

Universität Ulm
Abteilung Angewandte Physiologie
Leiter: Prof. Dr. F. Lehmann-Horn

Untersuchungen von Mutationen im muskulären
Chloridkanalgen CLCN-1

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr.med.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Sandra Benz
aus Unterelchingen
2000

Amtierender Dekan: Prof. Dr. P. Gierschik

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lehmann-Horn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Speit

Tag der Promotion: 14.12.2000

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
2	ZIELSETZUNG.....	12
3	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	PATIENTEN UND FAMILIEN	13
3.2	MATERIAL.....	13
3.3	METHODEN	21
4	ERGEBNISSE	37
4.1	GENOTYPISIERUNG VON PATIENTEN MIT DOMINANTER UND REZESSIVER MYOTONIA CONGENITA	37
4.2	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MUTATIONEN GLY200ARG UND TYR261CYS.....	60
4.3	DER AUSTAUSCH DER AMINOSÄURE HISTIDIN DURCH DIE AMINOSÄURE ALANIN AN DEN POSITIONEN 180, 237, 436, 451 UND 538	63
5	DISKUSSION.....	66
5.1	GENOTYPISIERUNG	66
5.2	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER GLY200ARG UND TYR261CYS MUTANTE.....	70
5.3	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER HISTIDINSUBSTITUENTEN	76
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
7	ANHANG.....	79
8	LITERATUR	82

Abkürzungen

Krankheiten:

DM	Myotone Dystrophie
HyperPP	hyperkaliämische periodische Paralyse
HypoPP	hypokalämische periodische Paralyse
MC	Myotonia congenita
PAM	Kalium-induzierte Myotonie
PC	Paramyotonia congenita
PROMM	Proximale myotone Myotonie
RGM	rezessive generalisierte Myotonie

Aminosäuren:

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Cys	Cystein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

Sonstige:

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIC-1	skelettmuskulärer Chloridkanal
CLCN-1	Chloridkanalgen
DNA	Desoxyribonukleinsäure

ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMG	Elektromyogramm
G	Guanin
m-RNA	messenger RNA
PCR	Polymerasen Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSCA	Einzelstrang-Konformations-Analyse
T	Thymin

1 Einleitung

Der Kreisphysikus Asmus Julius Thomsen berichtete 1876 in seinem Aufsatz für das „Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten“ ein „eigenthümliches Muskelleiden“, unter dem er selber zu leiden hatte, mit den Worten: „Es ist gleichsam so, als wenn das Nervenfluidum - sit venia verbo! - wenn es auf seinen Bahnen in die entsprechenden Muskeln auf den Impuls des bewussten Willen einströmen will, in diesen einem Hinderniss begegnet, und sich dann in ihnen anstaut. Es tritt dabei ein tonischer Krampfzustand in den Muskeln ein, sie fühlen sich fast steinhart an, wie es der Biceps z. B. bei musculösen Individuen willkürlich werden kann, und nur allgemach löset sich dieser Krampf“ (Thomsen 1876). Thomsen beschrieb damit das seltene Krankheitsbild der Myotonia congenita, deren dominante Vererbungsform nach ihm als die Thomsen-Myotonie bezeichnet wird.

1957 machte Becker auf eine Form der Myotonia congenita aufmerksam, die etwas von der Thomsen-Myotonie abweicht: ihr Vererbungsmodus ist rezessiv, generalisierter in der Art der Ausbreitung auf die verschiedenen Muskelgruppen und zeitweise von einer vorübergehenden Schwäche begleitet (Becker 1957). Diese Form wird deshalb als „rezessive generalisierte Myotonie“ oder als Becker-Myotonie bezeichnet.

Das Hauptsymptom beider Erkrankungen stellt die Myotonie dar, die auch bei anderen nicht-dystrophischen und dystrophen Muskelerkrankungen vorkommt.

Zu den nicht-dystrophischen Myotonien zählt neben der Thomsen- und Becker-Myotonie die Paramyotonia congenita (PC, Eulenburg), die kaliumsensitive Myotonie („potassium-aggravated Myotonie“, PAM), das seltene Schwartz-Jampel Syndrom (SJS) und fakultativ die hyperkaliämische periodische Paralyse (HyperPP, Gamstorp).

Als Myotonie wird dabei eine unkontrollierte vorübergehende Muskelsteifigkeit bezeichnet, die durch eine vorübergehende Übererregbarkeit der Muskelfasern hervorgerufen wird. Diese Übererregbarkeit wird bei den verschiedenen myotonen Krankheitsformen durch unterschiedliche Pathomechanismen hervorgerufen. Im Falle der Myotonia congenita konnte der amerikanische Pharmakologe Shirley H. Bryant bereits 1969 eine reduzierte Chloridleitfähigkeit für die Myotonie verantwortlich machen (Bryant 1969). Die im Skelettmuskel vorhandene Chlorid-leitfähigkeit von $133\mu\text{S}/\text{cm}^2$ stabilisiert normalerweise das Ruhemembranpotential in der Nähe des Chloridgleichgewichtspotentials von -80mV und trägt zur Repolarisierungsphase des Aktionspotentials bei. Wenn diese Leitfähigkeit vermindert oder überhaupt nicht vorhanden ist, kommt es am Ende eines Aktionspotentials zu einer Nachdepolarisierung, die durch eine lokale Kaliumakkumulation im T-Tubulus

hervorgerufen wird (Adrian u. Bryant 1974). Bei normal hoher Chloridleitfähigkeit führt die Anreicherung des Kaliums, das in der Repolarisierungsphase des Aktionspotential aus der Zelle austritt, zu einer unerheblichen Depolarisation des Sarkolemm von 0,1 mV pro Aktionspotential. In myotonen Fasern fehlt die ausgleichende Wirkung der Chloridkanäle und eine zehnmal stärkere Depolarisation ist die Folge. Diese Depolarisierung im T-Tubulus reicht aus, um weitere Aktionspotentialbildungen zu unterhalten.

Bei den anderen Myotonien handelt es sich einerseits um hereditäre Natriumkanalkrankheiten mit Mutationen im SCN4A-Gen für die α -Untereinheit des muskulären Natriumkanals (PC, PAM, HyperPP) und andererseits um Erkrankungen, deren Pathomechanismus noch nicht aufgeklärt ist (Übersicht bei Lehmann-Horn u. Rüdell 1996).

Seit der Erstbeschreibung durch Thomsen haben sich weltweit zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Aufklärung der seltenen Muskelerkrankung Myotonia congenita beschäftigt, trotzdem sind noch viele Fragen, unter anderem zur Struktur und Funktion des Chloridkanals, ungenügend geklärt. Einen ersten großen Fortschritt brachte die Erkenntnis, daß auch bestimmte Tierspezies unter dieser Muskelerkrankung leiden. White und Plaskett beschrieben 1904 Ziegen, die in Tennessee USA gezüchtet wurden und an Attacken von extremer Muskelsteifigkeit litten (White u. Plaskett 1904). 1939 erkannten Clark und Mitarbeiter, daß diese Ziegen unter einer Art der congenitalen Myotonie litten (Clark et al. 1939). Unabhängig voneinander wurden 1982 und 1984 zwei weitere Tiermodelle entdeckt. In Bar Harbor USA beobachteten Wissenschaftler, daß bei bestimmten Mäusen durch Erschütterung des Käfigs eine vorübergehende Muskelsteifigkeit der Hinterbeine ausgelöst wurde. Sie führten eine Elektromyographie der betroffenen Muskeln durch und konnten myotone Entladungssalven nachweisen. Daraufhin wurden diese Mäuse mit „MTO“, als Abkürzung für Myotonie bezeichnet (Heller et al. 1982). In London beobachteten Wissenschaftler Mäuse, die zeitweise Schwierigkeiten hatten, sich selber aus der Rückenlage aufzurichten. Diese Mutanten wurden „ADR-Mäuse“ benannt, eine Abkürzung für „arrested development of righting response“ (Watkins und Watts 1984).

Mit Hilfe dieser Tiermodelle konnten viele Zusammenhänge geklärt werden. 1973 verwendete der bereits erwähnte Pharmakologe Shirley H. Bryant Interkostalmuskeln einer myotonen Ziege für seine berühmten elektrophysiologischen Untersuchungen. Er konnte dabei nicht nur nachweisen, daß die Stabilität des Ruhemembranpotentials der myotonen Muskelfasern durch eine reduzierte Chloridleitfähigkeit gestört ist (Bryant 1973), sondern auch dazu beitragen, die Rolle des tubulären Systems beim Aufbau des Aktionspotentials zu

klären (Adrian und Bryant 1974). Am Tiermodell der myotonen Maus (ADR) zeigten Füchtbauer et al. 1988 durch Transplantationsversuche, daß es sich bei dieser Störung um eine intrinsische Muskelerkrankung handelt und nicht um eine Folge einer neurogenen Störung (Füchtbauer et al. 1988). Durch elektrophysiologische Studien konnte Bryant für die MTO-Maus und Mehrke für die ADR-Maus nachweisen, daß wie bei der myotonen Ziege eine Erregungsstörung ausgelöst durch eine reduzierte Chloridleitfähigkeit, vorliegt (Bryant et al. 1987, Mehrke et al. 1988).

Eine elektrophysiologische Identifizierung und Charakterisierung des für die hohe Leitfähigkeit verantwortlichen Chloridkanals stellte sich als sehr schwierig heraus. Durch Einzelkanalmessungen an menschlichen Myotuben konnte Fahlke 1992 drei verschiedene Typen von Chloridkanälen identifizieren (Fahlke et al. 1992). Leider konnte keiner von ihnen für die hohe Leitfähigkeit verantwortlich gemacht werden. Ähnlich erging es den Mitarbeitern von Burton und Költgen (Burton et al. 1988; Költgen et al. 1991).

Zur selben Zeit wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden intensiv an der Aufklärung der Myotonia congenita gearbeitet. Bereits 1986 konnten Jockusch und Bertram durch Kreuzung der ADR- und MTO-Maus zeigen, daß es sich um Störungen handelt, die sich auf dem selben Gen befinden (Jockusch et al. 1986). Nachdem es nicht gelang den Chloridkanal mittels blockierender Reagenzien zu identifizieren, versuchte die Wissenschaftliche Mitarbeiter von Thomas Jensch einen anderen Weg. Sie nutzen das von Miller und Richard vorgestellte Modell des Zitterrochen *Topedo californica* (Miller u. Richard 1990). Das elektrische Organ dieses Zitterrochen ist mit einem spannungsabhängigen Chloridkanal ausgestattet, der in großen Mengen exprimiert wird. Nachdem die gesamte m-RNA des elektrischen Organes des verwandten Zitterrochens *Torpedo marmorata* isoliert worden war, konnte diese fraktioniert in Froschoozyten exprimiert werden. Aufgrund der Größe der m-RNA Fraktion mit erhöhter Leitfähigkeit wurde die Methode der indirekten Expressionsklonierung ausgewählt, um nach dem entsprechenden Gen zu suchen. Ausgehend von dieser m-RNA wurde eine c-DNA Bibliothek in Plasmiden erstellt. Einzelsträngige DNA dieser Bibliothek wurde dann dazu benutzt, die Expression von m-RNA in Froschoozyten zu unterdrücken. Der Klon, welcher die Erbinformation des gesuchten Kanals besitzt, unterdrückt die Expression und ist durch eine Reduktion oder Auslöschung der Ströme erkennbar. 3000 Klone mußten ausgetestet werden, bis sich endlich der gewünschte Erfolg einstellte. Die Primärstruktur des gesuchten Chloridkanals wurde bestimmt und unterschiedliche elektrophysiologische und biochemische

Untersuchungen vorgenommen. Unter anderem wurde mit Hilfe von Hydrophobizitätsstudien das erste Modell des Chloridkanalmonomers des Zitterrochens entworfen (Jentsch et al. 1990). Diese Veröffentlichung stellte die Basis für viele weitere Untersuchungen dar. Durch homologes Screening konnten mit Hilfe dieser Information die Chloridkanalgene in der Skelettmuskulatur von Ratte und Maus identifiziert werden (Steinmeyer et al. 1991). Durch weiterführende Arbeiten wurde schließlich das Gen des humanen Chloridkanals CIC-1 identifiziert und lokalisiert. Das Chloridkanalgen (CLCN-1) setzt sich aus 23 Exons, die insgesamt 2964 Basenpaare umspannen, zusammen. Es codiert für ein Protein mit einer Länge von 988 Aminosäuren und befindet sich auf Chromosom 7q35 (Koch et al. 1992). Weitere Untersuchungen zeigten eine Segregation des CIC-1 Locus sowohl mit der dominanten als auch mit der rezessive Form der congenitalen Myotonie (Abdalla et al. 1992; Koch et al. 1992).

Damit war die Grundlage für die Mutationssuche im Chloridkanalgen für die dominante und die rezessiven Form der Myotonia congenita geschaffen. Die erste Mutation wurde von Koch und ihren Mitarbeitern beschrieben. Es handelt sich um eine Substitution eines Phenylalanins in Position 413 durch ein Cystein bei einer Familie mit rezessiver congenitaler Myotonie (Koch et al. 1992). Mittlerweile haben sich zahlreiche Laboratorien unter anderem in Nashville Tennessee USA (George et al.), Marburg (Koch et al.), Hamburg (Jentsch et al.) und in Ulm (Lehmann-Horn et al.) erfolgreich mit der Mutationssuche beschäftigt.

Fünf dominante, 30 rezessive Mutationen und zwei Mutationen, die sowohl als rezessiv als auch als dominant beschrieben wurden, sind bislang bekannt. Die beschriebenen dominanten Mutationen sind extrem selten und wurden bisher nur jeweils in einer Familie gefunden. Die beschriebenen rezessiven Mutationen können in zwei Gruppen unterteilt werden. Eine kleinere Gruppe von Mutationen, die häufiger vorkommen, dazu zählen die Mutationen F413C, A415V und die 14 Basen Deletion 1437-1450. Und eine größere Gruppe von rezessiven Mutationen die sehr selten beschrieben wurden. Am häufigsten wurde bisher die Stopp-Mutation in Position 894 beschrieben, die wie die G230L Mutation eine Zwischenstellung zwischen dominanter und rezessiver Mutation darstellt (Übersicht über diese Mutationen bietet die Tabelle 1 am Ende der Einleitung).

Inzwischen gehört der Nachweis bestimmter Mutationen bereits zur Routineuntersuchung und dient der Diagnosesicherung und der genetischen Beratung.

Ein weiterer Schwerpunkt der Forschung, der auch in Zukunft einen wichtigen Platz einnehmen wird, stellt die Aufklärung der Funktion und Struktur des Chloridkanals dar. Der Chloridkanal wurde 1991 von Steinmeyer in Froschoozyten (Steinmeyer et al. 1991) und von Pusch und Fahlke in menschlichen embryonalen Nierenzellen exprimiert (Pusch u. Jentsch 1994; Fahlke u. Rüdell 1995).

Der Chloridkanal leitet über den gesamten physiologischen Spannungsbereich. Durch Depolarisierung wird der Chloridkanal aktiviert und durch Hyperpolarisierung deaktiviert. Die Einzelkanalleitfähigkeit ist sehr gering und wurde durch Rauschanalyse auf ca. 1pS geschätzt. Die hohe Gesamtchloridleitfähigkeit ist nur durch eine relativ große Dichte von Chloridkanälen im Sarkolemm erklärbar (Pusch et al. 1994). Die Kanalaktivität kann durch extrazelluläre Exposition mit Jod und niedrigen Konzentrationen von 9-Anthrazen-Carbonsäure geblockt werden (Pusch u. Jentsch 1994, Palade u. Barchi 1977). Zwei kontroverse Theorien über den Aufbau des Chloridkanals aus Monomeren stehen zur Diskussion: Steinmeyer und Mitarbeiter folgerten aus elektrophysiologischen Messungen der Mutanten Gly-230-Glu und Pro-480-Leu, daß der Kanal aus vier Untereinheiten aufgebaut ist (Steinmeyer et al. 1994). Middleton beschrieb, begründet auf seine Untersuchungen über Sedimentationseigenschaften, ein dimeres Protein (Middleton et al. 1996). Neuere Ergebnisse unterstützen das Modell des dimeren Moleküls (Fahlke und Knittle et. al. 1997, Schmidt-Rose u. Jentsch 1997). Die Erforschung des Aufbaus der Untereinheit ähnelt einem Puzzle, bei dem viele kleine Bausteine von verschiedenen Wissenschaftlern zusammengetragen und von Zeit zur Zeit neu geordnet werden. Das aktuelle Modell der Chloridkanaluntereinheit nach Schmidt-Rose besteht aus 11 transmembranären, einer extrazellulären (D4) und einer intrazellulären Domäne (D13), die durch hydrophile Aminosäurenketten miteinander verbunden werden (siehe Abbildung 1) (Schmidt-Rose u. Jentsch 1997).

Tab. 1: Mutationen im Chloridkanalgen CLCN-1

dominante Mutationen:

Aminosäure-austausch	Mutation	Exon	Anzahl der beschriebenen Familien ¹	Erstveröffentlichung
Gly200Arg	G598A	5	1	Mailänder et al. 1996
Ile290Met	C870G	8	1	Lehman-Horn et al. 1995
Arg317Glle	G950A	8	1	Meyer-Kleine et al. 1995
Pro480Leu	C1439T	13	1	Steinmeyer et al. 1994
Gln552Arg	A1655G	15	1	Lehmann-Horn et al. 1995

rezessive Mutationen:

Aminosäure-austausch	Mutation	Exon	Anzahl der beschriebenen Familien ¹	Erstveröffentlichung
Gln74Stop	C220T	2	1	Mailänder et al. 1996
Arg105Cys	C313T	3	1	Meyer-Kleine et al. 1995
Asp136Gly	A407G	3	2	Heine et al. 1995
Tyr150Cys	A449G	4	1	Mailänder et al. 1996
Gln160His	G480C	4	1	Promotionsarbeit Mailänder
Val165Gly	T494G	4	1	Meyer-Kleine et al. 1995
Phe167Leu	C501G	4	1	George et al. 1995
194 Stop	T518 Del	4	1	Promotionsarbeit Mailänder
Tyr261Cys	A782G	7	1	Mailänder et al. 1996
Thr268Met	C793G	7	1	Promotionsarbeit Mailänder
Glu 291Lys	G871A	8	3	Meyer-Kleine et al. 1995
Arg300Stop	C898T	8	1	George et al. 1994
Val327Gln	G979A	8	1	Lorenz et al. 1994
Ile329Thr	T986C	9	1	Meyer-Kleine et al. 1995 George et al. 1994
Arg338Gln	G1013A	9	1	George et al. 1994
Gly355Arg	G1063A	9	1	Promotionsarbeit Mailänder
387Stop	2Bp Del 1095-1096	10	1	Meyer-Kleine et al. 1995
Phe413Cys	T1238G	11	21	Koch et al. 1992

Aminosäure- ausTausch	Mutation	Exon	Anzahl der beschriebenen Familien ¹	Erstveröffentlichung
Ala415Val	C1244T	11	6	Mailänder et al. 1996
429Stop	1262ins C	12		Meyer-Kleine 1994
433Stop	4 Bp Del 1282-1285	12	2	Heine et al. 1995
503 Stop	14 Bp Del 1437-1450	13	15	Meyer-Kleine et al. 1994
Gly482Arg	G1444A	13	2	Meyer-Kleine et al. 1995
Met485Val	A1453G	13	1	Meyer-Kleine et al. 1995
Splice-Mutation	G1471+1A	13	3	Meyer-Kleine et al. 1995
Ala493Glu	C1478A	14	4	Promotionsarbeit Mailänder
Arg496Ser	G1488T	14	1	Lorenz et al. 1994
Gly859Asp	G2576G	22	1	Promotionsarbeit Mailänder

Mutationen, die sowohl bei dominanten als auch bei rezessiven Erbgang gefunden wurden:

Aminosäure- austausch	Mutation	Exon	Anzahl der beschriebenen Familien ¹	Erstveröffentlichung
Gly230Glu	G689A	5	3	George et al. 1993
Arg894Stop	C2680T	23	27	George et al. 1994 Meyer-Kleine et al. 1995

Zusammengefaßt sind die Ergebnisse aus folgenden Veröffentlichungen: Koch et al. 1992, George et al. 1993, George et al 1994, Lorenz et al. 1994, Meyer-Kleine et al. 1994, Meyer-Kleine et al. 1995, Steinmeyer et al 1994, Heine et al. 1995, Mailänder et al. 1996, Mailänder V: Mutationen des Chloridkanalgens CLCN-1 bei Patienten mit Myotonia congenita. Med Dissertation, Universität Ulm, 2000;

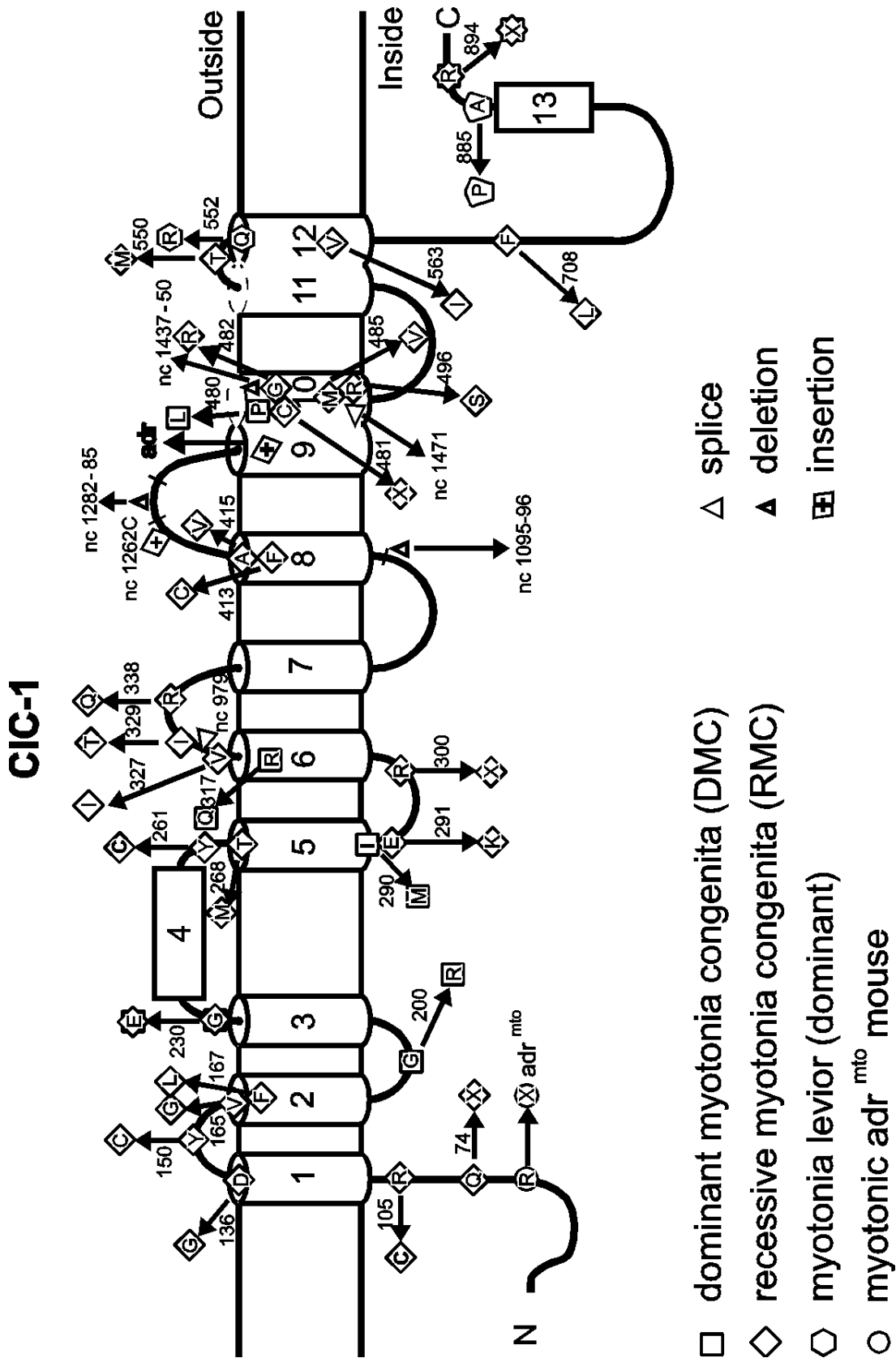


Abb. 1: Schema des Chloridkanals CIC-1 (modifiziert nach Schmidt-Rose u. Jentsch. 1997), sowie die Lokalisation der bekannten Aminosäure-Substitutionen;

2 Zielsetzung

Aufbauend auf die vorhergehenden wissenschaftlichen Arbeiten von Heine und Mailänder (Abteilung Angewandte Physiologie, Universität Ulm), die eine Vielzahl von Mutationen (3 dominante und 12 rezessive) im CLCN-1 Gen beschreiben konnten, wurden in dieser Arbeit folgende Ziele verfolgt:

1. Können bekannte Mutationen im vorhandenen Patientenkollektiv nachgewiesen werden?
2. Gibt es weitere Mutationen im CLCN-1 Gen?
3. Sind die von Heine und Mailänder gefundenen Mutationen Gly200Arg und Tyr261Cys tatsächlich krankheitsverursachend?
4. Können durch die elektrophysiologische Charakterisierung der Mutanten Gly200Arg und Tyr261Cys weitere Erkenntnisse zur Membrantopologie und zur Struktur-Funktions-Beziehung des Chloridkanals ClC-1 gewonnen werden?
5. Können durch die Substitution von bestimmten Histidinen durch Alanin weitere Hinweise auf die Struktur und Funktion des Chloridkanals gewonnen werden?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten und Familien

Insgesamt 43 Patienten mit Symptomen einer Myotonia congenita wurden untersucht. Zur Genotypisierung wurde EDTA-Blut der Patienten und möglichst vieler Familienmitglieder verwendet. Die Patienten sowie ihre ebenfalls erkrankten und gesunden Familienmitglieder wurden je nach Verfügbarkeit und Bereitschaft klinisch untersucht.

