

Aus dem Friedrich-Baur-Institut der Medizinischen Fakultät  
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich)

**Analyse des *RAPSN* – Gens  
bei kongenital myasthenen Syndromen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Gina Anja Ivonne Mildner  
aus Karl – Marx – Stadt

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Angela Abicht

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Müller - Felber

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Juliane Simona Müller

Dekan: Prof. Dr. med. Dr .h.c. Maximilian Reiser , FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2009

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:**

Müller JS, **Mildner G**, Müller-Felber W, Schara U, Krampfl K, Petersen B, Petrova S, Stucka R, Mortier W, Bufler J, Kurlemann G, Huebner A, Merlini L, Lochmüller H, Abicht A. Rapsyn N88K is a frequent cause of CMS in European patients. *Neurology* 2003, 60: 1813–1818.

Müller JS, **Mildner G**, Müller- Felber W, Schara U, Krampfl K, Petersen B, Petrova S, Stucka R, Mortier W, Bufler J, Kurlemann G, Huebner A, Merlini L, Abicht A, Lochmüller H. Rapsyn N88K is a frequent cause of CMS in European patients. 8<sup>th</sup> World Muscle Society (WMS) International Congress, Szeged, Hungary. *Neuromuscul Disord* 2003 , **13**: G.P.9.04: 663.

**Mildner G**, Müller JS, Müller-Felber W, Schara U, Krampfl K, Petersen B, Petrova S, Stucka R, Mortier W, Bufler J, Kurlemann G, Huebner A, Merlini L, Abicht A, Lochmüller H. Rapsyn N88K is a frequent cause of CMS in European patients. 16. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V., Hannover 2003.

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>A</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>B</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.	Neuromuskuläre Endplatte	8
1.1.	Aufbau	8
1.2.	Erregungsablauf	8
1.3.	AChR Clustering	9
1.3.1.	Agrin	9
1.3.2.	MUSK	10
1.3.3.	Rapsyn	10
1.4.	AchR	11
2.	Kongenitale Myasthene Syndrome	12
2.1.	Klinik	12
2.2.	verschiedene Formen von CMS	12
2.3.	molekulargenetische Klassifizierung	14
2.3.1.	Postsynaptische CMS	14
2.3.2.	Synaptische CMS	15
2.3.3.	Präsynaptische CMS	16
2.3.4.	weitere Kandidatengene	16
<b>C</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>D</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
1	Patienten.	18
1.1.	klinische Daten	18
1.2.	Patientenmaterial	18
2.	Chemikalien	18
3.	Molekulargenetische Methoden	19
3.1.	DNA Extraktion	19
3.2.	Polymerasekettenreaktion	19
3.2.1.	Prinzip der PCR	19
3.2.2.	Primer	19
3.2.3.	Reaktionsbedingungen der PCR	19
3.2.4.	Aufreinigung des PCR Produktes	20

3.3.	Sequenzanalyse	21
3.4.	Genotypanalyse	21
3.5.	RFLP Analyse	22
<b>E</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
1.	Mutationsanalyse	25
2.	Häufigkeit von <i>RAPSN</i> N88K	26
3.	Patienten mit N88K	27
3.1.	Klinik der untersuchten Patienten	27
3.2.	Genotyp der Patienten	40
<b>F</b>	<b>Diskussion</b>	<b>42</b>
1.	Molekulargenetische Ergebnisse	42
2.	Die Rolle von Rapsyn	42
3.	Die Founder – Mutation N88K	43
4.	Phänotyp der Patienten	44
5.	Weiterführende Ergebnisse zur Founder – Mutation N88K	45
6.	Weiterführende Ergebnisse zu <i>RAPSN</i> Mutationen	45
7.	Weiterführende Ergebnisse zum Phänotyp von <i>RAPSN</i> Patienten	46
8.	Wichtige diagnostische Aspekte	46
9.	Konsequenzen für die Patienten	48
<b>G</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>49</b>
<b>H</b>	<b>Anhang</b>	<b>53</b>
1.	Fragebogen zur Erfassung der klinischen Daten	53
2.	Verzeichnis der verwandten Abkürzungen	55
3.	Danksagung	58
4.	Ehrenwörtliche Erklärung	59

