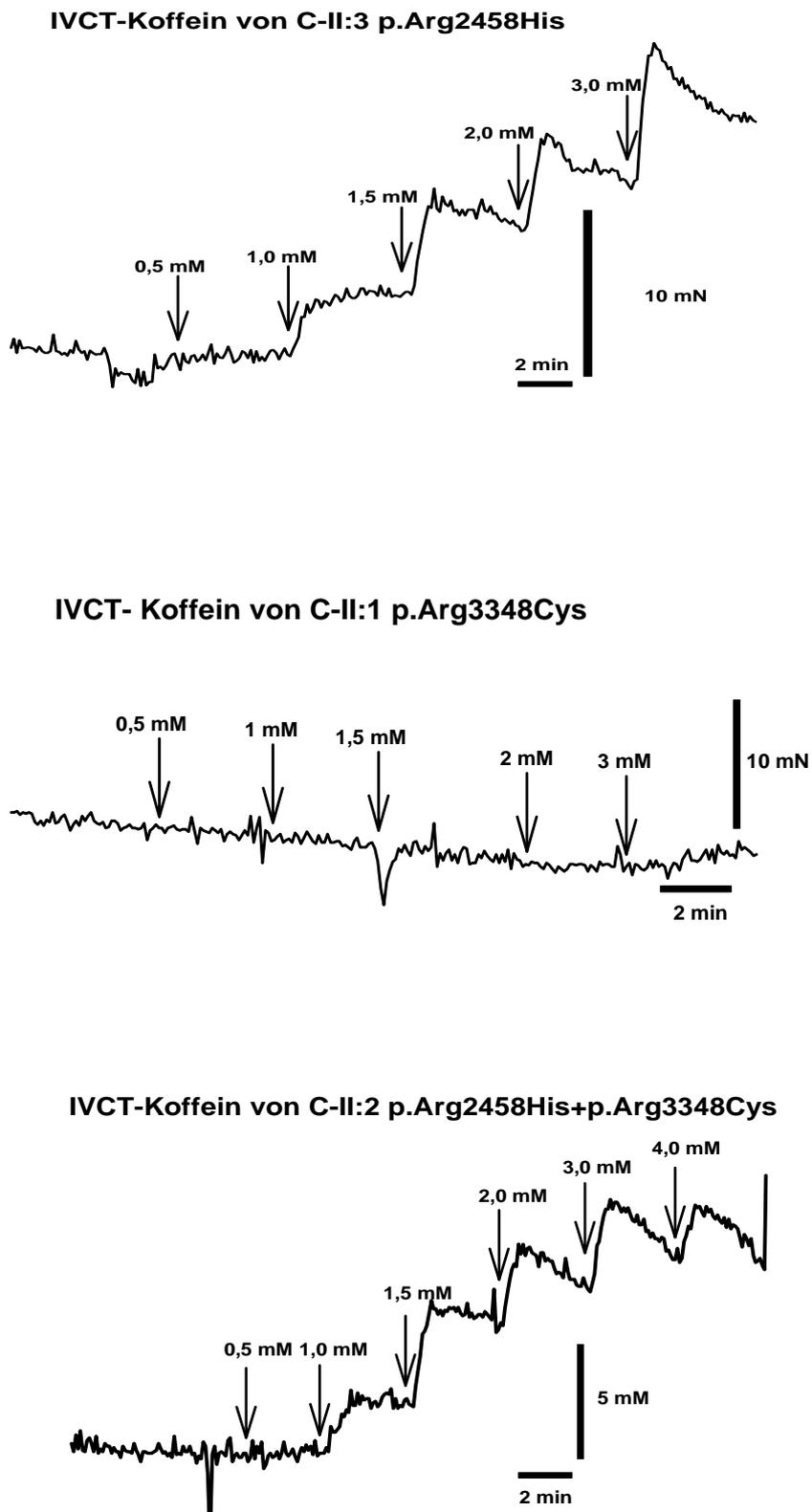


Abb. 34 IVCTs der verschiedenen Familienmitglieder mit Koffein als Testsubstanz.

2.7.3.1 Gefundene Mutationen

Doppelmutation p.Arg2458His + p.Arg3348Cys

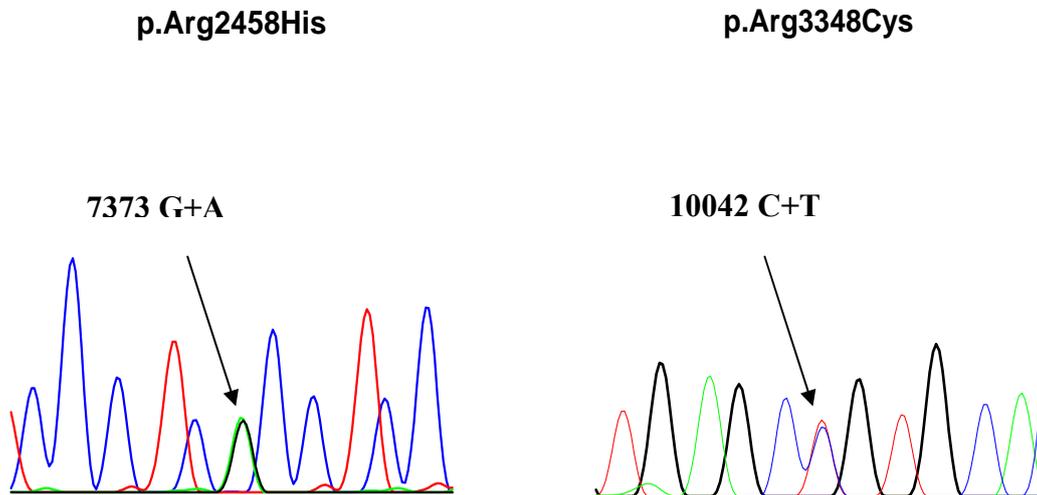


Abb. 35 Elektropherogramm mit links der Transition von Guanin (schwarz) zu Adenin (grün), welche die Missense Mutation p.Arg2458His verursacht, und rechts der Transition von Cytosin (blau) zu Thymin (rot), welche die Missense Mutation p.Arg3348Cys verursacht. Die Pfeile zeigen die exakten Positionen der Mutationen in der cDNA an.

Mutationen in der cDNA von C-II:2				
betroffenes Exon	Position in der cDNA (1=ATG)	Triplett (wt)	Triplett C-II:2	betroffene Aminosäure
Exon 7	594	CUA	CUG	Leu 198
Exon 19	2286	CCT	CCC	Pro 762
Exon 24	2979	AAC	AAT	Asn 993
Exon 26	3456	ATC	ATT	Ile 1152
Exon 35	5625 homozyg.	GAA	GAG	Glu 1875
Exon 36	5988 homozyg.	CGT	CGC	Arg 1996
Exon 46	7373	CGC	CAC	p.Arg2458His
Exon 67	10042	CGT	TGT	p.Arg3348Cys

Tab. 29 Auflistung aller Mutationen, welche in der cDNA des Patienten C-II:2 gefunden wurden.

2.7.3.2 Charakterisierung von p.Arg2458His, p.Arg3348Cys und p.Arg2458His+ p.Arg3348Cys

Zur Charakterisierung der gefundenen Mutationen wurden primäre Muskelzellkulturen von drei Familienmitgliedern (C-I:2; C-II:2; C-II:3) angelegt, welche sich dem IVCT unterzogen haben. Die Aufteilung der Mutationen auf die einzelnen Familienmitglieder ermöglichte eine Analyse der einzelnen Mutationen p.Arg2458His (C-II:3) und p.Arg3348 (Cys C-I:2) sowie der Kombination der beiden Mutationen p.Arg3348Cys+p.Arg2458His (C-II:2). Da es sich beim Familienmitglied C-I:2 um eine MHEH Diagnose handelt, wurden neben den Testsubstanzen Koffein und Chlorkresol auch Halothan als spezifischer Aktivator des RYR1 verwendet. Die nachfolgende Abbildung 36 zeigt repräsentative Ca^{2+} -Imaging Einzelexperimente.

2.7.3.2.1 Halothan

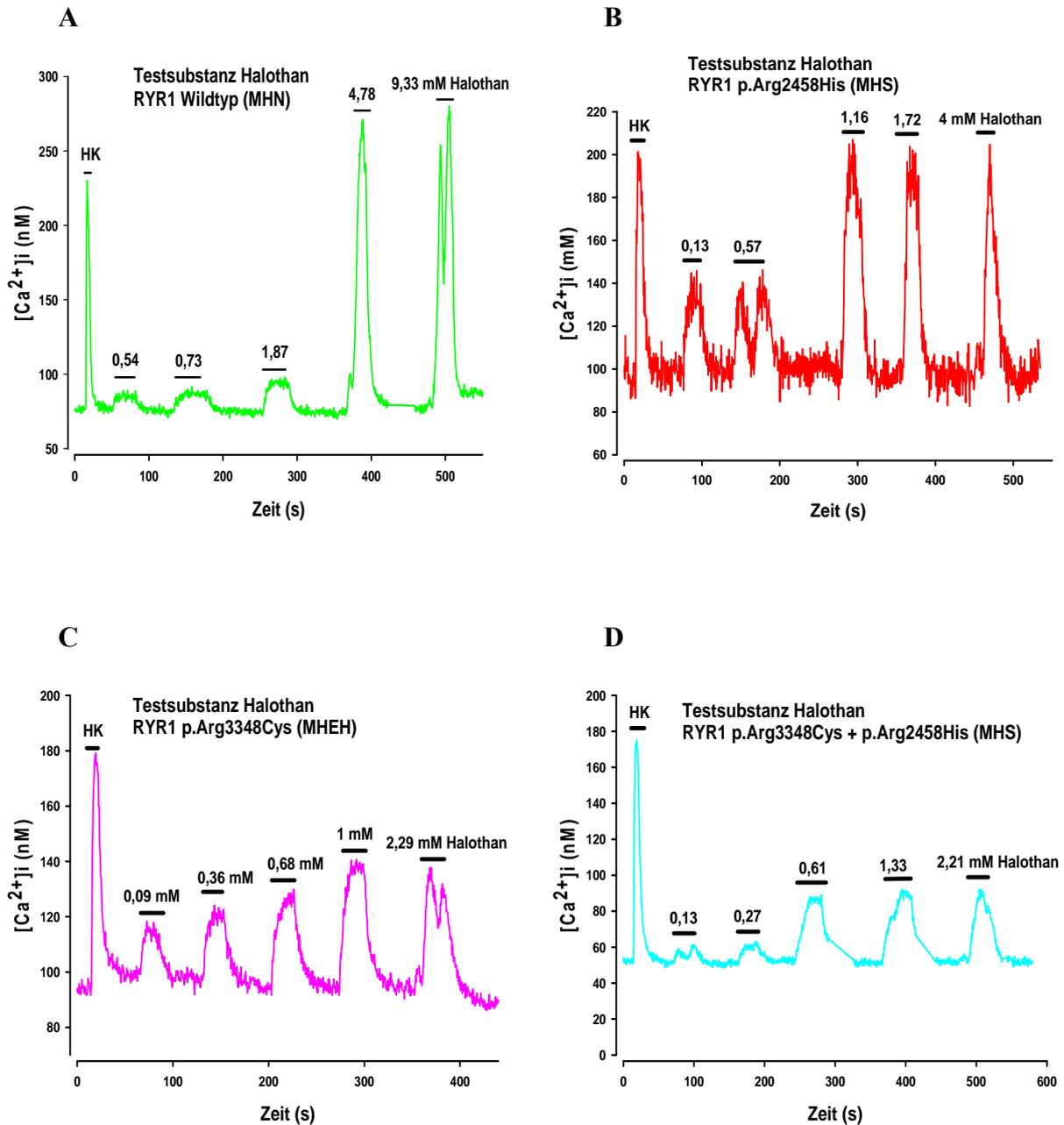


Abb. 36 Representative Ca^{2+} Imaging Experimente mit Halothan als spezifischen RYR1 Aktivator: A) grün einer MHN-Zelle, B) rot einer MHS p.Arg2458His, C) violett einer MHEH p.Arg3348Cys und D) türkis einer MHS p.Arg2458His+p.Arg3348Cys Muskelzelle.

Während bei der dargestellten MHN Zelle (Abb.36 A) die Applikation von 1,87 mM Halothan nur eine geringe Ca^{2+} Freisetzung bewirkte, verursachten bereits Konzentrationen um 1 mM Halothan eine maximale Ca^{2+} Freisetzung bei Muskelzellen die eine (Abb.36 B und C) oder beide (Abb.36 D) der hier besprochenen Mutationen tragen. Die experimentellen

Daten wurden mittels der Hill-Gleichung gefittet. Die Halothankonzentration, welche eine halb-maximale Ca^{2+} Freisetzung verursacht, wurde für jeden Mutationstyp sowie für die MHN Kontrollgruppe errechnet. Abbildung 37 zeigt einen graphischen Vergleich der ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven. Auffallend ist, dass die maximale Ca^{2+} Freisetzung bei Muskelzellen mit einem mutierten RYR1 deutlich geringer ist, als bei der MHN Kontrollgruppe. Da die Daten der maximale Ca^{2+} Freisetzung bei p.Arg3348Cys (MHEH) und der Doppelmutation p.Arg3348Cys+p.Arg2458His (MHS) keiner Normalverteilung entsprechen, wurden die Medianwerte herangezogen. Eine Analyse der maximalen Ca^{2+} Freisetzung mittels Mann-Whitney Test ergab einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen MHN Muskelzellen (99 nM, (87,131), $n = 14$) und p.Arg3348Cys (67 nM, (60, 105), $n = 13$), sowie für die Doppelmutation p.Arg3348Cys+p.Arg2458His (52, (41, 77) $n = 12$) mit $P = 0,004$. Die maximalen Ca^{2+} Freisetzung von p.Arg2458His Muskelzellen (83 nM, (58, 124) $n = 15$) hingegen, unterscheidet sich nicht signifikant ($P = 0,114$) von MHN Zellen (Tab. 33).

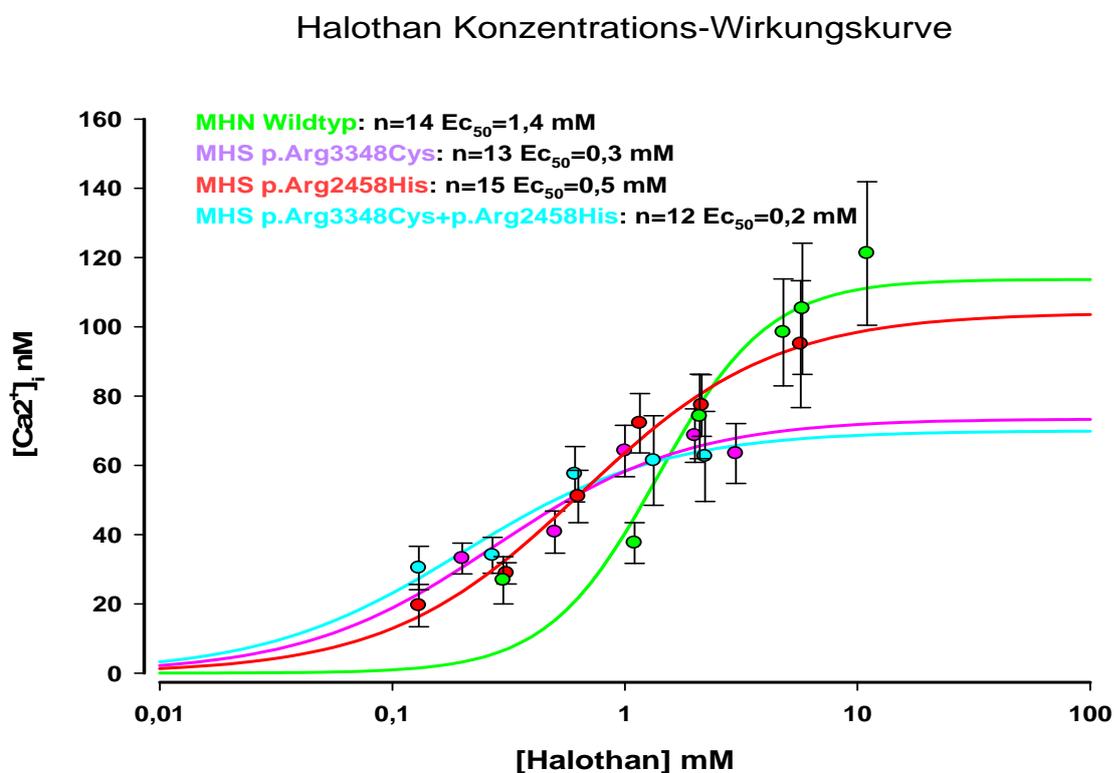


Abb. 37 Änderung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in Abhängigkeit von steigenden Halothan Konzentrationen. Die experimentell verwendeten und gemessenen Halothan Konzentrationen wurden zu Konzentrationsbereichen (siehe Tab.24) zusammengefasst, wobei

der jeweils obere Wert für die graphische Darstellung verwendet wurde.

Halothan Konzentrationsbereiche in mM			
MHN	p.Arg3348Cys	p.Arg2458His	p.Arg3348Cys+p.Arg2458His
0,2 - 0,3	0,1 – 0,2	0,07 - 0,13	0,13
0,5 – 1,1	0,3 – 0,5	0,22 – 0,31	0,27
1,9 – 2,1	0,5 – 1	0,57 – 0,63	0,53 – 0,61
4,4 – 4,9	1 -2	0,98 – 1,16	1,22 – 1,33
5,2 – 5,8	2 - 3	1,72 – 2,14	2,21
9 - 11		4,01 – 5,77	

Tab. 30 Zur graphischen Darstellung verwendete Halothankonzentrationsbereiche.

2.7.3.2.2 Koffein

Auch in Bezug auf die Testsubstanz Koffein wurden Zellkulturen aller verfügbaren Familienmitglieder charakterisiert. Abbildung 38 zeigt repräsentative Einzelexperimente.

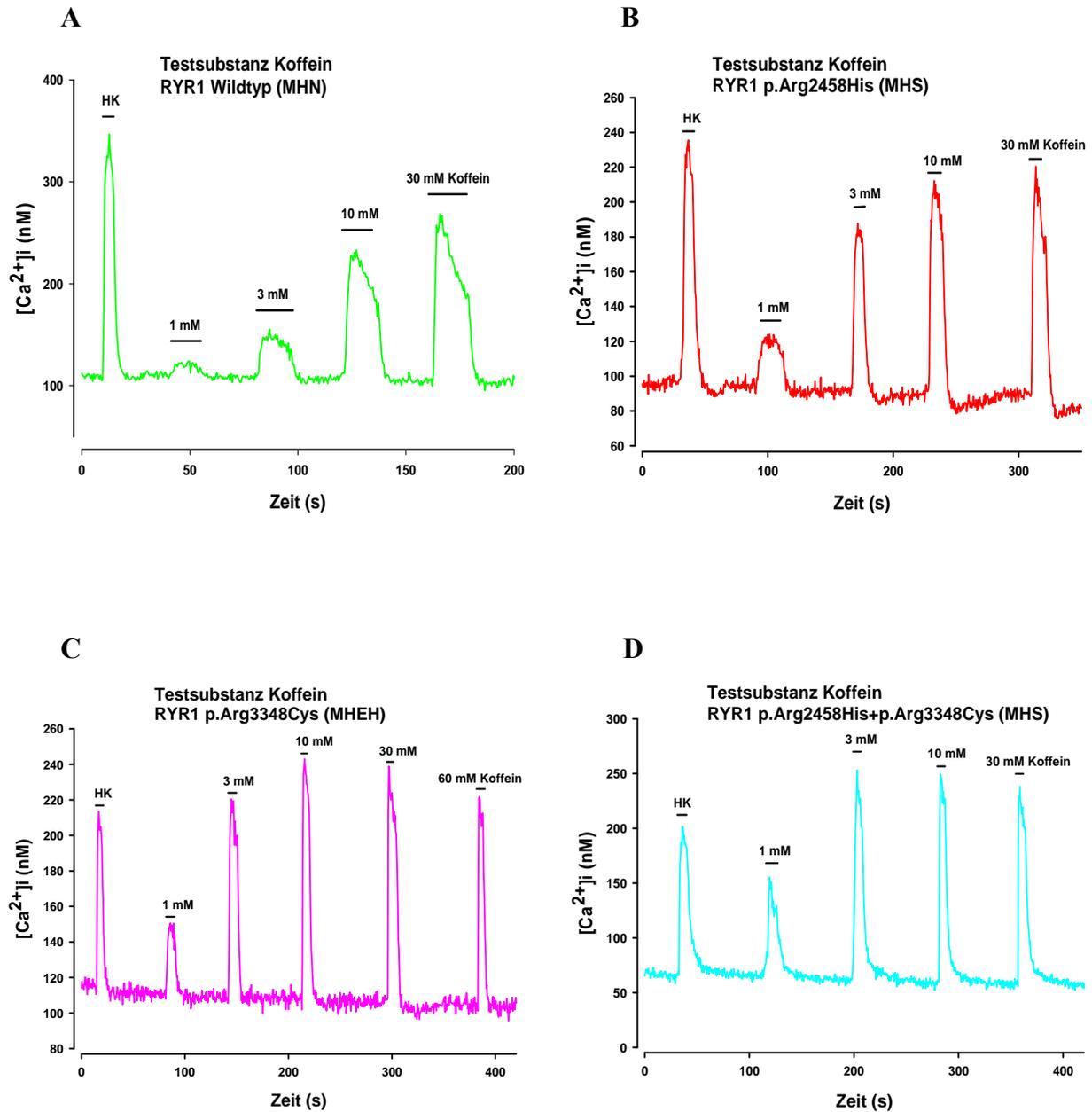


Abb. 38 Zeitverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ in Muskelzellen mit Koffein als spezifischen RYR1 Aktivator: A) grün MHN, B) rot MHS p.Arg2458His, C) violett MHEH p.Arg3348Cys und D) türkis MHS p.Arg2458His+p.Arg3348Cys Muskelzelle.