3.2 Material

3.2.1 EDTA-Blut

Das EDTA-Blut wurde bis zur DNA-Extraktion bei -20°C gelagert.

3.2.2 Eukaryontische Zellen

Für die Expressionsexperimente des Chloridkanals wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) eingesetzt. Die Zellen stammten von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA (ATCC Nr. CRL 1573, Batch Date 09.01.1992, Passage 31).

3.2.3 Bakterien

Escherichia-coli Bakterien des Stammes DH5 α und JM 109 (Life Technologies GmbH, Eggenstein) wurden für die Plasmidvermehrung benutzt.

3.2.4 Plasmide

Zur Expression des Chloridkanals in Zellen wurden zwei verschiedene Plasmide eingesetzt: das Plasmid pRC-CMV (Invitrogen Corporation, Can Diego, USA) für die HEK-Zellen und das Plasmid pSP64T für die Xenopus Oozyten. Die Mutagenese erfolgte unter Einsatz des Plasmid p-Alter. In alle drei Plasmide wurde das Chloridkanalgen CIC-1 oder Teile davon kloniert. Die Klonierungen wurden größtenteils im Labor von Alfred L. George, Nashville, Tennessee, USA durchgeführt.

3.2.5 Primer

Für die Amplifikation der spezifischen Abschnitte des CIC-1 Gens wurden uns die Sequenzinformationen von Alfred L. George, Nashville, Tennessee, USA, zur Verfügung gestellt. Weitere Oligonukleotidsequenzen für die PCR sowie für die Mutagenese wurden mit Hilfe des Primerentwicklungsprogramms Oligo 4,0 konstruiert. Synthetisiert wurden die Primer von den Firmen MWG Biotech, Ebersberg, und Interactiva, Ulm. Die Primer, die für die PCR-SSCA eingesetzt wurden, sind im Anhang unter VII.1 aufgelistet. Die in der anschließenden Tabelle aufgeführten, für die Mutagenese eingesetzten Primer unterscheiden sich von der Originalsequenz in den fett gedruckten Nukleotiden. Durch diesen Basenaustausch wird die gewünschte Mutation eingeführt. Weiterhin ergeben sich aufgrund dieser Sequenzänderungen die in der Tabelle ebenfalls angegebenen neuen Restriktionsschnittstellen.

Tab. 2: Mutagenese-Primer:

Mutation	Primer und eingeführte Restriktionsschnittstelle	Restriktions-enzym
Gly200Arg	ATT CCT TCA GGA CAA CCC TAC GTA GTA TTG	Eco105I
His237Ala	GAT GCT GGC AAT CGC GAC GAA GGG GCC C	Bsp68I
Tyr261Cys	GTA TAT GAG CAG CCA TGC TAC TAC TCT G CAT ATA CTC GTC GGT ACG ATG ATG AGA C	
His180Ala	CGC CCT CTT CTG CGC GCT CAT CTC TCC CC GCG GGA GAA GAC GCG CGA GTA GAG AGG GG	BssHII
His436Ala	CAA TAC ATG GGT GAA AGC CGC GGG TGA TC GTT ATG TAC CCA CTT TCG GCG CCC ACT AG	SacII
His480Ala	CTG TGT GGA TTG CCC CGC GGG TCA ACG GAC ACA CCT AAC GGG GCG CCC AGT TGC	SacII
His538Ala	CTG GTG CCG TCT CCG CCA CAG TCT CC GAC CAC GGC AGA GGC GGT GTC AGA GG	Esp3I

3.2.6 Spezielle Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Bezugsquellen
Autoklav: Vario Typ 300 und 500	H&P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Brutschränke: CO ₂ -Brutschrank Jouan IG150 mit CO ₂ -Umschalter Low 150 Jouan EB/EU 280	Jouan GmbH, Unterhaching Jouan GmbH, Unterhaching
Bilderfassungssystem: Cypertech CS-1	Cybertech GmbH, Berlin
Elektrophorese: Flachbett: GNA 100 und GNA 200 Vertikal: Protean II, kühlbar und Mini- Protean	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Filme: Kodak X-OMAT AR 5	Eastman Kodak Company
Nunclon Gewebekulturflaschen 50 ml	Nunc GmbH Wiesbaden Bieberich
Nunclon Zell und Gewebekulturschalen 12 mm ² 8,8 cm ²	Nunc GmbH Wiesbaden Bieberich
Mikroskop: Televal 31	Zeiss, Jena
Petrishalen für Bakterien 35mm Durchmesser	Nunc GmbH Wiesbaden Bieberich
PH-Meter: WTW pH 530	WTW, Weilheim
Photometer: Ultraspec III	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten: Gilson Pipetman P2, P20, P100, P200, P1000	Abimed GmbH, Langenfeld
Pipettenspitzen mit Sterilfilter	Biozym GmbH, Hess. Oldendorf
Rührer, Schüttler und Vortex: Ikamag REO, VF 2, MTS 2	Janke und Kunkel GmbH, Staufen Bender und Hobein, Bruchsal
Malta Celloshaker	
Sequenziergerät: ABI 373 A	Applied Biosystems, Weiterstadt
Sicherheitswerkbänke: Typ 6.12S und 6.15S	BDK, Sonnenbühl-Gerkingen
Spannungsgeber: EPS 500/400 und 3000/150	Pharmacia Biotech, Freiburg
Temperaturblock: Stuart Scientific SHT 10	Bender und Hobein, Bruchsal
Thermocycler: Hybaid Omnigene	MWG Biotech, Ebersbach
Bio-med Thermocycler 60	Bachhofer, Reutlingen
Tiefkühlschrank: VX 530	Jouan GmbH, Unterhaching
UV-Illuminator	Bachhofer, Reutlingen
Waagen: BS 2100S und BA 210S	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus GmbH, Karlsruhe
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
EBA 8s	Hettich, Tuttlingen
MR 1812	Jouan GmbH, Unterhaching
Sorvall RC 5B mit Rotor SS 34	Du Pont, Bad Homburg

3.2.7 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Fluka, Merck, Serva, Sigma und United States Biochemicals in der Qualität „pro Analysis“ (p.A.) oder „für Molekularbiologie“ bezogen:

Chemikalien und Medien	Bezugsquelle
Arcylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fertiggemische Protogel und Sequagel 6	National Diagnostics über Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorff
Agar	Life Technologies GmbH, Eggstein
Agarose Low EEO	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Sea KEM LE	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Alconox Detergenz	Aldrich über Sigma Chemie GmbH
Bakto Tryptophan	Life Technologies GmbH, Eggstein
Bakto Yeast Extrakt	Life Technologies GmbH, Eggstein
Bromphenolblau Na-Salz	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu- Ulm
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
DNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dCTP	Pharmacia Biotech, Freiburg, und Boehringer, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Etidiumbromid	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu- Ulm
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Formamid	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Life Technologies GmbH, Eggstein
Glycerin, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu- Ulm
HEPS-Puffer	Gibco, Life Technologies GmbH, Eggstein
Ionenaustauscher AG 501-X8	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MEM-Medium nach Eigel mit Earle Salzen und L-Glutamin	Gibco, Life Technologies GmbH, Eggstein
Natriumchlorid	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu- Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu- Ulm

Chemikalien und Medien	Bezugsquelle
Nonidet P40 (NP 40)	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm
Parafinöl	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm
PBS	Life Technologies GmbH, Eggstein
TEMED N,N,N',N',Tetramethylethylen-diamin	Serva Feinbiochemika GmbH + CoKg, Heidelberg
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol)	United States Biochemicals über Amersham Bucher GmbH, Braunschweig
Trypsin	Gibco, Life Technologies GmbH, Eggstein

3.2.8 Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen stammen von folgenden Firmen: Boehringer (Mannheim), MBI Fermentas (St.Leon-Rot) New England Biolabs (Schwalbach) und Pharmacia Biotech (Freiburg). Es wurden die mitgelieferten zehnfach konzentrierten Puffer für die Reaktionsansätze verwendet. Abgesehen von Restriktionsenzymen wurden folgende Enzyme verwendet:

Enzym	Firma
DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i> (Taq-Polymerase)	Pharmacia Biotech, Freiburg
T4-DNA-Ligase	Pharmacia Biotech, Freiburg

3.2.9 Kits

Altered Sites in vitro Mutagenesis System von Promega, über Serva Feinbiochemica GmbH & CoKG; Heidelberg;

Der Kit enthält: pAlter-1-DNA
Ampicillin Repair Oligonukleotide
Annealing-Puffer: 200mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM MgCl₂,
500mM NaCl
Synthesis-Puffer: 100mM Tris-HCl, pH 7,5 , 5mM dNTPs,
10mM ATP, 20mM DTT
T4 DNA Polymerase
T4 DNA Ligase
R408 Helper Phage

Dye-Desoxy-Terminator-Kit von Applied Biosystems, Weiterstadt, zur Sequenzierung.

Der Kit enthält: Premix (Puffer, Taq-Polymerase, dNTP's, farbstoffmarkierte ddNTPs)

Jetstar-Plasmid-Midi-Präparations-Kit von Genomed GmbH, Bad Oeynhausen

Der Kit enthält:	Solution E1	50mM Tris-HCl pH 8,0,
	Cell Resuspending	10mM EDTA
	Solution E2 Cell Lysis	200mM NaOH, 1% SDS
	Solution E3 Neutralisation	3,1M Kaliumacetat pH 5,5
	Solution E4 Equilibration	600mM NaCl, 100mM Natriumacetat pH 5,5, 0,15% TritonX-100
	Solution E5 Waschpuffer	800mM NaCl, 100mM Natriumacetat pH 5,5
	Solution E6 Elution	1250mM NaCl, 100mM Tris pH 8,5
	Midi-Columns	Säulen zur Aufreinigung

Qiaex-Kit von Qiagen GmbH, Hilden, zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelmatrix

Der Kit enthält:	Puffer QX1	3M NaI, 4M NaClO ₄ , 5mM Tris/HCl pH 7,5
	Puffer QX2	8M NaClO ₄
	Puffer QX3	70% Ethanol, 100mM NaCl, 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 7,5
	Qiaex	Matrixpartikel

Qiaprep-Kit von Qiagen GmbH, Hilden, für die Minipreparation von Plasmiden

Der Kit enthält:	Puffer P1	zur Resuspendierung von Zellen
	Puffer P2	für die Lyse der Zellen
	Puffer N3	zur Neutralisation
	Puffer PB	zum Waschen der Säule
	Puffer PE	zum Waschen der Säule
	RNase	Abau von RNA
	Collection Strip Tube	Säulen zur Aufreinigung
Elution mit	TE-Puffer	

Qiaprep Spin M13 Kit von Qiagen GmbH, Hilden, zur Aufreinigung von einzelstängiger Phagen DNA

Der Kit enthält:	M13 Präzitationspuffer
	M13 Lysis und Binding Puffer
	PE Waschpuffer
	Qiaprep spin Säulen

Qiaquick-Kit von Qiagen GmbH, Hilden zur Aufreinigung von PCR-Produkten

Der Kit enthält:	Puffer PB	Puffer mit hoher Salzkonzentration
	Puffer PE	zum Waschen der Säule
	Qiaquick spin column	Säulen

Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit

Der Kit enthält:	Pfu DNA Polymerase	2,5U/μl
	Reaktionspuffer	10X
	DpnI	10U/μl
	dNTP	10mM
	superkompetente Zellen	Coli XL1-Blue

3.2.10 Puffer und Lösungen

Acrylamidlösungen 30%, 49:1	29,4g Acrylamid, 0,6g Bisacrylamid in 100ml Aqua bidest
Agarplatten	100ml LB-Medium + 1,5g Agar
Ampicillin 1000X	50mg in 1ml Aqua bidest
Blue Sucrose Lösung	30% Sucrose, 0,25% Bromphenolblau, 50mM EDTA in Aqua dest, pH 7,6
DNTP-Mix 100X	25mM dATP, 25mM dCTP, 25mM dGTP, 25mM dTTP in Aqua bidest, pH 7,5
DTT-Lösung 0.2 M	308mg DTT in 10ml Aqua bidest lösen + 33μl 3M Na-acetat pH 5,2; sterilfiltrieren
Ethidiumbromidlösung 1000X	15mg in 1ml Aqua bidest

HEPS-Puffer 2X	280mM NaCl, 40mM Hepes, 10mM KCl, 1,4mM Na ₂ HPO ₄ in Aqua bidest
LB-Medium	10g Tryptone, 10g Yeast Extract, 5g NaCl in Aqua dest mit NaOH auf pH 7,5
PBS	8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na ₂ HPO ₄ , 0,24g KH ₂ PO ₄ in 1l Aqua bidest, pH 7,4
Phagenpräzipitationspuffer	3,75M Ammoniumacetat pH 7,5, 20% Polyethylenglycol (MW 8,000)
PCR-Puffer 10X	500mM KCl, 15mM MgCl, 100mM Tris/HCl, in Aqua bidest pH 9,0
SSCA-Ladepuffer	40% Sucrose, 0,05M Tris pH 8,0, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol in Aqua bidest
TBE-Puffer	89mM Tris, 89mM Borsäure, 2mM EDTA, in Aqua dest
TE-Puffer	10mM Tris/HCl, 1mM EDTA in Aqua dest pH 7,6
TKM1-Puffer	10mM Tris, 10mM KCl, 10mM MgCl, 2mM EDTA in Aqua bidest pH 7,6
TKM1-Puffer	TKM1 + 0,4M NaCl
Transformationspuffer A	10mM MOPS, pH 6,5, 10mM Rubidium Chlorid
Transformationspuffer B	100mM MOPS, pH 6,5, 50mM Calciumchlorid, 10mM Rubidiumchlorid,
TYP-broth Medium	16g Tryptone, 16g Yeast Extrakt, 5g NaCl, 2,5g K ₂ HPO ₄

3.3 Methoden

3.3.1 Extraktion genomischer DNA aus EDTA-Blut

Zur Extraktion genomischer DNA aus kernhaltigen Leukozyten in gefrorenem EDTA-Vollblut (Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure) wurde die Salzpräzipitationsmethode von Miller et al. 1988 leicht abgewandelt. Drei ml aufgetautes Vollblut wird mit 9ml Aqua Bidest hämolysiert und für 10 Minuten bei 2200g zentrifugiert. Das Pellet, welches sich aus Leukozyten, Thrombozyten und Zellfragmenten der Erythrozyten zusammensetzt, wird mit 7ml einer 0,1% Nonidet P40-Lösung gewaschen, um überschüssige Zellfragmente zu entfernen. Durch Resuspendierung des Pellets in 3ml TKM1 und Zugabe von 37,5µl 100% Nonidet P40 werden vorhandene Zellmembranen zerstört. Nach zehn Minuten Zentrifugation bei 500g wird das Pellet mit 3ml TKM2 gewaschen. Durch Zugabe von 480µl TKM2 und 30µl 10% Natriumdodecylsulfat werden die vorhandenen Proteine

denaturiert und durch die folgende Zugabe von 180µl 6M NaCl-Lösung präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 1000g wird die DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 2,5Vol. 100% Ethanol ausgefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer gelöst. Die Konzentration wird durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt (Sambrook et al. 1989). Die Reinheit wurde durch den Quotienten OD260/OD280 ermittelt. Es werden nur solche DNA-Präparationen verwendet, die einen Quotienten von 1,7 bis 1,9 haben.

3.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonucleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden werden. (Mullis u. Faloona 1987, Saiki et al.1988). Durch zyklische Temperaturänderungen werden immer wieder drei Stadien durchlaufen: Denaturierung, Annealing, Elongation. Während der Denaturierung trennt sich die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge bei einer Temperatur knapp unterhalb des Siedepunktes auf. Als Annealing wird die Anlagerung der Primeroligonukleotide an den jeweiligen Strang bezeichnet. Die Annealingtemperatur ist primerspezifisch. In der Phase der Elongation findet die Synthese eines neuen komplementären Stranges an das angeheftete Starteroligonukleotid durch eine DNA-Polymerase statt. Die Verwendung einer extrem hitzebeständigen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), die im Denaturierungsschritt nicht zerstört wird, ermöglicht die einzeitige Zugabe des Enzyms und damit einen automatischen Reaktionsablauf in einem programmierbaren Wasserbad (Thermocycler).

Ein üblicher Standard-PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

PCR-Puffer 10X	10 µl
dNTP-Mix 100X	1 µl
Primer F	50 pmol
Primer R	50 pmol
Matrizen-DNA	100 ng
Taq-Polymerase	1,5 U
Aqua bidest	ad 100 µl

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Aerosole wird der Reaktionsansatz an einer sterilen Werkbank mittels Einmalspitzen mit Sterilfiltereinsätzen pipettiert. Durch Überschichten mit Paraffinöl wird ein Verdunsten der Probe verhindert. Jeder PCR-Ansatz wird durch Negativkontrollen (ohne Matrizen-DNA) und, soweit vorhanden, mit Positivkontrollen (Matrizen-DNA mit bekanntem mutiertem Allel) überprüft. Für die PCR-Amplifikation wird folgendes Standardprotokoll verwendet:

Zyklus	Denaturierung	Anlagerung	Elongation
0	96°C, 10 min		
1-30	94°C. 30 sec	X°C. 45 sec	72°C, 1 min
31			72°C. 5 min

Die Taq-Polymerase wird nach dem ersten Denaturierungszyklus (Zyklus 0) hinzugegeben (Hotstart). Die Anlagerungstemperatur (°C) wird mit Hilfe des Programms „Oligo“ berechnet und durch Test-PCRs optimiert (siehe Anhang VIII). Bei geringer Ausbeute unter diesem Standardprotokoll wird die Anzahl der Vermehrungszyklen auf 35 Zyklen erhöht.

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Standardverfahren der Molekularbiologie zur Auftrennung von DNA im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie Größe der DNA, Konformation, Agarosekonzentration und Pufferbedingungen. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wird Agarose in Konzentrationen von 0,8 bis 2% in 1x TBE-Puffer eingewogen, aufgekocht und nach Abkühlung auf 50 bis 60°C in eine Flachbettkammer gegossen (Sambrook et al. 1989 a). Unter Zusatz von 1/10Volumen Blue Sucrose-Lösung werden die DNA-Proben auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese in TBE-Puffer werden die

Gele 20 bis 30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (15 mg Ethidiumbromid/l) inkubiert. Durch Anregung mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 312 nm kann die DNA durch den Farbstoff sichtbar gemacht werden kann. Die Ergebnisse werden mit Hilfe eines Bilderfassungssystems dokumentiert.

3.3.4 Polyacrylamidgelelektrophorese

In Gegenwart freier Radikale wie Ammoniumpersulfat (APS) und Stabilisatoren wie Tetraethylendiamin (TEMED) polymerisieren Acrylamidmonomere zu langen Ketten, welche durch N,N'-Methylenbisacrylamid zu einem Gel vernetzt werden (Sambrook et al. 1989b). Dieses Gel kann wie Agarose als Matrix zur Auftrennung von DNA dienen. Verwendet werden Acrylamidgele in Konzentrationen von 5 bis 12 %, mit einem Mischungsverhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylbisacrylamid von 29:1 bis 49:1 in 0,5fach konzentriertem TBE-Puffer. 100 ml Gellösung werden mit 750 µl APS und 80 µl TEMED versetzt und zwischen zwei mit Isopropanol und Äthanol gereinigte Glasplatten gegossen. Unter Zusatz von ¼ Volumen SSCA-Ladepuffer werden die Proben auf das Gel aufgetragen und aufgetrennt. Nach der Elektrophorese in 0,5fach konzentriertem TBE-Puffer werden die Gele ebenfalls 20 bis 30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter UV-Licht betrachtet.

3.3.5 Einzelstrang-Konformations Analyse (SSCA)

Die SSCA ist eine besondere Art der Gelelektrophorese, mit der sich Mutationen nachweisen lassen (Orita et al. 1989). Dabei wird einzelsträngige DNA in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das PCR-Produkt wird durch Inkubation bei 96°C denaturiert und durch sofortiges Abkühlen in diesem Zustand konserviert. Im Gel renaturiert die DNA und bildet innerhalb des Einzelstranges sequenzspezifische Basenpaarungen. Eine Änderung in der Sequenz bewirkt somit eine Veränderung der Basenpaarung und damit eine Veränderung der Konformation. Diese veränderte Konformation bewirkt eine andere Lauf-eigenschaft des mutierten Einzelstranges im Vergleich zum nicht mutierten Strang. Die Sensitivität ist am höchsten, wenn ca. 150Bp lange DNA-Fragmente verwendet werden (Sheffield et al. 1993). Das PCR-Produkt wurde für die SSCA mit Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 30µl Aqua bidest

gelöst. Hiervon wurden 6µl mit 1,5µl SSCA-Ladepuffer gemischt, für 3 Minuten bei 96°C denaturiert und sofort in einem Eiswasserbad abgekühlt. Nach 10 Minuten wurde die denaturierte Probe kurz zentrifugiert und auf ein 5% Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach einem 1,5 stündigen Vorlauf wurde die Elektrophorese bei 4°C, 300 V Spannung in 0,5x TBE-Puffer für 3 bis 5 Stunden durchgeführt. Um eine Temperatur von 4°C konstant zu halten, wurde die Elektrophorese in einer mit Wasser gekühlten Apparatur durchgeführt (Protean II, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) .

3.3.6 Restriktionanalyse zum Nachweis von Mutationen

Restriktionsenzyme sind Nukleasen, die sequenzspezifisch DNA schneiden. Durch eine Mutation kann eine solche Erkennungssequenz verändert werden, so daß eine Schnittstelle wegfallen oder eine neue Schnittstelle entstehen kann. Zum Nachweis von Mutationen werden folgende Restriktionsenzyme verwendet: AatII, AluI, AseI, BspHI, BsrI, BssHII, Eco130I, Fnu4H, Ksp632I, NlaIII, PstI, SbfI, TaqI, ThaI.