## A ZUSAMMENFASSUNG

Bei den kongenitalen myasthenen Syndromen (CMS) handelt es sich um seltene erbliche Erkrankungen des Kindesalters. Ursächlich ist eine gestörte Erregungsleitung im Bereich der neuromuskulären Endplatte. Dieser können verschiedene Gendefekte zugrunde liegen. Ebenso zeigt das klinische Bild eine große Variationsbreite von schweren frühkindlichen Krankheitsbildern bis hin zu erwachsenen Patienten, die kaum durch die Erkrankung eingeschränkt sind.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von genetischen Veränderungen im *RAPSN* Gen, die zu einer gestörten Erregungsübertragung an der menschlichen neuromuskulären Endplatte und damit zu CMS führen. Als häufigste genetische Veränderung waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit Mutationen im Gen, kodierend für die epsilon Untereinheit des AChR, bekannt. Als wesentlich seltenere genetische Ursachen waren Veränderungen anderer Untereinheiten des Rezeptors (*CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRND*) bekannt, sowie der präsynaptischen Cholin-Acetyltransferase (*CHAT*-Gen) bzw. des synaptischen ColQs (*COLQ*-Gen), das als Verankerungsprotein der Acetylcholinesterase (AChE) dient.

Es wurden über 120 CMS-Patienten aus Deutschland und anderen europäischen Ländern molekulargenetisch analysiert. Bei 12 Patienten aus 10 Familien fand sich die Mutation N88K im *RAPSN* Gen homozygot oder heteroallelisch zusammen mit unterschiedlichen anderen Missense-Mutationen. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation N88K, welche kurz zuvor von Ohno et al erstbeschrieben wurde, die zweithäufigste Mutation im Münchner Patienten-Kollektiv darstellt und die häufigste genetische Ursache eines CMS bei Patienten mitteleuropäischer Abstammung ist. Die besondere Häufigkeit von N88K konnte auf einen Founder in der indoeuropäischen Bevölkerung zurückgeführt werden, was im weiteren Verlauf auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt wurde.

Die meisten Patienten mit dieser Mutation zeigten klinisch einen recht homogenen Phänotyp mit Krankheitserstmanifestation im frühen Kindesalter, Ansprechen auf eine Therapie mit AChE-Inhibitoren und einem relativ gutartigem Krankheitsverlauf. Kennzeichnend war insbesondere das wiederholte Auftreten plötzlicher Apnoen, das - einhergehend mit einer allgemeinen Verschlechterung der myasthenen Symptomatik – meist im Rahmen von fieberhaften Infekten auftrat. Teilweise zeigten die Patienten auch leichte dysmorphologische Auffälligkeiten des Gesichts. Eine Patientin unterschied sich von allen anderen durch eine erst im Erwachsenenalter auftretende Manifestation der Erkrankung. Eine derartige Verlaufsform wurde später bei anderen Patienten ebenfalls beobachtet und als „Late-onset“ Form abgegrenzt, die eine Differentialdiagnose

zur seronegativen Myasthenia gravis darstellt.

Für die sichere Diagnosestellung sowie Einordnung der CMS ist die Analyse der zugrunde liegenden Mutation und deren pathophysiologischen Auswirkung von Bedeutung. Die molekulare und klinische Charakterisierung der CMS-Patienten im Rahmen dieser Arbeit konnte neue Genotyp-Phänotyp-Korrelationen etablieren. Für eine erste Zuordnung der Patienten zu einer zugrunde liegenden CMS Form ist eine genaue Charakterisierung des klinischen Phänotyps sinnvoll. Die so gewonnenen ersten Daten können für den einzelnen Patienten in Bezug auf weitere molekulargenetische Diagnostik und Beratung hilfreich sein.

## **B EINLEITUNG**

Unter Myasthenien versteht man eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen die neuromuskuläre Übertragung gestört ist. Die Klinik wird durch eine belastungsabhängige Muskelschwäche charakterisiert. Man kann die Myasthenien einteilen in die autoimmun bedingten wie z.B. die Myasthenia gravis oder das Lambertton-Eaton-Syndrom, sowie die hereditären mit welchen sich diese Arbeit beschäftigt.