Ein Vergleich der errechneten EC_{50} Werte in Bezug auf die Testsubstanz Koffein zeigt für alle untersuchten Muskelzellen der Familie C einen MHS Phänotyp (Abb. 39). Obwohl das

Familienmitglied C:I-2 im IVCT MHEH diagnostiziert wurde, entspricht dieses auf zellulärer Ebene einem MHS Phänotyp.

Koffein Konzentrations-Wirkungskurve

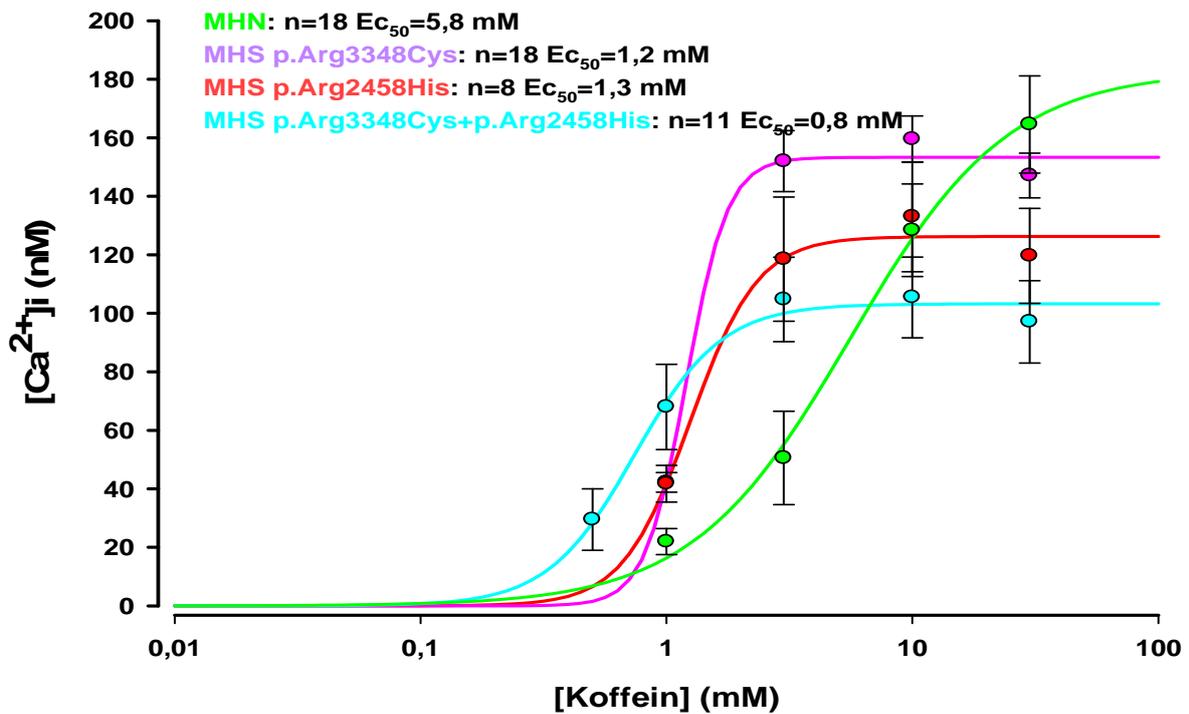


Abb. 39 Änderung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in Abhängigkeit von unterschiedlichen Koffein Konzentrationen

Die maximale Ca^{2+} Freisetzung in Bezug auf die Testsubstanz Koffein zeigt nur für die Doppelmutation p.Arg3348Cys+p.Arg2458His (96, (64, 142) n= 11) einen signifikanten Unterschied (P= 0,006) zur MHN Kontrollgruppe (154, (131, 204) n= 18) (siehe Tab. 33).

2.7.3.2.3 Chlorkresol

Auch in Bezug auf die Testsubstanz Chlorkresol wurden alle Muskelzellkulturen der Familie C charakterisiert. Abbildung 40 zeigt repräsentative Einzelexperimente.

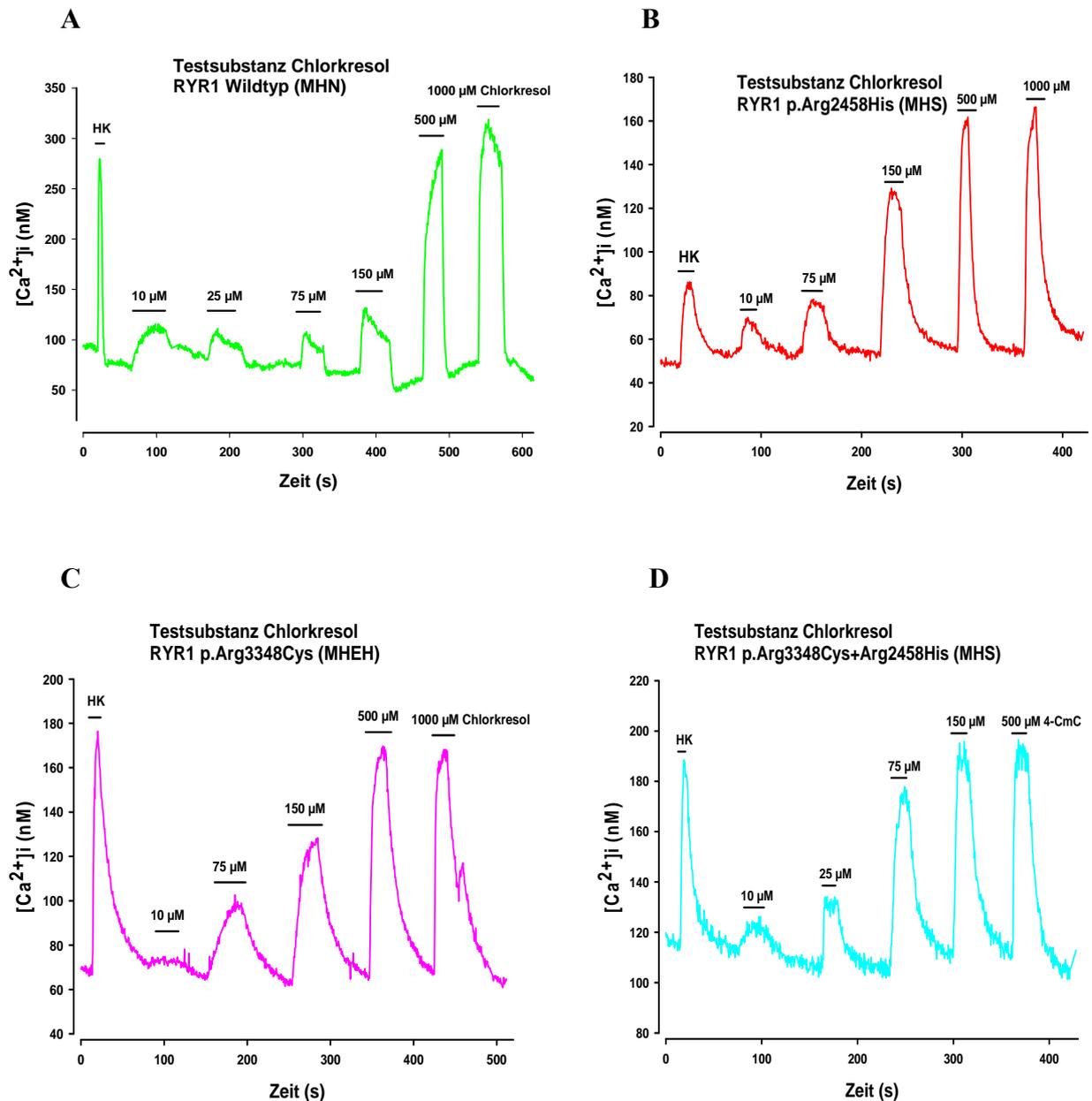


Abb. 40 Zeitverlauf der [Ca²⁺]_i in Muskelzellen mit Chlorkresol als spezifischer RYR1 Aktivator: A) grün MHN, B) rot MHS p.Arg2458His, C) violett MHEH p.Arg3348Cys und C) türkis MHS p.Arg2458His+p.Arg3348Cys.

Eine Analyse der ermittelten Daten zeigt, dass der E_{50} Mittelwert für Chlorkresol (Abb. 41) für Muskelzellen mit der Mutation p.Arg3348Cys einen höher ist (E_{50} = 210 μM) als in der

MHN Kontrollgruppe ($Ec_{50} = 165 \mu\text{M}$). Die Ec_{50} Werte der Muskelzellkultur p.Arg2458His und p.Arg3348Cys+p.Arg2458His hingegen ($Ec_{50} = 133 \mu\text{M}$ bzw. $42 \mu\text{M}$) liegen hingegen deutlich unter dem Ec_{50} Mittelwert der MHN Kontrollgruppe ($Ec_{50} = 165 \mu\text{M}$).

Chlorkresol Konzentrations-Wirkungskurve

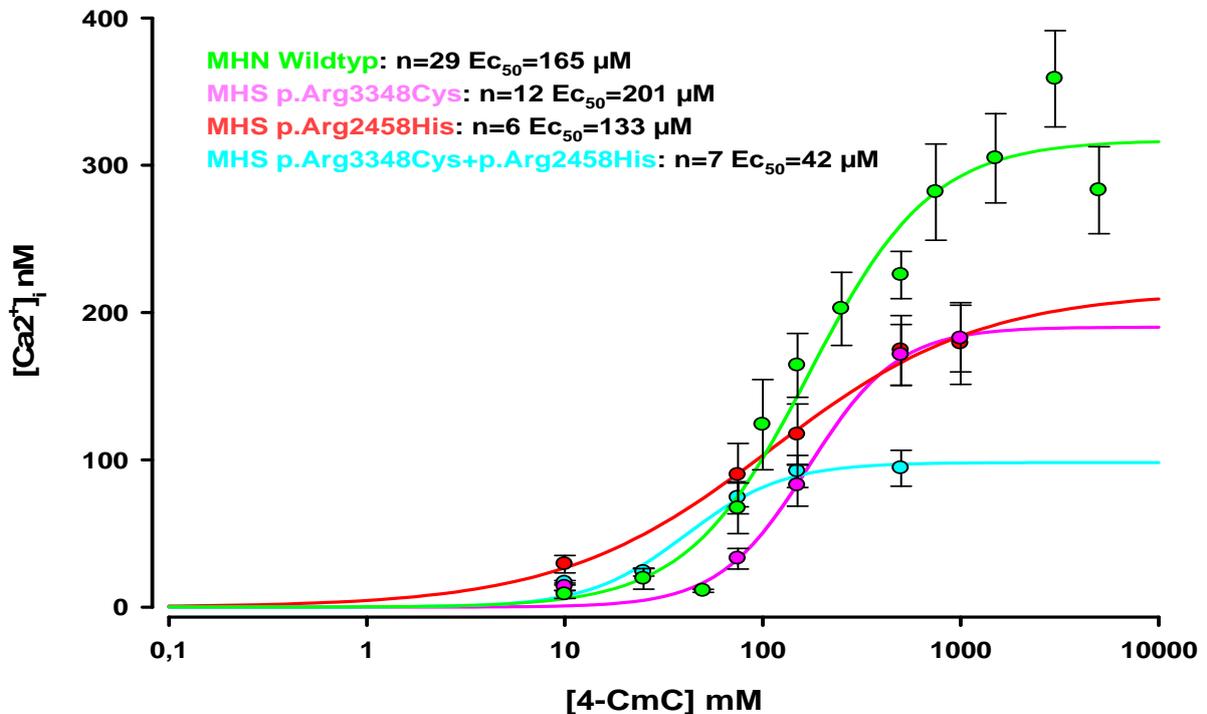


Abb. 41 Änderung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in Abhängigkeit von steigenden Chlorkresol Konzentrationen

Wie bereits bei den Testsubstanzen Halothan und Koffein, zeigt die Zellkultur mit der Doppelmutation p.Arg3348Cys+p.Arg2458His auch gegenüber der Testsubstanz Chlorkresol den niedrigsten Ec_{50} Mittelwert ($42 \mu\text{M}$).

Die maximalen Ca^{2+} Freisetzung in Bezug auf die Testsubstanz Chlorkresol zeigt einen signifikanten Unterschied ($P = 0,046$) für die Zellkulturen p.Arg3348Cys (214, (120, 256) n=12) und ($P < 0,05$) für p.Arg3348Cys+p.Arg2458His (94, (89, 118) n=7), aber nicht ($P = 0,347$) für p.Arg2458His Muskelzellen (235, (111, 263) n=6) (siehe Tab. 33).

Die statistische Analyse der Ruhecalciumkonzentrationen zeigt eine Normalverteilung der ermittelten Daten auf, wobei alle untersuchten Zellkulturen der Familie C ein erhöhtes Ruhecalcium aufweisen (siehe Tab. 31).

	Mittelwert des Ruhecalciums (nM) und Signifikanz (P)	S.E.M	Anzahl der Experimente n
MHN Kontrollgruppe	64	3,6	44
p.Arg3348Cys	86 (P < 0,001)	3,5	43
p.Arg2458His	93 (P < 0,001)	3,6	33
p.Arg3348Cys+p.Arg2458His	78 (P = 0,016)	4,6	32

Tab. 31 Vergleich der Ruhecalciumkonzentration in MHS und MHN Muskelzellen

2.7.4 Zusammenfassung und Vergleich der erzielten Ergebnisse

Um den EC_{50} Wert sowie die maximale Ca^{2+} Freisetzung aller untersuchten Muskelzellen vergleichen zu können, wurden die Medianwerte herangezogen. Tabelle 32 zeigt eine Zusammenfassung aller ermittelten EC_{50} Werte, Tabelle 33 eine Analyse der maximalen Ca^{2+} Freisetzung in Bezug auf die verwendete Testsubstanz.

RYR1	Testsubstanz	EC_{50} (Medianwerte)	U	Signifikanz P	n
p.Trp3985Arg	Koffein	1,4 mM (1,1; 2) *	U = 20	P < 0,001	37
	Chlorkresol	68 μ M (58, 83) *	U = 132	P < 0,001	32
p.Ala612Pro	Koffein	1,1 mM (1; 1,3) *	U = 2	P < 0,001	10
	Chlorkresol	45 μ M (20; 60) *	U = 24	P < 0,001	12
p.Arg2458His	Koffein	1,3 mM (1,0; 1,5) *	U = 0	P < 0,001	8
	Chlorkresol	143 μ M (29; 221)	U = 86	P = 0,983	6
	Halothan	0,33 mM (0,3; 0,6) *	U = 17	P < 0,001	15
p.Arg3348Cys	Koffein	1,1 mM (1,0; 1,3) *	U = 2	P < 0,001	18
	Chlorkresol	179 μ M (129; 261) *	U = 101	P = 0,038	12
	Halothan	0,35 mM (0,2; 0,4) *	U = 1	P < 0,001	13
p.Arg2458His+ p.Arg3348Cys	Koffein	0,9 mM (0,5; 1,0) *	U = 0	P < 0,001	11
	Chlorkresol	38 μ M (36; 49) *	U = 7	P < 0,001	7
	Halothan	0,16 mM (0,1; 0,23) *	U = 1	P < 0,001	12
MHN	Koffein	5,7 mM (4,8; 6,8)			18
	Chlorkresol	116 μ M (88; 169)			29
	Halothan	1,1 mM (0,89; 2)			14

Tab. 32 Vergleich der ermittelten EC_{50} Werte von Muskelzellen der Familie A, B und C. Signifikante Unterschiede sind mit * bezeichnet.

Maximale Ca ²⁺ Freisetzung					
RYR1	Testsubstanz	Median in nM (25.;75.) Perzentil	U	P	N
p.Trp3985Arg	Koffein	232 (185, 283) *	U = 180	P = 0,006	37
	Chlorkresol	273 (218, 321)	U = 414	P = 0,605	32
p.Ala612Pro	Koffein	141 (81, 215)	U = 74	P = 0,457	10
	Chlorkresol	141 (121, 168) *	U = 36	P < 0,001	12
p.Arg2458His	Koffein	126 (82, 178)	U = 46	P = 0,157	8
	Chlorkresol	235 (111,263)	U = 65	P = 0,347	6
	Halothan	83 (58, 124)	U = 71	P = 0,114	15
p.Arg3348Cys	Koffein	158 (140, 172)	U = 161	P = 0,987	18
	Chlorkresol	214 (120, 256) *	U = 104	P = 0,046	12
	Halothan	67 (60, 105) *	U = 50	P = 0,049	13
p.Arg2458His+ p.Arg3348Cys	Koffein	96 (64, 142) *	U = 37	P = 0,006	11
	Chlorkresol	94 (89, 118) *	U = 4	P < 0,001	7
	Halothan	52 (41, 77) *	U = 28	P = 0,004	12
MHN	Koffein	154 (131; 204)			18
	Chlorkresol	255 (190, 331)			29
	Halothan	99 (86, 131)			14

Tab. 33 Vergleich der maximalen Ca²⁺ Freisetzung in Bezug auf die jeweils verwendete Testsubstanz. Signifikante Unterschiede sind mit * bezeichnet.

3 Diskussion

3.1 Genetisches Screening:

Im Rahmen des genetischen Screenings von Exon 2, 9, 17, 39, 45 und 46 wurden bei zwei Patienten die Mutation p.Arg614Cys im Exon 17 und bei einem Patienten die Mutation p.Arg2458Cys identifiziert. Beide Mutationen sind anerkannte MH Mutationen (siehe www.emhg.org RYR1 Mutations) und wurden bereits bei 67 respektive 10 Familie entdeckt (Robinson R. and D.Carpenter 2006).

3.2 Sequenzierung des gesamten RYR1 ausgewählter österreichischer MH Patienten

3.2.1 Familie A: Mutation p.Trp3985Arg

Die hier beschriebene Mutation befindet sich in einer Region des RYR1, welche noch nicht zu den so genannten malignen Hyperthermie „hot-spot“ Regionen zählt. Erst in den letzten Jahren wurden einige Mutationen, welche in dieser Region entdeckt wurden, in Zusammenhang mit der malignen Hyperthermie gebracht (Monnier et al. 2002) und dieser Region mehr Bedeutung beigemessen. Fessenden und Mitarbeiter konnte 2003 die Chlorkresol Aktivierungsdomäne auf dem RYR1 lokalisieren. Es handelt sich um einen Abschnitt, welcher sich ganz in der Nähe der hier beschriebenen Region befindet und sich von Aminosäuren 4007 bis 4180 erstreckt (Fessenden et al. 2003). Mit Hilfe von Fusionsproteinen konnte er 2006 zwei Aminosäuren identifizieren, welche essentiell für die Chlorkresol Aktivierung des RYR1 sind: Gln4020 und Lys4021 (Fessenden et al. 2006). Ein Austausch dieser zwei Aminosäuren mit den korrespondierenden Aminosäuren von RYR3 – Leucin und Glutamin – resultiert im Verlust der Aktivierbarkeit durch Chlorkresol. 2006 beschrieb Robinson und Mitarbeiter die Mutation p.Asp3986Glu (Robinson R. and D.Carpenter 2006), welche in einer Familie aus Großbritannien mit einem MHS Phänotyp segregiert. 2007 präsentierte Muldoon, beim „XXVIth European Malignant Hyperthermia Group Meeting“ in Siena (Italien), den Fall eines Mädchens, welches seit seiner Kindheit immer wieder MH-Krisen entwickelte, obwohl es nachweislich keinen MH-Triggersubstanzen ausgesetzt war. Im

Rahmen einer kleinen Infektion, entwickelte es eine fulminante MH-Krise, an der es am Weg ins Spital verstarb. Post mortem wurde eine p.Arg3983Cys Mutation festgestellt. Die gleiche Mutation wurde auch bei einem jungen Mann entdeckt, der sich einem „Caffein-Halothan contracture test (CHCT – die nordamerikanische Version des IVCTs) unterzog, welcher stark positiv ausfiel. Auch er zeigte immer wieder Symptome einer MH-Krise ohne spezifischen Triggersubstanzen ausgesetzt gewesen zu sein. Diese Fälle verdeutlichen, dass bestimmte Mutationen im RYR1 wahrscheinlich auch MH ähnliche Krisen auslösen können ohne, dass die Betroffenen Triggersubstanzen ausgesetzt sind. Obwohl sich in dieser Region noch keine anerkannte MH Mutation befindet, deuten diese Fallbeschreibungen darauf hin, dass dieser Region ein hoher Stellenwert beigemessen werden muss.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Einzelzellmessungen haben gezeigt, dass der EC_{50} Wert für Koffein um das 4,5-fache und der EC_{50} Wert für Chlorkresol um das 1,6-fache niedriger in der p.Trp3985Arg Gruppe war als in der MHN Kontrollgruppe. Muskelzellen mit p.Trp3985Arg zeigt somit einen Phänotyp der mit MHS Muskelzellen vergleichbar ist. Im Gegensatz zu den Muskelzellen von Familie B und C, zeigen p.Trp3985Arg Muskelzellen kein signifikant erhöhtes Ruhecalcium auf und die maximale Ca^{2+} Freisetzung in Bezug auf die Testsubstanz Koffein ist signifikant höher als bei der MHN Kontrollgruppe (siehe Tab. 33). Diese Mutation scheint somit nicht einen undichten Calciumkanal zu verursachen. Die Mutation p.Trp3985Arg ist die erste MH Missense Mutation, bei der ein Tryptophan im RyR1 betroffen ist. Tryptophan, wie auch Methionin, sind die einzigen proteinogenen Aminosäuren, welche nur durch ein einziges Basen-Triplett codiert werden und jeder Austausch einer dieser Nukleobasen in diesem Codon führt daher zwangsläufig zu einem Austausch dieser Aminosäure. Im Gegenzug wurden bereits 9 Mutationen (Robinson R. and D.Carpenter 2006) entdeckt und in Zusammenhang mit MH, CCD und der Multi-minicore Disease (MmD) gebracht, welche durch einen Austausch eines Arginins gegen ein Tryptophan bedingt waren. Nur eine von ihnen – p.Arg552Trp (Keating et al. 1997) – ist eine von der EMHG anerkannte MH-Mutation und wurde in mehreren Populationen – Irland, Großbritannien und Taiwan - beschrieben. Mit Phenylalanin, Tyrosin und Histidin zählt Tryptophan zu den aromatischen Aminosäuren (siehe Abbildung 42).