Für die Restriktionsanalyse wird das Amplikon nach der PCR mit Ethanol gefällt und in 89µl Aqua bidest gelöst sowie mit 10µl 10fach Reaktionspuffer und 1µl Restriktionsenzym (5 bis 10U) versetzt. Nach drei- bis vierstündiger Inkubation bei dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms werden die Proben hitze-inaktiviert, mit Ethanol gefällt und in 30 µl Aqua bidest gelöst. Anschließend werden die Proben auf ein Agarosegel oder ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger und Mitarbeitern 1977 beschriebenen Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Amplifikation des Zieltemplates mit einer Mischung aus unveränderten Mononukleotiden (ATP, CTP, GTP, TTP) und veränderten, farbstoffmarkierten Didesoxy-Nukleotiden mit Hilfe einer Taq-Polymerase. Diese Didesoxy-Nukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) werden ganz normal in die Kette eingebaut, können aber keine Phosphordiesterbrücke mit dem nächsten anzuhängenden Nukleotid bilden. Sie führen deshalb zu einem Kettenabbruch. Das Ergebnis einer solchen Amplifikation ist eine Mischung aus DNA-Bruchstücken, jeweils von einem markierten Didesoxy-Nukleotid terminiert. Die Verwendung von vier verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen, spezifisch für die jeweilige Base, läßt die Auftrennung eines Produktes unter denaturierenden Bedingungen in einer Spur zu. Das Polyacrylamidgel, welches die Sequenzierungsreaktion auftrennt, wird von einem automatischem Sequenziergerät (ABI 373A) gelesen und in die entsprechende Sequenz umgeschrieben.

Die Sequenzreaktion von PCR-Produkten bedarf einiger Vor- und Nachbereitung und kann deshalb in die folgenden Schritten unterteilt werden:

1. PCR
2. Auftrennung der PCR-Produkte im Polyacrylamidgel; Ausschneiden der Bande;
3. Elution der DNA aus dem Acrylamid
4. asymmetrische PCR aus dem Eluat
5. Aufreinigung des PCR-Produktes
6. Sequenzierreaktion
7. Aufreinigung der Sequenzierreaktion
8. Auftrennung-Polyacrylamidgel

Die Auftrennung des PCR-Produktes im Polyacrylamidgel dient der Kontrolle des PCR-Produktes und der Abtrennung der verwendeten Primer. Die ausgeschnittene Bande wird in 100 µl Aqua dest 15 Minuten bei 80 °C inkubiert, während dieser Zeit diffundiert die DNA aus dem Gel heraus und geht in Lösung. Um eine Überlagerung mit der komplementären Sequenz zu vermeiden, wird nur ein DNA-Strang als Matrize benutzt. Bei der Sequenzierung des kodierenden Stranges (Vorwärtssequenzierung) dient der

Rückwärtsprimerstrang, als Matrize und umgekehrt. Ziel der asymmetrischen PCR ist es, den jeweiligen Strang zu vermehren. Dies wird erreicht indem man den entsprechenden Primer in höherer Konzentration einsetzt.

Ansatz für Vorwärtssequenzierung:

Template (Eluat)	10 µl
10 X Taq-Puffer	10 µl
dNTPs (10mMol)	1 µl
Primer F	5 pmol
Primer R	10 pmol
Aqua dest	ad 100 µl

Programm:

Zyklus	Denaturierung	Annealing	Elongation
0	96°C, 5min		
1-50	94°C, 30sec	X°C, 45 sec	72°C, 1min
51			72°C, 5min

Da die nicht eingebauten Primer und dNTPs bei der Sequenzierreaktion störend wirken, werden sie mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kits beseitigt. Das Prinzip der Qiaquick-Säulen beruht auf der Bindung von DNA an eine Silikon-Gel-Membran in Anwesenheit eines Puffers (PB) mit hoher Salzkonzentration. Nach einem Waschschrift mit PE-Puffer wird die DNA mit 10 mM Tris/HCl pH 8,5 Puffer eluiert. Für die Sequenzierreaktion wurde der Taq-DyeDesoxy-Terminator-Cycle-Sequenzung Kit eingesetzt. Zu der DNA-Matrix (Eluat) wurden je Reaktionsansatz 8 µl Premix, 5 pmol Primer und Aqua bidest bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gegeben. Die Reaktionsansätze wurden mit Paraffinöl überschichtet.

Für die Sequenzierungsreaktion kam folgendes Protokoll zum Einsatz:

Zyklus	Denaturierung	Annealing	Elongation
0	96°C, 5min		
1-25	94°C, 30sec	X°C, 15sec	60°C, 4min

Zur Abtrennung der nicht eingebauten NTPs werden die Proben mit Ethanol gefällt und in 4µl Formamid gelöst. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 95°C sowie Abkühlung auf Eis werden die Proben auf ein 8M harnstoffhaltiges, 6-8%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese dauert 10 bis 14 Stunden (40°C, 30Watt). Hierbei detektiert ein Argonlaser die endmarkierten Sequenzierungsprodukte. Unter Verwendung der Programme Data Collection und Analysis werden die Daten und Sequenzen aufgezeichnet und ausgewertet.

3.3.8 Transformation

Als Transformation wird das Einschleusen von Plasmid-DNA durch die intakte Zellwand in eine Bakterienzelle bezeichnet. Die Transformation der Bakterien DH5a und JM 105 mit den rekombinanten Plasmiden erfolgte nach der von Hanahan 1983 beschriebenen Rubidium-Chlorid Methode (Hanahan 1983). Hierzu impft man 20ml LB-Medium mit 500µl einer frischen Übernacht-Kultur an und läßt sie unter kräftigem Schütteln bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,3 bis 0,5 bei 600nm (OD 600) heranwachsen. Danach wird die Kultur im Eisbad abgekühlt und 5min bei 5000g und 4°C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte finden im Eisbad beziehungsweise bei 4°C statt. Das Pellet wird vorsichtig in 10ml Lösung A und nach erneutem Pelletieren in 10ml Lösung B resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten werden die Zellen zentrifugiert und in 2ml Lösung B aufgenommen. Zu 200µl dieser Zellen wird 3µl DMSO und 1-100ng Plasmid gegeben und dann erfolgt eine weitere 30 minütige Inkubation. Um die Ausbeute zu erhöhen, kann anschließend ein Hitzeschock durchgeführt werden. Dazu gibt man den Ansatz unter vorsichtigem Schütteln für 1-2 Minuten in ein Wasserbad mit 42°C. Danach läßt man die Zellen, zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz 30 Minuten im flüssigen Medium (4ml LB) ruhen und streicht sie anschließend auf Agarplatten mit Antibiotika aus.

3.3.9 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA

In Abhängigkeit vom Kulturvolumen wurden die Plasmide aus den Bakterien mittels Mini- oder Midipräparation isoliert.

Die Minipräparation wird mit Hilfe des QIAprep 8 Plasmid Kit durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgebrochen und die DNA wird durch Bindung an eine Silikon-Gel-Membran gereinigt. Dabei werden 1,5ml einer Übernacht-Kultur 10min mit 6000g bei Raumtemperatur pelletiert und in 250µl Puffer P1 resuspendiert. Zum Aufschluß der Zellen wird 250µl Puffer P2 zugesetzt und 4 bis 6 mal vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 500µl Puffer N3, sowie zehnmütiger Zentrifugation bei 10000g sedimentiert die hochmolekulare Bakterien-DNA zusammen mit den Zellwandbestandteilen aus der wäßrigen Lösung. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wird über QIAprep-Säulen gereinigt. Nach Auftragen des Überstandes wird die Säule mit PB- und PE-Puffer gewaschen. Anschließend wird die DNA mit 100µl 10mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert.

Die Midipräparation erfolgt unter Anwendung des Plasmid-Präparations Kit von Jetstar. Diese Säulen arbeiten nach ähnlichen Prinzip wie die oben beschriebenen QIAprep-Säulen. Hierbei wird das Pellet einer 50ml Übernacht Kultur in 4ml Lösung E1 resuspendiert. Zum Zellaufschluß wird 4ml Lösung L2 zugegeben und vorsichtig untergemischt. Nach fünfminütiger Inkubation wird mit 4ml E3 Lösung neutralisiert und 10 Minuten bei 15000g zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine equilibrierte Säule gegeben, mit der Lösung L5 gewaschen und schließlich mit Lösung L6 eluiert. Anschließend wird die DNA mit 0,7 fachem Volumen Isopropanolalkohol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in Aqua dest gelöst.

3.3.10 In-vitro Mutagenese

Die *In-vitro* Mutagenese bietet eine Möglichkeit zur genaueren Erforschung von Struktur und Funktion von Genen, indem man die DNA-Sequenz verändert und die Wirkung solcher Abwandlungen auf die Genfunktion untersucht. Die verschiedenen Verfahrensweisen zur Mutagenese lassen sich grob in zufällige und zielgerichtete (sequenzspezifische) Methoden einteilen. Für die zielgerichtete *In-vitro* Mutagenese wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Die Mutationen Gly200Arg und His237Ala wurden mit Hilfe des „Altered-Sites

in Vitro Mutagenesis System“ von Promega eingeführt, und für die Mutationen Thy261Cys, His180Ala, His436Ala, His451Ala und His538Ala wurde der „Quick Change Site Directed Mutagenesis“ Kit von Stratagene verwendet. Die beiden Verfahren arbeiten mit unterschiedlichen Selektionsprinzipien. Während sich bei der Mutagenese nach dem Promega-Verfahren mutiertes und nicht mutiertes Plasmid durch eine unterschiedliche Antibiotikaresistenz unterscheiden, wird bei dem Verfahren nach Stratagene das nicht mutierte Plasmid durch das Enzym DpnI verdaut und damit zerstört.

Altered Sites in vitro Mutagenesis System von Promega:

Die zielgerichtete Mutagenese nach dem Protokoll von Promega kann in sechs Teilschritte unterteilt werden.

Der erste Schritt ist die Subklonierung des Inserts, in diesem Fall die Sequenz für den Chloridkanal in den Mutagenese-Vektor pAlter-1. Das Labor von Alfred L. Georg, Nashville, Tennessee, USA, stellte uns freundlicherweise ein pAlter-1-Plasmid mit einem 1.4kb langem Teil des Chloridkanals, begrenzt von den Enzymen HindIII (Polylinker) und SmaI (1440Bp ClCN-1) zur Verfügung. Das restliche 1,6kb Fragment wurde aus dem Plasmid psP64T, welches die Sequenz des gesamten Chloridkanal beinhaltet und ebenfalls von Alfred L. George stammte, mit Hilfe der Restriktionsenzyme SmaI (1440Bp) und EcoRI (Polylinker von psP64T) entnommen und ebenfalls in das p-Alter-1-Plasmid gebracht.

Während des zweiten Schrittes wird mit Hilfe von M13-Phagen einzelsträngige Plasmid-DNA erzeugt. Dazu impft man 5ml TYP-Medium mit 100µl frischer Übernacht-Kultur an und gibt nach 30 Minuten Inkubationszeit 40µl R408 Helfer-Phagen (mit einem Titer von 10^{11} PFU/ml) und 50µl Dikaliumhydrogenphosphat hinzu und inkubiert weitere 4 bis 6 Stunden bei 37°C. Während dieser Zeit infiziert der Phage das Bakterium, und im Zuge dieses Infektionsprozesses entstehen Nachkommen-Phagen, die den Sense-Strang des Plasmids enthalten. Die Reinigung der Phagen und Einzelstrang-DNA wird mit Hilfe eines Qiagen-Kits durchgeführt. Hierbei wird der Überstand (5ml) nach Zentrifugation bei 12000g mit 50µl Präzipitationspuffer versetzt, zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in 0,7ml Fraktionen auf die Qiagen-Säule gegeben. Anschließend wird zweimal mit M13 Lysis und Binding Puffer und einmal mit PE-Puffer gewaschen und die Einzelstrang-DNA mit 100µl Tris pH 8,5 eluiert.

An diese Einzelstrang-DNA bindet im nächsten Schritt der Oligonukleotid-primer, und mit Hilfe der T4-Polymerase und der Ligase werden die Bruchstücke verlängert und miteinander verbunden. Für das Annealen gibt man zu 5µl einzelsträngiger DNA folgende Komponenten:

Ampicillin-repair-Oligonukleotid	0,25 pmol
Oligonukleotid (antisense)	1,25 pmol
Annealing-Puffer (10X)	2 µl
Aqua bidest	2,6 µl

Dieser Ansatz wird 5 Minuten bei 90°C denaturiert und dann ca. 1 bis 2 Stunden langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Verlängerung und Ligation wird diesem Ansatz folgendes zugegeben:

Syntesepuffer (10X)	3µl
T4-Polymerase (5U/µl)	2µl
10mMol ATP	2µl
T4-Ligase (5WeissU/µl)	0,4µl
Aqua bidest	2,6µl

Dieser Ansatz wird 90 Minuten bei 37°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Im vierten Schritt findet die Selektion und Vermehrung der doppelsträngigen mutierten Plasmid-DNA statt. Dazu werden 30µl des Plasmids aus dem dritten Schritt in kompetente Zellen vom Stamm ES1301 transformiert, mit Hilfe der Plasmidminipräparation geerntet und in den E.coli-Stamm DH5a transformiert. Bei dem ES1301 Stamm handelt es sich um mutierte E. coli Bakterien, die Mismatches bzw. Fehlpaarungen zwischen Plasmid und Mutationsprimer besser tolerieren. Durch den Selektionsdruck mit Ampicillin können sich nur noch zwei Arten von Plasmiden vermehren, Plasmide nur mit Ampicillinresistenz und Plasmide mit Ampicillinresistenz und Mutation, die Vermehrung des ursprünglichen Plasmides wird unterdrückt.

Um diese beide Formen zu unterscheiden, findet im fünften Schritt eine Kontrolle mit Restriktionsenzymen statt.

Mit folgenden Enzymen wurden die Mutationen kontrolliert:

Mutation	Enzym
Gly200Arg	Eco105I
His237Ala	Bsp68I

Anschließend an den Verdau wird die Mutation bei den positiven Klonen durch Sequenzierung ebenfalls mit dem Taq-DyeDeoxy-Cycle-Sequenzierung-Kit bestätigt.

Im letzten Schritt findet die Zurückklonierung des Inserts in die Expressions-vektoren pSP64T und pRC-CMV statt. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII (Schnittstelle im Polylinker von p-Alter) und EcoRV (Schnittstelle im Chloridkanalgen bei 795Bp) wird ein 795 Bp langes Fragment vom p-Alter-Vektor in den Vektor pSP64T umkloniert. Vom Plasmid pSP64T wird dann mit Hilfe der Restriktionsenzyme NotI (Polylinker von pSP 64T) und AscI (schneidet das Chloridkanalgen bei 2096Bp) die Mutation weiter in den Expressionsvektor pRC-CMV gebracht.

Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit von Stratagene:

Der Mutagenese Kit von Stratagene hat den Vorteil, daß er mit dem Expressionsvektor durchgeführt werden kann, und somit entfällt das Umklonieren. Den ersten Schritt bildet hier eine PCR mit Sense- und Antisense-Primer, welche die Mutation und eventuelle Schnittstellenänderungen enthalten. Der Ansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Reaktionspuffer 10X	5µl
Plasmid pRC-CMV-hCIC-1	50ng
Mutageneseprimer (sense) 25ng/µl	5µl
Mutageneseprimer (antisense) 25ng/µl	5µl
dNTP 10mM (2,5mM pro Nukleosid)	1µl
Pfu-DNA-Polymerase 2,5U/µl	1µl
Aqua dest.	ad. 50µl

Der Reaktionsansatz wird mit Paraffinöl überschichtet, um ein Verdunsten der wässrigen Phase zu verhindern, und ist folgendem Zeit- und Temperaturprotokoll unterworfen:

Zyklus	Denaturierung	Annealing	Elongation
0	95°C, 30sek		
1-14	95°C, 30sek	55°C, 1min	68°C, 17min

Danach wird der Ansatz auf Eis abgekühlt, 10U DpnI zugesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nur Plasmide, die innerhalb eines Bakteriums entstehen, werden zum Schutz vor endogenen Nukleasen methyliert. Plasmide, die im Rahmen einer PCR entstehen, sind nicht methyliert. Deshalb wird durch das methylierungssensitive Enzym DpnI der ursprüngliche

Wildtyp-DNA Strang des Bakteriums verdaut und nicht der während der PCR entstandene mutierte Strang. Anschließend erfolgt die Transformation des Ansatzes in superkompetente E. coli XL-1-Blue Zellen. Dazu gibt man 1µl des Ansatzes zu 50µl kompetenter Zellen und läßt diese dann 30 Minuten auf Eis ruhen. Zur Erhöhung der Ausbeute wird ein Hitzeschock durchgeführt, indem man die Zellen 45 Sekunden bei 42°C inkubiert und dann wieder vorsichtig auf Eis stellt. Danach läßt man den Zellen eine Stunde Zeit, sich im reichhaltigen NZY-Medium zu erholen und streicht sie dann auf Agarplatten mit Ampicillin(50ng/ml) aus. Nach Minipräparation werden die Plasmide ebenfalls durch Restriktionsverdau kontrolliert. Hierbei werden folgende Enzyme verwendet:

Mutation	Enzym
H180A	BssHIII
H436A	SacII
H451A	SacII
H538A	Esp3I

Positive Klone im Restriktionsverdau wurden auch hier durch Sequenzierung bestätigt. Für die Mutation Tyr261Cys konnte keine Restriktionsschnitt-stellenänderung erzeugt werden, sie wurde deshalb nur durch Sequenzierung kontrolliert.

3.3.11 Subklonierung

Im Rahmen der Mutagenese ist es notwendig, Fragmente zwischen Plasmiden auszutauschen; dafür sind einige Schritte notwendig:

1. Restriktion (3.3.6)
2. Gelelektrophorese zur Auftrennung der Fragmente (3.3.3)
3. DNA-Extraktion aus dem Agarosegel mit Hilfe von Qiaex-Säulen
4. Ligation des Fragments in entsprechende Vektoren
5. Transformation der rekombinanten Plasmide in Bakterien (3.3.8)
6. Isolierung der rekombinierten Plasmide (3.3.9)

DNA Extraktion aus Agarosegelen:

Die DNA-Extraktion aus Agarosegel mit Hilfe von Qiaex-Säulen beruht darauf, daß DNA unter Hochsalzbedingungen an Silikongelpartikel bindet, nachdem man sie bei einer Temperatur von 50°C aus der Agarose gelöst hat. Nach einigen Waschschritten kann dann die DNA mit TE-Puffer wieder eluiert werden. Im einzelnen sind die Schritte wie folgend:

Pro 100mg Agarose werden 300µl Puffer QX1 zugegeben und gemischt. Dazu werden für ca. 5µg DNA 10µl Qiaex hinzugefügt und 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt befindet sich die DNA im Pellet und kann jeweils zweimal mit QX2 und QX3 gewaschen werden. Nachdem das Pellet getrocknet ist, wird es in 20µl TE gelöst und erneut zentrifugiert. Im Überstand ist dann die gereinigte DNA enthalten.

Ligation:

Die Ligase ist ein Reparaturenzym, das kovalente Bindungen zwischen DNA-Fragmenten schließt. Der Ligationsansatz wird auf Eis angesetzt, 16 Stunden bei 14°C inkubiert und anschließend durch Erhitzen auf 65°C für 15 Minuten inaktiviert.

Ligationsansatz:	10X Ligationspuffer	2µl
	10mM ATP	2µl
	linearisierter Vektor	
	Insert-DNA	
	T4-Ligase	1 U
	Aqua dest	ad 20µl

3.3.12 Transfektion:

Die Transfektion der Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe der Calciumphosphat-Technik (abgewandelt nach Graham u. van der Eb 1973). Hierfür werden 3×10^5 Zellen in einer 50 ml (25cm^2) Gewebekulturflasche ausgesäht. Ca. 24 Stunden danach wird mit den Zellen, die ca. 30% des Bodens bedecken sollten, ein Mediumwechsel (8ml MEM+10% FCS) durchgeführt. Anschließend läßt man den Zellen ca. 4 bis 5 Stunden Zeit, um sich zu erholen. In der Zwischenzeit wird das Calcium-DNA-Präzipitat hergestellt. Dazu gibt man zu einer Mischung aus 500µl CaCl (200mM) und 10µg DNA tropfenweise unter vorsichtigem Schwenken 500µl zweifach konzentrierten HEPS-Puffer und läßt diesen Ansatz 30 bis 40 Minuten stehen. Anschließend wird das Calcium-DNA-Präzipitat

tropfenweise unter vorsichtigem Schwenken zu den Zellen gegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wird wieder ein Mediumwechsel durchgeführt, dabei werden die Zellen ein- bis zweimal mit Medium gespült, um nicht eingebaute DNA-Kristalle zu entfernen. Nach erneuter Ruhezeit von 4 bis 5 Stunden werden die Zellen in kleine Petrischalen (35mm Durchmesser) umgesetzt. Dazu werden die Zellen mit wenig Trypsin abgelöst, in 2 bis 5 ml Medium aufgenommen und auf die Petrischalen verteilt (ein bis zwei Tropfen in die Mitte der Petrischale). Nach 2 Stunden werden einige Tropfen Medium in jede Petrischale dazugegeben. Am vierten Tag werden die Schälchen mit Medium aufgefüllt und die Zellen können elektrophysiologisch mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht werden.

3.3.13 Patch-Clamp-Technik

Für die elektrophysiologische Charakterisierung der Mutationen im CLCN-1 Gen wurde die Patch-Clamp-Technik (Hamill et al. 1981) ausgewählt. Dazu werden HEK 239 Zellen transient mit einem pRC-CMV Plasmid, welches das Gen des Chloridkanals mit eventuellen Mutanten enthält transfiziert. Als Meßanordnung wurde die Konfiguration der Ganzzellmessung, „Whole-cell-recording“ ausgewählt. Dieses Verfahren bietet einerseits die Möglichkeit, die Spannung über der gesamten Zellmembran zu kontrollieren und andererseits über den Zugang durch die Meßpipette das Milieu im Zellinneren vorzugeben. Dazu führt man die Pipette sehr nahe an die Zelle heran und wartet sich bis sich der erforderliche Gigaseal (Widerstand im Gigaohmbereich zwischen dem Glas der Pipette und der Lipiddoppelschicht der Zellmembran) ausgebildet hat. Danach befindet man sich im sog. „Cell attached mode“. Um die Zellmembran zu durchbrechen saugt man einmal kurz an und schafft sich Zugang zum Zellinneren. Die Elektrode dient sowohl der Spannungsmessung als auch der Strominjektion. Das Meßprinzip besteht aus einer konstant gehaltenen Membranspannung und der Messung der Ionenströme als Spannungsabfall am bekannten Widerstand (Rückkopplungswiderstand). Über Pulsprogramme wird ein zeitlicher Spannungsverlauf vorgegeben. In Abbildung 2 ist ein vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers dargestellt. Durch den Operationsverstärker (OPA) des Strom-Spannungs-Wandlers wird die Pipettenspannung der Sollspannung (U-Soll) angeglichen, der hierzu notwendige Kompensationsstrom wird auf dem I-Monitor registriert.

Zusammensetzung der Patch-Clamp-Lösungen:

Externe Lösung	Interne Lösung
140 mM NaCl	130 mM CsCl
4 mM KCl	2 mM MgCl ₂
2 mM CaCl ₂	5 mM EDTA
1mM HEPES	10 mM HEPES
pH 7,5	pH 7,5

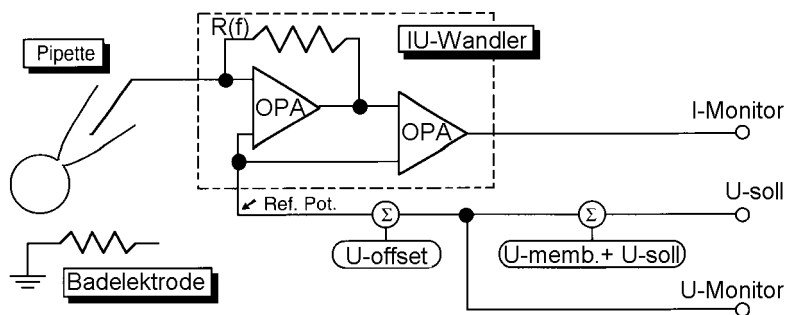


Abb. 2.

Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers in Whole-cell-recording Konfiguration; OPA: Operationsverstärker, IU-Wandler: Strom-Spannungs-Wandler, R(f): Rückkopplungswiderstand;

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit können in drei Abschnitte unterteilt werden. Der erste Teil beschreibt die Genotypisierung von Patienten mit dominanter und rezessiver Myotonia congenita. Im zweiten Teil wurde mit Hilfe von elektrophysiologischen Methoden die beiden Mutationen Gly200Ala und Thr261Cys charakterisiert. Der letzte Teil versucht durch künstlich erzeugte Mutationen weitere Auskunft über die Struktur und Funktion des Chloridkanals zu gewinnen.

4.1 Genotypisierung von Patienten mit dominanter und rezessiver Myotonia congenita

Voraussetzung für eine erfolgreiche Suche nach Mutationen ist eine präzise Erfassung der klinischen Symptomatik und die Abgrenzung gegen andere Differentialdiagnosen.

4.1.1 Beschreibung des Phänotyps

Die klinische Symptomatik ließ bei Patienten von insgesamt 43 Familien an eine Myotonia congenita denken. Die weitere Unterscheidung in die dominante und die rezessive Form der Myotonia congenita erfolgte durch Erhebung der Familienanamnese und, soweit möglich, durch Untersuchung der Verwandten. Aufgrund der klinischen Symptomatik ist eine eindeutige diagnostische Zuordnung myotoner Krankheitsbilder nicht immer möglich, deshalb wurden mehrere Patienten mit verschiedenen Verdachtsdiagnosen versehen. Die Abgrenzung der Myotonia congenita von kaliuminduzierten Myotonien (potassium aggravated Myotonia PAM, hyperkalämische periodische Paralyse HyperPP, Paramyotonia congenita PC), von der proximalen myotonen Myopathie (Promm) und von der myotonen Dystrophie (MD) war klinisch nicht immer eindeutig. Die definitive diagnostische Einordnung war oft nur durch den molekularbiologischen Nachweis der entsprechenden Mutation in den Genen der zugehörigen Ionenkanälen zu leisten.

Folgende Symptome bzw. Untersuchungen dienen der klinischen Einordnung:

1. Auslösender Faktor für die Myotonie:

Typischerweise tritt die Myotonie bei Myotonia congenita nur nach einer längeren Ruhephase (5-10min) auf. Eine Ruhephase löst auch bei der Myotonen Dystrophie und teilweise bei der Proximalen Myotonen Myopathie eine Myotonie aus. Im Gegensatz dazu wird die Myotonie im Falle einer Paramyotonia congenita oder einer Potassium-Aggravated Myotonie durch Bewegung ausgelöst.

2. Warm-up-Phänomen

Im Falle der Myotonia congenita, der Proximalen Myotonen Myopathie und der Myotonen Dystrophie nimmt die Muskelsteifigkeit durch Bewegung ab. Diese Wirkung nennt man warm-up-Phänomen.

3. Perkussionsmyotonie

Als Perkussionsmyotonie bezeichnet man das Auslösen einer Myotonie bzw. eine mehrere Sekunden anhaltende Kontraktion durch Beklopfen der Muskulatur. Sie tritt immer dann auf, wenn die Myotonie sehr ausgeprägt ist. Sie ist typisch für die Myotonia congenita, kommt aber auch bei der Myotonen Dystrophie und bei der Paramyotonia congenita vor.

4. Schwäche:

Eine vorübergehende Schwäche besonders der Hand- und Armmuskulatur wird bei der rezessiven Form der Myotonia congenita beobachtet. Dies wird eindrücklich demonstriert, wenn ein Patient aufgefordert wird, nach einer Phase der Ruhe eine schwere Tasche hochzuheben und ihm dabei der Griff aus der Hand gleitet. Bei der dominanten Form der Myotonia congenita tritt typischerweise keine Schwäche auf. Die hyperkalämische periodische Paralyse ist gekennzeichnet durch Anfälle von Schwäche oder Lähmungen. Die Schwäche tritt dabei meist generalisiert auf und wird von einem signifikanten Anstieg des Kaliumspiegels begleitet. Bei der Paramyotonie kann eine Schwäche nach körperlicher Anstrengung und Kälteexposition auftreten. Im Falle einer Kalium induzierten Myotonie wurde bisher keine Schwäche beobachtet.

5. Myalgie

Muskelschmerzen sind kein typisches Kennzeichen der Myotonia congenita, trotzdem wurden einige Fälle mit Muskelschmerzen beschrieben.

6. Kälteempfindlichkeit

Typischerweise leiden Patienten mit einer Paramyotonia congenita an einer Kälteempfindlichkeit. Durch eine Kälteexposition kann bei dieser Patientengruppe eine Schwäche ausgelöst werden. Vereinzelt tritt dieses Phänomen jedoch bei allen myotonen Krankheitsformen auf.

7. Provokationsteste

Bei der kaliuminduzierten Myotonie kann eine Muskelsteifigkeit durch Kaliumaufnahme provoziert werden.

Im Falle der Hyperkalämischen Periodischen Paralyse wird häufig ein Provokationstest mit Hilfe des Fahrradergometers durchgeführt. Dabei wird während der Phase der körperlichen Anstrengung und auch während der Ruhephase der Serumkaliumspiegel gemessen. Typischerweise tritt nach 10 bis 20 Minuten der Ruhe nach körperlicher Anstrengung eine Paralyse, begleitet von einem Kaliumanstieg, auf.

8. EMG

Typisch für alle myotonen Krankheitsformen sind myotone Entladungssalven. Kurze Entladungsserien mit Amplituden- und Frequenzmodulation charakterisieren das Elektromyogramm bei Patienten mit dominanter und rezessiver Form der Myotonia congenita. Lange Serien von fibrillationsartigen Aktionspotentialen sind typisch für die Hyperperiodische Paralyse, die Paramyotonia congenita und für die kaliumsensitive Myotonie.

9. Muskelbiopsie

Bei der histologischen Untersuchung von Muskelgewebe von Patienten mit Myotonia congenita wird häufig ein Auftreten von hypertrophen Muskelfasern und das Fehlen von Typ II Fasern beobachtet. Patienten mit Myotoner Dystrophie zeigen dagegen exzessive Kaliberschwankungen der Muskelfasern ohne Bevorzugung eines bestimmten Fasertyps. Weitere charakteristische Merkmale der myotonen Dystrophie sind zentral liegende Muskelkerne, Strukturdefekte innerhalb der Muskelfasern, Fasernekrosen und eine mit einem lipomatösen Umbau verbundene Vermehrung des interstiellen Bindegewebes.

Tab. 3: Übersicht über den Phänotyp der Familien mit klinisch dominanter Myotonia congenita (MC)

Familie/ Patient	m/ w	Beginn (Lebens- jahr)	Klinische Untersuchung	EMG	DD	Besonderes
MC 17 1043	m					
MC 26 1576	w					
MC 28 1722	m				PC	
MC 29 1799	w		PerMT	MT	PAM	Proximale Schwäche
MC 32 1877	m	2	KlinMT	MT		Vater und Groß- vater betroffen

w weiblich; m männlich; n.b. nicht bekannt; MT Myotonie; PerMT Perkussionsmyotonie; klinMT klinische Zeichen einer Myotonie; PAM potassium aggravated myotonia; PC Paramyotonia congenita;

Tab. 4: Übersicht über den Phänotyp der Familien mit klinisch rezessiver Myotonia congenita (RMG)

Familie Patient	m/w	Beginn Lebensjahr	klinische Untersuchung	EMG	DD	Besonderes
RGM 22 554	w		Klin MT	MT		Schulter und Brustschmerzen
RGM 23 1099	m					
RGM 24 1148	m					
RGM 27 1314	m	3-4	Klin MT	MT		keine Schwäche
RGM 28 1388	m		Klin MT	MT		
RGM 29 1415	m					
RGM 30 1429	m					
RGM 53 1798	m	3-4	PerMT		PROMM	Schwäche
RGM 55 1275	w?					
RGM 56 1467	m					
RGM 57 1469	m				PAM	
RGM 59 1475	m	2	klinMT Lid Lag			Schwäche in Händen und Schultern pseudohypertrophe Wade
RGM 60 1498	m	früheste Kindheit	klin MT PerMT Lid Lag	MT	PROMM MD	
RGM 61 1498	m		klin MT		PAM	Gnomenwaden
RGM 63 1658	m					
RGM 64 1564	m					
RGM 65 1801	w	13	klin MT PerMT	MT	PROMM	Schwäche
RGM 66 1811	m				PC	
RGM 67 1867	m					
RGM 68 1878	w	3	klin MT	MT	MH	
RGM 71 1953	m					

Familie Patient	m/w	Beginn Lebensjahr	klinische Untersuchung	EMG	DD	Besonderes
RGM 72 1959	m					
RGM 73 1960	m					
RGM 74 1964	w	seit Geburt	klin MT			
RGM 75 1968	m					
RGM 77 2111	w					
RGM 90 1471	w					
RGM 124 1822	w					
RGM 125 1835	m	2	klinMT	MT		
RGM 141 1625	m					
RGM 142 1921	w	10	PerMT	MT		
RGM 145 2101	w					
RGM 148 1909	w					
RGM 185 1882	m					
UMS 2 989	m					
UMS 3 1011	m					
PAM 12 1493	m					
PAM 13 1587	m					

UMS unbekanntes myotones Syndrom; PAM potassium-aggravated Myotonie; MD Myotone Dystrophie; PROMM Proximale Myotone Myotonie; PerMT Perkussionsmyotonie; MH Maligne Hyperthermie; Lid Lag typisches verlangsamtes Augenöffnen;

4.1.2 Mutationsuche im CLCN-1 Gen

Für die Mutationssuche wurden die codierenden Bereiche des CLCN-1 Gens aus der genomischen DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.3.2.). Mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) wurden das Bandenmuster mit Negativkontrollen verglichen. Zur genaueren Charakterisierung möglicher Sequenzveränderungen wurden die entsprechenden Banden aus dem SSCA-Gel ausgeschnitten. Die aus den Banden eluierte DNA wurde erneut amplifiziert und anschließend sequenziert (Abschnitt 3.3.5. und 3.3.7.).

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, alle 43 Familien mit Myotonia congenita in allen 23 Exons zu untersuchen. Deshalb wurden zuerst alle Indexpatienten auf die häufigsten bereits bekannten Mutationen untersucht. Die dominante Form der Myotonia congenita wurde auf die Mutationen Gly200Arg und Gly230Glu in Exon 5, Ile290Met und Arg317Gln in Exon 8, Gln552Arg in Exon 15 und auf die Mutation Arg894Stop in Exon 23 untersucht.

Bei zehn Patienten mit der dominanten Form der Myotonia congenita konnten zwei verschiedene bereits bekannte Mutationen gefunden werden (Ala493Glu bei MC 32 und Arg894Stop bei MC 33). Die Mutation Arg894Stop ist eine Mutation, die sowohl bei der dominanten als auch bei der rezessiven Form der Myotonia congenita vorkommt. Bei der Mutation Ala493Glu handelt es sich um eine rezessive Mutation, die hier bei einer dominanter Vererbungsform auftritt. Auf dieses Phänomen wird im Diskussionsteil näher eingegangen.

Bei der rezessiven Form der Myotonia congenita wurde in Exon 8 nach den Mutationen Glu291Lys, Arg300Stop, Ala313Thr und Val327Gln und in Exon 11 und 14 nach den Mutationen Phe413Cys und Ala493Glu gesucht. Des weiteren wurden das Exon 13 und das Exon 23 auf die sehr häufig auftretende 14 Bp-Deletion beziehungsweise Arg894Stop Mutation untersucht. Bei der Untersuchung von 31 Indexpatienten mit rezessiver Form der Myotonia congenita wurde dabei bei 13 Patienten eine bekannte Mutation festgestellt. Insgesamt konnte siebenmal die 14 Bp-Deletion in Exon 13 (MC 30, 31, RGM 27, 61, 63,

71, 74) und fünfmal die Arg894Stop-Mutation (RGM 22, 53, 56, 59) nachgewiesen werden. Bei einem Patient (RGM 63) zeigte sich ein Austausch der Aminosäure Phenylalanin durch Cystein in Position 413 (Phe413Cys).

Durch den Nachweis der bekannten Mutationen wurden vier Patienten vollständig geklärt, indem entweder zwei rezessive oder eine dominante Mutation gefunden wurde. Die Mutation Arg894Stop wurde bei MC 33 heterozygot und bei RGM 22 homozygot gefunden. Bei den Patienten RGM 53 und RGM 63 wurde jeweils eine Kombination von zwei verschiedenen rezessiven Mutationen gefunden.

Eine vollständige Untersuchung aller 23 Exons mit Hilfe der SSCP wurde dann mit 20 Patienten aus dem oben aufgeführten Kollektiv durchgeführt. Dabei wurden 29 aberrante Banden entdeckt, die ausgeschnitten und sequenziert wurden. Das Ergebnis dieser Sequenzierung ergab sechs verschiedene neue Mutationen bei acht Patienten. Eine stumme Mutation in Exon 3, die zu keiner Aminosäurenveränderung führt, und eine Mutation im Intronbereich vor Exon 11 konnten nachgewiesen werden. In Exon 3, 8 und 11 konnte jeweils ein bekannter Polymorphismus festgestellt werden. Bei 12 Patienten ließ sich trotz Abweichen des Bandenmusters von den Kontrollpersonen kein Basenaustausch entdecken.

Sechs bisher nicht beschriebene Mutationen konnten nachgewiesen werden:

1. Gly285Glu

Mit Hilfe der Sequenzierung wurde bei zwei Familien (RGM 59 und 67) ein Basenaustausch von Guanin (GGA) durch Adenosin (GAA) in der Position 854 in Exon 8 nachgewiesen. Diese Mutation verursacht eine Substitution der hoch konservierten Aminosäure Glycin durch eine Glutaminsäure an Position 285. Die Mutation kann durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym SbfI (Erkennungssequenz CCTGCAGG) nachgewiesen werden. Normalerweise schneidet SbfI das 259 Bp lange Exon in zwei Fragmente. Durch die Gly285Glu Mutation fällt jedoch diese Schnittstelle weg. Bei 50 Kontrollpersonen wurde diese Mutation nicht gefunden. Bei RGM 67 handelt es sich um eine türkische Familie, von der wir leider keine näheren Angaben über die klinische Situation der Patienten erhalten haben, deren Blutproben uns eine Ärztin aus Istanbul (Dr. Feza Deymer) zur Verfügung stellte. Der Indexpatient und sein Vater sind heterozygote Träger der Glu285Gly Mutation.

Die Mutter und der Bruder des Indexpatienten sind nicht von der Mutation betroffen. Beim Indexpatienten konnte außer der obengenannten Mutation noch eine Mutation im Intronbereich vor Exon 11 nachgewiesen werden.

Die Familie RGM 59 war leider nur durch die Blutprobe des Indexpatienten vertreten. Bei diesem Indexpatienten handelt es sich um einen elf Jahre alten Jungen, bei dem die ersten myotonen Symptome bereits im zweiten Lebensjahr bemerkt wurden und bei dem, abgesehen von myotonen Entladungssalven im EMG, ein typischer Lid Lag und eine Schwäche in den Händen und in den Schultern festgestellt werden konnte. Bei diesem Indexpatienten konnte die Gly285Glu Mutation und die Mutation Arg894Stop in Exon 23 jeweils heterozygot nachgewiesen werden.

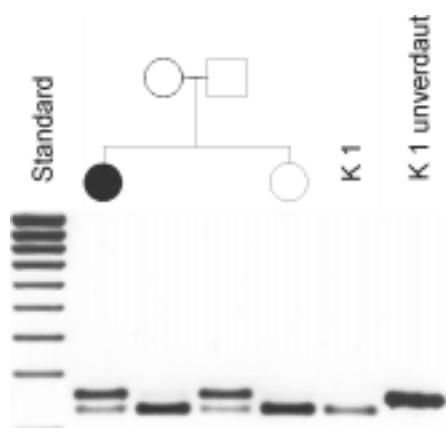
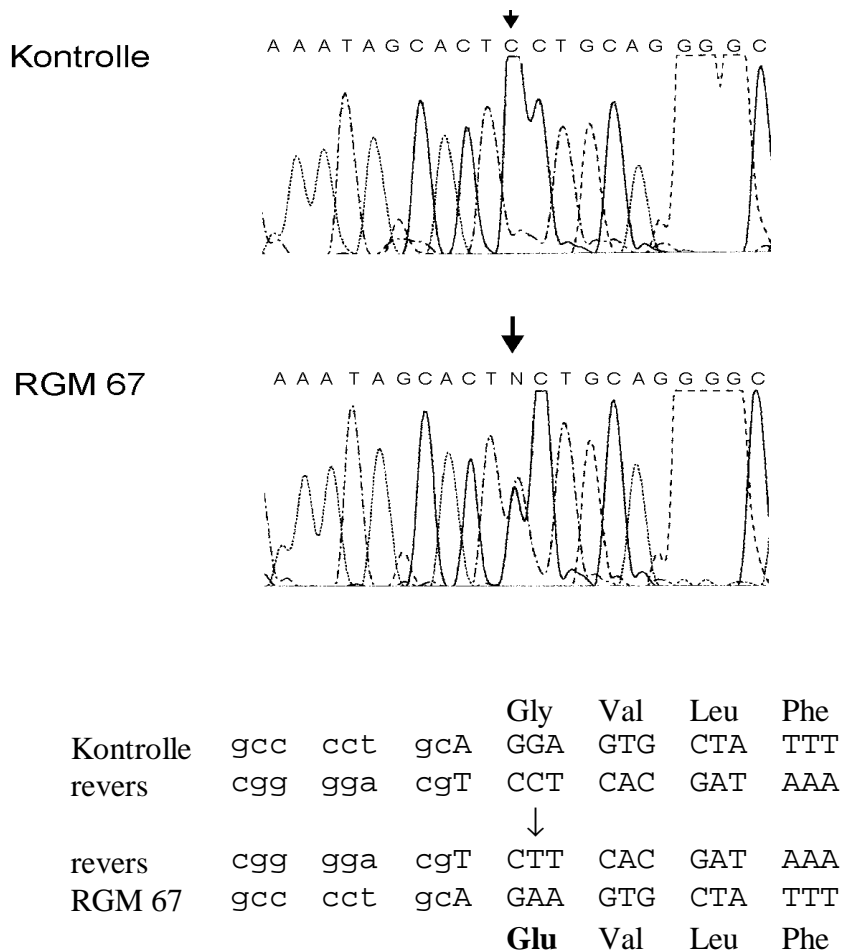


Abb. 3:

Restriktionsverdau von Exon 8 der Familie RGM 67 mit Sbf I (Erkennungs-sequenz CCTGC↓GG); normalerweise schneidet Sbf I das Exon 8 in zwei Fragmente mit einer Länge von 229 und 30Bp; durch die Mutation fällt diese Schnittstelle weg; der Vater und die betroffene Tochter sind heterozygote Träger dieser Mutation, sie weisen in ihren Spuren Banden von einer Länge von 259 und 229Bp auf; die 30Bp große Bande ist nicht abgebildet; K1 bezeichnet die Kontrolle mit Sbf I verdaut und unverdaut (2% Agarosegel, Negativ eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels);



	↓285		
hClC-1	VGVS	FGTPLGGVLF	SIEVTSTYFA
rClC-1	VGCAV	FGTPLGGVLF	SIEVTSTYFA
mClC-0	VGCALGISCC	FGTPLAGVLF	SIEVTCSHFG
hClC-2	AACA	FAAPIGGVLF	SIEVTSTFFA
hClC-3	AASAAGVSVA	FGAPIGGVLF	SLEEVSYFFP
hClC-4	AAAAAGVSVA	FGAPIGGVLF	SLEEVSYFFP
hClC-5
hClC-6	AGAAAGVAAA	FGAPIGGTLF	SLEEGSSFW.
hClC-7	AGAAAGVSAA	FGAPVGGVLF	SLEEGASFW.
hClCKb	AAA	FGAPFSGVLF	SIEVMSSHFS
hClCKa	AAA	FAAPFSGVLF	SIEVMSSHFS
hClCK1	AAA	FAAPFSGVLF	SIEVMSSHFS
hClCK2	AGA	FAAPISGVLF	SIEVMSSHFS
CONSENS	A GV	F AP G VLF	E F

→

D 5

Abb. 4: Ausschnitt aus der Sequenzierung des Exons 8; beim Patienten RGM 67 resultiert aus einer G854A-Transversion eine Substitution der konservierten Aminosäure Glycin durch Glutaminsäure; Evolutionärer Vergleich (Chloridkanalfamilie siehe Tabelle Nr.9); das Glycin in Position 285 ist hoch konserviert innerhalb der ClC-Genfamilie; D5: transmembranöse Domäne nach dem Modell von Middleton et al 1994;

2. Ala313Thr

Bei dem Indexpatient der Familie UMS 2 wurde im Amplikon des Exons 8 eine zusätzliche SSCA-Bande gefunden. Dieses Bandenmuster fand sich bei 103 Kontrollpersonen nicht. Die Sequenzierung der entsprechenden Bande ergab eine G937A Transversion in der DNA-Sequenz. Diese Mutation verursacht eine Substitution des Alanin in Position 313 durch ein Threonin. Der Patient ist heterozygoter Träger der Mutation. Blutproben weiterer Familienmitglieder und klinische Befunde waren uns leider nicht zugänglich. PCR-SSCA Untersuchungen des gesamten CIC-1 Gens ergaben keine weiteren Mutationen.