### **1. NEUROMUSKULÄRE ENDPATTE**

#### **1.1. Aufbau**

Als neuromuskuläre Endplatte versteht man den synaptischen Übergang vom Motoneuron zur Muskelfaser. Die Nervenfasern verlieren hier ihre Myelinscheide und bilden Verzweigungen, in welchen der Transmitter Acetylcholin in Vesikeln gespeichert vorliegt. An den Muskelfasern befinden sich nikotinische ACh Rezeptoren. Die Übertragung eines elektrischen Impulses vom Nerv findet über chemische Transmission auf den Muskel statt, wodurch eine Muskelkontraktion ausgelöst wird. Der Abbau des Acetylcholins im synaptischen Spalt erfolgt durch das Enzym Acetylcholinesterase (Vincent A. et al 1997, Wood and Slater 2001).

#### **1.2. Erregungsablauf**

Der Neurotransmitter Acetylcholin wird im Cytoplasma der präsynaptischen Neuronen aus Acetyl-CoA und Cholin, katalysiert durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) synthetisiert. Mit Hilfe eines spezifischen Transporters, der vesikulären Acetylcholintransferase (VAChT), wird es in die synaptischen Vesikel aufgenommen.

Bei Eingang eines Aktionspotentials am Nerventerminal erfolgt eine Depolarisation desselben. Hierdurch wird ein Calciumstrom über spannungsabhängige Calciumkanäle ausgelöst. Dies wiederum triggert die Freisetzung von Acetylcholin über Vesikelexozytose in den synaptischen Spalt. Dort diffundiert Acetylcholin zu den in der postsynaptischen Membran lokalisierten AChR, an welche es sich bindet (Mc Conville und Vincent 2002, siehe auch Abb 1).

Hierdurch kommt es zu einer Öffnung des Acetylcholinrezeptor-Ionenkanals und zur Depolarisation der postsynaptischen Membran.

Beim Überschreiten eines bestimmten Schwellenpotentials werden spannungsabhängige Natriumkanäle am Boden der postsynaptischen Einfaltungen geöffnet und ein Aktionspotential durch Natriumeinstrom generiert. Dieses Aktionspotential wird nun über die Muskelfaser fortgeleitet und führt zu einer Kontraktion des Muskels.

Acetylcholin wird anschließend durch das Enzym Acetylcholin Esterase (AChE) hydrolysiert. Dieses Enzym ist in der Basalmembran des synaptischen Spaltes über eine kollagenartige Struktur (ColQ) verankert und bewirkt durch seine Aktivität eine Begrenzung der Reizweiterleitung.

Das Membranpotential der präsynaptischen Membran wird wieder hergestellt durch die Öffnung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen und hieraus folgendem Kaliumausstrom.

Acetylcholinrezeptoren findet man an der Spitze der postsynaptischen Einfaltungen in der Basalmembran während die spannungsabhängigen Natriumkanäle am Boden dieser zu finden sind. Diese Lokalisation ist begründet in der Interaktion des Agrin-MuSK- Rapsyn-AChR Signaltransduktionsweges.

### **1.3. AChR Clustering**

Für das Clustering des AChR an der postsynaptischen Membran sind verschiedene Proteine notwendig, welche in Signalwegen miteinander interagieren.

#### 1.3.1. Agrin

Bei Agrin handelt es sich um ein ~200 kDa Protein, dessen Carboxylregion das Clustern der AChR induziert, während die Sequenzen in der Aminoregion für die Assoziation von Agrin mit der extrazellulären Matrix verantwortlich sind.

Agrin wird von verschiedenen Zelltypen synthetisiert. Durch Spleißen entstehen unterschiedliche Agrinisoformen, die sich in ihrer Effektivität beim AChR Clustering unterscheiden.

Von Motoneuronen synthetisiertes Agrin wird in Motoraxonen zur Synapse transportiert, in den synaptischen Spalt freigesetzt und stimuliert dort das Clustern anderer synaptischer Proteine wie AChE, Rapsyn, Utrophin und anderen (Burden S. 1998), siehe auch Abb.1). Agrin kommt somit eine zentrale Rolle in der synaptischen Differenzierung zu.

