

1.7. Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Knaben wurde im dritten Lebensjahr die Diagnose einer MM und im dreizehnten Lebensjahr die Diagnose einer CCM gestellt. Diese in der vorliegenden Literatur bisher nicht berichtete Konstellation wirft verschiedene Fragen auf, die im folgenden diskutiert und beantwortet werden sollen:

- (1) Sind beide Diagnosen zum jeweiligen Zeitpunkt plausibel und nachvollziehbar? Handelt es sich um Fehldiagnosen, um eine zufällige Koinzidenz oder stehen beide Diagnosen in einem pathogenetischen Zusammenhang?
- (2) Wie entstehen „cores“ und welche Rolle spielen mitochondriale Veränderungen dabei?
- (3) In welchem Lebensalter treten „cores“ auf? Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von „cores“ und der klinischen Symptomatik?
- (4) Spielt die Typ-I-Faserprädominanz eine Rolle bei die Entstehung von „cores“?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Myohistologische Untersuchungen

Die erste Muskelbiopsie erfolgte im Jahre 1988 in der Kinderklinik der Technischen Universität München. Die weitere Aufarbeitung des Muskelgewebes aus dem rechten M. quadriceps femoris wurde im Friedrich-Baur-Institut München bei der Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die lichtmikroskopische Befundung wurde unter der Eingangsnummer 314/88 von Herrn Prof. Dr. Pongratz vorgenommen, der uns freundlicherweise ausgewählte Schnittpräparate zur Reanalyse zur Verfügung stellte. Weiterführende elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden unter der Eingangsnummer EM 11392 von Herrn Prof. Dr. Hübner im Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Auch von diesen Untersuchungen erhielten wir dankenswerterweise repräsentative Photographien zur Einsichtnahme.

Die zweite Muskelbiopsie wurde im Jahre 1998 im Rahmen des stationären Aufenthaltes in der Neurologischen Universitätsklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen. Nach ausführlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis erfolgte die Gewebeentnahme als offene Biopsie unter Lokalanästhesie aus dem linken M. biceps brachii. Ein Teil des Muskelgewebes wurde sofort in Flüssigstickstoff-gekühltem Isopentan schockgefroren, eine andere Portion wurde in Glutaraldehyd fixiert und nachfolgend in Kakodylatpuffer aufbewahrt. Von dem Nativegewebsstück wurden 10 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt. Nach den üblichen Standardmethoden (vgl. Dubowitz 1985) wurden HE-, modifizierte Trichrom-, PAS- und Ölrot-O-Färbungen sowie ATPase-Reaktionen bei drei verschiedenen pH-Werten und außerdem mit der NADH-, SDH- und saure Phosphatase-Reaktion weitere enzymhistochemische Reaktionen durchgeführt. Aufarbeitung und Befundung des Glutaraldehyd-fixierten Gewebsanteils für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten durch Herrn Prof. Dr. Holzhausen im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, der uns freundlicherweise einige Photographien zur Verfügung stellte.

2.2. Molekulargenetische Untersuchungen

Aus Muskelgewebe des Patienten und seiner Mutter erfolgte die Präparation von DNA mit einem QUIAamp DNA Mini Kit (Fa. Quiagen, Hilden) nach Standardmethoden; als Kontrolle diente Muskelgewebe von gesunden Personen. Die Suche nach den sieben bis dato beschriebenen pathogenen CCM-Punktmutationen wurde mittels PCR und Sequenzierung vorgenommen. Von der präparierten DNA wurden hierzu verschieden große, überlappende Fragmente des RyR-Gens unter Benutzung der in Tabelle 2 (s. nächste Seite) aufgeführten Primer (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) amplifiziert.

Das Reaktionsgemisch (25 µl) enthielt jeweils 100 ng der präparierten genomischen DNA, 25 pmol der korrespondierenden Vorwärts- und Rückwärts-Primer, ein Puffergemisch aus 400 nmol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 125 nmol Tris pH 8,8, außerdem 37,5 nmol MgCl_2 , 3,75 nmol dNTP sowie 1 U Taq-Polymerase (Fa. Perkin Elmer, Langen). Bei den PCR-Reaktionen Nr. 1 und Nr. 2 wurde dem Reaktionsgemisch zusätzlich jeweils 7,5%iges Dimethylsulfoxid zugefügt.

Tabelle 2: Primer und PCR-Bedingungen der Amplifizierung ausgewählter Abschnitte des RyR-Gens

PCR-Nr.	Exon	Mutation	Primersequenz (1. vorwärts 5'>3') (2. rückwärts 3'>5')	Größe (bp)	T _{ann} (°C)
1	6	Arg163Cys	1. CCT GCT AGA AGG AGG CTG ACC 2. GCA GAC CTT CTA CCC CCT GAA	187	65
2	12	Ile403Met	1. TCT TGG GCA TGG CCT GGG T 2. GGA GCA TGG GAC AGC ACA GGA	230	60
3	14	Tyr522Ser	1. TGC CCA CTT TGC TGA GTT 2. ATG TGA TTC TCC TGG ATG ATG	418	60
4	39	Arg2163His	1. GCG CTG GGC CCA AGA GGA CT 2. AGG GGA AGG GCG GTG TCT CAC	241	65
5	45	Arg2436His	1. TCC CGG CCC CCT CCT CAA TAG 2. GGC GTT CAA AGC GGC TGT GC	247	65
6	45	Arg2436Leu	1. TCC CGG CCC CCT CCT CAA TAG 2. GGC GTT CAA AGC GGC TGT GC	247	65
7	102	Ile4898Thr	1. TGT TTC ACA TGT ACG TGG GTG T 2. CAG TAG GAC AAC CGG TAG TA	146	66

Legende: T_{ann} = Annealing-Temperatur
bp = Basenpaare

Die Amplifikation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 5 min Denaturierung bei 94°C, anschließend 30 Zyklen mit jeweils 10 s Denaturierung bei 94°C, 45 s Annealing bei der in Tabelle 2 für die jeweilige Mutation angegebenen Temperatur und 45 s Elongation bei 72°C. Die abschließende Extension erfolgte bei 72°C.

Die Sequenzierung wurde mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger 1981) mittels ³⁵Schwefel-markierter Trinukleotide unter Verwendung der in Tabelle 2 aufgeführten Primer vorgenommen. Die Auftrennung der Produkte der Sequenzierungsreaktion erfolgte mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE). Nach Trocknung der Gele wurden die Sequenzierungsprodukte durch Aufbringen auf einen Röntgenfilm visualisiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den bekannten Sequenzen des RyR verglichen (Phillips et al. 1996).