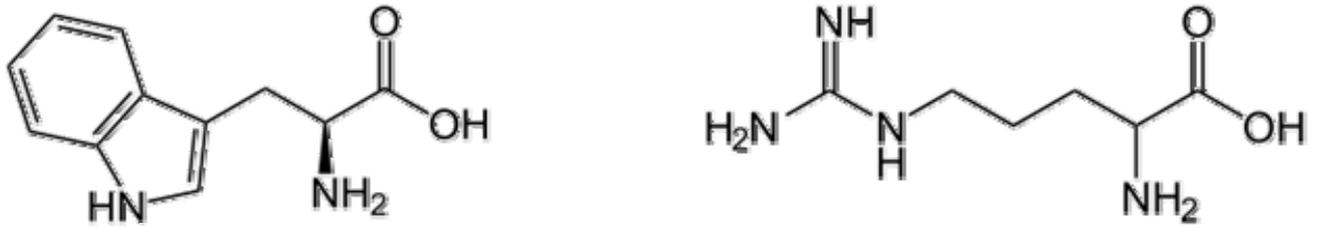


Abb. 42: Strukturformel von L-Tryptophan und L-Arginin

Während Tryptophan neutral und einen Hydrophobizitätsindex von -0,9 besitzt, ist Arginin stark basisch und mit -4,5 Hydrophobizitätsindex die hydrophilste aller proteinogenen Aminosäuren. Die Grundeigenschaften dieser zwei Aminosäuren sind somit sehr unterschiedlich.

3.2.1.1 Sequenzanalyse

Sequenzvergleich der Region um Position 3985 mit den entsprechenden RYR1 Isoformen 2 und 3

Ein Sequenzvergleich der Region in der sich die hier beschriebene Mutation p.Trp3985Arg befindet mit den respektiven Regionen von RYR2 und RYR3 zeigt, dass die Region unmittelbar um Position 3985 bei allen RYR Isoformen identisch ist (siehe in Tab. 34 gelb hervorgehobene Region). Der gesamte in Tabelle 34 dargestellte Sequenzbereich zeigt eine Sequenzidentität von 88%.

RYR1 p.Trp3985Arg	GPCTGNQQSLAHSRL R DAVVGFLHVF AHMMM KLA
RYR1 wt	GPCTGNQQSLAHSRL W DAVVGFLHVF AHMMM KLA
RYR2 wt	GPCTGNQQSLAHSRL W DAVVGFLHVF AHMQ MKLS
RYR3 wt	GPC I GNQQSLAHSRL W DAVVGFLHVF ANMQ MKLS

Tab. 34 Region um p.Trp3985Arg: Die Aminosäuren sind in der Ein Buchstaben Schreibweise gezeigt. Rot ist die Position 3985 dargestellt, wobei W für Tryptophan und

R für Arginin steht. Aminosäuren, welche von der wtRYR1 Sequenz abweichen, sind blau dargestellt. Der flankierende Bereich um Position 3985 ist gelb hervorgehoben und zeigt eine 100% Sequenzidentität zwischen den verschiedenen RYR Isoformen. Die Positionen 3983 und 3986 sind grün hervorgehoben (RYR1wt): sie stehen in Verdacht kausale MH Mutationen zu sein .

Sequenzvergleich der Region um Position 3985 mit den entsprechenden RYR1 bzw. deren homologen Regionen im RYR verschiedener Wirbeltiere

Ein Sequenzvergleich des humanen RYR1 mit den entsprechenden Ryanodin Rezeptoren verschiedener Wirbeltiere zeigt eine 100% Sequenzidentität in dieser Region (Tab. 35). Diese Tatsache unterstreicht den hoch konservativen Charakter dieser Region.

MHS p.Trp3985Arg	GPCTGNQQSLAHSRL^RDAVVGFLHVFAHMMMKLA
<i>Homo sapiens</i> Mensch	GPCTGNQQSLAHSRL^WDAVVGFLHVFAHMMMKLA
<i>Sus scrofa</i> Wildschwein	GPCTGNQQSLAHSRL^WDAVVGFLHVFAHMMMKLA
<i>Mus musculus</i> Hausmaus	GPCTGNQQSLAHSRL^WDAVVGFLHVFAHMMMKLA
<i>Oryctolagus cuniculus</i> Wildkaninchen	GPCTGNQQSLAHSRL^WDAVVGFLHVFAHMMMKLA
<i>Rattus norvegicus</i> Wanderratte	GPCTGNQQSLAHSRL^WDAVVGFLHVFAHMMMKLA
<i>Rana catesbeiana</i> Ochsenfrosch	GPCTGNQQSLAHSRL^WDAVVGFLHVFAHMMMKLA
<i>Danio rerio</i> Zebrabärbling	GPCTGNQQSLAHSRL^WDAVVGFLHVFAHMMMKLA

Tab. 35 Vergleich der Region um Trp3985 von *Homo sapiens* mit den entsprechenden Regionen des RYR1 bzw. deren Homologa anderer Wirbeltiere: gelb unterlegte Regionen zeigen eine 100% Sequenzidentität zum humanen wtRYR1.

Sequenzvergleich der Region um Position 3985 mit den entsprechenden RYR1 bzw. deren homologen Regionen im RYR verschiedener wirbelloser Tiere

Ein Sequenzvergleich dieser Schlüsselregion um Position 3985 des RYR1 mit den homologen Ryanodin Rezeptoren wirbelloser Tiere zeigt eine sehr hohe Sequenzidentität. Besonders die Region unmittelbar um Position 3985 ist bei allen gezeigten Arten völlig identisch und zeigt den absolut konservativen Charakter dieser Region selbst auf dieser evolutionär weit entfernten Ebene der wirbelloser Tiere.

Aufgrund von Hydrophobieprofilen, Proteolysestudien und Antikörpermarkierungen postulierte Zorzato 1990 ein 12 Transmembran (TM) Modell für den RYR1 (Zorzato et al. 1990). In diesem Modell inserieren 12 Domäne einer Untereinheit des homotetrameren RYR1 (M', M'', sowie M1 bis M10) in der Membran des SR. Die Transmembrandomäne M1 erstreckt sich von Aminosäure 3984 bis 4003 und ist in Tabelle 36 grau unterlegt. Die Mutationen p.Asp3986Glu und p.Trp3985Arg befinden sich am Beginn dieser transmembranären Region, wohingegen p.Arg3983Cys eine Aminosäure vor dieser TM Region liegt. Somit befinden sich diese drei Mutationen in unmittelbarer Nähe zueinander.

MHS p.Trp3985Arg	GPCTGNQQLAHSRLDAVVGFLHVFAHMMMCLA
<i>Homo sapiens</i> Mensch	GPCTGNQQLAHSRLDAVVGFLHVFAHMMMCLA
<i>Anopheles gambiae</i> Stechmücke	GPCTQNQQALAH SRLWDVGGFLFLFSHMQDKLS
<i>Apis mellifera</i> Honigbiene	GPCAQNQQALAH SRLWDVGGFLFLFSHMQDKLS
<i>Drosophila melanogaster</i> Taufliege	GPCTLNQQALAH SRLWDVGGFLFLFSHMQDKLS
<i>C. elegans</i> Fadenwurm	GPCVGNQMTLAN SRLWDVINGFFLFAHMMKLY

Tab. 36 Vergleich der Region um Trp3985 von *Homo sapiens* mit den entsprechenden Regionen des RYR1 bzw. deren Homologa wirbelloser Tiere: gelb unterlegte Regionen

zeigen eine Sequenzidentität zum humanen wtRZR1. Aminosäuren, welche von der *Homo sapiens* wtRZR1 Sequenz abweichen, sind blau dargestellt. Grün hervorgehoben sind die Positionen 3983 und 3986, wo bereits Missense Mutationen beschrieben wurden. Die Transmembransequenz M1, welche von Zorzato 1990 postuliert wurde, ist grau hervorgehoben und unter [http://www.uniprot.org/blast/?about=P21817\[3984-4003\]](http://www.uniprot.org/blast/?about=P21817[3984-4003]) beschrieben.

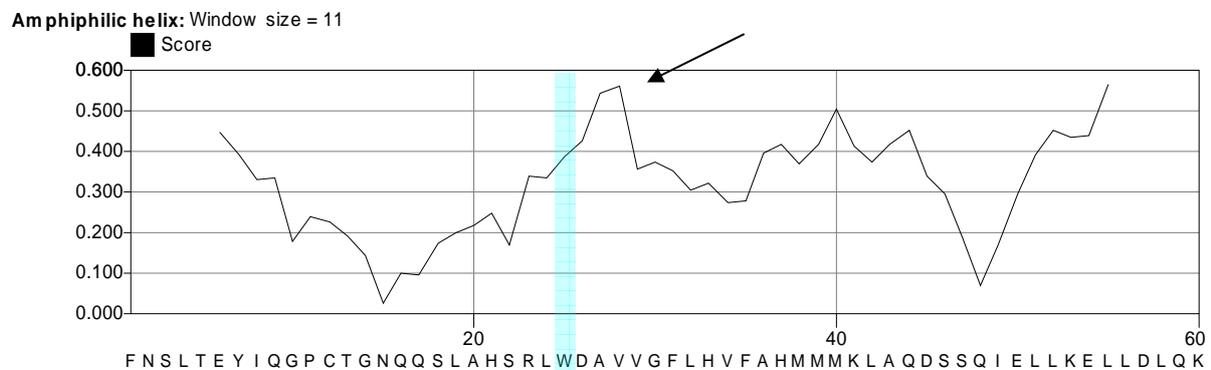
Art	Species	Rezeptor	Proteindatabase	Länge in AS
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	RZR1	NP_000531	5038
Wildschwein	<i>Sus scrofa</i>	RZR1	NP_001001534	5035
Hausmaus	<i>Mus musculus</i>	RZR1	EDL24092	4905
Wildkanninchen	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	RZR1	NP_001095188	5037
Wanderratte	<i>Rattus norvegicus</i>	RZR1	XP_001078539	5033
Blauer Marlinfisch	<i>Makaira nigricans</i>	RZR1	AAB58117.1	5081
Ochsenfrosch	<i>Rana catesbeiana</i>	RZR alpha	BAA04646	5037
Ochsenfrosch	<i>Rana catesbeiana</i>	RZR beta	BAA04647	4868
Zebrabärling	<i>Danio rerio</i>	RZR alpha	XP_001923294	5063
Zebrabärling	<i>Danio rerio</i>	RZR beta	NP_001096041	5076
Stechmücke	<i>Anopheles gambiae</i>	RZR homologon	XP_318561	5109
Honigbiene	<i>Apis mellifera</i>	RZR homologon	XP_392217	5083
Taufliege	<i>Drosophila melanogaster</i>	RZR homologon	BAA41470	5126
Fadenwurm	<i>Caenorhabditis elegans</i>	RZR homologon	BAA08309	5071

Tab. 37 RZR1 Proteine mit den entsprechenden Zugriffsnummern, welche unter www.ncbi.nlm.nih.gov abrufbar sind.

3.2.1.2 Sekundärstrukturanalyse der Region um Position 3985 des RYR1

Eine Sekundärstrukturvorhersage mittels DS-Gen Software (Accelrys; San Diego, USA) legt nahe, dass die Punktmutation p.Trp3985Arg eine direkte Auswirkung auf die Sekundärstruktur der in Tabelle 36 grau unterlegten Region haben könnte. Bei einem Austausch des Tryptophans auf Position 3985 gegen ein Arginin, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Helixstruktur in dieser Region drastisch (siehe Abbildung 43).

wtRYR1



p.Trp3985Arg

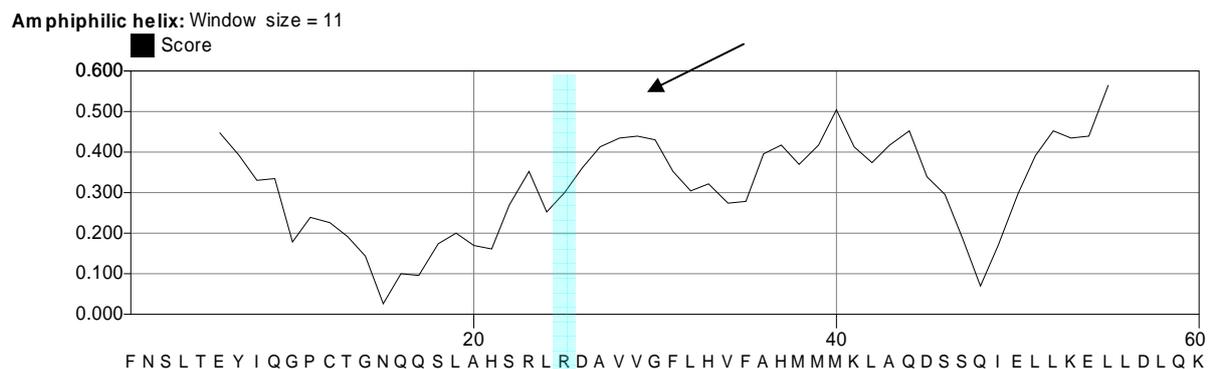


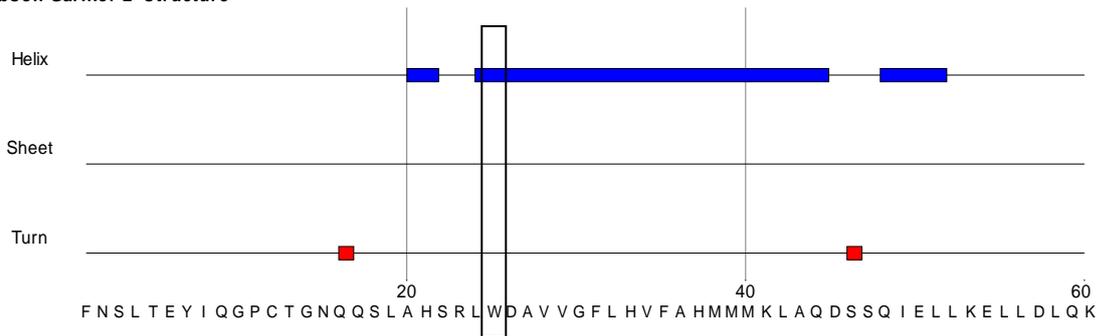
Abb. 43 Strukturvorhersage mittel DS-Gen Software. Die obere Graphik stellt die wtRYR1 Sekundärstruktur dar, die untere Graphik die gleiche Region wobei ein Aminosäureaustausch in Position 3985 (türkis hervorgehoben) von Tryptophan zu Arginin stattfindet (p.Trp3985Arg). Die Pfeile deuten auf die durch die Mutation p.Trp3985Arg veränderte Wahrscheinlichkeit einer Helixstruktur in diesem Abschnitt hin.

Die Sekundärstrukturvorhersage mittels der Methoden von Robson und Garnier (Robson and Garnier 1993) postuliert ebenfalls eine Alpha-Helix, welche sich mit der M1 Transmembranregion (TM) von Zorzatos 12 TM Modell deckt. Bei einem Austausch des Tryptophans auf Position 3985 gegen ein Arginin, wird diese Helix auf Position 3988 und 3989 unterbrochen (siehe Abbildung 44). Der Austausch dieser Aminosäure hat somit höchstwahrscheinlich bereits für die Sekundärstruktur des RYR1 weit reichende Konsequenzen.

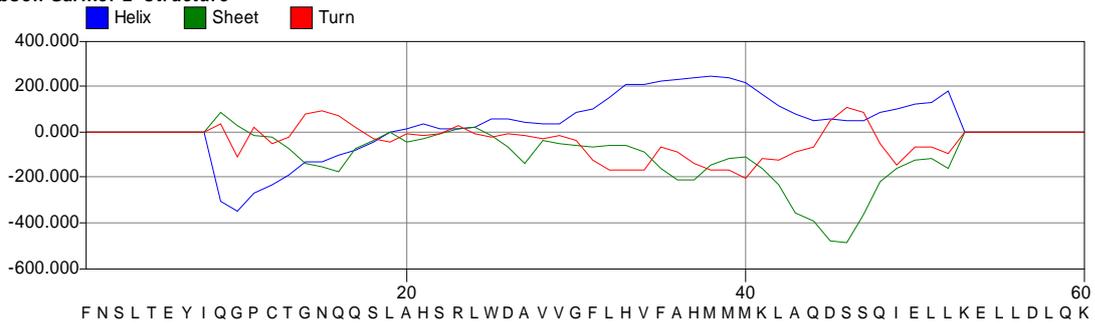
Auch mittels Sekundärstruktur-Vorhersagemodell nach Robson und Garnier zeigt die Mutation eine Auswirkung auf die Struktur des gezeigten Abschnittes.

RYR1wt

Robson Garnier 2° structure

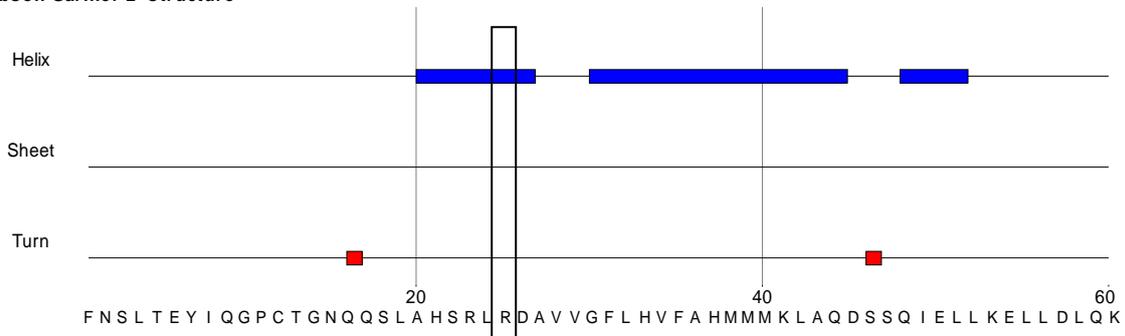


Robson Garnier 2° structure



p.Trp3985Arg

Robson Garnier 2° structure



Robson Garnier 2° structure

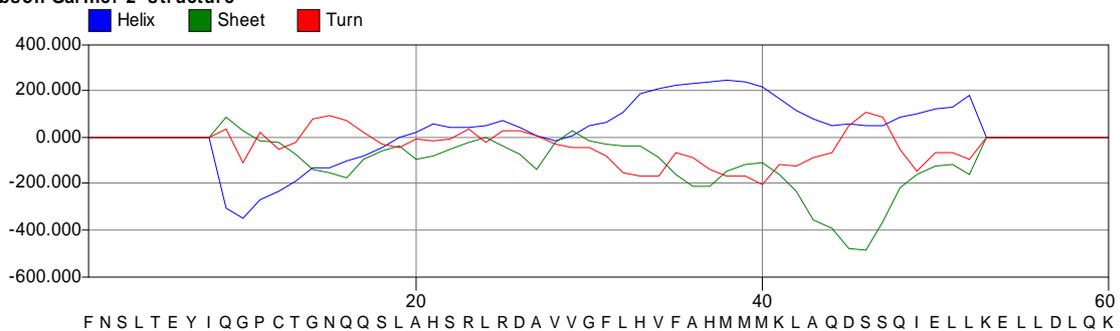


Abb. 44 Sekundärstruktur-Vorhersagemodell für Proteine nach Robson und Garnier (Robson and Garnier 1993) (Garnier et al. 1978). Im oberen Teil der Abbildung wird die

Sekundärstruktur der Wildtypsequenz dargestellt, während im unteren Teil die Region mit der Mutation p.Trp3985Arg dargestellt ist.

Weitere Sekundärstrukturvorhersagemodelle mittels SIMPA 96 (Levin 1997) und GORIV (Garnier et al. 1996) (einzusehen unter <http://npsa-pbil.ibcp.fr>) zeigen ebenfalls, dass die Punktmutation p.Trp3985Arg eine direkte Auswirkung auf die Sekundärstruktur dieser Region hat.