### 1.3.2. MuSK

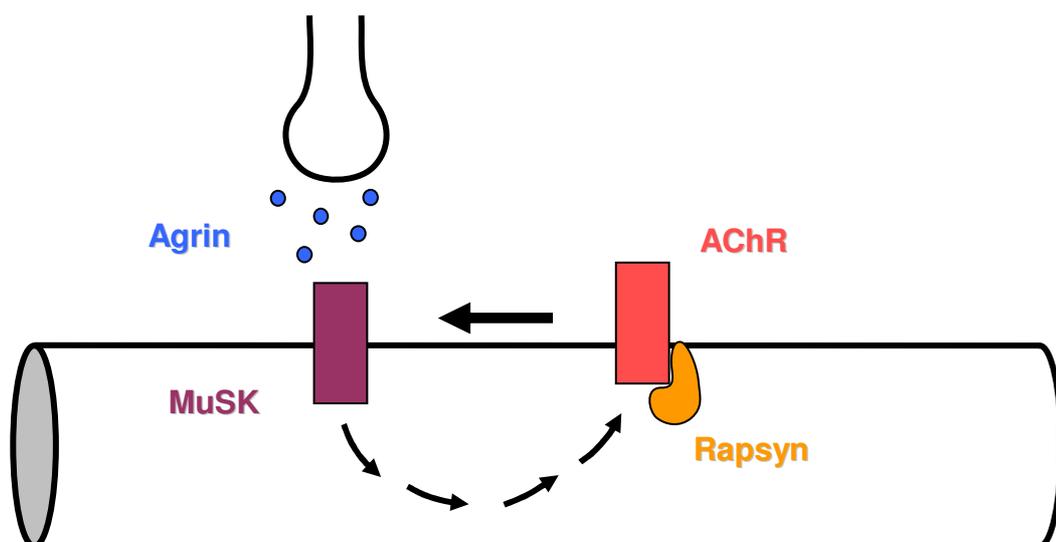
Die in der postsynaptischen Membran lokalisierte, Rezeptor-Tyrosin-Kinase (MuSK) ist der Rezeptor des vom Agrin generierten Signals. Agrin stimuliert die schnelle Phosphorylierung von MuSK. Die Kinase Aktivität von MuSK ist essentiell für Agrin zur Stimulation des Clusterings von AChR (Burden S. 1998; Glass et al 1996). Jedoch ist neben ihr auch die Aktivität von Rapsyn nötig.

### 1.3.3 Rapsyn

Rapsyn ist ein 43 kDa membranassoziertes cytoplasmatisches postsynaptische Protein (receptor associated protein of the synapse) (Ramaraao MK et al 2001, Romaro und Cohen 1998).

Es ist durch einen myristinylierten N-Terminus in der Membran verankert und enthält sieben Tetratricopeptid-Wiederholungen, welche die Selbstassoziation von Rapsyn Molekülen ermöglichen. Agrin stimuliert diesen Prozess. Die Selbstassoziation ist Voraussetzung für das Clustern von AChR (siehe Abb.1). Die Coiled-coil-Domäne im C-terminalen Bereich dient der Wechselwirkung mit AChR Untereinheiten.

Rapsyn kommt in einem 1:1 Verhältnis mit dem AChR vor und interagiert direkt mit diesem. Bei Mäusen, welche ohne Rapsyn zur Welt kommen, findet sich kein Clustern von AChR und es treten innerhalb von Stunden nach der Geburt Bewegungsprobleme und Atemnot auf.



**Abb. 1** Interaktionen an der neuromuskulären Endplatte

#### **1.4. Acetylcholinerezeptor**

Der in der Skelettmuskulatur vorkommende nikotinische Acetylcholinerezeptor ist ein Ionenkanal, welcher von Neurotransmittern gesteuert wird. Als pentameres Protein besteht er in der adulten Muskelzelle aus den Untereinheiten  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ . Im fetalen noch nicht innervierten Muskel ist die  $\epsilon$ -Untereinheit durch die  $\gamma$ -Untereinheit ersetzt. Die Transmembranregionen der Untereinheiten bilden eine Pore, durch welche geladene Ionen fließen können. In der  $\alpha$ -Untereinheit findet sich die Bindungsstelle für ACh, an welche für Öffnung des Kanals je zwei Moleküle ACh binden müssen.

Acetylcholin wird durch die Aktion der Cholin-Acetyltransferase (ChAT) im Motorterminal synthetisiert. Daraufhin erfolgt sein Transport in den Synaptischen Vesikel (Mc Conville 2002).