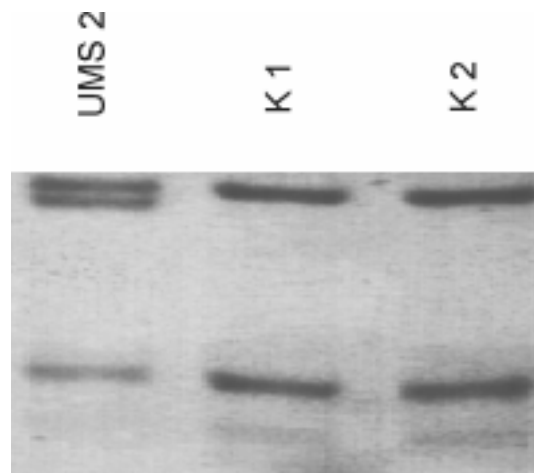


Abb. 5:

PCR-SSCA von Exon 8; im Vergleich zu den Kontrollen 1 und 2 konnte beim Patienten eine zusätzliche Bande gefunden werden; (5% Polyacrylamidgel, Negativ des mit Ethidiumbromid gefärbten Geles);

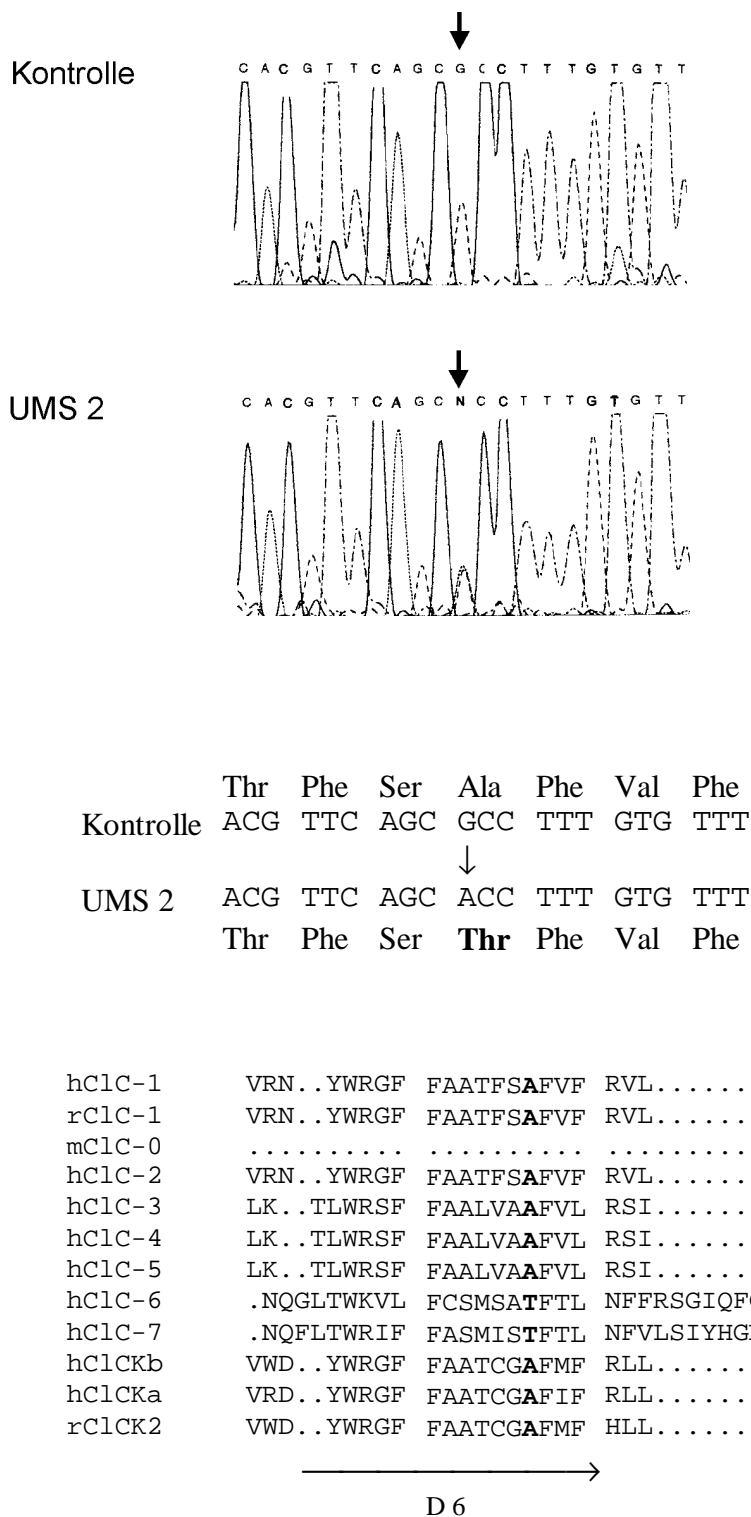


Abb.6:
 Ausschnitt der Sequenzierung von Exon 8; es zeigt sich bei der Sequenzierung der aberranten Bande eine G937A Transition, wodurch es zur Substitution des Prolin 558 durch ein Leucin kommt; evolutionärer Vergleich (Chloridkanäle siehe Tabelle Nr.9); das Alanin 312 ist relativ gut konserviert; D 6: Transmembranöse Domäne nach dem Modell von Middelton et al. 1994;

3. 6 Bp-Deletion (1444-1449)

Beim Bandenmuster des Indexpatienten der Familie RGM 53 zeigte sich in der PCR-SSCA in Exon 13 eine aberrante Bande. Die Sequenzierung deckte eine Deletion von sechs Basen von Position 1444 bis 1449 auf. Das Leseraster wird durch diese Mutation nicht verschoben, es entfallen lediglich zwei Aminosäuren Glycin in der Position 482 und 483. Die Mutation kann durch den Verdau des Amplikon des Exons 13 mit dem Restriktionsenzym *AciI* (Erkennungssequenz CGCC) nachgewiesen werden. Durch die Mutation fällt die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *AciI* weg, und das 176Bp lange Amplikon wird nicht wie bei den Kontrollpersonen in die beiden Fragmente von einer Länge von 81 und 95Bp geschnitten. Bei 52 Kontrollpatienten konnte durch *AciI*-Verdau diese Mutation ausgeschlossen werden. Beim Indexpatienten zeigten sich die ersten myotonen Symptome bereits im dritten Lebensjahr. Abgesehen von myotonen Entladungssalven im EMG und einer Perkussionsmyotonie konnte bei diesem Patienten ebenfalls eine proximal betonte Schwäche beobachtet werden. Deshalb bestand neben der Verdachtsdiagnose Rezessiv Generalisierte Myotonie auch noch die Verdachtsdiagnose Proximale Myotone Myopathie. Ein betroffener Bruder, eine betroffene und eine nicht betroffene Schwester und die Mutter des Indexpatienten sind heterozygote Träger der Mutation. Die Blutprobe des Vaters stand für die Untersuchung nicht zur Verfügung. Bei allen betroffenen Geschwistern konnte noch eine zweite Mutation in Exon 23 (Arg894Stop) nachgewiesen werden.

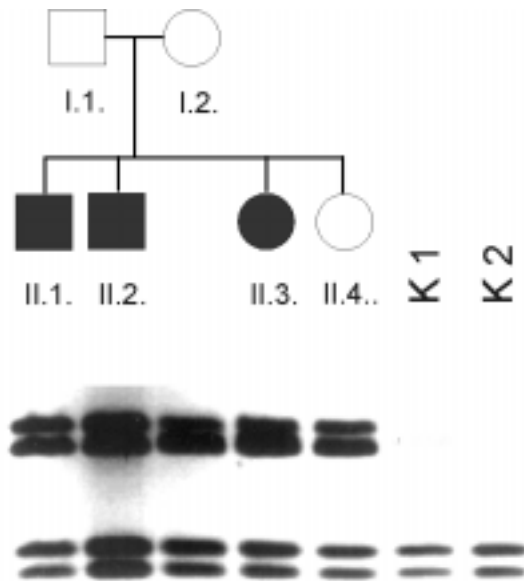
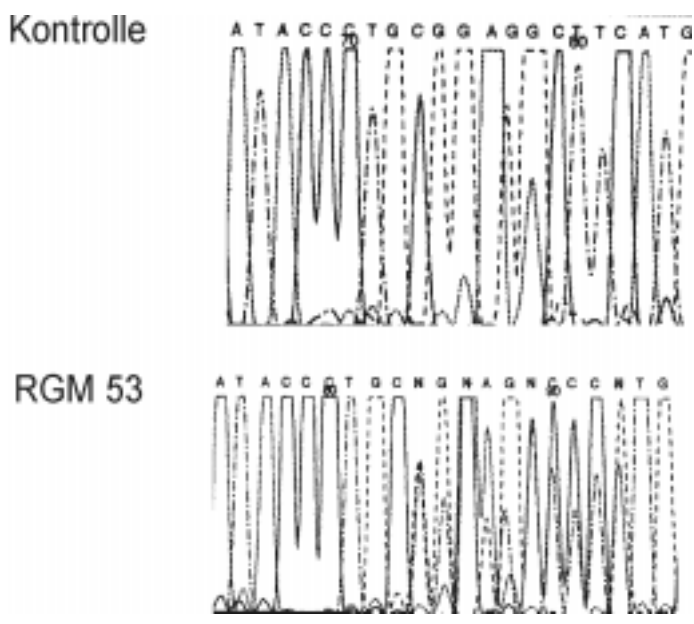


Abb. 7:

Restriktionsverdau von Exon 13 mit Aci I (Erkennungssequenz CCGC); normalerweise schneidet Aci I das Exon in zwei Fragmente von 81 und 95Bp; durch die 6Bp Deletion fällt die Schnittstelle weg; alle Familienmitgliedern sind heterozygote Träger der Mutation; sie haben in ihrer Spur vier Banden: die beiden geschnittenen Banden, die ungeschnittene Bande mit einer Länge von 176Bp und eine unspezifische Bande, die etwas größer als 176Bp ist und nur bei den Familienmitgliedern und nicht in den Kontrollen auftritt (2% Agarosegel, Negativ des mit Ethidiumbromid gefärbten Geles);



	Ile	Pro	Cys	Gly	Gly	Phe	Met	
Kontrolle	ATA	CCC	TGC	GGA	GGC	TTC	ATG	
RGM 53	ATA	CCC	TGC	GGA	GGC	TTC	ATG	} überlagert
	ATA	CCC	TGC	TTC	ATG	CCT	GTG	
	Ile	Pro	Cys	Phe	Met	Phe	Val	

HC1C-1	FFVMKFWMSI	VATZMPIPCG	GFMPVFLGA
RC1C-1	FFVMKFWMSI	VATZMPIPCG	GFMPVFLGA
MC1C-0	FFVMK.....
HC1C-2	FILMKFWMSA	LATTIPVPCG	AFMPVFLGA
HC1C-3	ALIFKIIMTV	FTFGIKVPSG	LFIPSMALGA
HC1C-4	ALIFKIVVTI	FTFGMKIPSG	LFIPSMALGA
HC1C-5
HC1C-6	FFVLYFLLAC	WTYGISVPSG	LFVPSLLCGA
HC1C-7	FTLVYFFLAC	WTYGLTVSAG	VFIPSLLIGA
HC1CKb	FLVMKFWMLI	LATTIPMPAG	YFMPIFVYGA
HC1CKa	FLVMKFWMLI	LATTIPMPAG	YFMPIFILGA
HC1CK2	FLVMKFWMLI	LATTIPIAG	YFLPIFVYGA
HC1CK1	FLVMKFWMLI	LATTIPMPAG	YFMPIFIIGA
Consens		P G	F P F GA

-----> <-----
 D 9 D 10

Abb.: 8
 Ausschnitt aus der Sequenzierung des PCR-Produktes von Exon 13; nach dem TGC-Triplett für die Aminosäure Glycin kommt es zu einer Überlagerung des nicht mutierten Stranges mit dem mutierten Strang; evolutionärer Vergleich (Chloridkanäle siehe Tabelle Nr.9); durch die 6Bp Deletion fallen zwei Glycine in der Position 482 und 483 weg; das Glycin in Position 482 ist hoch konserviert und das Glycin in Position 483 ist wenig konserviert ist; D 9: transmembranöse Domäne und D 10 intrazelluläre Domäne nach Middleton et al. 1994;

4. Thr550Met

Beim Patienten RGM 28 wurde mit Hilfe der SSCA eine zusätzliche Bande in Exon 15 gefunden, die bei den Kontrollpersonen nicht vorhanden war. Die Sequenzierung der abweichenden Bande ergab einen Basenaustausch des Cytosin-1649 gegen ein Thymidin. Diese Transition verursacht eine Threonin-550-Methionin Substitution und führt gleichzeitig eine neue Restriktionsschnittstelle für das Restriktionssenzym AseI (Erkennungssequenz ATTAAT) ein. Das 280Bp lange Amplikon wird dadurch nur bei Trägern der Mutation in die 172 und 88Bp langen Fragmente geschnitten. Bei 50 Kontrollpersonen konnte mit Hilfe des AseI-Verdau die Thr550Met Mutation ausgeschlossen werden. Mit der angewendeten Mutationssuchmethode konnten außer der Thr550Met Mutation keine weiteren Mutationen gefunden werden. Bei dem Patienten RGM 28 handelt es sich um eine Einzelperson, die an einer besonders schweren Form einer generalisierten Myotonie leidet, und die uns freundlicherweise von Prof. Dr. Ken Ricker zugewiesen wurde.

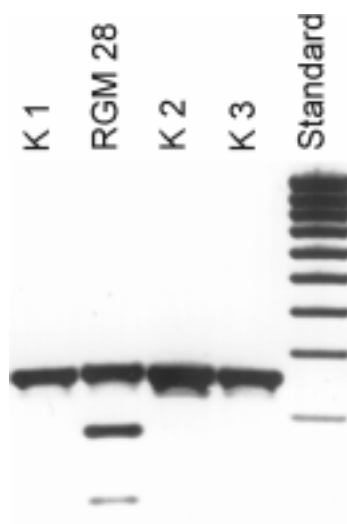


Abb. 9:

Restriktionsverdau von Exon 15 mit AseI (Erkennungssequenz AT↓TAAT); normalerweise liegt in diesem Abschnitt keine Schnittstelle für AseI vor; durch die Thr550Met Mutation wird eine neue Schnittstelle eingeführt; das 260Bp lange Amplikon wird dadurch in zwei Fragmente von 88 und 172 Bp geschnitten; da der Patient diese Mutation heterozygot besitzt enthält seine Spur 3 Banden: 260, 176 und 88 Bp (2% Agarosegel, Negativ des mit Ethidiumbromid gefärbten Geles);

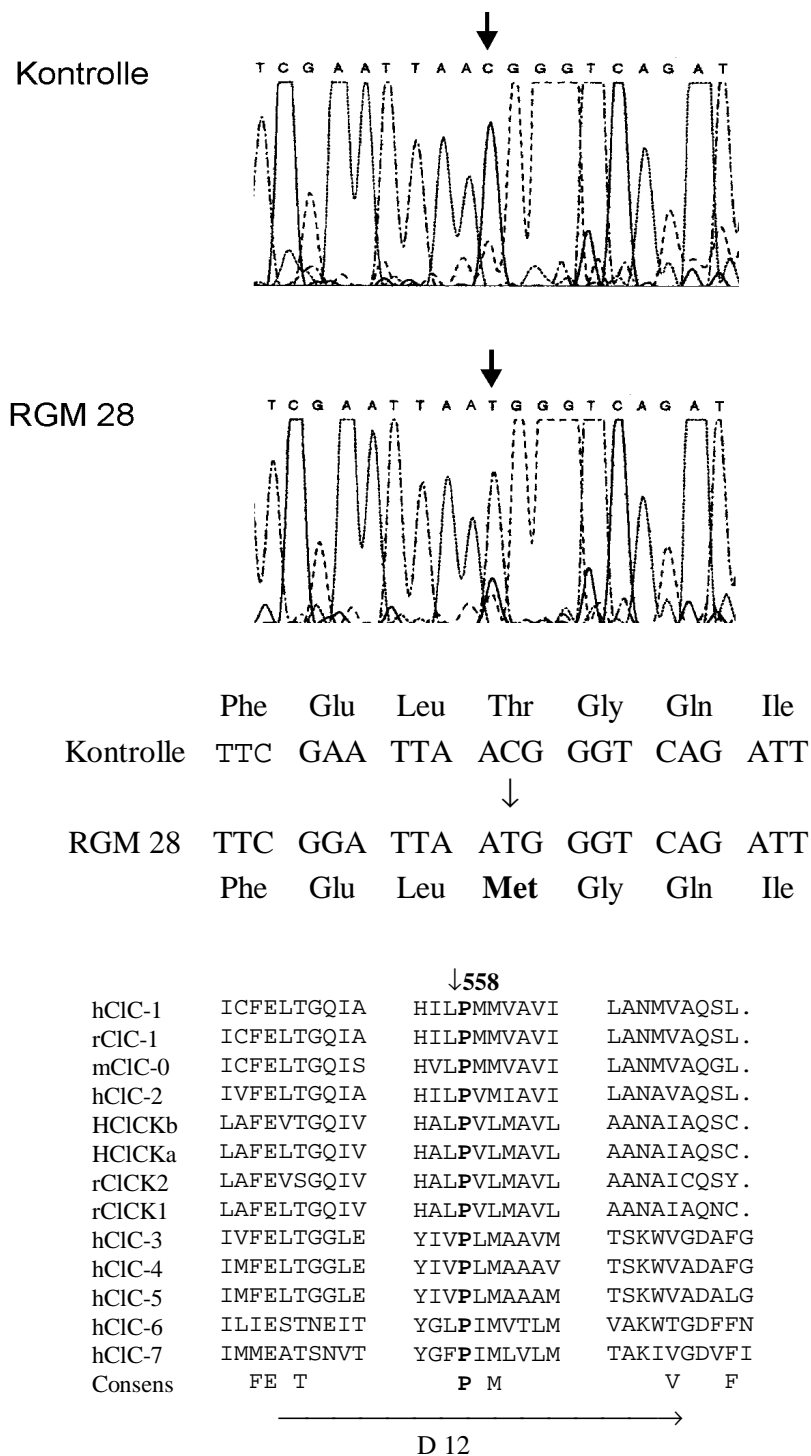


Abb. 10:
 Ausschnitt aus der Sequenzierung von Exon 15; Nachweis der C1649T Transition; das Codon für Threonin (ACG) wird durch das Codon für Methionin (ATG) ersetzt; evolutionärer Vergleich (Chloridkanalfamilie siehe Tabelle Nr.9): das Prolin in Position 558 ist hoch konserviert in der CIC-Genfamilie; D12: transmembranöse Domänen nach dem Modell von Middleton et al. 1994;

5. Pro558Leu

In Exon 15 konnte noch an einer anderen Stelle ein Austausch der Base Cytosin durch die Base Thymin nachgewiesen werden. Durch diese Transition (C1673T) wird das Codon für Prolin (CCC) an Position 558 zu CTC und steht nun für Leucin. Gleichzeitig wird wie bei der Thr550Met Mutation eine neue Schnittstelle eingeführt, in diesem Fall für das Restriktionsenzym BspHI. Mit Hilfe des Restriktionsenzym konnte bei 50 Kontrollpersonen die Pro558Leu Mutation ausgeschlossen werden. Leider lag von der türkischen Familie RGM 90, bei der diese Mutation nachgewiesen wurde, nur die Blutprobe des Indexpatienten und keine klinischen Daten vor. Außer der Pro558Leu Mutation in Exon 15 konnte keine weitere Mutation gefunden werden.

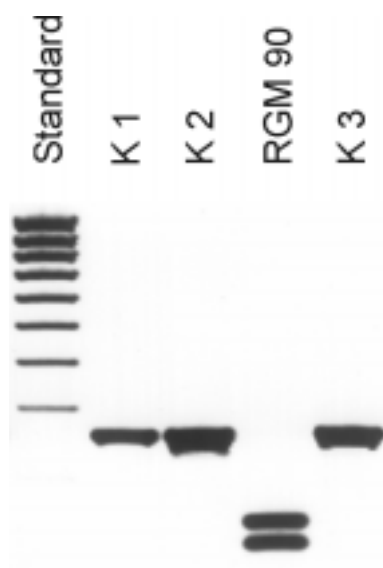
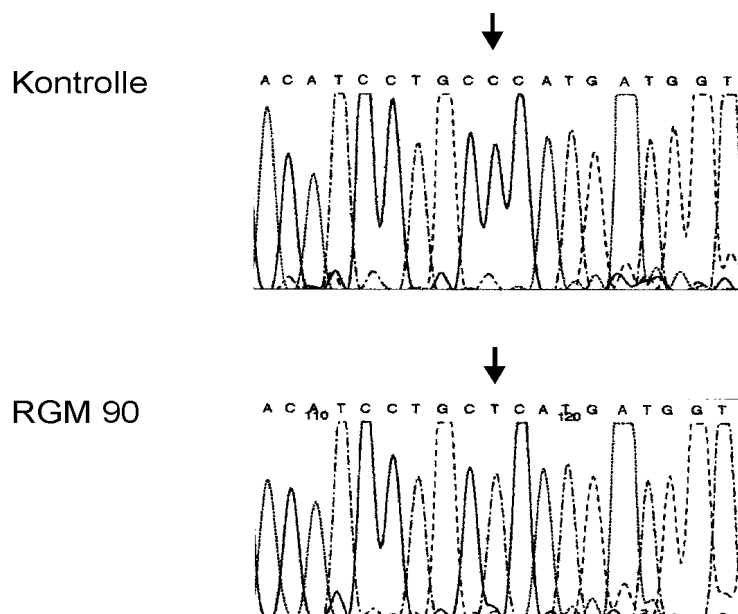


Abb. 11:

Restriktionsverdau von Exon 15 mit BspHI (Erkennungssequenz T^hCATGA); durch die Mutation C1673T wird in diesem Abschnitt eine neue Schnittstelle für BspHI eingeführt; das 260Bp lange Amplikon wird dadurch in zwei Fragmente von 108 und 152Bp geschnitten; der Patient ist im Vergleich zu den Kontrollen 1, 2 und 3 homozygot für diese Mutation (2% Agarosegel, Negativ des mit Ethidiumbromid gefärbten Geles);



Kontrolle	His	Ile	Leu	Pro	Met	Met	Val
	CAC	ATC	CTG	CCC	ATG	ATG	GTG
				↓			
RGM	CAC	ATC	CTG	CTC	ATG	ATG	GTG
	His	Ile	Leu	Leu	Met	Met	Val

			↓550	
hCIC-1	VSH.TVSTAV	ICFELTGQIA	HILPMMVAVI	
rCIC-1	VSH.TVSTAV	ICFELTGQIA	HILPMMVAVI	
mCIC-0	VSH.TVSTAV	ICFELTGQIS	HVLPMMAVAI	
hCIC-2	VSH.TVSTAV	IVFELTGQIA	HILPVMIAVI	
hCICKb	VTH.TISTAL	LAFEVTGQIV	HALPVLMAVL	
hCICKa	VTH.TISTAL	LAFEVTGQIV	HALPVLMAVL	
rCICK2	VTH.TISTAL	LAFEVSGQIV	HALPVLMAVL	
rCICK1	VTH.TISTAL	LAFEVTGQIV	HALPVLMAVL	
hCIC-3	VTRMTVSLVV	IVFELTGGLE	YIVPLMAAVM	
hCIC-4	VTRMTVSLVV	IMFELTGGLE	YIVPLMAAAV	
hCIC-5	VTRMTVSLVV	IMFELTGGLE	YIVPLMAAAM	
hCIC-6	VVRMTISLTV	ILIESTNEIT	YGLPIMVTLM	
hCIC-7	IVRMTLSLTV	IMMEATSNVT	YGFPIMLVLM	
consens	V:::T:S::V	FE T	P M	

D 11

D 12

Abb. 12:

Ausschnitt aus der Sequenzierung von Exon 15; Nachweis der C1673T Transition; das Codon für Prolin CCC wird zu CTC und codiert nun für Leucin; evolutionärer Vergleich (Chloridkanalfamilie siehe Tabelle Nr.9): das Threonin in Position 550 ist hoch konserviert in der CIC-Genfamilie; D 11 und D 12: transmembranöse Domänen nach dem Modell von Middleton et al. 1994;

6. Leu843Phe

Bei der türkischen Familie RGM 55 wurde durch PCR-SSCA und anschließender Sequenzierung eine C2530T-Transition im CLCN-1 Gen gefunden. Daraus resultiert die Substitution der Aminosäure Leucin in Position 843 durch ein Phenylalanin. Durch den Basenaustausch fällt die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Eco130I weg, wodurch der Nachweis dieser Mutation sehr erleichtert wird. 50 Kontrollpersonen wurden mit Hilfe von Eco130I überprüft und bei keinem dieser Personen wurde die Leu843Phe-Mutation gefunden. Innerhalb der türkischen Familie RGM 55, von der uns keine klinische Daten übermittelt wurden, sind die beiden betroffenen Geschwister und die nicht betroffene Schwester heterozygote Träger der Mutation. Von den Eltern trägt nur der Vater die Mutation heterozygot. Mit Hilfe des angewendeten Screeningverfahrens konnte keine weitere Mutation nachgewiesen werden.