3.2.1.3 Die “RYR and IP3R Homology“ (RHI) Region

Der Inositol 1,4,5 Triphosphatrezeptor (IP3R) gehört mit dem Ryanodin Rezeptor zu einer großen Familie von homotetrameren Rezeptoren, die ligandengesteuerte Ca²⁺ Kanäle repräsentieren. Die in Tabelle 36 gezeigte Region des RYR1 repräsentiert die „RYR and IP3R Homology“ (RHI) Region und erstreckt sich von Aminosäure 3870 bis 4003. Die Funktion dieser Domäne ist noch umstritten, wird aber bei allen IP3R Isoformen vorgefunden. Auffallend ist jedoch, dass obwohl diese Region eine starke Homologie zum IP3R aufweist, genau die hier diskutierte Region - RLWD - in der sich alle drei hier erwähnten Mutationen befinden, fehlt (siehe Tab. 38). Dieser kurze Abschnitt, welcher spezifisch für die Familie der Ryanodin Rezeptoren ist, scheint eine strukturelle und/oder funktionelle essentielle Region zu beherbergen.

RYR1	LTEYIQGPCTGNQQSLAHSRLWDAVVG
InsP3-Typ1	LTEYCQGPCHENQNCIATH----ESNG
InsP3-Typ2	LTEYCQGPCHENQTCIATH----ESNG
InsP3-Typ3	LTEYCQGPCHENQTCIVTH----ESNG

Tab. 38 Vergleich der Region um Trp3985 mit der homologen Region der Inositol 1,4,5 Triphosphatrezeptoren (IP3R) Typ1, 2 und 3 mit den respektiven Zugriffsnummern NP_002213, NP_002214 und NP_002215 (einzusehen unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Dies könnte eine Erklärung für die Schlüsselposition dieser Region darstellen und Mutationen in dieser Region nur mit folgenschweren Veränderungen in der Stabilität und/oder Funktionalität des Ca²⁺ Kanals zulassen.

3.2.1.4 Genexpressionsstudie

In der ersten Phase dieses Pilotprojektes wurden die Parameter für die elektrische Stimulation der Muskelzellkulturen definiert. Die Festlegung der Stimulationsdauer, Spannung, Impulsdauer und Frequenz wurde mit MHN Zellkulturen durchgeführt. Im späteren Verlauf der Studie stellte sich heraus, dass unter diesen Bedingungen eine hohe Anzahl von MHS Zellen sich von dem Boden der Zellkulturschale löste und zugrunde ging. Es mußte daher die Stimulationsdauer für p.Trp3985Arg Zell von 72 auf 48 Stunden reduziert und die Impulsfrequenz von 0,5 auf 0,1 Hz herabgesetzt werden. Diese Diskrepanz in Bezug auf die Dauer der Stimulation erschwert die Interpretation der ermittelten Daten.

Obwohl mehrere DNase Behandlungen einer Verunreinigung mit genomische DNA vorbeugen sollten, zeigten drei von vier Proben eine Kontamination mit genomischer DNA (positive Negativkontrollen). Zusätzlich wurde für die Durchführung dieser Experimente ein qRT-PCR Leihgerät benutzt, welches lediglich das Exportieren der ermittelten Ct-Werte zuließ, nicht aber das Abspeichern der Rohdaten. Da die Sequenz der verwendeten Primer nicht bekannt waren, konnte nicht abgeschätzt werden, in wie weit eine Kontamination mit genomischer DNA die verschiedenen Messergebnisse beeinflusste. Lediglich über die Schmelzkurvenanalyse konnte eine Aussage über die Spezifität des PCR Produktes gemacht werden. Diese Analyse zeigte, dass alle PCR-Produkte spezifisch waren.

Die Resultate der Genexpressionsstudie haben aufgrund der zuvor beschriebenen Gründe nur bedingt eine wissenschaftliche Aussagekraft. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass bestimmte Gene, deren Expression nicht nachgewiesen werden konnte, in primären humanen Skelettmuskelzellkulturen unter diesen experimentellen Bedingungen nicht exprimiert werden.

Die Durchführung und die Resultate dieses Pilotprojektes zeigen die in der Praxis möglicherweise auftretenden methodischen und praktischen Schwierigkeiten eines solchen Projektes und könnten in zukünftigen Projekten gezielt gelöst bzw. vermieden werden.

3.2.2 Familie B: RYR1 Mutation p.Ala612Pro

Die Eigenschaften von Alanin und Prolin im Vergleich

Beiden Aminosäuren ist gemein, dass sie klein, neutral und unpolar sind. In Bezug auf die Hydrophobizität hingegen unterscheiden sie sich beachtlich. Während Alanin als Hydrophobizitätsindex 1,8 aufweist und somit als lipophil zu betrachten ist, ist Prolin mit -1,6 hydrophiler.

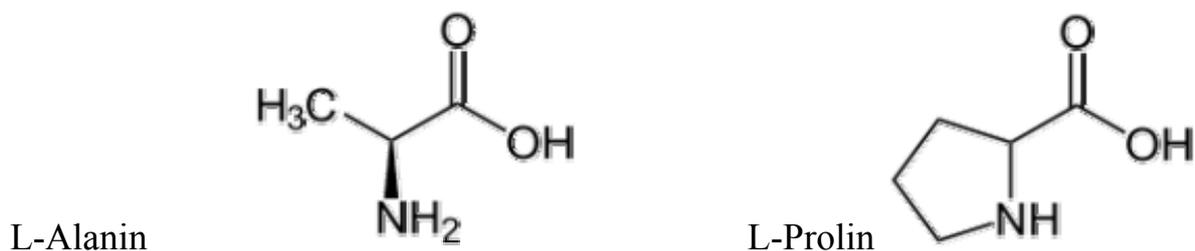


Abb. 45 Strukturformel von Alanin und Prolin.

Prolin kommt noch eine Sonderstellung zu, da es nicht in einer Helix vorkommen kann und als „Helixbrecher“ bekannt ist. Sekundärstrukturvorhersagen ergeben aber keine helikalen Strukturen in dieser Region.

3.2.2.1 Sequenzanalyse

Sequenzvergleich der Region um p.Ala612Pro des RYR1 mit seinen Isoformen 2 und 3

Ein Sequenzvergleich zwischen den verschiedenen Isoformen des RYR zeigt das die Domäne, in der die Mutation liegt sehr konserviert ist (Tab. 39). Besonders die Position 612 flankierenden Aminosäuren sind identisch bei RYR1, 2 und 3.

RYR1 p.Ala612Pro	KVLDVLC SLCVCNGV P VRSN Q DLITENLLPG
RYR1 wt	KVLDVLC SLCVCNGV A VRSN Q DLITENLLPG
RYR2 wt	KVLDVLC SLCVC H GV A VRSN Q H L I C DNLLPG
RYR3 wt	KVLD I L CSL C L C NGV A V R A N Q N L I C D NLL P R

Tab. 39 p.Ala612Pro mit flankierendem Bereich: Rot ist die Position 612, wobei A für Alanin und P für Prolin steht. Aminosäuren, welche von der RYR1 Sequenz abweichen, sind blau dargestellt, während Aminosäuren, welche bei allen Isoformen gleich sind, gelb hervorgehoben sind. Grün ist die Aminosäure 614, welche als erste MH Mutation beim Menschen (p.R614C) (Gillard et al. 1991) beschrieben wurde.

Sequenzvergleich der Region um p.Ala612Pro mit den homologen Regionen im RYR anderer Wirbeltiere

MHS p.Ala612Pro	KVLDVLC SLCVCNGV P VRSN Q DLITENLLPG
<i>Homo sapiens</i> Mensch	KVLDVLC SLCVCNGV A VRSN Q DLITENLLPG
<i>Sus scrofa</i> Wildschwein	KVLDVLC SLCVCNGV A VRSN Q DLITENLLPG
<i>Mus musculus</i> Hausmaus	KVLDVLC SLCVCNGV A VRSN Q DLITENLLPG
<i>Oryctolagus cuniculus</i> Wildkaninchen	KVLDVLC SLCVCNGV A VRSN Q DLITENLLPG
<i>Rattus norvegicus</i> Wanderratte	KVLDVLC SLCVCNGV A VRSN Q DLITENLLPG
<i>Rana catesbeiana</i> Ochsenfrosch	KVLDVLC SLCVCNGV A VRSN Q N LITENLL P R
<i>Danio rerio</i> Zebrabärbling	KVLDVLC SLCVCNGV A VRSN Q N LITENLLPG
<i>Makaira nigricans</i> Blauer Marlin	KVLDVLC SLCVCNGV A VRSN Q N LITENLLPG

Tab. 40 Vergleich der Region um Ala612 von *Homo sapiens* wird mit den entsprechenden Regionen des RYR1 bzw. dessen Homologa anderer Wirbeltiere. Rot ist die Position 612, wobei P für Prolin steht und somit die beschriebene Mutation darstellt, A ist Alanin und

repräsentiert den Wildtyp. Grün weist auf die Position 614 im RYR1 hin. Aminosäuren, welche von der *Homo sapiens* wtRYR1 Sequenz abweichen, sind blau dargestellt.

Sequenzvergleich der Region um p.Ala612Pro mit den entsprechenden homologen RYR Isoformen Wirbelloser

Ein Sequenzvergleich der Region um Position 612 des RYR1 bzw. den homologen Rezeptoren Wirbelloser (Tab. 41), zeigt eine sehr hohe Sequenzidentität. Auf der Ebene der niederen Tiere wird der konservative Charakter dieser Region deutlich sichtbar.

MHS p.Ala612Pro	KVLDVLCSLCV CNGV P V R SNQDLITEN LLPG
<i>Homo sapiens</i> Mensch	KVLDVLCSLCV CNGV A V R SNQDLITEN LLPG
<i>Anopheles gambiae</i> Stechmücke	KVLDVLCSLCV GNGV A V R SS Q NN I CD F LL P G
<i>Apis mellifera</i> Honigbiene	KVLDVLCSLCV GNGV A V R SS Q NN I CD F LL P G
<i>Drosophila melanogaster</i> Taufliege	KVLDVLCSLCV GNGV A V R SS Q NN I CD F LL P G
<i>C. elegans</i> Fadenwurm	KVLDVLCSLCV GNGV A V R SS Q NN I CD F LL P G

Tab. 41 p.Ala612Pro mit flankierendem AS Bereich: Rot ist die Position 612, wobei A für Alanin und P für Prolin steht. Die Aminosäuren, welche von der wt *Homo sapiens* RYR1 Sequenz abweichen, sind blau dargestellt. Grün dargestellt ist wiederum die Position 614.

3.2.2.2 Die Region um Ala612

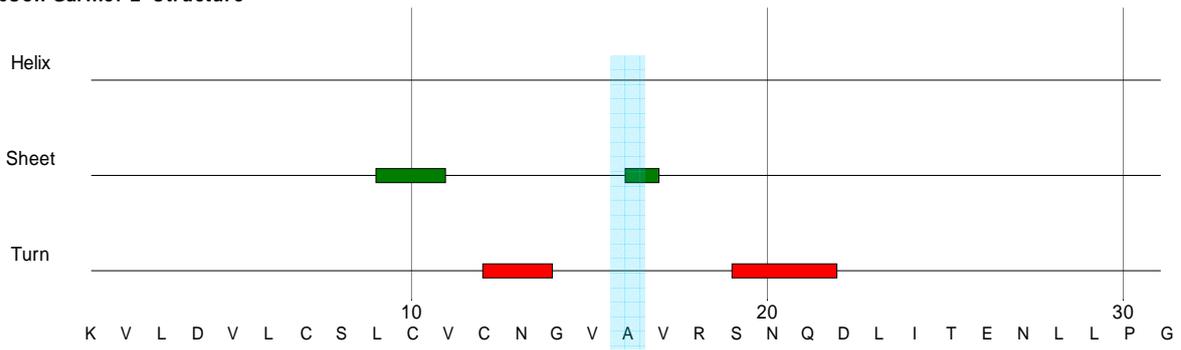
Wie der Aminosäuresequenzvergleich mit Säugetieren (Tab. 40) als auch mit Wirbellosen (Tab. 41) zeigt, ist diese Region sehr konserviert und in der Kernregion um die Position 612

sind keine Polymorphismen beschrieben. Die erste RYR1 Mutation, die entdeckt und beschrieben wurde, war p.Arg615Cys beim Hausschwein *Sus scrofa*. Sie wurde mit dem porcinen Stress Syndrom (PSS) in Verbindung gebracht (Otsu et al. 1991). Kurze Zeit später, wurde an der homologen Stelle des menschlichen RYR1 die erste MH Mutation entdeckt und beschrieben. Es waren Gillard und Kollegen, welche 1991 die Mutation p.Arg614Cys (Gillard et al. 1991) entdeckten und einen Zusammenhang mit der MH herstellten. Diese Mutation befindet sich zwei Aminosäuren nach der hier beschriebenen Mutation p.Ala612Pro und ist somit ebenfalls in der hier beschriebenen Region. Die Bedeutung und Funktion dieser Region wurde 2002 durch Paul-Pletzer und Kollegen neu beleuchtet. Sie konnten die Bindungsdomäne von Dantrolen auf dem RYR1 identifizieren (Paul-Pletzer et al. 2002). Es handelt sich um eine Region welche sich von AS 590 bis 609 erstreckt. Interessanterweise ist diese Region bei allen drei RYR Isoformen fast gänzlich identisch und dennoch interagiert Dantrolen nur mit RYR1 und RYR3, nicht aber mit RYR2. So konnten Fruen und Kollegen keine Dantrolen bedingte Inhibition der Ca^{2+} Freisetzung in CHO Zellen mit heterolog exprimierten RYR2 feststellen. Eine Hypothese um dieses Phänomen zu erklären, ist eine unterschiedliche tertiäre oder quartäre Struktur der Rezeptoren.

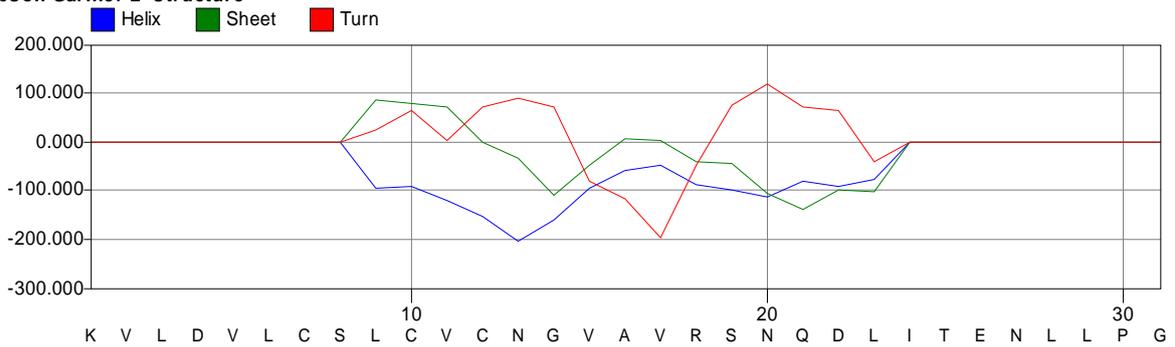
Yamamoto und Kollegen (Yamamoto and Ikemoto 2002) konnten 2002 mit Hilfe eines synthetischen Peptids, DP1, welches der Aminosäure-Region 590 bis 609 des RYR1 entspricht zeigen, dass diese Region essentiell für die intramolekulare Interaktion des Rezeptors ist und eine modulatorische Schlüsselrolle in der Ca^{2+} Regulation trägt. Sie interagiert mit einer zentralen Region des RYR1 (DP4-Region Leu2442 bis Pro2477) um diesen geschlossen zu halten. Dantrolen, welches bis heute das einzige zugelassene und wirksame Pharmazeutikum gegen eine unkontrollierte Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR ist, bindet wahrscheinlich genau an diese DP1 Region und stabilisiert den Rezeptor im geschlossenen Zustand. Diese Stabilisierung im geschlossenen Zustand, bewirkt eine drastische Reduktion seiner Öffnungsdauer sowie seiner Öffnungswahrscheinlichkeit (Kobayashi et al. 2005).

Die Sekundärstrukturvorhersage mittels der Methoden von Robson und Garnier (Abb. 46) (Robson and Garnier 1993) postuliert ein kurzes β -Faltblatt, welches beim Austausch des Alanins auf Position 612 gegen ein Prolin nicht mehr zustande kommt. Der Austausch dieser Aminosäure verändert somit die Sekundärstruktur dieses kurzen Abschnitts, welcher im Wildtypzustand reißverschlussartig mit der DP4-Region (Leu2442 bis Pro2477) interagiert.

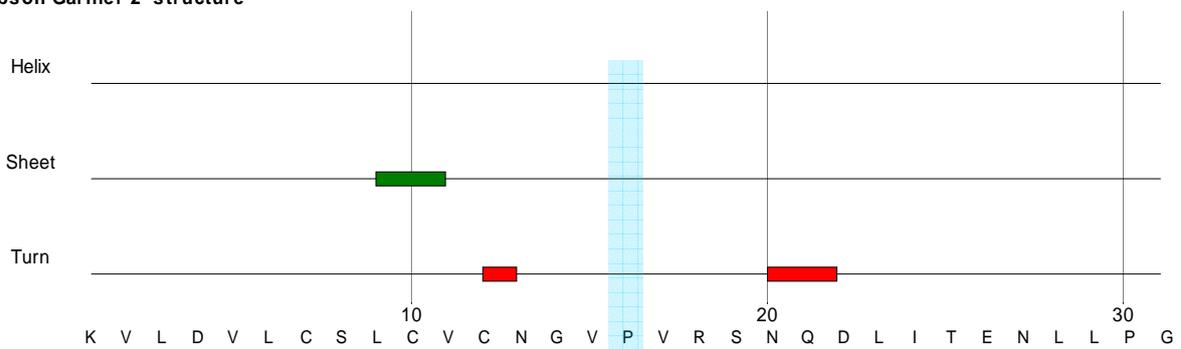
Robson Garnier 2° structure



Robson Garnier 2° structure



Robson Garnier 2° structure



Robson Garnier 2° structure

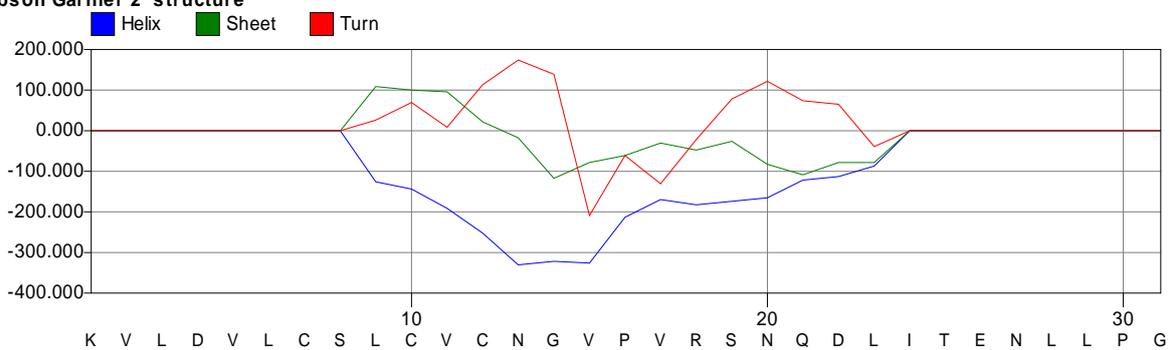


Abb. 46 Protein Sekundär Strukturvorhersagemodell von Robson und Garnier (Robson and Garnier 1993), (Garnier et al. 1978). Im oberen Teil der Abbildung wird die Sekundärstruktur

der Wildtypsequenz dargestellt, während im unteren Teil die Region mit der Mutation p.Ala612Pro dargestellt ist. Türkis hervorgehoben ist die Position 612.

Auch ein Vergleich dieser Region des RYR mit der zweiten großen Familie von Ca^{2+} Kanälen – den IP3 Rezeptoren - zeigt die modulatorische Schlüsselposition dieser Domäne. AS 440 bis 643 zeigt eine starke Homologie zu einer Region des InsP3 Rezeptors, welche deshalb auch als RIH - **R**yR und **I**P3R **H**omologie - Region eingestuft wird. Ein Sequenzvergleich der beiden Ca^{2+} Kanäle zeigt, dass die Aminosäure Alanin, welche sich in Position 612 des RYR1 befindet, auch in InsP3 Rezeptoren Typ2 und Typ3 zu finden ist und die Region um diese Position eine Sequenzidentität von ungefähr 45% aufweist. Im InsP3R spielt sie eine regulatorische Schlüsselrolle, da sie durch Bindung von IP3 die Öffnungswahrscheinlichkeit und Öffnungsdauer des Kanals beeinflusst. Auch im RYR1 scheint diese Region maßgeblich an der Regulation der Ca^{2+} Freisetzung beteiligt zu sein, wie die Auswirkungen der Bindung von Dantrolen an den Rezeptor zeigen.

Auffallend ist, dass p.Ala612Pro Muskelzellen ein signifikant höheres ($P \leq 0,001$) Ruhecalcium aufweisen (98 nM; $6,3 \pm \text{SEM}$; $n = 22$) als MHN Muskelzellen (64 nM; $3,6 \pm \text{SEM}$; $n = 44$) ebenso wie ein signifikant ($P = 0,03$) niedrigere maximale Ca^{2+} Freisetzung (140 nM (104; 185) $n = 22$) verglichen mit MHN Zellen (174 nM (129; 261) $n = 61$) Eine Erklärung für diese Phänomen könnte ein mutationsbedingter „undichter“ Ca^{2+} Kanal sein, wobei der Träger dieser Mutation aber keinen CCD Phänotyp aufweist.