## 2. KONGENITALE MYASTHENE SYNDROME (CMS)

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (engl. congenital myasthenic syndromes, CMS) stellen klinisch und pathogenetisch eine heterogene Gruppe von erblichen Erkrankungen dar, deren gemeinsamer Defekt eine Störung der neuromuskulären Übertragung im Bereich der Endplatte ist. Die meisten Formen werden autosomal-rezessiv vererbt oder treten sporadisch auf. Eine autosomal-dominante Vererbung ist seltener (Engel und Ohno 2002; Engel et al 2002). CMS Fälle machen bis zu 10% aller Myasthenien aus, im Kindesalter liegen die Zahlen etwas höher (Anlar et al, 1996).

### **2.1. Klinik**

Der Beginn der Symptomatik von CMS liegt in der Regel in der frühen Kindheit, meist in den ersten beiden Lebensjahren. Verlauf und Schweregrad der Erkrankung sind jedoch sehr unterschiedlich: Die Symptomatik reicht vom schweren 'floppy-infant'-Syndrom bei Geburt bis zu einer Minimalsymptomatik mit Ptose und leichter muskulärer Schwäche (Abicht und Lochmüller 2002). Im Säuglingsalter fallen Trinkschwäche, kraftloses Schreien und generalisierte muskuläre Hypotonie, mit oder ohne Ptose auf. In vielen Fällen kommt es, ausgelöst durch respiratorische Infekte, zu krisenhaften Verschlechterungen, die zu einer plötzlichen Ateminsuffizienz und zum Kindstod führen können. Im Erwachsenenalter steht meist eine abnorme Ermüdbarkeit der Muskulatur bei Belastung im Vordergrund, dazu kommt häufig eine tageszeitabhängige Ptose mit oder ohne Störungen der externen Augenmuskulatur.

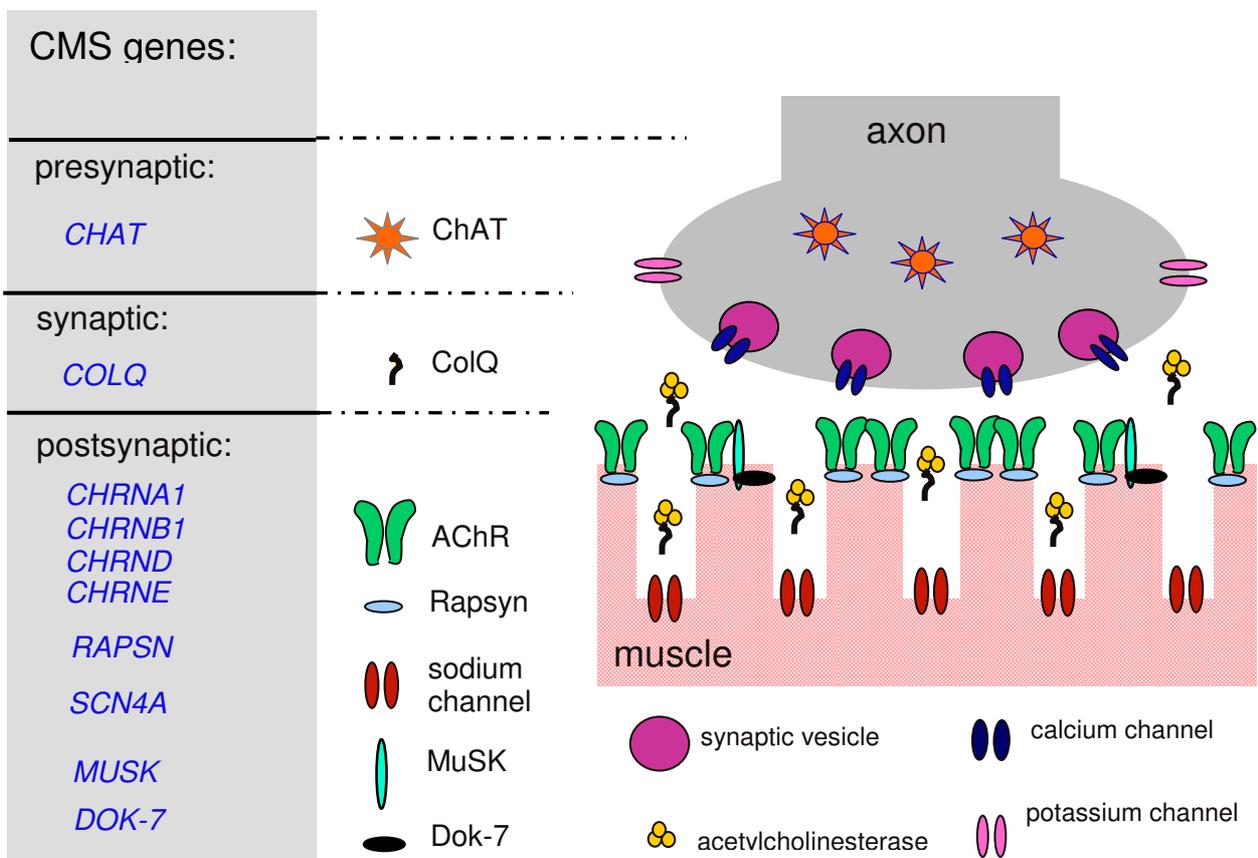
Anders als bei der autoimmunologisch ausgelösten Myasthenia gravis lassen sich keine Antikörper gegen AChR oder MuSK nachweisen und die Patienten sprechen nicht auf eine immunsuppressive Therapie an.