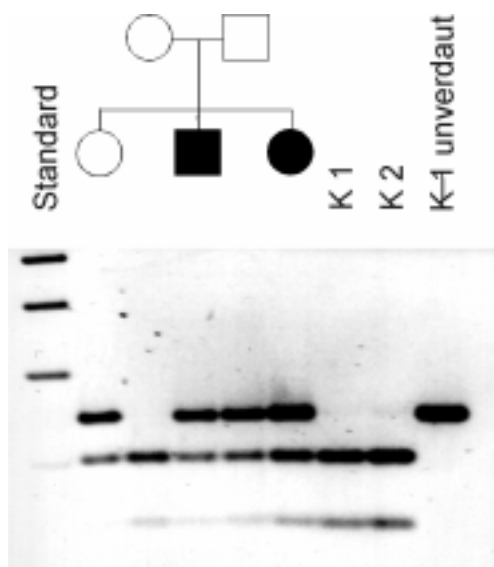
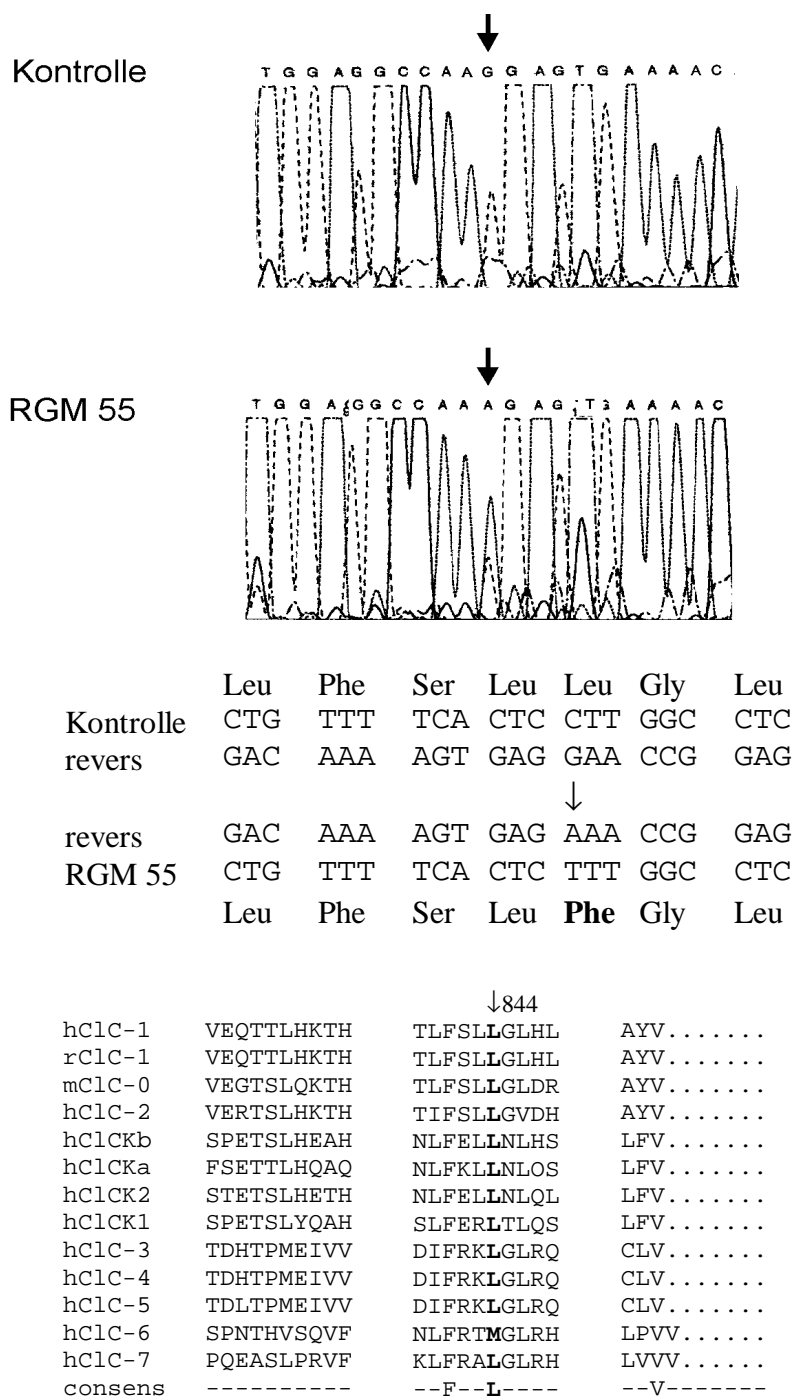


Abb. 13:

Restriktionsverdau von Exon 22 mit Eco 130I (Erkennungssequenz C'CWGG); normalerweise schneidet Eco 130I das Exon 22 in zwei Fragmente mit 102 und 42Bp; durch die C2530T Transition fällt diese Schnittstelle weg; mit Ausnahme der Mutter sind alle Mitglieder der Familie sind heterozygote Träger der Leu843Phe Mutation; K1 und K2 bezeichnen Kontroll DNA (2% Agarosegel, Negativ des mit Ethidiumbromid gefärbten Geles);



←-----

D 13

Abb. 14:

Ausschnitt der Sequenzierung von Exon 22 (revers); Nachweis der C2530T Transition, wodurch es zur Substitution des Leucin an Stelle 844 durch ein Phenylalanin kommt; evolutionärer Vergleich (Chloridkanäle siehe Tabelle Nr.9); das Lysin in Position 844 ist hoch konserviert in der ClC-Familie; D13: intrazelluläre Domäne nach dem Modell von Middleton et al. 1994;

Übersicht über die Ergebnisse der Mutationssuche:

Tab.5: Übersicht über die Patienten, bei denen nach den häufigsten bekannten Mutationen gesucht wurde:

Nr.	Patient	Mutation auf DNA Ebene	Aminosäureaustausch	Bemerkung
1	MC 26		---	
2	MC 28		---	
3	MC 29		---	
4	MC 32	C1478A	Ala493Glu	heterozygot
5	RGM 22	C2680T	Arg894Stop	homozygot
6	RGM 23		---	---
7	RGM 24		---	---
8	RGM 29		---	---
9	RGM 30		---	---
10	RGM 57		---	---
11	RGM 60		---	---
12	RGM 63	14Bp Deletion (1437-1450)	503 Stop	heterozygot
		T1238G	Phe413Cys	heterozygot
13	RGM 64			---
14	RGM 65			---
15	RGM 66			---
16	RGM 68			---
17	RGM 124	14 Bp Deletion (1437-1450)	503 Stop	heterozygot
18	RGM 125	14 Bp Deletion (1437-1450)	503 Stop	heterozygot
		C2680T	Arg894Stop	heterozygot
19	RGM 141			---
20	RGM 185	C2680T	Arg894Stop	heterozygot
21	UMS 3			---
22	PAM 12			---
23	PAM 13			---

Tab. 6: Übersicht über die Patienten, bei denen in allen 23 Exons des CLCN-1 Gens nach neuen Mutationen gesucht wurde:

Nr	Patient	Mutation auf DNA Ebene	Aminosäureaustausch	Bemerkung
1	MC 17	---		
2	RGM 27	14 Bp Deletion (1437-1450)	503Stop	heterozygot
3	RGM 28	C1649T	Thr550Met	heterozygot neue Mutation
4	RGM 53	6 Bp Deletion 1444-1449 C2680T	Deletion Gly 482 u. 483 Arg894Stop	heterozygot heterozygot
5	RGM 55	C2530T	Leu843Phe	heterozygot neue Mutation
6	RGM 56	C2680T	Arg894Stop	heterozygot
7	RGM 59	C2680T G854A	Arg894Stop Gly285Glu	heterozygot heterozygot
8	RGM 61	14 Bp Deletion (1437-1450)	503Stop	heterozygot
9	RGM 64	---		
10	RGM 67	G854A	Gly285Glu	heterozygot neue Mutation
11	RGM 71	---		
12	RGM 72	C2680T	Arg894Stop	heterozygot
13	RGM 73	C351 1Bp Deletion	Frameshift	homozygot
14	RGM 74	---		
15	RGM 75			
16	RGM 77	C2680T	Arg894Stop	heterozygot
17	RGM 90	C1673T	Pro558Leu	heterozygot neue Mutation
18	RGM 148			
19	RGM 142	14Bp Deletion (1437-1450)	503Stop	heterozygot
20	UMS 2	G937A	Ala313Thr	heterozygot neue Mutation

4.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Mutationen Gly200Arg und Tyr261Cys

Bei dem Patienten RMC 34-302 beschreibt Dr. Roland Heine in Exon 5 eine G598A-Transition (Heine 1995). Auf Grund dieser Mutation wurde ein Glycin in Position 200 gegen ein Arginin ausgetauscht. Der Patient und seine Mutter waren für diese Substitution heterozygot. Weitere Mutationen konnten beim Patienten RMC 43-302 nicht gefunden werden.

Die Mutter hatte eine latente, schwach ausgeprägte klinische Myotonie und myotone Entladungssalven im EMG. Der Sohn litt seit seinem zweiten Lebensjahr an einer stark ausgeprägten Myotonie. Bei ihm konnten ebenfalls myotone Entladungssalven im EMG festgestellt werden. Trotz der Verdachtsdiagnose rezessive myotone Myotonie hielten wir es für möglich, daß diese Mutation einen dominanten Effekt besitzt.

Um den krankheitsverursachenden Zusammenhang zwischen Mutation und Myotonie zu überprüfen, wurde diese Mutation mit Hilfe der *in vitro* Mutagenese in die Expressionsvektoren pRC-CMV und pSP64T, welche bereits das komplette CLCN-1 Gen enthielten, integriert (siehe Material und Methoden 3.3.10.).

Als Expressionssystem wurde eine permanente Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) verwendet. In diese Zellen wurde der pRC-CMV-Vektor mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitations-Methode transfiziert (siehe Material und Methoden 3.3.12) und mit dem Patch-Clamp-Verfahren in „whole-cell-recording“ Konfiguration gemessen.

Nach dem Erreichen der „whole-cell-recording“ Konfiguration wurden verschieden große Spannungssprünge unterschiedlicher Dauer appliziert. Von einem Haltepotential von 0mV wurde das Potential jeweils 400ms auf verschiedene Testpotentiale und dann wieder auf eine konstante Testspannung von -105mV gebracht. Die jeweiligen Pulsfolgen sind bei den entsprechenden Bildern in den Legenden angegeben. Die Wildtyp-Ströme sind charakterisiert durch eine schnelle, aber inkomplette Deaktivierung bei Hyperpolarisierung und durch einen zeitunabhängigen Strom bei positiveren Spannungen. Die Gly200Arg-Mutante ähnelte in ihrem Verhalten dem Wildtyp, zeigt aber bei positiver Spannung eine Aktivierung. Um ein „steady-state-level“ zu erlangen, wurde deshalb der Puls auf 800ms verlängert. Der Strom beim Einsetzen eines konstanten Testpulses nach Anlegen verschiedener Präpulse ist ein Maß für die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit

beim Präpuls. Für die Beschreibung dieser Offenwahrscheinlichkeit wurde die Boltzmann-Funktion

$$g(V) = g_{\max}/(1+\exp[(V-V_{0,5})/k_V])$$

verwendet. Die Darstellung dieses Stromes wird Aktivierungskurve genannt. Sie ist ein Maß für die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle bei verschiedenen Spannungen. Diese Aktivierungskurve war bei der Gly200Arg-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich verändert. Die Offenwahrscheinlichkeit des Wildtypkanals steigt zwischen -100mV und -20mV und erreicht dann ihr Maximum. Im Vergleich dazu öffnet die Mutante im wesentlichen erst bei -10mV und erreicht das Maximum der spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit frühestens bei 100mV.

Die zweite Mutation, die in das CLCN-1 Gen integriert wurde, entdeckte Volker Mailänder bei der Familie RMC 48 (Mailänder et al. 1996). Es handelt sich dabei um den Austausch der Aminosäure Tyrosin durch Cystein, in der Position 261. Bei diesem Patient konnte noch eine weitere Mutation Tyr150Cys nachgewiesen werden. Der Indexpatient ist Träger beider Mutationen, die Mutation Thr261Cys trägt außer ihm noch die Mutter und der nicht betroffene Bruder, während von der Mutation Tyr150Cys nur noch der Vater betroffen ist. Diese Mutation ist bereits von Bernd Wollnik und Susanne Wagner (Wollnik et al. 1997, Wagner et al. 1997) überprüft worden. Zur Überprüfung der Auswirkung auf die Struktur-Funktions-Beziehung, und der krankheitsverursachenden Wirkung der Thr261Cys Mutation sollte nun diese Mutation in unserem Labor erzeugt werden. Mit Hilfe der in vitro Mutagenese wurde die Mutation in das CLCN-1 Gen des Chloridkanals gebracht und ebenfalls in tsA-201 Zellen exprimiert. Auch in diesem Fall wurden die Ströme der exprimierten Kanäle mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in „whole-cell-recording“ Konfiguration gemessen und mit den Wildtyp Kanälen verglichen. Nach den derzeitigen Untersuchungen konnte jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden.

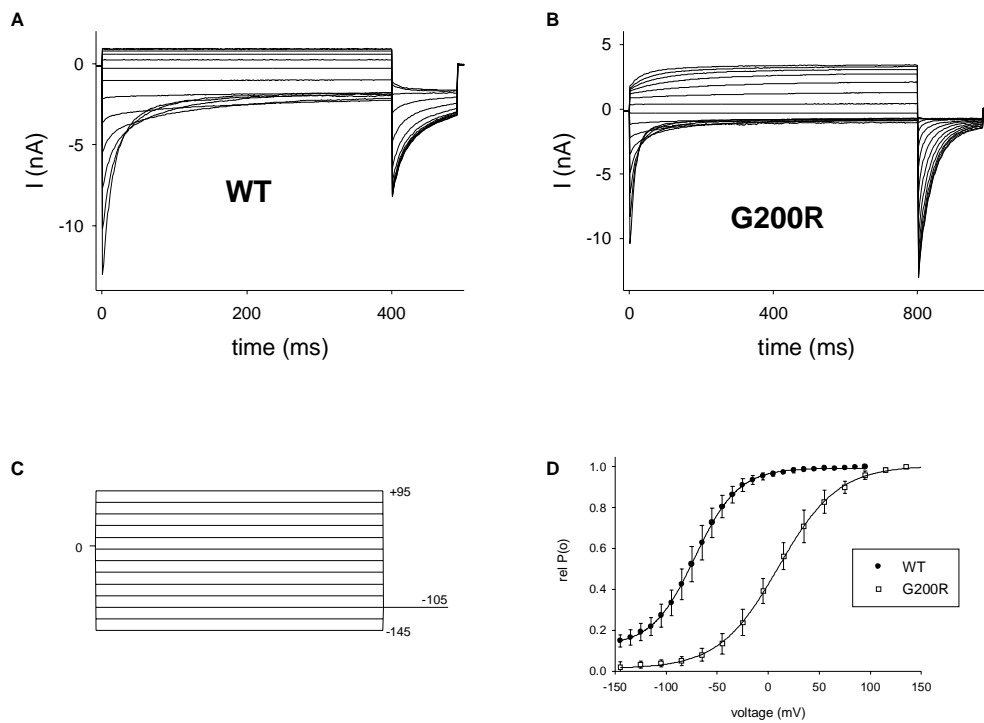


Abb. 15:

A: Ströme des Wildtyp-Chloridkanal ClC-1

B: Ströme der Gly200Arg-Mutante

C: Pulsprotokoll

D: Offenwahrscheinlichkeit der Gly200Arg-Mutante im Vergleich zum Wildtyp

(diese elektrophysiologischen Messungen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik von Dr. Lothar Kürz und Dr. Susanne Wagner Abteilung für Allgemeine Physiologie durchgeführt);

4.3 Der Austausch der Aminosäure Histidin durch die Aminosäure Alanin an den Positionen 180, 237, 436, 451 und 538;

Um mehr über die Membrantopologie und die Struktur-Funktions-Beziehung des humanen Muskelchloridkanals zu erfahren, wurde von Lothar Kürz und seinen Mitarbeitern (Abteilung für Allgemeine Physiologie, Universität Ulm) die Wirkung verschiedener proteinmodifizierender Reagenzien auf den Chloridkanal überprüft. Dabei wurde eine massive Stromreduzierung durch verschiedene cystein- und histidinreaktive Substanzen, wie zum Beispiel Zink, Diethylcarbonat und organische Quecksilberverbindungen festgestellt (Kürz et al. 1997). Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der sogenannten Zinkblockade geschenkt. Die Ergebnisse dieser Zinkblockade auf den Chloridkanal waren vereinbar mit einem direkten Einfluß auf den Ionenfluß und dem Vorhandensein von mindestens zwei extrazellulären Bindungsstellen. Um diese Bindungsstellen für Zink oder andere blockierende Reagenzien zu identifizieren, wurden bestimmte Cystein- und Histidinreste durch Alanin mit Hilfe der in-vitro-Mutagenese ersetzt. Der Austausch der Histidine in Position 180, 237, 436, 451 und 538 war Teil dieser Arbeit. Den Austausch der Cysteine in den Positionen 179, 242, 254, 271, 481, 546 und von Histidin in Position 555 übernahm Maja Kuchenbecker als Teil ihrer Dissertation. Die Mutanten wurden transient in tsA201 Zellen transfiziert und elektrophysiologisch mit Hilfe der Patch-clamp-Technik charakterisiert. Die Ströme wurden unter physiologischen Bedingungen und unter Blockade mit 1mM Zink und DEPC (Diethylpyrocarbonat) gemessen. Die Messung der Histidinsubstituenten zeigte keinen deutlichen Unterschied zu dem Blockadeverhalten des Wildtyp (Kürz et al. 1999).

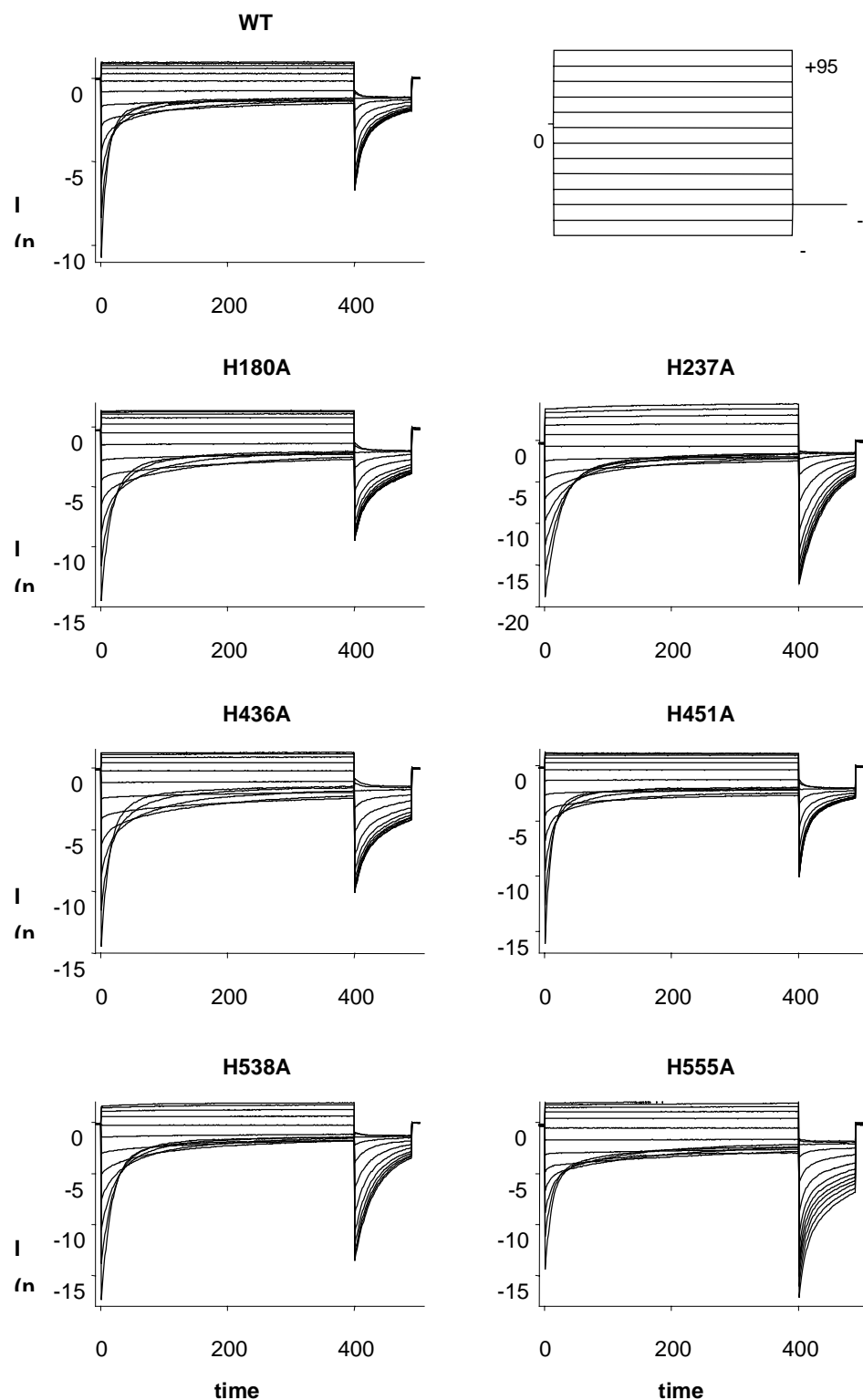


Abb. 16:

Ströme der Mutanten His180Ala, His237Ala, His436Ala, His451Ala, His538Ala, und His555Ala im Vergleich zum Wildtyp Chloridkanal ClC-1; Pulsprotokoll; (diese elektrophysiologischen Messungen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik von Dr. Lothar Kürz und Dr. Susanne Wagner Abteilung für Allgemeine Physiologie durchgeführt);

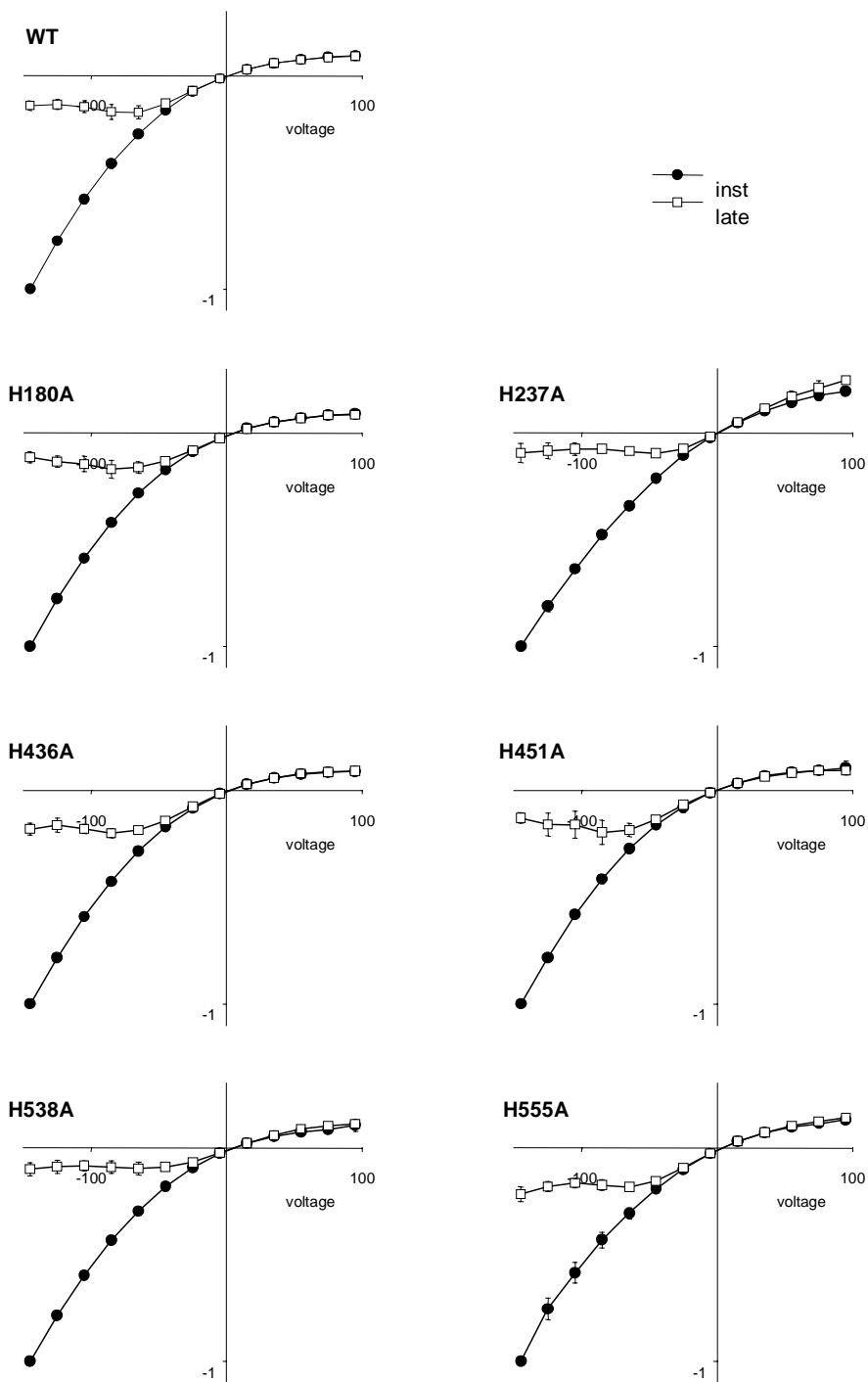


Abb. 17
Strom-Spannungskurve der Mutanten His180Ala, His237Ala, His451Ala, His538Ala und His555Ala im Vergleich zum Wildtyp;

5 Diskussion

5.1 Genotypisierung

Spektrum von Mutationen im Patientenkollektiv mit dominantem Erbgang

Bei einem Patienten mit dominanter Form der Myotonia congenita wurde die rezessive Mutation Ala493Glu in Exon 14 gefunden.