3.2.3 Familie C: RYR1 Mutation p.Arg2458His, p.Arg3348Cys und p.Arg2458His.p.Arg3348Cys

3.2.3.1 Die Missense Mutation p.Arg2458His

Die Mutation p.Arg2458His ist eine von der EMHG anerkannte MH Mutation, welche bereits in mehreren europäischen Familien entdeckt und beschrieben wurde (Bernadette M. Manning et al. 1998). Ein Sequenzvergleich mit den Isoformen 2 und 3, sowie mit den homologen RYR von Wirbeltieren als auch Wirbellosen, zeigt eine Region unmittelbar um Position 2458 welche hoch konserviert ist. Es handelt sich hierbei um die Aminosäuresequenz **ILRSL** – Position 2458 ist rot dargestellt - welche von *Caenorhabditis elegans* über *Drosophila melanogaster* bis zum *Homo sapiens* konserviert ist. Die Besonderheit dieser zentralen Domäne des RYR1 um Position 2458 wird durch spektroskopische Untersuchungen von (Yamamoto and Ikemoto 2002), und durch Peptidbindungsuntersuchungen von Kobayashi (Kobayashi 2004) demonstriert. Sie zeigten, dass die Region Leu2442-Pro2477 reißverschlussartig mit einer N-terminalen Region des RYR1 interagiert und auf diese Weise einen intramolekularen Zusammenhalt des Rezeptors garantiert. Es wurden bereits drei MH und 1 CCD Mutation in dieser Region beschrieben, und bei *in vitro* Versuchen zeigte sich der sensitivierende und aktivierende Effekt dieser Mutationen auf den RYR1. Diese Resultate lassen vermuten, dass diese Domäne für die Stabilität des Rezeptors, sowie für dessen intramolekularen Zusammenhalt von großer Bedeutung ist. Auf der Position 2458 wurde bereits eine weitere Aminosäure beschrieben, welche mit einer MHS Diagnose im Stammbaum der betroffenen Familie segregiert: nämlich ein Cystein (Bernadette M. Manning et al. 1998).

3.2.3.2 Die Missense Mutation p.Arg3348Cys

Sequenzvergleich der Region um p.Arg3348Cys mit den RYR Isoformen 2 und 3

Ein Sequenzvergleich zwischen den verschiedenen Isoformen des RYR (Tab. 43) zeigt, dass die Domäne in der die Mutation liegt zwar eine gewisse Variabilität besitzt, dennoch die

verschiedenen Aminosäuren ähnliche Grundeigenschaften in Bezug auf Polarität, Hydrophobizität, Azidität und Van-der-Waals Volumen aufweisen. So gehören die die Position 3348 flankierenden Aminosäuren Serin (S) und Asparagin (N) zur Gruppe der neutralen, polaren Aminosäuren, und Alanin und Valin zur Gruppe der neutralen, unpolaren Aminosäuren. Besonders Arginin (R) und Lysin (K) - welche sich in Position 3348 von RYR1 bzw. RYR2 und RYR3 befinden – sind beides polare Aminosäuren, haben annähernd den gleichen Hydrophobizitätsindex -4,8 respektive -3,9, sind beide basisch und haben ein Van-der-Waals Volumen von 148 respektive 135.

RYR1 p.Arg3348Cys	GIDEASW M KRLAVFAQPIV S CARPELLQSHFIPT
RYR1 wt	GIDEASW M KRLAVFAQPIV S RARPELLQSHFIPT
RYR2 wt	GIDE G AW M KRLAVFSQPI I N K V K P Q LL K TH F L L P
RYR3 wt	GIDEASW M K R I A V Y AQPI I S K ARPDLL R SHFIPT

Tab. 43 Vergleich der Region um p.Arg3348Cys des RYR1 von *Homo sapiens* mit den entsprechenden Regionen der Isoformen 2 und 3. Rot ist die Position 3348, wobei C für Cystein steht, R für Arginin und K für Lysin. Aminosäuren, welche von der wtRYR1 Sequenz abweichen, sind blau dargestellt.

Cystein (Abb. 47) hingegen, gehört zwar auch zu den polaren Aminosäuren, hat aber einen Hydrophobizitätsindex von + 2,5, ist neutral und besitzt ein Van-der-Waals-Volumen von 86.

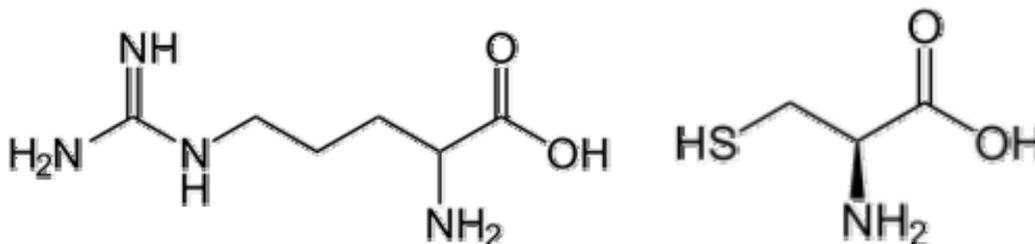


Abb. 47 Strukturformel von L-Arginin (links) und L-Cystein (rechts) im Vergleich

Sequenzvergleich der Region um p.Arg3348Cys mit den entsprechenden RYR1 bzw. deren homologen Regionen im RYR verschiedener Wirbeltiere

Ein Aminosäurenvergleich im Wirbeltierstamm der Region um die Position 3348 des RYR1 zeigt deutlich den konservativen Charakter dieser Region. Eine gewisse Variabilität bzw. Austauschbarkeit der basischen AS Lysin (K) und Arginin (R) ist ersichtlich, aber die große Mehrheit der Aminosäuren in dieser Region ist hoch konserviert. Die Region unmittelbar um die Position 3348, welche bei allen angeführten Arten identisch ist, ist unterstrichen dargestellt (Tab. 44)

MHS p.Arg3348Cys	GIDEASWMKRLAVFAQPIVSCARPELLQSHFIPT
<i>Homo sapiens</i> , Mensch	GIDEASWMKRLAVFAQPIVSRARPELLQSHFIPT
<i>Sus scrofa</i> , Wildschwein	GIDEASWMKRLAVFAQPIVSRARPELLHSHFIPT
<i>Mus Musculus</i> , Hausmaus	GIDEASWMKRLAVFAQPIVSRARPELLRSHFIPT
<i>Oryctolagus cuniculus</i> , Wildkaninchen	GIDEATWMKRLAVFAQPIVSRARPELLHSHFIPT
<i>Rattus norvegicus</i> , Wanderratte	GIDEASWMKRLAVFAQPIVSRARPELLRSHFIPT
<i>Rana catesbeiana</i> , Ochsenfrosch	GIDEASWMKRLAVFAQPIVSKAKPELLRTHFIPT
<i>Danio rerio</i> , Zebrabärbling	GIDEASWMKRLAVFSQPIVSRAKPEMLKSHFIPT
<i>Makaira nigricans</i> Blauer Marlin	GIDEASWMKRLAVFSQPIVSRAKPEMLKSHFIPT

Tab.44 Vergleich der Region um Arg3348 von *Homo sapiens* mit den entsprechenden Regionen des RYR1 bzw. deren Homologa anderer Wirbeltierarten. Rot ist Position 3348, wobei C für Cystein und somit für die beschriebene Mutation, R für Arginin und K für Lysin steht. Aminosäuren, welche von der *Homo sapiens* wtRYR1 Sequenz abweichen, sind blau dargestellt. Unterstrichen ist die Region unmittelbar um Position 3348

Sequenzvergleich der Region um p.Arg3348Cys mit den entsprechenden homologen RYR Isoformen Wirbelloser

Ein Sequenzvergleich dieser Region um Position 3348 des RYR1 bzw. deren Homologa bei wirbellosen Tieren (siehe Tab. 45), zeigt fast keine Sequenzidentität mehr. Auf der Ebene der niederen Tiere verliert sich somit der konservative Charakter dieser Region fast gänzlich. Während Arginin (R) zu den basischen Aminosäuren zählt, gehört Asparagin (N) zu den neutralen Aminosäuren.

<i>Homo sapiens</i> wtRYR1	DEASWMKRLAVFAQPIVSRARPELLQSHFIP
<i>Anopheles gambiae</i> Stechmücke	ENAPWMTRIAATYTQQIIINSSEELLKDVFLP
<i>Apis mellifera</i> Honigbiene	ENAPWMTRIAAYTQQIIINSSEELLKDPFLP
<i>Drosophila melanogaster</i> Taufliege	DNAPWMTRIAAYTQQIIINTSEELLKDPFLP
<i>Caenorhabditis elegans</i> Fadenwurm	ENAPWLCRVNFFAVQIIQNVTSDPVREFVLP

Tab. 45 Position 3348 mit flankierenden Aminosäuren Bereichen: Rot ist die Position 3348 dargestellt, wobei R für Arginin und N für Asparagin steht. Die Aminosäuren, die von der *Homo sapiens* RYR1 Sequenz abweichen, sind blau bzw. Asparagin (N) rot dargestellt.

3.2.3.3 Die Mutationen p.Arg3348Cys, p.Arg2458His und p.Arg3348Cys+p.Arg2458His

Die allererste MH-Mutation, welche von Gillard et al., 1991 (Gillard et al. 1991) beschrieben wurde, war ebenfalls der Austausch eines Arginins gegen ein Cystein, wobei Position 614 des RYR1 betroffen war. Bis heute wurden 14 Arginin→Cystein Austausche beschrieben, wovon 5 von der EMHG anerkannte MH Mutationen sind (Robinson R. and D.Carpenter 2006). Der Stammbaum der Familie C umfasst zu wenige Familienmitglieder um eine zuverlässige Aussage über die Korrelation zwischen IVCT Diagnose und Segregation der Mutationen zuzulassen. Obwohl die in dieser Arbeit untersuchte Mutation p.Arg3348Cys eine Erstbeschreibung ist, wurde in dieser Position bereits eine andere Missense Mutation beschrieben. Sambuughin und Kollegen konnten in einer nordamerikanischen Familie einen

Austausch des Arginins in Position 3348 gegen ein Histidin nachweisen (Sambuughin and Nyamkhisig 2005). Diese p.Arg3348His Mutation segregierte mit der CHCT (Coffeine-Halothane contracture testing - die nordamerikanische Version des IVCT-) Diagnose MHS in der betroffenen Familie. An dieser Stelle muss daran erinnert werden, dass der CHCT nicht zwischen MHS und MHE (MHEH oder MHEC) differenziert: in beiden Fällen wird die Diagnose MHS gestellt.

In dem hier beschriebenen Fall der Familie C wurde p.Arg3348Cys bei einem Individuum mit der Diagnose MHEH gefunden. Obwohl der IVCT mit der Testsubstanz Koffein negativ ausfiel (Abb. 34), zeigten Einzelzellversuche eine erhöhte Sensitivität dieser Zellen gegenüber der Testsubstanz Koffein ($EC_{50} = 1,1 \text{ mM}$ (1; 1,3) $n = 18$), welche sich signifikant ($P \leq 0,001$) von der MHN Gruppe ($EC_{50} = 5,7 \text{ mM}$ (4,8; 6,8) $n = 18$) unterschied. Auch gegenüber Halothan ($EC_{50} = 0,35 \text{ mM}$ (0,2; 0,4) $n = 13$) zeigen diese Muskelzellen einen deutlichen MHS Phänotyp ($P \leq 0,001$) auf (p.Arg3348Cys : $EC_{50} = 0,35 \text{ mM}$ (0,2; 0,4) $n = 13$; MHN: ($EC_{50} = 1,1 \text{ mM}$ (0,89; 2) $n = 14$) (Tab. 32). Auf zellulärer Ebene verursacht die Mutation p.Arg3348Cys somit einen Phänotyp der vergleichbar mit einem MHS Phänotyp ist. Auffällig ist jedoch, dass in Bezug auf Chlorkresol p.Arg3348Cys einen signifikant ($P = 0,038$) höheren EC_{50} Medianwert ($179 \mu\text{M}$ (129; 261) $n = 12$) aufweist, als die MHN Kontrollgruppe ($116 \mu\text{M}$ (88; 169) $n = 29$). Dies könnte auf eine Desensibilisierung des RYR1 gegenüber der Testsubstanz Chlorkresol durch die Mutation p.Arg3348Cys zurückzuführen sein, ähnlich wie Du et al., 2001 dies für p.Gly2370Ala, p.Gly2373Ala und p.Gly2375Ala beschrieben haben (Du et al. 2001). Untersuchungen von Gilly und Kollegen zeigten, dass im Rahmen des IVCT Chlorkresol – welches als zusätzliche Testsubstanz benutzt wird - oft keinen signifikanten Unterschied im Kontrakturverhalten von MHN und MHEH Muskeln aufzeigt (Gilly et al. 1997).

Gegenüber Halothan und Koffein zeigen alle Mutationen bzw. Mutationskombinationen der Familie C einen signifikant ($P \leq 0,001$) niedrigeren EC_{50} Wert als die MHN Kontrollgruppe (siehe Tab. 32).

Die maximale Ca^{2+} Freisetzung in Bezug auf die einzelnen Testsubstanzen ist signifikant geringer für die Doppelmutation als auch für p.Arg3348Cys (außer für Koffein bei der MHEH Mutation p.Arg3348Cys). Für p.Arg2458His jedoch, konnte keine der verwendeten Testsubstanzen einen signifikanten Unterschied in der maximalen Ca^{2+} Freisetzung verursachen (siehe Tab. 33).

Kausale MH Doppelmutationen kommen relativ selten vor, scheinen aber – wie im Falle der hier untersuchten Doppelmutation - den MH Phänotyp deutlich zu verstärken. Guis und

Mitarbeiter berichteten 2004 von einer großen MH-Familie in Frankreich mit 17 MHS Mitgliedern, in der zwei Mutationen im RYR1 gefunden wurden. Beide Mutationen segregierten mit der Diagnose MHS, sowie mit dem Krankheitsbild der Multiminicore Disease in der betroffenen Familie. Ein weiterer Fall wurde 2007 von Adam und Kollegen beschrieben. Ein Patient, der im Vorfeld bereits acht Allgemeinanästhesien ohne offensichtliche Komplikationen überstanden hatte, entwickelte eine fulminante MH-Krise. Eine genetische Analyse zeigte, dass der Patient zwei Mutationen im RYR1 trägt (Adam et al. 2007). Zhou et al, konnte 2006 zeigen, dass epigenetisches "allel silencing" eine Erklärung für das plötzliche Auftreten von MH Krisen bei Patienten, welche bereits mehrere Anästhesien problemlos überstanden haben, sein kann (Zhou et al. 2006). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass p.Trp3985Arg, p.Ala612Pro und p.Arg3348Cys mit hoher Wahrscheinlichkeit kausale MH Mutationen sind.

4 Literaturliste

- Adam, H., U. Gottschaldt, et al. (2007). "Kasuistik: Fulminante Maligne Hyperthermie - Untypischer Verlauf während der 9. Allgemeinanästhesie." Fulminant MH crisis during the ninth general anaesthesia
Anästhesiologisches Intensivmedizinisches Notfallmedizinisches Schmerztherapeutisches **42**(10): 692-699.
- Ahern, G. P., P. R. Junankar, et al. (1994). "Single channel activity of the ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506." FEBS Letters **352**(3): 369-374.
- Allen, G. C., M. G. Larach, et al. (1998). "The sensitivity and specificity of the caffeine-halothane contracture test - A report from the North American Malignant Hyperthermia Registry." Anesthesiology **88**(3): 579-588.
- Angela F Dulhunty, P. P. (2003). "What we don't know about the structure of ryanodine receptor calcium release channels." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **30**(10): 713-723.
- Anne Baroffio, J.-P. A., Andre Kaelin, Ryoko M. Krause, Martine Hamann, Charles R. Bader, (1993). "Purification of human muscle satellite cells by flow cytometry." Muscle & Nerve **16**(5): 498-505.
- Barone, V., O. Massa, et al. (1999). "Mutation screening of the RYR1 gene and identification of two novel mutations in Italian malignant hyperthermia families." J Med Genet **36**(2): 115-8.
- Beard, N. A., M. G. Casarotto, et al. (2005). "Regulation of Ryanodine Receptors by Calsequestrin: Effect of High Luminal Ca²⁺ and Phosphorylation." Biophysical Journal **88**(5): 3444-3454.
- Bernadette M. Manning, Kathleen A. Quane, et al. (1998). "Novel mutations at a CpG dinucleotide in the ryanodine receptor in malignant hyperthermia." Human Mutation **11**(1): 45-50.
- Berridge, M. (1997). "Elementary and global aspects of calcium signalling." J Exp Biol **200**(2): 315-319.
- Bhat, M. B., J. Zhao, et al. (1997). "Functional calcium release channel formed by the carboxyl-terminal portion of ryanodine receptor." Biophysical Journal **73**(3): 1329-1336.
- Block, B., T. Imagawa, et al. (1988). "Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle
10.1083/jcb.107.6.2587." J. Cell Biol. **107**(6): 2587-2600.
- Bootman, M. D., P. Lipp, et al. (2001). "The organisation and functions of local Ca²⁺ signals." J Cell Sci **114**(12): 2213-2222.
- Brandl, C., S. deLeon, et al. (1987). "Adult forms of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle." J. Biol. Chem. **262**(8): 3768-3774.
- Brandt, A., L. Schleithoff, et al. (1999). "Screening of the ryanodine receptor gene in 105 malignant hyperthermia families: novel mutations and concordance with the in vitro contracture test
10.1093/hmg/8.11.2055." Hum. Mol. Genet. **8**(11): 2055-2062.
- Brandt, N. R., A. H. Caswell, et al. (1992). "Mapping of the calpain proteolysis products of the junctional foot protein of the skeletal muscle triad junction." J Membr Biol **127**(1): 35-47.

- Brinkmeier, H., J. V. Mutz, et al. (1993). "Specific modifications of the membrane fatty acid composition of human myotubes and their effects on the muscular sodium channels." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1145**(1): 8-14.
- Brown, R. L., A. N. Pollock, et al. (2000). "A novel ryanodine receptor mutation and genotype-phenotype correlation in a large malignant hyperthermia New Zealand Maori pedigree 10.1093/hmg/9.10.1515." Hum. Mol. Genet. **9**(10): 1515-1524.
- Censier, K., A. Urwyler, et al. (1998). "Intracellular calcium homeostasis in human primary muscle cells from malignant hyperthermia-susceptible and normal individuals. Effect Of overexpression of recombinant wild-type and Arg163Cys mutated ryanodine receptors." J Clin Invest **101**(6): 1233-42.
- Diaz-Sylvester, P. L., M. Porta, et al. (2008). "Halothane modulation of skeletal muscle ryanodine receptors: dependence on Ca²⁺, Mg²⁺, and ATP 10.1152/ajpcell.90642.2007." Am J Physiol Cell Physiol **294**(4): C1103-1112.
- Du, G. G., H. Oyamada, et al. (2001). "Mutations to Gly2370, Gly2373 or Gly2375 in malignant hyperthermia domain 2 decrease caffeine and cresol sensitivity of the rabbit skeletal-muscle Ca²⁺-release channel (ryanodine receptor isoform 1). ." Biochem. J. **360**(1): 97-105.
- Du, G. G., B. Sandhu, et al. (2002). "Topology of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1)." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16725-30.
- Ellis, F. R. (1971). "Halothane induced muscle contrecture as a cause of hyperprexia." Br. J. Anaesth. **43**: 721-722.
- Fessenden, J. D., W. Feng, et al. (2006). "Amino acid residues Gln4020 and Lys4021 of the ryanodine receptor type 1 are required for activation by 4-chloro-m-cresol 10.1074/jbc.M600670200." J. Biol. Chem.: M600670200.
- Fessenden, J. D., C. F. Perez, et al. (2003). "Identification of a Key Determinant of Ryanodine Receptor Type 1 Required for Activation by 4-Chloro-m-cresol 10.1074/jbc.M303821200." J. Biol. Chem. **278**(31): 28727-28735.
- Fessenden, J. D., C. F. Perez, et al. (2003). "Identification of a key determinant of ryanodine receptor type 1 required for activation by 4-chloro-m-cresol 10.1074/jbc.M303821200." J. Biol. Chem.: M303821200.
- Franzini-Amstrong, C. (2004). "Functional implications of RyR-DHPR relationships in skeletal and cardiac muscles." Biological Research **37**: 507-512.
- Franzini-Armstrong, C., L. J. Kenney, et al. (1987). "The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study." J Cell Biol **105**(1): 49-56.
- Franzini-Armstrong, C. and F. Protasi (1997). "Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions." Physiol. Rev. **77**(3): 699-729.
- Fruen, B. R., J. M. Bardy, et al. (2000). "Differential Ca²⁺ sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin." Am J Physiol Cell Physiol **279**(3): C724-733.
- Futatsugi, A., G. Kuwajima, et al. (1995). "Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing in mouse skeletal muscle ryanodine receptor mRNA." Biochem J **305 (Pt 2)**: 373-8.
- Garnier, J., J.-F. Gibrat, et al. (1996). "GOR secondary structure prediction method version IV." Methods in Enzymology **266**: 540-553.
- Garnier, J., D. J. Osguthorpe, et al. (1978). "Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins." J Mol Biol **120**(1): 97-120.
- Gerbershagen, M. (2007). Safety Aspects of Ryanodex and Comparison of Therapeutic Effectiveness of Ryanodex and Dantrolene in Porcine Malignant Hyperthermia Normal and Susceptible Swine. XXVI EMHG Meeting, May 2007, Siena, Italien.