### **2.2. Verschiedene Formen von CMS**

Allen Formen der CMS liegt die gestörte neuromuskuläre Erregungsübertragung zugrunde, welche durch hereditäre Defekte im Bereich der neuromuskulären Endplatte bedingt ist. Die verschiedenen CMS Formen unterscheiden sich in ihrem Vererbungsmuster, dem klinischen Phänotyp und den verschiedenen Mutationen der jeweils veränderten Proteine.

Die Differenzierung von CMS erfolgte ursprünglich durch elektrophysiologische Untersuchungen

an einem Nerv-Muskelpräparat, gewonnen aus einer Biopsie des *M. intercostalis*. Durch ergänzende morphologische, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen gelang es, einzelne CMS Formen weiter zu differenzieren, Rückschlüsse auf die vermutliche Pathogenese einzelner Defekte zu ziehen und prä- und postsynaptische Syndrome zu unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass dem Großteil von CMS postsynaptische Störungen zugrunde liegen. Auch die molekulargenetische Analyse der CMS brachte weiteren Erkenntnisse im Zusammenhang mit den ursächlichen Krankheitsmechanismen. Für einige Formen von CMS konnten die zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen identifiziert werden. Diese molekulargenetischen Ergebnisse fanden Eingang in die Klassifikation der CMS.



Modified from: McConville and Vincent. 2002

**Abb. 2** Bisher bekannte CMS-Gene und die Lokalisation ihrer Proteinprodukte an der neuromuskulären Endplatte.

## 2.3. Molekulargenetische Klassifizierung von CMS

### 2.3.1. Postsynaptische Formen

#### Mutationen am Acetylcholinrezeptor

Der erste entscheidende Fortschritt in der molekularen Charakterisierung kongenitaler myasthener Syndrome war der Nachweis von pathogenen Mutationen des AChR's. Diese Mutationen können die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptores verändern, zu veränderten Kanalöffnungszeiten oder zu einer veränderten Ligandenaffinität führen. Es kann auch zu einer reduzierten Rezeptorexpression kommen.

CMS-ursächliche Mutationen sind in allen Genen beschrieben, die die verschiedenen Untereinheiten des adulten AChR kodieren: *CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRND*, *CHRNE* (Engel, A.G. et al, 2003).

Heterozygote Punktmutationen innerhalb der transmembranen, die Kanalpore begrenzenden M2-Region können die Öffnungszeit des Ionenkanals verlängern und so das Bild eines „Slow Channel Syndroms“ (SCCMS) verursachen. Der Vererbungsmodus des SCCMS ist in der Regel autosomal dominant.

Mutationen, welche zu einer verkürzten Kanalöffnungszeit führen (sog. Fast-Channel-Syndrome), werden autosomal rezessiv vererbt; zum Teil sind sie ebenfalls durch Missense-Mutationen in den M2-Regionen der AchR-Untereinheiten bedingt.

Der Großteil aller autosomal rezessiv vererbten und sporadischen CMS beruht jedoch auf Mutationen der AChR $\epsilon$ -Untereinheit, die über eine verminderte Expression des adulten AChRs zum morphologischen Bild eines AChR-Mangels führen. Wesentlich seltener sind rezessive Mutationen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Untereinheiten des AChRs beschrieben worden, die Einfluss auf die Expression der jeweiligen Untereinheit haben.