Wie kann das Auftreten von rezessiv beschriebenen Mutationen bei Patienten mit dominanter Vererbungsform erklärt werden?

1. Die Diagnose Thomsen-Myotonie trifft nicht zu.

Bei der Familie MC 32 ist aus dem Stammbaum zu erkennen, daß ein dominanter Erbgang vorliegt, über drei Generationen ist eine Myotonia congenita zu beobachten. Untersuchungsmaterial lag leider nur vom Indexpatienten vor, bei dem im zweiten Lebensjahr die ersten myotonen Symptome auftraten. Klinisch und elektromyographisch konnte eindeutig eine Myotonie diagnostiziert werden.

2. Es könnte sich bei der Ala493Glu Mutation um eine Mutation handeln, die einen ähnlichen Grenzfall wie die Mutationen Arg894Stop und Gly230Glu darstellt.

Beide Mutationen wurden sowohl bei dominanter als auch bei rezessiver Form der Myotonia congenita beobachtet. Coexpressionsstudien zeigten, daß beide Mutationen nur einen schwachen dominant negativen Effekt ausüben. Bei beiden Mutanten konnten Ströme um 30-40% der Wildtypströme gemessen werden, ein Wert, der sich zwischen dem Wert von rezessiven Mutanten (ca. 50%) und dominanten Mutationen (10-15%) befindet (Meyer-Kleine et al. 1995, Steinmeyer et al. 1994).

3. Die Ala493Glu Mutation, die bisher noch nicht elektrophysiologisch charakterisiert wurde könnte ein seltener Polymorphismus sein und die eigentliche, krankheitsverursachende Mutation wurde noch nicht nachgewiesen.

Bei dem Indexpatienten der Familie MC 32 wurde nicht das gesamte CLCN-1 Gen untersucht, so daß keine Auskunft über weitere Mutationen vorliegt. Ein ähnlicher Fall

wurde von Meyer-Kleine et al. 1995 bei der Mutation Ala437Thr beschrieben. Damals zeigt die elektrophysiologische Charakterisierung der von Koty et al. 1994 als rezessiv beschriebenen Mutation keinen Unterschied zum Wildtyp-Chloridkanal. Daraufhin wurden weitere Kontrollpersonen auf diese Mutation untersucht, und bei 5 von 200 Chromosomen diese Mutation nachgewiesen (Meyer-Kleine et al. 1995, Koty et al. 1994).

Welche weiteren Indizien sprechen für einen Polymorphismus:

Die Aminosäure Alanin in Position 493 ist nur mittelmäßig konserviert. In bestimmten Mitgliedern der Chloridkanal-Familie ist die neutrale Aminosäure Alanin durch die ebenfalls neutralen Aminosäuren Valin (mClC-0, cClC-0) und Isoleucin (hClC-3, hClC-4, mClC-3, rClC-5) oder durch die schwefelhaltige Aminosäure Methionin (rClC-3) ersetzt. Eine eindeutige Klärung der Bedeutung der Ala493Glu Mutation kann nur durch eine elektrophysiologische Charakterisierung erfolgen.

Mutationsspektrum im Patientenkollektiv mit rezessivem Erbgang

Die bisher beschriebenen Mutationen bei Patienten mit rezessivem Erbgang können in zwei Gruppen unterteilt werden. Eine kleine Gruppe von Mutationen kommt häufig vor. Dazu gehören die Mutationen Phe413Cys, Arg894Stop und die 14 Basenpaar Deletion in Exon 13. Daneben gibt es eine große Gruppe von sehr seltenen Mutationen.

Die drei häufigen Mutationen finden sich bei 16 von 68 Chromosomen in der gesamten Patientengruppe mit RGM. Das ergibt einen Prozentsatz von ca. 23,5% im Vergleich zu 32% in Studien von Meyer-Kleine (Meyer-Kleine et al. 1995).

In der RGM Patientengruppe, bei der das gesamte CLCN-1 Gen untersucht wurde, konnte insgesamt bei 13 von 18 Patienten eine Mutation nachgewiesen werden.

Warum wurde bei den Patienten, bei denen alle 23 Exon untersucht wurde zum Teil keine (6 Patienten) bzw. nur eine rezessive (10 Patienten) Mutation gefunden?

1. Bei den Patienten, bei denen keine Veränderung nachgewiesen wurde, könnte eine Fehldiagnose vorliegen.

2. Zur Mutationssuche wurde die Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) eingesetzt. Die SSCA ist eine sehr empfindliche Methode, bei der die Versuchsbedingungen sehr exakt eingehalten werden müssen, um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Trotz exakt eingehaltener Versuchsbedingungen lassen sich nicht alle Exons gleich gut untersuchen. Schwierigkeiten mit unspezifischen Banden gab es mit den Exons 16 bis 18 und 23a und 23b. Die Ausbeute dieser Methode könnte erhöht werden, wenn die Banden bei 4°C und zusätzlich bei Raumtemperatur im Polyacrylamidgel aufgetrennt würden. Ein weitere Vorteil könnte zudem der Nachweis der Banden mit einer radioaktiven Sonde an Stelle von Ethidiumbromid bringen, da die radioaktive Methode den Vorteil hat, daß Filme mit unterschiedlicher Expositionszeit entwickelt werden könnten. Trotz dieser Optimierungsmöglichkeiten ist die SSCA eine Methode, mit der sich nicht 100% aller Mutationen nachweisen lassen (Sheffield et al. 1993). Um vollständige Sicherheit zu erlangen, müßte bei den Patienten, bei denen bisher keine Mutation gefunden wurde, das CLCN-1 Gen vollständig sequenziert werden.

Im Rahmen dieser Studie konnten sechs Mutationen erstmals beschrieben werden. Welche Kriterien sprechen für einen krankheitsverursachenden Zusammenhang zwischen Mutation und Myotonia congenita?

1. Bei jeweils mindestens 50 Kontrollpersonen konnten die einzelnen Mutationen ausgeschlossen werden. Damit ist ein seltener Polymorphismus jedoch noch nicht ausgeschlossen.

2. Bei drei (Gly285Glu, Leu843Phe, 6-Bp-Deletion 1444-1449) der sechs neuen Mutationen konnte eine Überprüfung des klinischen Bildes mit dem Genotyp innerhalb der Familie durchgeführt werden. Bei allen drei Mutationen waren sowohl klinisch betroffene als auch klinisch nicht betroffene Familienmitglieder heterozygote Träger der Mutation, so daß von compound heterozygoten betroffenen Mutationsträger ausgegangen werden muß. Bei allen drei Mutanten konnte jedoch durch das angewandte Screeningverfahren keine weitere Mutation nachgewiesen werden. Für eine endgültige Aussage über die Segregation des Phänotyp mit dem Genotyp sind deshalb weitere Untersuchungen, z.B. die

Sequenzierung aller 23 Exons des CLCN-1 Genes dieser betroffenen Familienmitglieder erforderlich.

3. Die Auswirkung einer Mutation ist abhängig von der Art der Mutation. Eine Nonsense-Mutation, bei der eine bestimmte Aminosäure durch ein Stoppcodon ersetzt wird, spricht meist, je nach Position des Strangabbruchs für einen Funktionsverlust des Protein. Bei einer Missense-Mutation wird eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure ersetzt. Je nach dem ob der Aminosäureaustausch durch eine chemisch verwandte oder durch eine Aminosäure mit unterschiedlicher Seitenkette, elektrischer Ladung oder unterschiedlicher polarer Seitenkette stattfindet, spricht man von einer konservativen oder einer nichtkonservativen Substitution. Die Auswirkungen einer konservativen Substitution auf die Proteinfunktion ist häufig gering. Bei fünf der sechs beschriebenen Mutationen fand eine nichtkonservative Substitution statt, was für eine Mutation sprechen könnte. Bei der sechsten Mutation fand eine 6-Bp-Deletion statt, durch die das Leseraster nicht verändert wird, sondern lediglich zwei Glycin-Aminosäuren entfallen. Bei der elektrophysiologischen Untersuchung dieser Mutation zeigten sich Wildtypströme (mündliche Mitteilung von L.Kürz Abteilung für Allgemeine Physiologie). Dieses Ergebnis spricht eher für einen Polymorphismus.

4. Der Austausch einer evolutionär konservierten Aminosäure spricht eher für eine krankheitsverursachende Mutation als für einen Polymorphismus. Deshalb wurden die betroffenen Aminosäuren mit den entsprechenden Aminosäuren vergleichbarer Chloridkanäle wie dem Chloridkanal der Ratte (rClC-1) und des Zitterrochens *Torpedo marmorata* (mClC-0) und mit weniger verwandten humanen Chloridkanälen, mit ganz unterschiedlicher Funktion verglichen (Chloridkanal Familie siehe Tabelle 10). Bei fünf der sechs beschriebenen Mutationen fand ein Austausch einer hoch konservierten Aminosäure statt. Durch die 6-Bp-Deletion entfällt eine hoch konservierte und eine wenig konservierte Aminosäure. Weitere klärende Hinweise über die Auswirkungen dieser Mutationen (Polymorphismus oder rezessive Mutation) könnte die elektrophysiologische Charakterisierung der einzelnen Mutanten liefern.

5.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Gly200Arg und Tyr261Cys Mutante

Bisher sind insgesamt sieben dominante und acht rezessive Mutationen bei Patienten mit Myotonia congenita elektrophysiologisch charakterisiert worden. Eine weitere Charakterisierung der dominanten Mutation Gly200Arg und der rezessiven Mutation Tyr261Cys sollen einen Beitrag dazu leisten, die Auswirkungen dieser Mutationen und damit auch den Aufbau und die Funktion des Chloridkanals besser verstehen zu können.

Von der Sequenz, der Position und der Art des Aminosäureaustausches ist die Art des Erbganges nicht abzuleiten, dominante und rezessive Mutationen liegen dicht zusammen und sind scheinbar willkürlich verteilt, was an dem Beispiel der dominanten Mutation in Position Ile290Met und der rezessiven Mutation in Position Glu291Lys deutlich gemacht werden kann. Als dominant wird ein Allel bezeichnet, wenn beim heterozygoten Träger neben seiner Wirkung die Wirkung des anderen Allels nicht erkennbar ist. Als Erklärung einer solchen dominanten Wirkung stehen drei verschiedene Modelle zur Verfügung:

1. Das mutierte Allel kodiert für ein Protein, das mit einer zusätzlichen Funktion ausgestattet ist, die zur Krankheit führt und vom gesunden Allel nicht kompensiert werden kann (dominant positiver Effekt).
2. Das Protein verliert bzw. verändert seine Funktion und 50% der Wildtyp- Gendosis reichen zur Erhaltung der Funktion nicht aus (Haploinsuffizienz).
3. Das Protein verliert bzw. verändert seine Funktion und 50% der Gendosis reichen zur Erhaltung der Funktion aus. Diese Konstellation ist nur durch einen dominant negativen Effekt des mutierten Protein auf das Wildtypprotein zu erklären. Dabei zwingt die Mutante seine veränderte Funktion dem Wildtypprotein durch Interaktion zwischen den Molekülen (z.B. veränderte Tertiär- und Quartärstruktur des Heteromers) auf. Dieser zuletzt genannte Mechanismus wurde, seit der Chloridkanal mit der Myotonie in Zusammenhang gebracht wurde (Koch et al., 1992), für die dominante Vererbung der Myotonia congenita Thomsen angenommen und durch elektrophysiologische Messungen bestätigt.

Die Gly200Arg Mutante stellte die letzte der sieben dominanten Mutationen dar, die nahezu parallel von Bernd Wollnik (Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg) und Susanne Wagner (Abteilung für allgemeine Physiologie der Universität Ulm) elektrophysiologisch charakterisiert wurde. Bei der alleinigen Expression von Gly200Arg konnte Susanne Wagner Ströme messen, die sich hinsichtlich ihrer Amplitude, der charakteristischen Deaktivierung und der Einwärtsrektifizierung annähernd wie Wildtyp verhielten und sich im positiven Spannungsbereich mit einer Aktivierungskurve von den Wildtypströmen unterschieden.

Bei der Auswertung der „Tail-Ströme“ zeigte sich jedoch ein drastischer Unterschied, eine Verschiebung der Aktivierungskurve um ca. 100mV, einen der größten „Shifts“ der bisher bei dominanten Mutationen beobachtet wurde.

Bernd Wollnik überprüfte zusätzlich die Auswirkungen einer Coexpression von Wildtyp und Mutante und stellte eine Rechtsverschiebung um ca. 30 mV fest (Wollnik et al. 1997).

Vergleicht man diese Meßergebnisse mit denen anderer bereits untersuchten dominanter Mutationen, so stellt man fest, daß die Mutationen Ile290Met und Arg317Gln ebenso nahezu Wildtypströme aufzeigen.

Die Mutationen Pro480Leu, Gly230Glu, Gln552Arg und Arg894Stop weisen im Gegensatz dazu, eine große Reduktion der Ströme oder keine Ströme im möglichen Spannungsbereich des verwendeten Systems auf. Bei allen Mutationen mit Ausnahme der Gly230Gln und Arg894Stop (hier wurden keine Angaben über die Offenwahrscheinlichkeit angegeben) ergab die Auswertung der „Tail-Ströme“ eine positive Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit der Chloridkanäle um 40 bis 100mV.

Daraus folgt, daß der vorherrschende Mechanismus der mutierten Chloridkanäle darin besteht, daß die Kanäle im physiologischen Spannungsbereich nur teilweise geöffnet sind und damit keinen ausreichenden Beitrag zur Repolarisierung leisten können.

Durch Coexpression von Wildtyp und Mutante im Verhältnis 1:1 konnten je nach „Stärke“ der dominanten Mutation Ströme zwischen 10 und 35% der Wildtypströme bzw. ein positiver Shift der Aktivierungskurve nachgewiesen werden. Die Pro480Leu Mutation, die zusammen mit dem Arg300Gln Polymorphismus in der originalen Thomsen Familie nachgewiesen wurde, zeigte bei der Coexpression 10% der Wildtypströme und bewies damit einen deutlich dominanten Charakter. Die Mutationen Gly230Glu und Arg894Stop bewegen sich mit Ströme um 35% im Grenzgebiet zwischen dominanter und rezessiver

Vererbung und wurden tatsächlich bei dominanter und bei rezessiver Form der Myotonia congenita nachgewiesen.

Im Gly200Arg/WT Heteromer ist die Mutante in der Lage, ihre veränderte spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit auf den Kanalkomplex zu übertragen. Die resultierende Offenwahrscheinlichkeit ist zwar im geringeren Maß als im Gly200Arg Homomer verändert, diese Veränderung reicht aber aus, um den Kanal an der Beteiligung der Repolarisierung zu behindern. Dieser Mechanismus erklärt damit vollkommen den dominanten Charakter der Gly200Arg Mutation.

Auffallend an diesen Ergebnissen ist, daß mehrere Mutationen an den unterschiedlichsten Positionen des Kanals den gleichen Effekt auf das Schaltverhalten ausüben. Michael Pusch erklärt dieses Phänomen in seiner Arbeit vom Dezember 1995 damit, daß diese Mutationen möglicherweise das „Gate“ nicht direkt betreffen, sondern die thermodynamische Stabilität der geschlossenen und offenen Kanalkonformationen verändern (Pusch et al. 1995).

Tab. 7: Übersicht über die bisher veröffentlichten Meßergebnisse dominanter Mutationen:

Mutante	Position	Expression	Coexpression	Literatur
Gly200Arg	zw. D ₂ und D ₃	WT ähnliche Ströme p _{open} Rechtsverschiebung von 102mV (67mV)	p _{open} Rechtsverschiebung von ca. 30mV	Wagner et al. 1998 Wollnik et al. 1997
Gly230Glu	zw. D ₃ und D ₄	keine Ströme bei physiologischen Spannungen	Ströme < 35% der WT-Ströme	Steinmeyer et al. 1994
Ile290Met	Ende D ₅	WT ähnliche Ströme p _{open} Rechtsverschiebung von ca. 75mM	p _{open} Rechtsverschiebung von 45mV	Pusch et al. 1995
Arg317Gln	D ₆	WT ähnliche Ströme p _{open} Rechtsverschiebung von ca. 40mM	p _{open} Rechtsverschiebung von 25mV	Pusch et al. 1995
Pro480Leu	zw. D ₉ und D ₁₀	keine Ströme bei physiologischen Spannungen; p _{open} Rechtsverschiebung geschätzt auf ca. 180mV	Ströme kleiner 10% des WT; p _{open} Rechtsverschiebung von 90mM	Pusch et al. 1995 Steinmeyer et al. 1994
Gln552Arg	zw. D ₁₁ und D ₁₂	keine Ströme	p _{open} Rechtsverschiebung von 60mV	Pusch et al. 1995
Arg894Stop	C-terminus	ca. 10-15% der WT-Ströme	30-40% der WT-Ströme	Meyer-Kleine et al. 1995 Steinmeyer et al. 1994

P_{open} Offenwahrscheinlichkeit, D Domäne, WT Wildtyp;

Von den Chloridkanal-Mutationen, die zu einer rezessiven Myotonie führen, wird erwartet, daß sie zu einem Funktionsverlust führen. Da eine fünfzigprozentige Gendosisfunktion ausreicht, um die Funktion des Chloridkanals aufrecht zu erhalten, kommt es erst bei Homozygotie bzw. bei „compound“ Heterozygotie zu Krankheitserscheinungen. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Charakterisierung der Tyr261Cys und Tyr150Cys

Mutation zeigten jedoch Wildtypströme. Dieses Ergebnis läßt verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zu:

1. Bei den beiden Mutationen handelt es sich um seltene Polymorphismen und die eigentliche krankheitsverursachende Mutation wurde noch nicht gefunden. Volker Mailänder untersuchte im Falle der Tyr261Cys Mutation 51 türkische und 57 deutsche Kontrollen und im Falle der Tyr150Cys Mutation 54 türkische und 87 deutsche Kontrollen und konnte bei keiner dieser Kontrollen die Mutationen nachweisen (Mailänder V: 2000). Da deutsche Kontrollprobanden für eine bei einer türkischen Familie gefundenen Mutation weniger gut geeignet sind, wäre eine weitere Untersuchung an türkischen Kontrollprobanden sinnvoll, um Klarheit über das Vorliegen einer rezessiven Mutation oder eines Polymorphismus zu schaffen.

2. Die Chloridleitfähigkeit ist bei den Patienten, die diese Mutation tragen, durch einen Mechanismus reduziert, welcher nur in der intakten Muskelzelle, nicht aber in Oozyten- oder im HEK-Zell-System repräsentiert wird. Ein möglicher Mechanismus könnte die Störung wichtiger Interaktionen, wie Aktivierung und Hemmung unterschiedlicher Proteine sein. Wegen der bei beiden Mutationen betroffenen Aminosäure Cystein könnte eine Bildung von Disulfidbrücken zu anderen Proteine, die Funktion bzw. die Dimerbildung des Chloridkanals stören.

Bei fünf der bisher neun elektrophysiologisch untersuchten rezessiven Mutanten wurden Wildtypströme festgestellt. 1994 stellte Lorenz bei der Mutante Val327Gln Wildtypströme fest und dieses Ergebnis veranlaßte ihn zu der Interpretation, daß der Basenaustausch G979A an der Exon-Intron Grenze vor Exon acht zu einem veränderten Spleißingverhalten des RNA-Stranges führen könnte (Lorenz et al. 1994). Meyer-Kleine konnte 1995 bei der Ala437Thr Mutation Wildtypströme nachweisen und konnte durch weiterführende Untersuchungen von Kontrollprobanden den Verdacht eines Polymorphismus bestätigen (Meyer-Kleine et al.1995). Bei drei weiteren Mutationen (Tyr261Cys, Tyr150Cys, 6-Bp Deletion 1444-1449), die von unserer Arbeitsgruppe gefunden wurde, konnten nun Wildtypströme nachgewiesen werden. Für die elektrophysiologische Funktion scheinen diese Positionen nicht wichtig zu sein. Um diese Ergebnisse richtig interpretieren zu können, wären weitere Untersuchungen von Kontrollprobanden und eine weitere

elektrophysiologische Charakterisierung von rezessiven Mutationen sinnvoll. Die Ergebnisse der rezessiven Mutanten geben keine weiteren Hinweise auf die Struktur-Funktions-Beziehung des Chloridkanals.

Tab. 8: Übersicht über bisher veröffentlichte Meßergebnisse von rezessiven Mutanten:

Mutation	Position	Meßergebnisse	Besonderheiten	Literatur
Asp136Gly	Ende D1	Ströme, die grundlegend vom WT abweichen; langsame Aktivierung anstelle schneller Deaktivierung im neg. Spannungsbereich	besonders schwerer Phänotyp; evtl. Beeinflussung des Spannungssensors	Fahlke et al. 1995
Arg496Ser	Ende D10	keine Ströme im physiol. Spannungsbereich Coexpression: ca. 50% der WT-Ströme		Lorenz et al. 1994
Met485Val	Anfang D ₁₀	reduzierte Einzelkanal-leitfähigkeit von 1,5 auf 0,3pS Coexpression: WT-Ströme		Wollnik et al. 1997
Tyr150Cys	extrazell. Loop zw.D1 und D2 nicht gut konserviert	WT-Ströme Coexpression mit Thr261Cys: WT-Ströme		Wollnik et al. 1997
Tyr261Cys	extrazell. Loop zw. d4 und D5	WT-Ströme		Wollnik et al. 1997, Wagner et al. 1998
Val327Gln	intrazell. zw. D6 und D7	WT-Ströme	verändertes Spleißing	Lorenz et al. 1994
Glu291Lys	intrazell. zw. D5 und D6	keine Ströme bei -140 und +100mV Coexpression: WT-Ströme		Pusch et al. 1995
Ala437Thr	extrazell. zw. D8 und D9	WT-Ströme		Meyer-Kleine et al. 1995
Deletion Gly 482-483		WT-Ströme		mündliche Mitteilung von L.Kürz

D Domäne, WT-Ströme Wildtyp-Ströme;

5.3 Elektrophysiologische Charakterisierung der Histidinsubstituenten

Bei der Suche nach Reagenzien, die den Chloridkanal beeinflussen, wurde die Arbeitsgruppe um L.Kürz (Abteilung für allgemeine Physiologie) auf das Zink-Molekül aufmerksam. Zink ist ein zweiwertiges Metall und zählt zu den essentiellen Spurenelementen des menschlichen Körpers. Eine 1mM Zink-Lösung führte bei den Untersuchungen zu einer massiven Reduzierung der Chloridströme. Dieses Ergebnis war vereinbar mit einem direkten Einfluß auf den Ionenfluß.