- Gillard, E. F., K. Otsu, et al. (1992). "Polymorphisms and deduced amino acid substitutions in the coding sequence of the ryanodine receptor (RYR1) gene in individuals with malignant hyperthermia." *Genomics* **13**(4): 1247-54.
- Gillard, E. F., K. Otsu, et al. (1991). "A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia." *Genomics* **11**(3): 751-755.
- Gilly, H., I. Musat, et al. (1997). "Classification of malignant hyperthermia-equivocal patients by 4-chloro-M-cresol." *Anesth Analg* **85**(1): 149-154.
- Girard, T., M. Suhner, et al. (2008). "A Fulminant Malignant Hyperthermia Episode in a Patient with Ryanodine Receptor Gene Mutation p.Tyr522Ser 10.1213/ane.0b013e3181857903." *Anesth Analg* **107**(6): 1953-1955.
- Goonasekera, S. A., N. A. Beard, et al. (2007). "Triadin Binding to the C-Terminal Luminal Loop of the Ryanodine Receptor is Important for Skeletal Muscle Excitation Contraction Coupling 10.1085/jgp.200709790." *J. Gen. Physiol.*: jgp.200709790.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J. Biol. Chem.* **260**(6): 3440-3450.
- Guerini, D., E. Garcia-Martin, et al. (1998). "The calcium pump of the plasma membrane: membrane targeting, calcium binding sites, tissue-specific isoform expression." *Acta Physiol Scand Suppl* **643**: 265-73.
- H. Rueffert, D. O., C. Deutrich, C. D. Meinecke, U. G. Froster, (2002). "Mutation screening in the ryanodine receptor 1 gene (RYR1) in patients susceptible to malignant hyperthermia who show definite IVCT results: identification of three novel mutations." *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **46**(6): 692-698.
- Harrison (1975). "Control of malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium." *Br. J. Anaesth.* **47**(1): 62-65.
- Herrmann-Frank, A., H.-C. LÄ¼ttgau, et al. (1999). "Caffeine and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: a stimulating story." *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **20**(2): 223-236.
- Jacobson, A. R., S. T. Moe, et al. (2006). "Structural Determinants of 4-Chloro-m-cresol Required for Activation of Ryanodine Receptor Type 1 10.1124/mol.106.022491." *Mol Pharmacol* **70**(1): 259-266.
- Jenden, D. J. and A. S. Fairhurst (1969). "The pharmacology of Ryanodine." *Pharmacol Rev* **21**(1): 1-25.
- José R. López, L. A., Carlo Caputo, Jaime Wikinski, David Ledezma, (1985). "Intracellular ionized calcium concentration in muscles from humans with malignant hyperthermia." *Muscle & Nerve* **8**(5): 355-358.
- Kalow W, B. B. (1970). "Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia." *Lancet*: 895-898.
- Kaufmann, A., B. Kraft, et al. (2008). "Novel ryanodine receptor mutation that may cause malignant hyperthermia." *Anesthesiology* **109**(3): 457-64.
- Keating, K. E., L. Giblin, et al. (1997). "Detection of a novel mutation in the ryanodine receptor gene in an Irish malignant hyperthermia pedigree: correlation of the IVCT response with the affected and unaffected haplotypes." *J Med Genet* **34**(4): 291-6.
- Keating, K. E., L. Giblin, et al. (1997). "Detection of a novel mutation in the ryanodine receptor gene in an Irish malignant hyperthermia pedigree: correlation of the IVCT response with the affected and unaffected haplotypes. 10.1136/jmg.34.4.291." *J Med Genet* **34**(4): 291-296.
- Keating, K. E., K. A. Quane, et al. (1994). "Detection of a novel RYR1 mutation in four malignant hyperthermia pedigrees 10.1093/hmg/3.10.1855." *Hum. Mol. Genet.* **3**(10): 1855-1858.

- Kirino, Y., M. Osakabe, et al. (1983). "Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from fragmented sarcoplasmic reticulum: Ca²⁺-dependent passive Ca²⁺ efflux." J Biochem **94**(4): 1111-8.
- Kirino, Y. and H. Shimizu (1982). "Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from fragmented sarcoplasmic reticulum: a comparison with skinned muscle fiber studies." J Biochem **92**(4): 1287-96.
- Kobayashi, S. (2004). "Antibody probe study of Ca²⁺ channel regulation by interdomain interaction within the ryanodine receptor." Biochem J. **380**(Pt 2): 561-569.
- Kobayashi, S., M. L. Bannister, et al. (2005). "Dantrolene Stabilizes Domain Interactions within the Ryanodine Receptor." J. Biol. Chem. **280**(8): 6580-6587.
- Kolb, M. E., M. L. Horne, et al. (1982). "Dantrolene in Human-Malignant Hyperthermia - a Multi-Center Study." Anesthesiology **56**(4): 254-262.
- Lamb, G. D. and D. G. Stephenson (1994). "Effects of intracellular pH and [Mg²⁺] on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the rat." J Physiol **478**(Pt 2): 331-339.
- Larach, M. G. and for the North American Malignant Hyperthermia Group (1989). "Standardization of the Caffeine Halothane Muscle Contracture Test." Anesth Analg **69**(4): 511-515.
- Lee, J. M., S.-H. Rho, et al. (2004). "Negatively Charged Amino Acids within the Intraluminal Loop of Ryanodine Receptor Are Involved in the Interaction with Triadin 10.1074/jbc.M312446200." J. Biol. Chem. **279**(8): 6994-7000.
- Levin, J. (1997). "Exploring the limits of nearest neighbour secondary structure prediction." Protein Eng. **7**: 771-776.
- Levitt, R. C., N. Nouri, et al. (1991). "Evidence for genetic heterogeneity in malignant hyperthermia susceptibility." Genomics **11**(3): 543-547.
- Lüttgau HC, O. H. (1968). "The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres." J Physiol **194**: 51-74.
- Lynch, P. J., R. Krivosic-Horber, et al. (1997). Anesthesiology.
- Lynch, P. J., J. Tong, et al. (1999). "A mutation in the transmembrane/luminal domain of the ryanodine receptor is associated with abnormal Ca²⁺ release channel function and severe central core disease
" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(7): 4164-4169.
- MacLennan, D. and M. Phillips (1992). "Malignant hyperthermia." Science **256**(5058): 789-794.
- MacLennan, D. H., C. Duff, et al. (1990). "Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia." Nature **343**(6258): 559-61.
- Manning, B. M., K. A. Quane, et al. (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.
- Marty, I., M. Robert, et al. (1994). "Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2270-4.
- Marx, S. O., K. Ondrias, et al. (1998). "Coupled Gating Between Individual Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channels (Ryanodine Receptors) 10.1126/science.281.5378.818." Science **281**(5378): 818-821.
- McCarthy, T. V. (2000). Genetics of Malignant Hyperthermia. Malignant Hyperthermia. P. S. Publishers.
- Meissner, G. (1994). "Ryanodine Receptor/Ca²⁺ Release Channels and Their Regulation by Endogenous Effectors

- doi:10.1146/annurev.ph.56.030194.002413." Annual Review of Physiology **56**(1): 485-508.
- Meissner, G., E. Darling, et al. (1986). "Kinetics of rapid Ca²⁺ release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides." Biochemistry **25**(1): 236-44.
- Michalak, M., P. Dupraz, et al. (1988). "Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum membrane; comparison between cardiac and skeletal muscle." Biochim Biophys Acta **939**(3): 587-94.
- Monnier, N., R. e. Krivosic-Horber, et al. (2002). Presence of Two Different Genetic Traits in Malignant Hyperthermia Families: Implication for Genetic Analysis, Diagnosis, and Incidence of Malignant Hyperthermia Susceptibility. Anesthesiology.
- Monnier, N., V. Procaccio, et al. (1997). "Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle." Am J Hum Genet **60**(6): 1316-25.
- Monnier, N., N. B. Romero, et al. (2001). "Familial and sporadic forms of central core disease are associated with mutations in the C-terminal domain of the skeletal muscle ryanodine receptor
10.1093/hmg/10.22.2581." Hum. Mol. Genet. **10**(22): 2581-2592.
- Monnier, N., N. B. Romero, et al. (2000). "An autosomal dominant congenital myopathy with cores and rods is associated with a neomutation in the RYR1 gene encoding the skeletal muscle ryanodine receptor
10.1093/hmg/9.18.2599." Hum. Mol. Genet. **9**(18): 2599-2608.
- Nakai, J., N. Sekiguchi, et al. (1998). "Two Regions of the Ryanodine Receptor Involved in Coupling with L-Type Ca²⁺ Channels
10.1074/jbc.273.22.13403." J. Biol. Chem. **273**(22): 13403-13406.
- Nelson, T. E. and E. H. Flewelling (1983). "Current concepts. The malignant hyperthermia syndrome." N Engl J Med **309**(7): 416-8.
- Nicole Monnier, G. K.-R., Renée Krivosic-Horber, Yves Nivoche, Dong Qi, Natasha Kraev, Julian Loke, Parveen Sharma, Vincenzo Tegazzin, Dominique Figarella-Branger, Norma Roméro, Paulette Mezin, David Bendahan, Jean-François Payen, Thierry Depret, David H. Maclennan, Joël Lunardi, (2005). "Correlations between genotype and pharmacological, histological, functional, and clinical phenotypes in malignant hyperthermia susceptibility." Human Mutation **26**(5): 413-425.
- Ording, H., V. Brancadoro, et al. (1997). "In vitro contracture test for diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. The European Malignant Hyperthermia Group." Acta Anaesthesiol Scand **41**(8): 955-66.
- Otsu, K., V. K. Khanna, et al. (1991). "Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and a probable causal mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families." Genomics **11**(3): 744-50.
- Owen, V. J., N. L. Taske, et al. (1997). "Reduced Mg²⁺ inhibition of Ca²⁺ release in muscle fibers of pigs susceptible to malignant hyperthermia." Am J Physiol Cell Physiol **272**(1): C203-211.
- Oyamada, H., K. Oguchi, et al. (2002). "Novel mutations in C-terminal channel region of the ryanodine receptor in malignant hyperthermia patients." Jpn J Pharmacol **88**(2): 159-66.
- Paul-Pletzer, K., T. Yamamoto, et al. (2002). "Identification of the dantrolene binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor
10.1074/jbc.M205487200." J. Biol. Chem.: M205487200.

- Protasi, F., C. Paolini, et al. (2002). "Multiple regions of RyR1 mediate functional and structural interactions with alpha(1S)-dihydropyridine receptors in skeletal muscle." Biophys J **83**(6): 3230-44.
- Quane, K. A., J. M. S. Healy, et al. (1993). "Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia." **5**(1): 51-55.
- Quane, K. A., K. E. Keating, et al. (1994). "Mutation Screening of the RYR1 Gene in Malignant Hyperthermia: Detection of a Novel Tyr to Ser Mutation in a Pedigree with Associated Central Cores." Genomics **23**(1): 236-239.
- Quane, K. A., K. E. Keating, et al. (1994). "Detection of a novel common mutation in the ryanodine receptor gene in malignant hyperthermia: implications for diagnosis and heterogeneity studies
10.1093/hmg/3.3.471." Hum. Mol. Genet. **3**(3): 471-476.
- Quane, K. A., H. Ording, et al. (1997). "Detection of a novel mutation at amino acid position 614 in the ryanodine receptor in malignant hyperthermia
10.1093/bja/79.3.332." Br. J. Anaesth. **79**(3): 332-337.
- Reiken, S., A. Lacampagne, et al. (2003). "PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure." J Cell Biol **160**(6): 919-28.
- Robinson R. and M.-A. S. D.Carpenter, Jane Halsall, Philip Hopkins, (2006). "Mutations in *RYR1* in malignant hyperthermia and central core disease." Human Mutation **27**(10): 977-989.
- Robson, B. and J. Garnier (1993). "Protein structure prediction." Nature **361**(6412): 506.
- Rousseau, E., J. Ladine, et al. (1988). "Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds." Archives of Biochemistry and Biophysics **267**(1): 75-86.
- Rousseau, E., J. S. Smith, et al. (1986). "Single channel and 45Ca²⁺ flux measurements of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium channel." Biophys J **50**(5): 1009-14.
- Sambuughin and Nyamkhisig (2005). "Screening of the Entire Ryanodine Receptor Type 1 Coding Region for Sequence Variants Associated with Malignant Hyperthermia Susceptibility in the North American Population." Anesthesiology **102**.
- Sambuughin, N., T. E. Nelson, et al. (2001). "Identification and functional characterization of a novel ryanodine receptor mutation causing malignant hyperthermia in North American and South American families." Neuromuscular Disorders **11**(6-7): 530-537.
- Samsó, M., T. Wagenknecht, et al. (2005). "Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM." **12**(6): 539-544.
- Samsó, M., T. Wagenknecht, et al. (2005). "Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM." Nat Struct Mol Biol **12**(6): 539-44.
- Sencer, S., R. V. Papineni, et al. (2001). "Coupling of RYR1 and L-type calcium channels via calmodulin binding domains." J Biol Chem **276**(41): 38237-41.
- Sencer, S., R. V. L. Papineni, et al. (2001). "Coupling of RYR1 and L-type Calcium Channels via Calmodulin Binding Domains
10.1074/jbc.C100416200." J. Biol. Chem. **276**(41): 38237-38241.
- Shou, W., B. Aghdasi, et al. (1998). "Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12." **391**(6666): 489-492.
- Sitsapesan, R. and A. J. Williams (1995). "The gating of the sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel is regulated by luminal Ca²⁺." J Membr Biol **146**(2): 133-44.

- Smith, J. S., E. Rousseau, et al. (1989). "Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channels from cardiac and skeletal muscle." *Circ Res* **64**(2): 352-9.
- Snyder, H. R., Jr., C. S. Davis, et al. (1967). "1-[(5-arylfurfurylidene)amino]hydantoin. A new class of muscle relaxants." *J Med Chem* **10**(5): 807-10.
- Stiber, J., A. Hawkins, et al. (2008). "STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle." **10**(6): 688-697.
- Strehler, E. E. and D. A. Zacharias (2001). "Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps." *Physiol Rev* **81**(1): 21-50.
- Sudo, R. T., P. L. do Carmo, et al. (2008). "Effects of azumolene on normal and malignant hyperthermia-susceptible skeletal muscle." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **102**(3): 308-316.
- Takeshima, H., T. Ikemoto, et al. (1996). "Generation and Characterization of Mutant Mice Lacking Ryanodine Receptor Type 3
10.1074/jbc.271.33.19649." *J. Biol. Chem.* **271**(33): 19649-19652.
- Takeshima, H., S. Komazaki, et al. (1998). "Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2." *Embo J* **17**(12): 3309-16.
- Takeshima, H., S. Nishimura, et al. (1989). "Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor." **339**(6224): 439-445.
- Takeshima, H., T. Yamazawa, et al. (1995). "Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor." *Embo J* **14**(13): 2999-3006.
- Tarroni, P., D. Rossi, et al. (1997). "Expression of the Ryanodine Receptor Type 3 Calcium Release Channel during Development and Differentiation of Mammalian Skeletal Muscle Cells
10.1074/jbc.272.32.19808." *J. Biol. Chem.* **272**(32): 19808-19813.
- Tong, J., H. Oyamada, et al. (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
10.1074/jbc.272.42.26332." *J. Biol. Chem.* **272**(42): 26332-26339.
- Tripathy, A. and G. Meissner (1996). "Sarcoplasmic reticulum lumenal Ca²⁺ has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca²⁺ release channel." *Biophysical Journal* **70**(6): 2600-2615.
- Wagenknecht, T., J. Berkowitz, et al. (1994). "Localization of calmodulin binding sites on the ryanodine receptor from skeletal muscle by electron microscopy." *Biophys J* **67**(6): 2286-95.
- Wehner, M., H. Rueffert, et al. (2003). "Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum Is Facilitated in Human Myotubes Derived from Carriers of the Ryanodine Receptor Type 1 Mutations Ile2182Phe and Gly2375Ala
doi:10.1089/109065703322537214." *Genetic Testing* **7**(3): 203-211.
- Yamamoto, T. and N. Ikemoto (2002). "Spectroscopic Monitoring of Local Conformational Changes during the Intramolecular Domain-Domain Interaction of the Ryanodine Receptor
doi:10.1021/bi015581z." *Biochemistry* **41**(5): 1492-1501.
- Yamamoto, T. and N. Ikemoto (2002). "Spectroscopic monitoring of local conformational changes during the intramolecular domain-domain interaction of the ryanodine receptor." *Biochemistry* **41**(5): 1492-501.
- Yang, T., T. A. Ta, et al. (2003). "Functional Defects in Six Ryanodine Receptor Isoform-1 (RyR1) Mutations Associated with Malignant Hyperthermia and Their Impact on Skeletal Excitation-Contraction Coupling
10.1074/jbc.M302165200." *J. Biol. Chem.* **278**(28): 25722-25730.

- Zhang, Y., H. S. Chen, et al. (1993). "A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central core disease." *5*(1): 46-50.
- Zhou, H., M. Brockington, et al. (2006). "Epigenetic allele silencing unveils recessive RYR1 mutations in core myopathies." *Am J Hum Genet* **79**(5): 859-68.
- Zimanyi, I. and I. N. Pessah (1991). "Comparison of [³H]ryanodine receptors and Ca⁺⁺ release from rat cardiac and rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum." *J Pharmacol Exp Ther* **256**(3): 938-46.
- Zorzato, F., J. Fujii, et al. (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.
- Zucchi, R. and S. Ronca-Testoni (1997). "The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states." *Pharmacol Rev* **49**(1): 1-51.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

5 Anhang mit Publikation

Danksagung

Diese Dissertation wurde an der Universitätsklinik für Spezielle Anästhesie und Schmerztherapie – Leiter O.Univ.-Prof.Dr. H.G. Kress – im Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen die mich in meiner Arbeit unterstützt haben bedanken. Im Besonderen bei:

- Ass. Prof. Lukas Weigl, der mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem Projekt zu arbeiten und zudem meine Doktorarbeit betreut hat
- Univ.-Prof. Hermann Gilly für das Aufzeigen von Möglichkeiten und Perspektiven
- Univ.-Prof. Jörg Slany für die Unterstützung in medizinischen Fachfragen
- Ass. Prof. Dr. Martha Weindlmayr-Goettel für ihre Hilfe im Fachbereich Chemie
- Melanie Cezanne, Manuela Graf, Carmen Höller, Michael Röhrich, Amtsrätin

Elisabeth Sipos, Andreas Wagner und Gertrude Weberhofer für die kollegiale Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Mag. rer. nat. Alexius Kaufmann

Email: alexius@walzer.net

Akademischer Werdegang

Juni 2009: Arbeit an der Dissertation

Oktober 2005 bis Juli 2008: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitätsklinik für Spezielle Anästhesie und Schmerztherapie im Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien.

SS/WS 2007: Lehrtätigkeit im Rahmen des Wahlfaches „wissenschaftliche Arbeitsmethoden in der Anästhesie“

Mai 2007: Teilnahme am “XXVI Annual Meeting European Malignant Hyperthermia Group” in Siena, Italien. Präsentation von “A novel ryanodine receptor gene mutation possibly causative for MH in an Austrian family”.

Oktober 2005: Beginn der Dissertation im Fachgebiet der Mikrobiologie und Genetik “Systematische Mutationsanalyse des Ryanodinrezeptors 1 bei österreichischen Familien mit nachgewiesener maligner Hyperthermie Disposition” gefördert vom Jubiläumsfonds der österreichischen Nationalbank.

November 2004: Diplomprüfung zu Erlangung des akademischen Grades „Magister der Naturwissenschaften“, Studienzweig Zoologie, Spezialisierung Molekulare Genetik.

Mai 2003: Erhalt des Forschungsstipendiums der „Herzfelder’schen Familienstiftung“ und Beginn der Diplomarbeit am Institut für Krebsforschung der Universität Wien, Abteilung Molekulare Genetik.

1994: Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Wien

1992: Beginn des Studiums der Medizin an der Medizinischen Universität Wien

Erstautorenschaft:

Juni 2009: Arbeit an: „ Effects of a double missense mutation in the ryanodine receptor of a malignant Hyperthermia“

September 2008 : „Novel ryanodine receptor mutation that may cause malignant hyperthermia“ *Anesthesiology* 109(3):457-64

Mitautorenschaft:

Mai 2007: „The nuclear actin-related protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Arp4, directly interacts with the histone acetyltransferase ESA1p“ *J Biochem* 2007 May; 141(5):661-8

April 2006: „Novel regulatory properties of *Saccharomyces cerevisiae* Arp4“ *JBiochem.* 2006 April; 139(4):741-51

Novel Ryanodine Receptor Mutation That May Cause Malignant Hyperthermia

Alexius Kaufmann, M.S.,* Birgit Kraft, M.D.,† Andrea Michalek-Sauberer, M.D.,‡ Lukas G. Weigl, Ph.D.‡

Background: Malignant hyperthermia (MH) is a hypermetabolic condition caused by a genetic disposition leading to increased Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum after exposure to triggering agents. In the authors' ongoing evaluation of patients undergoing MH testing in Austria, they detected a family with a new variant of the ryanodine receptor 1. Guidelines suggest that genetic tests are possible only for individuals from families in which the mutations are known. The aim of this study was to provide functional data that establish a potential link between this new variant and susceptibility to MH, and thus enable application in genetic tests.