Da bereits von anderen Ionenkanälen wie z.B. dem GABA_A-Rezeptor im ZNS eine regulierende Wirkung von Zink bekannt war (Harrison u. Gibbons 1994), wurde der Verdacht geweckt, daß Zink auch auf den Chloridkanal einen regulierenden Faktor ausüben könnte.

Von Strukturanalysen anderer Proteine z.B. dem Transkriptionsfaktor IIIA (Rhodes u. Klug 1993) ist bekannt, daß Zink bevorzugt in Metall-Protein-Komplexen und dabei bevorzugt an die Aminosäuren Histidin, Cystein, Aspartat und Glutaminsäure gebunden vorkommt.

Zwei weitere Resultate, die bei der elektrophysiologischen Charakterisierung des Chloridkanals mit den unterschiedlichen Reagenzien gefunden wurden, sprechen für die Bindungen an die Aminosäure Histidin. Zum einen konnten die Ströme auch mit dem histidylreaktiven Reagenz Diethylpyrocarbonat (DEPC) geblockt werden und zum anderen spricht die pH-Abhängigkeit der Zinkblockade für die Aminosäure Histidin (Kürz et al. 1997).

Die Ergebnisse der extrazellulären und fraglich intrazellulären Histidin- und Cysteinsubstitutionen durch Alanin lassen zumindest eine Bindungsstelle für Zink am Cystein in Position 546 des Chloridkanals vermuten. Ob weitere eventuell unbekannte Bindungspartner für Zink existieren konnte nicht geklärt werden (Kürz et al. 1999).

6 Zusammenfassung

Gegenstand meiner Arbeit ist die genetisch bedingte Muskelerkrankung Myotonia congenita. Das führende klinische Symptom, bei Patienten die an dieser Erkrankung leiden ist eine Muskelsteifigkeit. Vorwiegend nach einer Muskelruhe führt eine Muskelkontraktion zu einer mehrere Sekunden andauernden Nachaktivität, welche die Entspannung der Muskulatur verhindert. Die Grundlage für diese Erkrankung stellen rezessiv und dominant vererbte Mutationen im Gen des hauptsächlich muskulären Chloridkanals CIC-1 dar.

Seit 1992 konnten bereits fünf dominante, 28 rezessive und zwei Mutationen, die sowohl bei dominanten als auch bei rezessiven Erbgang gefunden wurden, im CLCN-1 Gen identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nun weitere sechs rezessive Mutationen (Gly285Glu, Ala313Thr, Thr550Met, Pro558Leu, Leu844Phe, 6 Bp Deletion 1444-1449) zum ersten mal beschrieben werden.

Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese leistete diese Arbeit einen Beitrag dazu, zwei bereits bekannte Mutationen (Gly200Arg und Thr261Cys) von Patienten mit dominanter (Thomsen Myotonie) und rezessiver Form (Becker Myotonie) der Myotonia congenita elektrophysiologisch mit Hilfe der Patch-Clamp Technik zu charakterisieren. Durch Nachweis einer Rechtsverschiebung in der Aktivierungskurve der dominanten Mutation Gly200Arg gelang es, den krankheitsverursachenden Mechanismus dieser Mutante darzustellen. Diese Rechtsverschiebung führt dazu, daß der Chloridkanal im physiologischen Spannungsbereich nur teilweise geöffnet ist und somit nach einem Aktionspotential nicht ausreichend zur Stabilisierung und Repolarisierung des Sarkolemmes beitragen kann.

Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung der rezessiven Mutation Tyr261Cys zeigten sich Ströme wie beim Wildtypkanal. Dieses Ergebnis kann unterschiedlich interpretiert werden. Zum einen ist es möglich, daß es sich bei dieser Mutation lediglich um einen Polymorphismus handelt. Andererseits könnte dieses Ergebnis auf einen unbekanntem Pathomechanismus hindeuten, bei dem die Chloridleitfähigkeit der betroffenen Patienten durch einen Mechanismus reduziert ist, welcher nur in intakten Muskelzellen, nicht aber in dem verwendeten Expressionssystem repräsentiert wird.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Aufklärung der Struktur- und Funktionsbeziehung des Chloridkanals CIC-1. Um mehr Informationen über den Mechanismus der Zinkblockade des Chloridkanals CIC-1 herauszufinden, wurden die in Frage kommenden Bindungspartner (Histidin-Aminosäuren) des Zink Moleküls im CLCN-1 Gens durch Alanin substituiert. Anschließend wurden die mutierten Kanäle auf eine

Veränderung der Zinkblockade überprüft. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit histidinsubstituierten Chloridkanäle (His180Ala, His237Ala, His436Ala, His451Ala und His538Ala) zeigten keinen signifikanten Unterschied zu Wildtypkanälen. Damit können die überprüften Histidine als fragliche Bindungspartner des Zink-Moleküls ausgeschlossen werden.

7 Anhang

Tab. 9: Primersequenzen vom Chloridkanal-Gen CLCN-1

Bp: Länge des resultierenden PCR-Produkts in Basenpaaren;
 Tm: experimentell verwendete Annealing Temperatur in °C;

Exon	Sequenz	Bp	Tm
1V	GGG GCT CGG GGG GAG GGA AT	272	56
1R	CCT CAT TTT CAC CAG TCT CT		
2V	CTT CCA CAA GGC AGA CAC TG	234	51
2R	ATG CCC AAC TTA TTC TCC TA		
3V	TTT TCC CTC ATC TCT TCC TA	256	53
3R	CCA TAA CAC ACC CTG CTT AC		
4V	CGG TGG ACA CGG CTG CTC AG	211	59
4R	GCC GAG TCT GGT GGC AAG TT		
5V	TAA TCT TTC AAC GCT TTT AG	248	53
5R	ATC CAC TTC CAC TCC CAG AG		
6V	CCT CTG TGT AAC TCC CGT AT	227	53
6R	ATT TCA CTG TCT CAA CCT TA		
7V	ACC CAC CCT GTT TCT CTG TC	227	51
7R	GCT ATT CTC GTA AGT AAC CT		
8V	TGC CCC CAA CCA CAC TTC TG	259	55
8R	GCC CAT TAT TCC TTT TCT GA		
9V	ACT GGC CTT TCC ATC CTA CA	157	54
9R	GGC TCA CTC CAC ACC CTG CT		
10V	TCC AAG AGA TGA GGA TTT CA	229	52,
10R	GAC AAA AAG GGA GGA ACT CT		5
11V	ATT TAC TGT GAG TTG GCT GA	178	52
11R	GTG CTG TTT CCT CTT TAC CA		
12V	GAC CAC CTT CTG CTT CTT CC	214	54,
12R	TGG AGG TTT AGG GTG TTG CT		5
13V	CAG AGT TGA AAG GGT ATT CC	176	51
13R	CCT TAT GTT TCC TGT ATC CT		
14V	ATC TCG TAA CAC CTT CCT TC	221	51
14R	ATG GGA GAG TTT AAG TGT GG		
15V	CAG GCG TAT TCC TGT GTC AT	260	56
15R	ATT CAG GTC ACT AGC TCT GG		

Exon	Sequenz	Bp	Tm
16V	GGC TAA CCC ACC ATG CTT CT	209	55
16R	ATT CAG GTC ACT AGC TCT GG		
17V	GCC TCT CCT GTT CCT TCT CA	389	59
17R	AGA CGA CGC TTT CCC TTG CT		
18V	CCA GGC TGA GAC TTC TTA CT	179	55
18R	AGG GGT GAG TTG GGG TGC AT		
19V	CAT CCA CTC ACC TGT CCT CT	197	54,
19R	GGG TCT CTG CCT TCC TGA TT		5
20V	GGA AGA AAA GGG AAA GAA CT	171	47
20R	GAC AAC ACA ATA AAG AAG GT		
21V	TGA TTT TCG TGA CTT TCC TC	172	54
21R	CCC CAC AGC CCT GAG CAG TC		
22V	ACC TGT GCT CTT CAT CCT CA	144	55
22R	CCC TCC TGC TGC TCA AAT GG		
23aV	TTT CCA ACT TTT TAC CCT CT	229	55
23aR	TGG GGA GGC AGC AAT CAC AT		
23bV	ACT GGA ACA GGG GAT GTG AT	244	58
23bR	TTT ATG AGG AGG TCG TGG GA		

Die Sequenzen dieser Primer sind aus Lorenz et al. 1994 entnommen. V vorwärts (5'-3'), R rückwärts (5'-3')

Tab. 10: Chloridkanalfamilie

Symbol	Gewebeverteilung	Funktion	Literatur
CIC-0	elektrisches Organ Skelettmuskel	Stabilisierung des Ruhemembranpotentials	Jentsch 1993
hCIC-1	Skelettmuskel (glatte Muskulatur, Herz)	Stabilisierung des Ruhemembranpotentials	
hCIC-2	v.a. epitheliale Zellen	Regulation der Zellvolumen	Thiemann et al. 1992
hCIC-3	Gehirn	?	Kawasakie et al. 1995
hCIC-4	Skelettmuskel, Gehirn, Herz	?	Slegenhorst et al 1994
hCIC-5	Niere	?	Steinmeyer et al. 1995
hCIC-6	ubiquitär, v.a. Hoden, Ovar, Darm, Skelettmuskel	?	Brandt und Jentsch 1995
hCIC-7	ubiquitär, v.a. Hoden, Ovar, Darm, Gehirn	?	Brandt und Jentsch 1995
hCICKa	Niere	Reabsorbtion von	Kieferle et al. 1994
hCICKb		Chloridionen,	
hCICK1		Volumenregulation	
hCICK2			

Abdalla JA, Casley WL, Cousin HK, Hudson AJ, Murphy EG, Cornelis FC, Hashimoto L, Ebers GC: Linkage of Thomsen disease to the T-cell-receptor beta (TCRB) locus on chromosome 7q35. *Am J Hum Genet* 51: 579-584 (1992)

Adkinson L, Harris B, Lane PW, Davisson MT: New alleles of „arrested development of righting response (adr)“. *Mouse News Lett* 84: 89-90 (1989)

Adrian RH, Bryant SH: On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres. *J Physiol (Lond)* 240: 505-515 (1974)

Beck CL, Fahlke C, George AL: Altered voltage-dependent activation of skeletal muscle Cl-channel causes myotonia in the fainting goat. *Biophys J* 70: A69 (1996)

Becker PE: Zur Frage der Heterogenie der erblichen Myotonien. *Nervenarzt* 28: 455-460 (1957)

Bryant SH, Mambrini M, Entrikin RK: Chloride and potassium membrane conductances are decreased in skeletal muscle fibers from the (mto) myotonic mouse. *Neuroscience* 456: 17-34 (1987)

Bryant SH: Cable properties of external intercostal muscle fibres from myotonic and non-myotonic goats. *J Physiol* 204: 539-550 (1969)

Bryant SH: The electrophysiology of myotonia with a review of congenital myotonia of goats. In: Desmedt JE (ed): *New Developments in Electromyography and Clinical Neurophysiology* 1, Karger, Basel, S. 420-450 (1973)

Burton F, Dörstelmann U, Hunter OF: Singel-channel activity in sarcolemmal vesicles from human and other mammalian muscles. *Muscle Nerve* 11: 1029-1038 (1988)

Clark SL, Luton FH, Cutler JT: A form of congenital myotonia in goats. *J Nev Ment Dis* 90: 297-309 (1939)

Deymeer F, Cakirkaya S, Serdaroglu P, Schleithoff L, Lehmann-Horn F, Rüdell R, Ozdemir C: Transient weakness and compound muscle action potential decrement in myotonia. *Muscle Nerve* 21: 1334-1337 (1998)

Deymeer F, Lehmann-Horn F, Serdaroglu P, Cakirkaya S, Benz S, Rüdell R, Ozdemir C: Electrical myotonia in heterozygous carriers of recessive myotonia congenita. *Muscle Nerve* 22: 123-125 (1999)

Fahlke C, Knittle T, Gurnett CA, Campbell KP, George AL: Subunit stoichiometry of human muscle chloride channels. *J Gen Physiol* 109: 93-104 (1997)

Fahlke C, Rosenbohm A, Mitrovic N, George AL, Rüdell R: Mechanism of voltage-dependent gating in skeletal muscle chloride channels. *Biophys J* 71: 695-706 (1996)

Fahlke C, Rüdell R: Chloride currents across the membrane of mammalian skeletal muscle fibres. *J Physiol* 484: 355-368 (1995)

Fahlke C, Rüdell R, Mitrovic N, Zhou M, George AL: An aspartic acid residue important for voltage-dependent gating of human muscle chloride channels. *Neuron* 15: 463-467 (1995)

Fahlke C, Zachar E, Rüdell R: Single-channel recordings of chloride currents in cultured human skeletal muscle. *Pflügers Arch* 421: 108-116 (1992)

Franke C, Iaizzo PA, Hatt H, Spittelmeister W, Ricker K, Lehmann-Horn F: Altered Na channel activity and reduced Cl-conductance cause hyperexcitability in recessive generalized myotonia (Becker). *Muscle Nerve* 14: 762-770 (1991)

Füchtbauer EM, Reininghaus J, Jockusch H: Developmental control of the excitability of muscle: transplantation experiments on a myotonic mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3880-3884 (1988)

George AL, Crackover MA, Abdalla JA, Hudson AJ, Ebers GC: Molecular basis of Thomsen's disease (autosomal dominant myotonia congenita). *Nat Genet* 3: 305-310 (1993)

George AL, Sloan-Brown K, Fenichel GM, Mitchell GA, Spiegel R, Pascuzzi RM: Nonsense and missense mutations of the muscle chlorid channel gene in patients with myotonia congenita. *Hum Mol Genet* 3 : 2071-2072 (1994)

Graham FL, van der Eb AJ: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology* 52: 456-463 (1973)

Gronemeier M, Condie A, Prosser J, Steinmeyer K, Jentsch TJ, Jockusch H: Nonsense and missense mutations in the muscular chloride channel gene ClC-1 of myotonic mice. *J Biol Chem* 269: 5963-5967 (1994)

Gründer S, Thiemann A, Pusch J, Jentsch TJ: Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360: 759-762 (1992)

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Plugers Arch* 391: 85-100 (1981)

Hanahan D: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580 (1983)

Harrison NL, Gibbon SJ: Zink an endogenous modulator of ligand and voltage-gated ion channels. *Neuropharmac* 33: 935-952 (1994)

Heine R: Korrelation von Genotyp und Phänotyp bei Natrium- und Chloridkanalkrankheiten, Shaker, Aachen, Hum. Biol. Dissertation, Universität Ulm; (1995)

Heller AH, Eicher EM, Hallett M, Sidman RL: Myotonia, a new inherited muscle disease in mice. *J Neurosci* 2: 924-933 (1982)

Iaizzo PA, Franke C, Hatt H, Spittelmeister W, Ricker K, Rüdell R, Lehmann-Horn F: Altered sodium channel behaviour causes myotonia in dominantly inherited myotonia congenita. *Neuromuscul Disord* 1: 47-53 (1991)

Jentsch TJ, Günther W, Pusch M, Schwappach B: Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J Physiol* 482: 19-25 (1995a)

Jentsch TJ, Lorenz C, Pusch M, Steinmeyer K: Myotonia due to ClC-1 chloride channel mutation. *50*:149-159 (1995b)

Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G: Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348: 510-514 (1990)

Jockusch H, Bertram K, Schenk S: The genes for two neuromuscular diseases of the mouse, „arrested development of righting response,“ (adr), and „myotonia“, (mto) are allelic. *Genet Res* 52: 203-205 (1986)

Kieferle S, Fong P, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ: Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6943-6947 (1994)

Klocke R, Steinmeyer K, Jentsch TJ, Jockusch H: Role of innervation, excitability, and myogenic factors in the expression of the muscular chloride channel ClC-1. *J Biol Chem* 269: 27635-27639 (1994)

Koch MC, Ricker K, Otto M, Wolf Z, Zoll B, Lorenz C, Steinmeyer K, Jentsch TJ: Evidence for genetic homogeneity in autosomal recessive generalised myotonia (Becker). *J Med Genet* 30: 914-917 (1993)

Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik KH, Jentsch TJ: The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257:797-800 (1992)

Koty PP, Pegoraro E, Hobson G, Marks HG, Turel A, Flagler D, Cadaldini M, Angelini C, Hoffman EP: Myotonia and the muscle chloride channel: dominant mutations show variable penetrance and founder effect. *Neurology* 47: 963-968 (1996)

Költgen D, Brinkmeier H, Jockusch H: Myotonia and neuromuscular transmission in the mouse: *Muscle Nerve* 14: 775-780 (1991)

Kürz LL, Klink H, Jakob I, Kuchenbecker M, Benz S, Lehmann-Horn F, Rüdell R: Identification of three cysteines as targets of the Zn²⁺ blockade of the human skeletal muscle chloride channel. *J Biol Chem* 274: 11687-11692 (1999)

Kürz L, Wagner S, George AL, Rüdell R: Probing the major skeletal muscle chloride channel with Zn²⁺ and other sulfhydryl-reactive compounds. *Pflügers Arch* 433: 357-363 (1997)

Lehmann-Horn F, Mailander V, Heine R, George AL: Myotonia levior is a chloride channel disorder. *Hum Mol Genet* 4: 1397-1402 (1995)

Lehmann-Horn F, Rüdell R, Ricker K: Membrane defects in paramyotonia congenita (Eulenburg). *Muscle Nerve* 10: 633-641 (1987)

Lehmann-Horn F, Rüdell R: Molecular pathophysiology of voltage-gated ion channels. *Reviews Physiol, Biochem Pharmacol* 128: 195-268 (1996)

Lorenz C, Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ: Genomic organization of the human muscle chloride channel *ClC-1* and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia. *Hum Mol Genet* 3: 941-946 (1994)

Mailänder V: Mutationen des Chloridkanalgens CLCN-1 bei Patienten mit Myotonia congenita. Med Dissertation, Universität Ulm, (2000)

Mailänder V, Heine R, Deymeer F, Lehmann-Horn F: Novel muscle chloride channel mutations and their effects on heterozygous carriers. *Am J Hum Genet* 58: 317-324 (1996)

Mehrke G, Brinkmeier H, Jockusch H: The myotonic mouse mutant ADR: electrophysiology of the muscle fiber. *Muscle Nerve* 11: 440-446 (1988)

Meyer-Kleine C, Ricker K, Otto M, Koch MC: A recurrent 14 Bp deletion in the CLCN-1 gene associated with generalized myotonia (Becker). *Hum Mol Genet* 3: 1015-1016 (1994)

Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Ricker K, Jentsch TJ, Koch MC: Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN-1) leading to myotonia. *Am J Hum Genet* 57: 1325-1334 (1995)

Middleton RE, Pheasant DJ, Miller C: Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature* 383: 337-340 (1996)

Middleton RE, Pheasant DJ, Miller C: Purification, reconstitution, and subunit composition of a voltage-gated chloride channel from Torpedo electroplax. *Biochemistry* 33: 13189-13198 (1994)

Miller C, Richard EA: The voltage-dependent chloride channel of Torpedo electroplax. In: Alvarez-Leefmans FJ, Russel JM (eds) Chloride channels and carriers in nerve, muscle and glia cells. Plenum, New York: S. 383-405 (1990)

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215 (1988)

Mullis K, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Met Enzymol.* 155: 335 (1987)

Orita M, Iwahara H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770 (1989)

Palade PT, Barchi RL: Characteristics of the chloride conductance in muscle fibres of the rat diaphragm. *J Gen Physiol* 69: 325-342 (1977)

Pusch M, Jentsch TJ: Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. *Physiol Rev* 74: 813-827 (1994)

Pusch M, Steinmeyer K, Jentsch TJ: Low single channel conductance of the major skeletal muscle chlorid channel, ClC-1. *Biophys J* 66: 149-152 (1994)

Pusch M, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ: Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the ClC-1 chloride channel. *Neuron* 15: 1455-1463 (1995)

Ricker K, Koch MC, Lehmann-Horn F, Pongratz D, Otto M, Heine R, Moxley RT: Proximal myotonic myopathy: A new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts. *Neurology* 44: 1448-1452 (1994)

Ricker K, Koch MC, Lehmann-Horn F, Pongratz D, Speich N, Reiners K, Schneider C, Moxley RT: Proximal myotonic myopathy. Clinical features of a multisystem disorder similar to myotonic dystrophy. *Arch Neurol* 52: 25-31 (1995)

Ricker K, Moxley RT, Heine R, Lehmann-Horn F: Myotonia fluctuans. A third type of muscle sodium channel disease. *Arch Neurol* 51: 1095-1102 (1994)

Rhodes D, Klug A: Zinc Fingers. *Sci Am* 268: 56-59 (1993)

Rüdel R, Lehmann-Horn F, Ricker K: The non-dystrophic myotonias: Engel AG, Franzini-Armstrong C (eds) *Myology*, 2nd edition. McGraw-Hill, New York: S. 1291-3101 (1994)

Rüdel R, Dengler R, Ricker K, Haass A, Emser W: Improved therapy of myotonia with the lidocaine derivative tocainide: *J Neurol* 222: 275-278 (1980)

Rüdel R, Ricker K, Lehmann-Horn F: Transient weakness and altered membrane characteristic in recessive generalized myotonia (Becker). *Muscle Nerve* 11: 202-211 (1988)

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S; Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491 (1988)

Sambrook K, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A laboratory Manual, Second Edition*, Cold Harbor, S. 6.3 – 6.13 (1989a)

Sambrook K, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A laboratory Manual, Second Edition*, Cold Harbor, S. 18.47 – 18.59 (1989b)

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24: 104-108 (1977)

Schmidt-Rose T, Jentsch TJ: Transmembrane topology of a CLC-chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 7633-7638 (1997)

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitutions. *Genomic* 16: 325-332 (1993)

Steinmeyer K, Ortland C, Jentsch TJ: Primary structure and funktional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel: *Nature* 354: 301-304 (1991)

Steinmeyer K, Lorenz C, Pusch M, Koch MC, Jentsch TJ: Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen): *EMBO J* 13: 737-743 (1994)

Steinmeyer K, Klocke R, Ortland C, Gronemeier M, Jokusch H, Gründer S, Jentsch TJ: Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in motonic mice. *Nature* 354: 304-308 (1991)

Thiemann A, Gründer S, Pusch M, Jentsch TJ: A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356: 57-60 (1992)

Thomsen J: Tonische Krämpfe in willkürlich beweglichen Muskeln in Folge von erblicher psychischer Disposition. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 6: 702-718 (1876)

Wagner S, Deymeer F, Kürz LL, Benz S, Schleithoff L, Lehmann-Horn F, Serdaroglu P, Özdemir C, Rüdell R: The dominant chloride channel mutant G200R causing fluctuating myotonia: clinical findings, electrophysiology and channel pathology. *Muscle Nerve* 21: 1122-1128 (1998)

Wagner S, Kürz L.L., Benz S, Mailänder V, Deymeer F, Lehmann-Horn F, Rüdell R: The dominant myotonia causing mutation G200R leads to a right-shift of the activation curve of the muscle chloride channel hClC-1 *Pflüger Archiv*. 433: 143 (1997)

Watkins WJ, Watts DC: Biological features of the new A2G-adr mouse with abnormal muscle function. *Lab Anim* 18: 1-6 (1984)

Wollnik B, Kubisch C, Steinmeyer K, Pusch M: Identification of functionally important regions of the muscular chloride channel ClC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations. *Hum Mol Genet* 6: 805-811 (1997)

White MM, Plaskett J: „Nervous;“ „stiff-legg,“ or fainting goats. *Am Vet Rev* 28: 556-560 (1904)

Zachar E, Fahlke C, Rüdell R: Whole-cell recordings of chloride currents in cultured human skeletal muscle. *Pflügers Arch* 421: 101-107 (1992)