Methods: Messenger RNA was isolated from skeletal muscle cells grown in culture and used for synthesis of complementary DNA, which served as a template for 23 polymerase chain reactions. The sequences of all reaction products were analyzed. Functional studies in differentiated muscle cells included the Ca^{2+} releasing activity of caffeine and 4-chloro-*m*-cresol. The authors measured the intracellular Ca^{2+} concentration and, in combined patch clamp- Ca^{2+} detection experiments, the voltage dependence of the Ca^{2+} release.

Results: In a single family, the authors found a transition from a highly conserved thymine to cysteine at position 11953, leading to the exchange of tryptophan to arginine at position 3985. This variant was absent in 100 MH-nonsusceptible individuals. Functionally, cells carrying this variant were more sensitive to caffeine and 4-chloro-*m*-cresol than wild-type cells and showed a shift in the voltage-dependent Ca^{2+} release to more negative potentials.

Conclusion: These data document a role of the new W3985R variant in MH susceptibility.

MALIGNANT hyperthermia (MH) is a pharmacogenetic disorder characterized by increased Ca^{2+} release in skeletal muscles upon exposure to triggering substances such as volatile anesthetics and the depolarizing neuromuscular blocking drug succinylcholine.¹ Vigorous exercise and stress have also been reported to very rarely cause MH-like episodes.² Because of its high sensitivity and specificity,³ the *in vitro* contracture test (IVCT) of MH susceptibility on a vastus muscle fragment is regarded as the accepted standard. The European protocol of the IVCT differs slightly from the North American protocol; in both cases, muscle bundles are exposed to increasing concentrations of caffeine or halothane. Re-

searchers have long attempted to replace these with a genetic test requiring only a blood sample.⁴⁻⁶

Unfortunately, there is no single mutation causing MH susceptibility. Currently, more than 170 variations in the ryanodine receptor 1 (RYR1) gene have been detected that are linked to MH.⁷ Although generally MH susceptibility is a result of a defective Ca^{2+} release channel (RYR1) in the sarcoplasmic reticulum, so far one mutation outside the RYR1 gene has also been proven to cause MH. This mutation was found in the skeletal muscle voltage-dependent Ca^{2+} channel⁸ which regulates the Ca^{2+} release through the RYR1 channel after depolarization of the sarcolemma. Because linkage analysis seldom provides enough data to classify a variant as causative for MH, additional data about the pathophysiologic effects of a newly described variant are essential.

The huge number of possible mutations causing MH requires the identification of a specific family mutation to perform a genetic test. It is then possible to diagnose susceptibility without performing the IVCT.⁹

Our aim is to provide functional data of a new genetic variant found in one Austrian MH family, to establish a potential link between this receptor variant and MH, and to enable the use of this correlation in future genetic testing.

Materials and Methods

The study was approved by the institutional ethics committee at the Medical University of Vienna (Vienna, Austria). Written informed consent was obtained from all patients scheduled to undergo an IVCT because of suspected MH susceptibility. The IVCT is performed only in cases where there is a family history of MH, or after a suspected MH episode during anesthesia. Individuals with an American Society of Anesthesiologists physical status higher than III and children younger than 16 yr are excluded from the test. The IVCT was performed according to the protocol of the European Malignant Hyperthermia Group, where muscle specimens are exposed to halothane and caffeine. After stretching the muscle to 150% of its initial length and stabilization of the baseline force for at least 15 min, the drugs are added. The concentration of caffeine is increased stepwise to 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, and 4.0 mM; the concentrations of halothane used for the test are 0.11, 0.22, 0.44, and 0.66 mM. The result of the test is a threshold value that is the lowest concentration of a drug that induces a sustained increase in contracture of at least 2 mN. The diagnostic criteria for susceptibility to MH

* Doctoral Research Fellow, † Staff Anesthesiologist, ‡ Assistant Professor.

Received from the Department of Special Anesthesia and Pain Management, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. Submitted for publication December 4, 2007. Accepted for publication June 3, 2008. Supported by research grant No. 11336 from the Jubiläumssfonds of the Oesterreichische Nationalbank, Vienna, Austria (to Dr. Weigl). Presented in part at the Annual Meeting of the European Malignant Hyperthermia Group, Siena, Italy, May 20-23, 2007, and the Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, San Francisco, California, October 13-17, 2007.

Address correspondence to Dr. Weigl: Department of Special Anesthesia and Pain Management, Medical University of Vienna, Währinger Gürtel 18-20, Vienna A-1090, Austria. lukas.weigl@meduniwien.ac.at. This article may be accessed for personal use at no charge through the Journal Web site, www.anesthesiology.org.

(MHS) are a caffeine threshold of 2 mM or less and a halothane threshold of 0.44 mM or less. An individual is diagnosed as MH nonsusceptible (MHN) if the caffeine threshold is 3 mM or more and the halothane threshold is above 0.44 mM. All other test results are MH equivocal to either halothane only or caffeine only.³ For this study, sequencing of the RYR1 gene was performed only for individuals with a positive (MHS) test result on the IVCT but without a previously identified MH mutation. The family that was found to carry the new genetic variant described here had nine members. Four of them were tested by IVCT (two were diagnosed as MHS and two as MHN), and a DNA sample was available from six family members (fig. 1A). As a control, DNA from blood samples of 100 randomly selected nonrelated individuals who had an MHN result on an IVCT was used to exclude a simple polymorphism.

Sera and media for cell culture were obtained from PAA (Linz, Austria). Trypsin-EDTA, glutamax, penicillin, streptomycin, gentamicin, and amphotericin B were obtained from GIBCO (Vienna, Austria); trypsin was obtained from Roche (Vienna, Austria); and fura-2/AM was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Lofer, Austria). Fibronectin and matrigel were purchased from BD Biosciences (Bedford, MA). All other chemicals were obtained from Sigma Aldrich GmbH (Vienna, Austria).

During muscle biopsy for MH diagnosis, surplus muscle bundles (100–350 mg) were obtained for human skeletal muscle cell culture as described previously.¹⁰ In brief, muscle tissue was freed from fat and connective tissue, cut, and digested in collagenase (type IA, 0.5 mg/ml) and trypsin (0.25 mg/ml) in phosphate-buffered salt solution without Ca^{2+} and Mg^{2+} . After centrifugation (200g), the cell suspension was resuspended in wash medium (Ham's F12 supplemented with 20% horse serum), filtered through a 70- μm nylon mesh, and finally seeded in growth medium onto 50-ml cell culture flasks for proliferation. Growth and differentiation media were prepared according to Baroffio *et al.*¹¹ Growth medium contained Ham's F12 supplemented with 15% fetal calf serum, 10 ng/ml epidermal growth factor, 200 ng/ml insulin, 400 ng/ml dexamethasone, 0.5 mg/ml fetuin, 0.5 mg/ml bovine serum albumin, 7 mM glucose, 4 mM glutamax, 200 U/ml penicillin, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B. Differentiation medium contained Dulbecco/Vogt modified Eagle minimal essential medium supplemented with 5% horse serum, 4 mM glutamax, 100 ng/ml insulin, and 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin.

Cells were kept at 37°C under 2.5% CO_2 in an incubator, grown close to confluence, and reseeded on 25-mm glass coverslips coated with fibronectin or matrigel. Adherent cells were exposed to differentiation medium to promote fusion of myogenic satellite cells to myotubes in an incubator with 5% CO_2 .

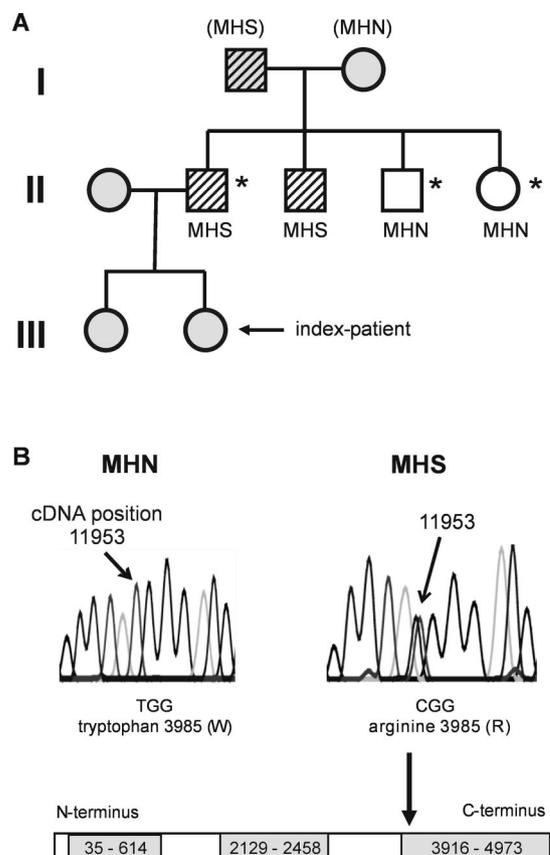


Fig. 1. *In vitro* contracture test (IVCT) and genetic data of the family. (A) Pedigree of the family with a new putative heterozygous malignant hyperthermia (MH) mutation in the ryanodine receptor 1 (RYR1) gene. Four individuals of the second generation were tested with the IVCT; two of them were found to be MH susceptible (MHS) and had the W3985R variant (*striped symbols*), whereas the other two were diagnosed as normal (MHN) and did not carry the W3985R variant (*empty symbols*). The diagnosis in parentheses is based not on the IVCT result but on the occurrence of the W3985R variant. Individuals in the third generation were too young for the IVCT, and no blood samples were available. *Gray symbols* = no IVCT was performed. * Q11266E variant. (B) A base change in the codon for tryptophan 3985 (TGG → CGG) leads to the insertion of arginine at this position. Below is a linear representation of the primary sequence of the RYR1. Shaded boxes denote the so-called MH regions, domains of the protein that are thought to harbor most causative MH mutations. The new variant is at the beginning of the third MH domain but not related to any other known functional site of the protein. cDNA = complementary DNA.

Genetic Analysis

RNA was isolated from differentiating muscle cells on day 4, after changing from growth medium to differentiation medium, with the Peqgold total RNA kit from Peqlab (Erlangen, Germany). RNA was then reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using the SuperScript First-Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen) according to the protocols of the manufacturers. cDNAs were used as templates for amplification of parts of the RYR1 sequence with the polymerase chain reaction technique. Oligonucleotide primers according to McCarthy¹² were used to amplify 23 overlapping sequences of the RYR1 and the 25i5 and 25i3 primers for

detection of the R1086H substitution in the α_1 subunit of the L-type Ca^{2+} channel.⁸ The length of the polymerase chain reaction products was 600–1,000 bp.

Polymerase chain reaction products were then purified with the Spin PCRapid purification kit (Invitek, Berlin, Germany) and sequenced by a commercial sequencing laboratory (DI Martin Ibl, Vienna, Austria). Both strands of all polymerase chain reaction products were sequenced.

Determination of Ca^{2+} Concentration

Cells were incubated with the Ca^{2+} -sensitive fluorescence dye fura-2/AM. The loading buffer was Tyrode solution (137 mM NaCl, 5.6 mM glucose, 5.4 mM KCl, 2.2 mM NaHCO_3 , 1.1 mM MgCl_2 , 0.4 mM NaH_2PO_4 , 10 mM HEPES-Na, 1.8 mM CaCl_2 , pH 7.4) supplemented with 2.5–5 μM fura-2/AM and 0.025% F-127 Pluronic. After incubation in loading buffer for 45–60 min at 37°C, unloaded dye was washed out, and coverslips were placed into a perfusion chamber of a Nikon fluorescence microscope at 400 \times magnification (Nikon, Vienna, Austria). Only cells that reacted to depolarization solution HK (Tyrode solution with 60 mM KCl and 80 mM NaCl, no Ca^{2+} added) with an increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were used for experiments, assuming a skeletal muscle-specific excitation-contraction coupling. Fluorescence intensity was monitored at an emission wavelength of 510 nm by altering excitation wavelengths between 340 and 380 nm using a monochromator (VisiTech, Sunderland, United Kingdom).

For measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, images were recorded with a sample interval of 0.2–2 s. Stored images were analyzed using the QC2000 software package from VisiTech. For determination of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, regions of interest were defined covering the entire visible area of a cell. The light intensity values from these specified areas were integrated and exported into the Sigma Plot program (SPSS Inc., Erkrath, Germany). Background subtraction, ratioing, and calculation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were performed off-line. Resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was defined by the average of the first 10 data points before application of any substances. The value of a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient was determined by the peak value reached within the time of substance application.

Calibration of fura-2 fluorescence signals to calculate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ values was performed according to Gryniewicz *et al.*¹³ To obtain the parameters for the equation, we used the pentapotassium salt of fura-2 (5 μM) in a solution mimicking the intracellular milieu.¹⁴

Dose-response curves were assessed by application of increasing concentrations of substances to a cell and measurement of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$. After washout of the substance and return of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to resting levels, the next higher concentration was applied. Least square fitting of dose-response curves to the Hill equation was performed with the Sigma Plot program.

Electrophysiology

Voltage-dependent Ca^{2+} release was determined in fura-2/AM-loaded cells clamped to a holding potential of -80 mV. From this potential, depolarization steps from -50 mV up to $+30$ mV were applied in 20-mV increments. The depolarization lasted for 2 s and was followed by a 13-s repolarization interval. The voltage-induced Ca^{2+} release was normalized to the maximum Ca^{2+} release obtained during a test pulse series and averaged for the respective diagnostic group. For patch clamping the cells, an Axopatch 1D connected to an Axon Digidata 1200 and a personal computer with pClamp6 (Axon Inc., Foster City, CA) were used. The patch electrodes (PG10150-4; WPI, Sarasota, FL) had a resistance from 0.8 to 2 M Ω and were filled with intracellular solution (130 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES- K^+ , 4 mM ATP- K_2 , pH 7.2, and 10 mg/ml Chelex 100). As a bathing solution, Tyrode solution was used.

Parameters for the voltage-dependent Ca^{2+} release were assessed using a Boltzmann equation, where the Ca^{2+} concentration reached during a step depolarization was normalized to the maximum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observed during a series of depolarizations.

Whole cell patch experiments for determination of the kinetics of L-type Ca^{2+} currents were performed using a HEKA EPC-9 patch clamp amplifier with the Pulse software package (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). Patch electrodes were filled with a solution containing 145 mM CsOH, 135 mM aspartic acid, 11 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES-Na, 2 mM K_2ATP , and 5 mM Na_2 creatine phosphate, pH 7.2; series resistance compensation was at least 50%. To measure currents through Ca^{2+} channels, Ba^{2+} was used as a charge carrier; the extracellular solution contained 115 mM CsCl, 15 mM BaCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES-Na, and 2.5 mM 4-aminopyridine, pH 7.4. L-type currents were determined by digital subtraction of current traces obtained in the presence of 10 μM of the specific L-type Ca^{2+} channel blocker nifedipine. Least square fitting of the current-voltage relation was performed according to a Boltzmann equation combined with a linear function describing the total voltage-dependent conductance:

$$I(x) = G_{\text{max}} \cdot (x - E_{\text{rev}}) \cdot (1 / (1 + e^{-(x - E_{0.5}) / k}))$$

where $I(x)$ is the current at a certain membrane potential, x is the membrane potential, G_{max} is the maximum total Ca^{2+} conductance, E_{rev} is the reversal potential, $E_{0.5}$ is the half activation voltage, and k is the slope factor.

Statistical Analysis

Data regarding cells from two individuals with the new receptor variant were pooled and compared with data

regarding cells from a total of 11 individuals without the variant. Because of a high variability in the Ca^{2+} -releasing properties between single cells—which exceeds the variability between cells of different individuals—results of single-cell experiments were treated as independent for statistical analysis. For statistical analysis, we used Statgraphics plus 4.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD). Tests for normal distribution included the chi-square goodness-of-fit test, the test for Shapiro-Wilk W, and the z score for skewness and kurtosis. Means of normally distributed data were compared using the Student *t* test. For other data, the Mann-Whitney test was used to compare the medians. Significant difference was assumed for $P < 0.05$. Data are given as medians with 25th and 75th percentiles or as mean \pm SE.

Results

IVCT and Genetic Testing

Four members of the family were tested with the IVCT after a 6-yr-old girl showed signs of a possible MH crisis during an adenotomy. The anesthesia was performed with less than 3% isoflurane and 70% nitrous oxide and oxygen in combination with 40 mg succinylcholine intravenously. The girl developed a tachycardia (252 beats/min), masseter spasm, and mydriasis without pupillary reflexes. No hyperthermia or generalized skeletal muscle rigidity was observed. The creatine phosphokinase values increased to 11,000 U/l. After immediate termination of anesthesia, the girl recovered without further symptoms. Because of her age, no IVCT was performed. The father of the girl and her uncle tested positive for MH on the IVCT (fig. 1A). Both showed slightly increased creatine phosphokinase values at rest (127 and 209 U/l, respectively) but were otherwise without obvious neuromuscular symptoms, and histologic tests were not performed. The threshold concentration of the MHS individuals for halothane was 0.11 mM (0.5% vol/vol). The thresholds for caffeine were reached at 1.0 and 1.5 mM, respectively. Two other members of this family were tested and diagnosed as MHN on the IVCT. The genetic analysis of the RYR1 of the two MHS members of the family yielded a nucleotide exchange in exon 87 at position 11953 from thymine to cytosine, which causes a change of the amino acid tryptophan at position 3985 to arginine (fig. 1B).

The new W3985R variant was found only in the two MHS individuals and not in any of the MHN individuals of that family or in 100 further individuals diagnosed MHN from other families. In the RYR1 gene of three family members, a further base change was found at position 11266 from cytosine to guanine (exon 79), which results in the change of amino acid 3756 from a glutamine to glutamate. This change in the protein sequence has already been described in an equivocal individual but was not regarded as important for the pathophysiology

of MH.¹⁵ In accord, we found this variant not only in one of the MHS individuals, but also in both nonaffected MHN family members, indicating that Q3756G is not a mutation involved in the pathophysiology of MH.

Ca^{2+} Release Experiments

For this study, differentiated skeletal muscle cells from two MHS individuals and two individuals of the same

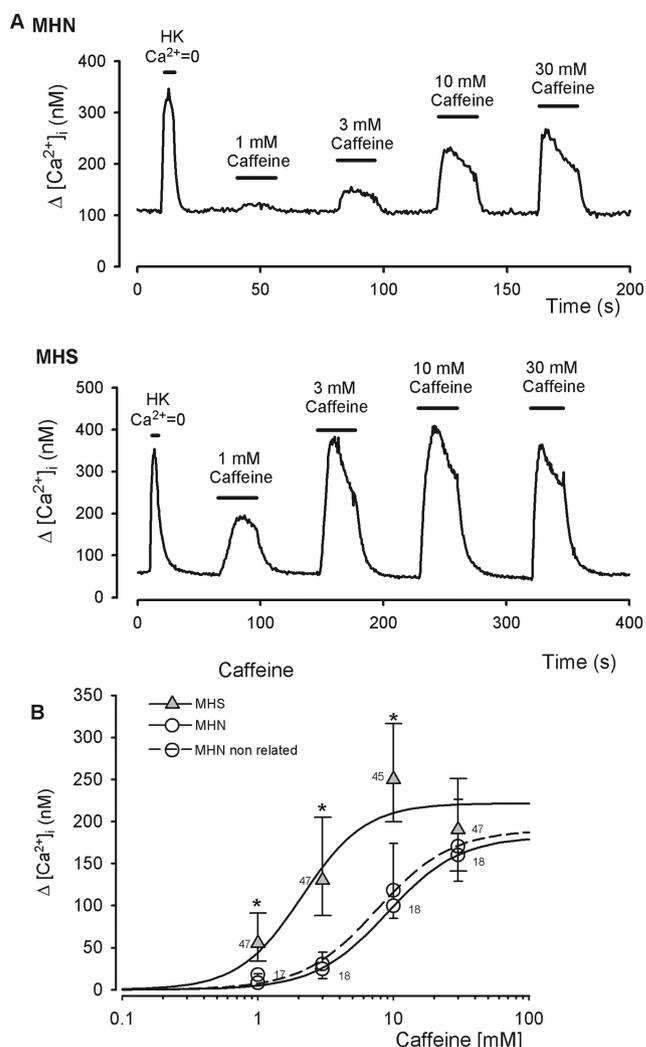


Fig. 2. Sensitivity against caffeine. (A) Time course of the intracellular Ca^{2+} concentration in differentiated human skeletal muscle cells. HK $\text{Ca}^{2+} = 0$ is a Ca^{2+} -free solution with elevated potassium, producing a depolarization of the cell. The observed increase in Ca^{2+} is due to a release and not an influx of Ca^{2+} , which is typical for the skeletal muscle type excitation contraction coupling. Increasing concentrations of caffeine resulted in increasing Ca^{2+} transients (MHN = cell from a normal individual; MHS = cell from an individual diagnosed as susceptible to malignant hyperthermia). (B) The concentration-response curves for caffeine showed a left shift for cells with the mutated RYR1. Lines are least square fits through the symbols according to the Hill equation. The dashed line shows the sensitivity of muscle cells derived from nonrelated MHN individuals. Figures next to the symbols give the number of experiments. Data are given as median with 25th and 75th percentiles. * Significant difference between MHS and MHN cells (Mann-Whitney test, $P < 0.05$).

family without the genetic variant were used as well as cells from nine nonrelated MHN individuals. All MHN cells were tested for absence of the W3985R mutation.

The resting Ca^{2+} levels in differentiated primary skeletal muscle cells were not different between cells from individuals diagnosed as MHS or MHN on the IVCT. The mean resting Ca^{2+} concentration in MHN cells was determined to be 82 ± 4 nM (SEM, $n = 121$ cells of two related and 6 nonrelated individuals), whereas MHS cells showed a resting Ca^{2+} concentration of 81 ± 4 nM (SEM, $n = 74$ cells of two related individuals with the W3985R variant).

To specifically activate a Ca^{2+} release through the RYR1, caffeine and 4-chloro-*m*-cresol (4-CmC) were used, and the sensitivity of muscle cells against these substances was determined. Changes in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to application of 1–30 mM caffeine were monitored (fig. 2A), and the maximum effects on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were used to calculate a concentration-response curve (fig. 2B) according to the Hill equation. The EC_{50} value of MHS cells was 1.4 mM caffeine (1.1 mM, 2.0 mM, $n = 30$ cells from two individuals with the W3985R variant), whereas MHN cells of the same family reacted only at 6.9 mM caffeine (5.5 mM, 10.2 mM, $n = 18$ cells from two related individuals) with a half-maximum increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (table 1). The maximum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reached during application of caffeine did not differ significantly between the two diagnostic groups. Cells from nonrelated MHN individuals ($n = 8$ cells from three individuals) reacted to caffeine in a similar way as those derived from the two MHN family members (fig. 2B). For 4-CmC, the difference in sensitivity against the Ca^{2+} -releasing potency of the drug was less pronounced (fig. 3). At a concentration of 68.1 μM 4-CmC (61.1 μM , 83.6 μM , $n = 31$ cells from two individuals with the W3985R variant), MHS cells showed half-maximum Ca^{2+} release; MHN cells, however, reacted only at 108 μM 4-CmC (88 μM , 150 μM , $n = 23$ cells from two related individuals) with a comparable release of Ca^{2+} . Again, no change in the amount of released Ca^{2+} was detected when comparing MHN and MHS cells.

The physiologic stimulus of Ca^{2+} release in skeletal muscle cells is the depolarization of the membrane. The

activation of the dihydropyridine receptor and the relay of this signal *via* physical interaction are thought to open the RYR1, thus leading to Ca^{2+} release.¹⁶ In combined patch clamp- Ca^{2+} -detection experiments (fig. 4A), the maximum Ca^{2+} release in MHN cells was observed at the highest depolarization potential of +30 mV, and the potential where the half-maximum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ occurred ($E_{0.5\text{Ca}}$) was determined to be -27 ± 3.6 mV (SEM, $n = 6$ cells from three individuals). In MHS cells, the maximum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was reached at a depolarization potential of +10 mV, and the $E_{0.5\text{Ca}}$ was -41 ± 4.0 mV (SEM, $n = 6$ cells from two individuals with the W3985R variant; $P < 0.05$; fig. 4B). To exclude the possibility that this shift is the result of altered Ca^{2+} channel kinetics, we determined the current-voltage relation of Ba^{2+} currents through L-type Ca^{2+} channels in myotubes from MHS and MHN individuals. The current-voltage curves of MHS and MHN Ba^{2+} currents were identical (fig. 4C).

In addition, we did not detect in MHS cells the Arg His mutation at residue 1086 of the α_1 subunit of the L-type Ca^{2+} channel—which is known to cause MH⁸—further corroborating the causative role of the new RYR1 variant for MH.

Discussion

The RYR1 plays a central role in releasing Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum. MH, central core disease (CCD), and minicore disease have all been linked to mutated RYR1 channels. We do not fully understand the mechanisms of mutations in impairing channel functions to the point of pathologic manifestations. So far, mutations leading to MH and/or CCD have been found to cluster in three distinct regions of the channel protein (MH/CCD regions 1–3), with region 1 (AA35–614) and region 2 (AA2129–2458) located in the myoplasmic domain of the channel, and region 3 (AA3916–4973) being part of the putative transmembrane and luminal domain of the protein.¹⁷ Although much effort has been made to elucidate the three-dimensional structure of the Ca^{2+} release channel,¹⁸ its relation to the primary sequence is

Table 1. Parameters for Ca^{2+} Release

	Maximum Ca^{2+} Increase	Hill Coefficient	EC_{50}	n
MHN caffeine	191 (135, 255) nM	1.9 (1.5, 2.6)	6.9 (5.5, 10.2) mM	18
Mann-Whitney test	U = 406, P = 0.193	U = 412, P = 0.159	U = 7, P < 0.001	
MHS caffeine	231 (186, 282) nM	2.5 (1.7, 4.1)	1.4 (1.1, 2.0) mM	30
MHN 4-CmC	249 (193, 300) nM	3.5 (1.9, 5.2)	108 (88, 150) μM	23
Mann-Whitney test	U = 411, P = 0.349	U = 467, P = 0.109	U = 603, P < 0.001	
MHS 4-CmC	273 (217, 319) nM	2.4 (1.7, 3.8)	68.1 (61.1, 83.6) μM	31

Parameters for Ca^{2+} release by caffeine and 4-chloro-*m*-cresol (4-CmC). Data are median with 25th and 75th percentiles in parentheses, and n is the number of experiments used for calculation of parameter values according to a Hill equation. The malignant hyperthermia susceptible (MHS) group contains experiments from two individuals with the W3985R variant, whereas in the malignant hyperthermia nonsusceptible (MHN) group cells of two individuals of the same family without the variant were used. Results of the Mann-Whitney test are given between the compared values.

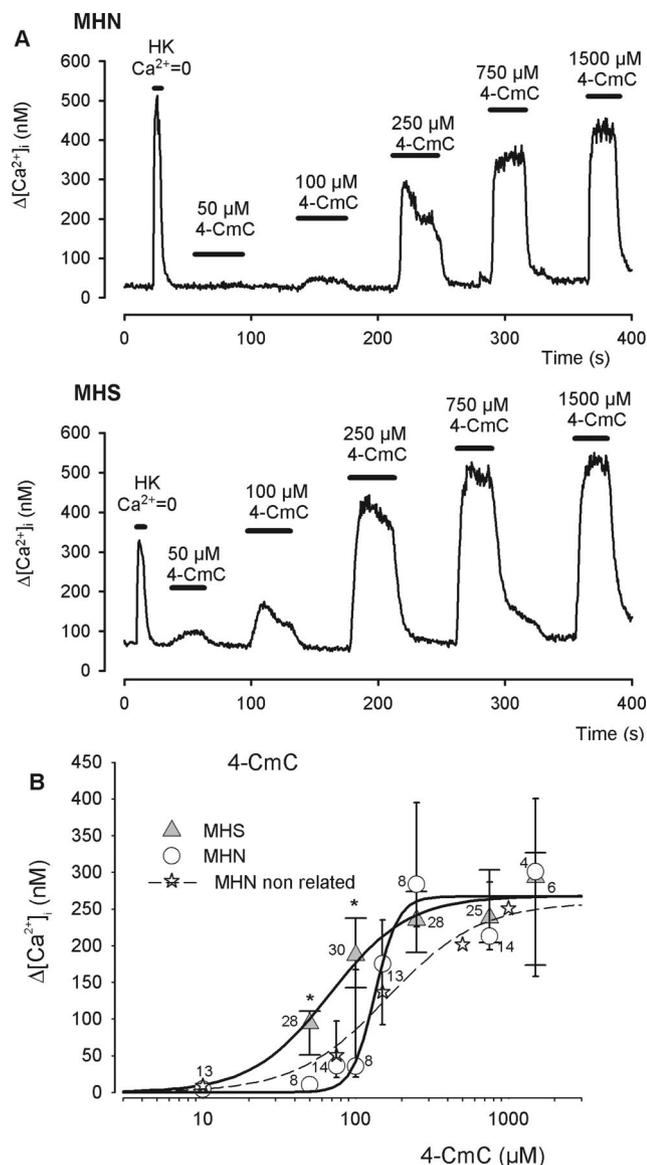


Fig. 3. Sensitivity against 4-chloro-*m*-cresol (4-CmC). (A) Effect of 4-CmC on the intracellular Ca^{2+} concentration in differentiated muscle cells (MHN = cell from a normal individual; MHS = cell from an individual diagnosed as susceptible to malignant hyperthermia). (B) Concentration-response curve of 4-CmC. MHS cells show a higher sensitivity than MHN cells, especially at low concentrations of 4-CmC. The dashed line shows the sensitivity of muscle cells derived from nonrelated MHN individuals. Fit to symbols as in figure 2B. Data are given as median with 25th and 75th percentiles. * Significant difference between MHS and MHN cells (Mann-Whitney test, $P < 0.05$).

still a matter of research. Mutations in highly conserved regions within the gene are of high interest because they are of functional importance and thus shed light on the structure-function relations of such domains.

The site of the new proposed mutation is at the beginning of the classic MH domain 3 and highly conserved, not only between different species but also between the three known isoforms of the RYR. The importance of this domain for MH is also highlighted by findings from

Robinson *et al.*,⁷ who found variants at AA3986 and 3990 in two MH families. Although the linkage between MH and those variants has yet to be established, sequence changes in this region of the RYR seem to render the channel unstable. The exchange of AA3985 from the aromatic tryptophan to the basic arginine makes this site more hydrophilic and could disrupt a possible interdomain interaction. Such interactions have been proposed to explain the stabilizing effect of dantrolene on the channel,¹⁹ as well as the destabilizing effect of MH mutations found in the DP4 region (corresponding to Leu 2442-Pro 2477) of the RYR1.²⁰

A similar destabilizing effect by the new proposed mutation is indicated by the fact that the sensitivity of Ca^{2+} release against 4-CmC and caffeine is enhanced (figs. 2 and 3). These two compounds are known to directly activate the RYR, and it is therefore plausible that the change in the primary sequence of the RYR leads to this increased sensitivity.

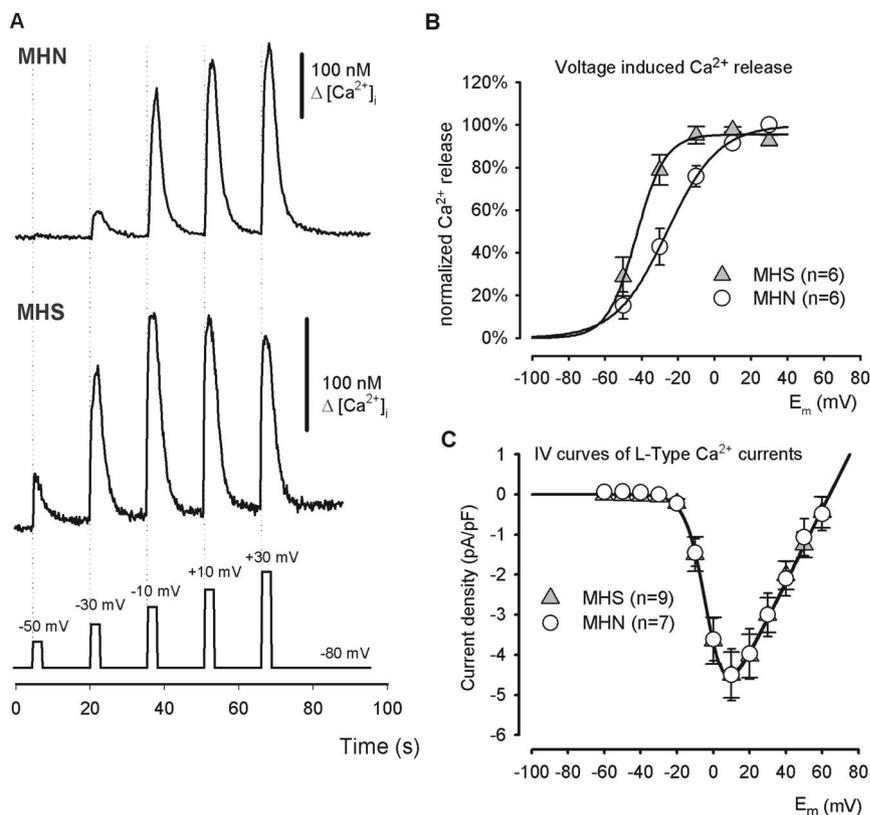
The physiologic stimulus for activating the RYR1 is the depolarization of the cell. Depolarization is sensed by the voltage-gated L-type Ca^{2+} channel in the plasma membrane and relayed to the Ca^{2+} release channel. MHS cells with the W3985R variant in the RYR1 showed a shift in the voltage-dependent Ca^{2+} release to more negative potentials (fig. 4), indicating either destabilization of the RYR and opening due to minute changes in L-type Ca^{2+} channel conformation, or an increased sensitivity of the channel against activating concentrations of Ca^{2+} as already shown for MHS muscle.^{21,22}

Another possibility for the observed early release of Ca^{2+} could be a shift in the voltage-dependent gating of the L-type Ca^{2+} channel toward more negative potentials. This was ruled out by voltage clamp experiments that revealed no differences of L-type channel kinetics in MHS cells and MHN cells.

To our knowledge, the two individuals carrying the new RYR1 variant do not have muscle fasciculations or other muscle-related abnormalities. This might occur when there is a shift of Ca^{2+} release to more negative potentials, resulting in spontaneous Ca^{2+} release events. However, the firing threshold for action potentials is around -60 mV, so even if there is more release of Ca^{2+} already at -50 mV due to the variant (fig. 4B), this release would take place only after an action potential has been triggered. So the difference between the thresholds for eliciting an action potential and releasing Ca^{2+} still seems to be big enough to enable regular muscular function.

Moreover, the resting Ca^{2+} concentration of MHS cells was not increased, and the net Ca^{2+} release was not diminished, indicating that the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content is not affected by the variant. Some experimental evidence indicates elevated resting $[Ca^{2+}]_i$ for

Fig. 4. Voltage-dependent Ca^{2+} release. (A) Myotubes were patch clamped at a holding potential of -80 mV and depolarized to increasing potentials for 2 s. Changes in intracellular Ca^{2+} concentrations were monitored fluorometrically. Activation of the voltage dependent Ca^{2+} channels results in an intracellular release of Ca^{2+} . (MHN = cell from a normal individual; MHS = cell from an individual diagnosed as susceptible to malignant hyperthermia). (B) The voltage-dependent Ca^{2+} release is shifted to more negative potentials in MHS cells. (C) This shift is not due to a change in the properties of voltage-activated L-type Ca^{2+} channel. The current-voltage relation shows the same activation kinetics in MHS and MHN cells.



MHS cells,²³⁻²⁵ whereas other reports did not find alterations. Conflicting reports may arise from different methods used for the determination of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ but also from the diversity of functional impairments due to different channel mutations. According to a model proposed by Dirksen and Avila,²⁶ MH in the absence of CCD arises from RyR1 mutations that result in overactive release channels that do not cause a net change in steady state sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content (so-called compensated leak channels), but predispose the muscle to increased Ca^{2+} release upon exposure to triggering substances. Mutations that enhance the RyR1 activity or sensitivity to an extent sufficient to result in a partial depletion of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} store would decrease the maximum Ca^{2+} release and lead to elevated resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (decompensated leak). Such leaky channels have been postulated to cause CCD. Therefore, this new variant would belong to the MH-only mutations with no leak or a compensated leak, and indeed, individuals carrying this variant do not have CCD.

The classification of this genetic variant as a mutation that causes MH requires the identification of a family not related to the family presented here, in which MH susceptibility is associated with this RyR1 variant. This will happen only if other centers that examine the RyR1 also examine exon 87. More work of this type is needed to improve the sensitivity of genetic testing for MH susceptibility.

References

- Rosenberg H, Davis M, James D, Pollock N, Stowell K: Malignant hyperthermia. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2:21-34
- Davis M, Brown R, Dickson A, Horton H, James D, Laing N, Marston R, Norgate M, Perlman D, Pollock N, Stowell K: Malignant hyperthermia associated with exercise-induced rhabdomyolysis or congenital abnormalities and a novel RYR1 mutation in New Zealand and Australian pedigrees. *Br J Anaesth* 2002; 88:508-15
- Ording H, Brancadoro V, Cozzolino S, Ellis FR, Glauber V, Gonano EF, Halsall PJ, Hartung E, Heffron JJ, Heytens L, Kozak-Ribbens G, Kress H, Krivosic-Horber R, Lehmann-Horn F, Mortier W, Nivoche Y, Ranklev-Twetman E, Sigurdsson S, Snoeck M, Stieglitz P, Tegazzin V, Urwyler A, Wappler F: *In vitro* contracture test for the diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: Results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997; 41: 955-66
- Girard T, Treves S, Voronkov E, Siegmund M, Urwyler A: Molecular genetic testing for malignant hyperthermia susceptibility. *ANESTHESIOLOGY* 2004; 100:1076-80
- Nelson T, Rosenberg H, Muldoon S: Genetic testing for malignant hyperthermia in North America. *ANESTHESIOLOGY* 2004; 100:212-4
- Sambuughin N, Holley H, Muldoon S, Brandom BW, de Bantel AM, Tobin JR, Nelson TE, Goldfarb LG: Screening of the entire ryanodine receptor type 1 coding region for sequence variants associated with malignant hyperthermia susceptibility in the North American population. *ANESTHESIOLOGY* 2005; 102:515-21
- Robinson R, Carpenter D, Shaw M-A, Halsall J, Hopkins P: Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat* 2006; 27:977-89
- Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, Lunardi J: Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the $\alpha 1$ -subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1316-25
- Urwyler A, Deufel T, McCarthy T, West S: Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 2001; 86: 283-7
- Brinkmeier H, Mutz J, Seewald M, Melzner I, Rüdell R: Specific modifications of the membrane fatty acid composition of human myotubes and their effects on the muscular sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1145:8-14
- Baroffio A, Aubry JP, Kaelin A, Krause RM, Hamann M, Bader CR: Purification of human muscle satellite cells by flow cytometry. *Muscle Nerve* 1993; 16:498-505

12. McCarthy TV: Mutation screening of the ryanodine receptor gene in malignant hyperthermia, Malignant Hyperthermia. Edited by Schulte am Esch J, Scholz J, Wappler F. Lengerich, Germany, Pabst Science Publishers, 2000, pp 200-11
13. Grynkiwicz G, Poenie M, Tsien R: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260:3440-50
14. Thomas A, Delaville F: The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic free calcium concentration in cell populations and single cells, *Cellular Calcium: A Practical Approach*. Edited by McCormack J, Cobbold P. New York, Oxford University Press, 1991, pp 1-54
15. Brown RL, Pollock AN, Couchman KG, Hodges M, Hutchinson DO, Waaka R, Lynch P, McCarthy TV, Stowell KM: A novel ryanodine receptor mutation and genotype-phenotype correlation in a large malignant hyperthermia New Zealand Maori pedigree. *Hum Mol Genet* 2000; 9:1515-24
16. Nakai J, Sekiguchi N, Rando TA, Allen PD, Beam KG: Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 1998; 273:13403-6
17. Lyfenko AD, Goonasekera SA, Dirksen RT: Dynamic alterations in myoplasmic Ca^{2+} in malignant hyperthermia and central core disease. *Biochem Biophys Res Com* 2004; 322:1256-66
18. Serysheva Hamilton SL II, Chiu W, Ludtke SJ: Structure of Ca^{2+} release channel at 14Å resolution. *J Mol Biol* 2005; 345:427-31
19. Kobayashi S, Bannister ML, Gangopadhyay JP, Hamada T, Parness J, Ikemoto N: Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2005; 280:6580-7
20. Bannister ML, Hamada T, Murayama T, Harvey PJ, Casarotto MG, Dulhunty A, Ikemoto N: Malignant hyperthermia mutation sites in the Leu2442-Pro2477 (DP4) region of RyR1 (ryanodine receptor 1) are clustered in a structurally and functionally definable area. *Biochem J* 2007; 401:333-9
21. Endo M, Yagi S, Ishizuka T, Horiuti K, Koga Y, Amaha K: Changes in the Ca^{2+} induced Ca^{2+} release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of the muscle from a patient with malignant hyperthermia. *Biomed Res* 1983; 4:83-92
22. Richter M, Schleithoff L, Deufel T, Lehmann-Horn F, Herrmann-Frank A: Functional characterization of a distinct ryanodine receptor mutation in human malignant hyperthermia-susceptible muscle. *J Biol Chem* 1997; 272:5256-60
23. Lopez JR, Alamo LA, Caputo C, Wikinski J, Ledezma D: Intracellular ionized calcium concentration in muscles from humans with malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 1985; 8:355-8
24. Yang T, Esteve E, Pessah IN, Molinski TF, Allen PD, Lopez JR: Elevated resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in myotubes expressing malignant hyperthermia RyR1 cDNAs is partially restored by modulation of passive calcium leak from the SR. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:C1591-8
25. Wehner M, Rueffert H, Koenig F, Neuhaus J, Olthoff D: Increased sensitivity to 4-chloro-m-cresol and caffeine in primary myotubes from malignant hyperthermia susceptible individuals carrying the ryanodine receptor 1 Thr2206Met (C6617T) mutation. *Clin Genet* 2002; 62:135-46
26. Dirksen RT, Avila G: Distinct effects on Ca^{2+} handling caused by malignant hyperthermia and central core disease mutations in RyR1. *Biophys J* 2004; 87:3193-204