#### Mutationen des RAPSN Gens

Auch Mutationen im *RAPSN* Gen auf Chromosom 11p11.2 können auslösend für einen postsynaptisches CMS sein. Dabei kann es sich um unterschiedliche rezessiv vererbte Mutationen handeln. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit waren in der Literatur vier Patienten beschrieben, die alle die Mutation N88K homozygot oder compound heterozygot zusammen mit

anderen Rapsyn-Mutationen trugen. (Ohno, K., et al 2002)

Die betroffenen Patienten fallen klinisch durch, im Rahmen von Infekten plötzlich auftretende lebensbedrohliche Krisen der Atmung auf.

*RAPSN* Mutationen führen zu einer reduzierten Clusterbildung der Rapsyn Moleküle mit dem AChR. Dies führt zu einer verminderten postsynaptischen Rezeptordichte.

#### Mutationen im *MUSK* Gen

MuSK spielt eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung postsynaptischer Strukturen. Mutationen im *MUSK*-Gen wurden weltweit allerdings erst bei einem einzigen CMS-Patienten identifiziert. Durch die Mutation kommt es zu einer verringerten Proteinstabilität welches zu einem verminderten Agrin – abhängigen Clustern des AChR an der Endplatte führt (Chevessier, F., et al, 2004).

#### Mutationen des *SCN4A*-Gens

Als Ursache eines postsynaptischen CMS wurden bei einer Patientin zwei compound heterozygote Mutationen im Gen *SCN4A*, kodierend für den spannungsabhängigen Natriumkanal (Nav1.4), auf Chromosom 17q23.3 identifiziert. Damit sind auch diese Mutationen bei CMS Patienten sehr selten (Tsujino, A., et al. 2003).

#### Mutationen des *DOK7*-Gens

Erst nach Abschluss dieser Arbeit wurden kürzlich CMS-ursächliche Mutationen in einem weiteren Gen identifiziert, das für ein postsynaptisches Protein kodiert: *DOK7* kodiert für das MusK-interagierende Protein Dok-7 (downstream of kinase 7). Mutationen in diesem Gen wurden – neben *RAPSN*-Mutationen - als weitere häufige Ursache eines CMS in Mitteleuropa ausgemacht (Beeson, D., et al, 2006) ; Müller, J.S., et al, 2007).

### 2.3.2 Synaptische CMS

#### Mutationen im *COLQ*-Gen

Der Mangel an Acetylcholinesterase, welcher auch lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann, ist eine häufige Ursache von CMS.

Die Acetylcholinesterase begrenzt die Signalübertragung im synaptischen Spalt durch rasche Hydrolyse des freigesetzten Acetylcholins. Das Enzym besitzt einen Verankerungsteil (ColQ), Mutationen in dessen kodierenden Gen *COLQ* sind als Ursache von CMS mit einem Mangel an Acetylcholinesterase beschrieben (Donger, C., et al, 1998; Ohno, K., et al, 1998).

### 2.3.3. Präsynaptische CMS

#### *CHAT Gen*

Die Cholinacetyltransferase (*CHAT*) katalysiert die Biosynthese des Neurotransmitters Acetylcholin aus Cholin und Acetyl-CoA im Cytoplasma präsynaptischer Neuronen.

Auffällig bei allen Patienten mit Mutationen im *CHAT*-Gen waren krisenhafte Verschlechterungen des Krankheitsbildes, die meist im Rahmen von fieberhaften Infekten auftraten und mit episodischen Apnoen einher gingen (Ohno, K., et al., 2001).

### 2.3.4. Weitere Kandidatengene bei CMS

Weiterhin gibt es Patienten mit klinisch gesichertem CMS, bei denen bisher in keinem der bekannten Gene Mutationen nachweisbar waren. Aus diesem Grund ist mit weiteren, möglicherweise noch nicht identifizierte CMS-Genen zu rechnen. Dabei bieten sich insbesondere solche Gene als Kandidaten an, die spezifisch an der neuromuskulären Endplatte exprimiert werden, die aber nicht unbedingt Bestandteil des AChR-Apparats sein müssen. Ebenso könnten Mutationen von Genen, die regulatorische Funktionen auf synapsenspezifische Gene ausüben, oder von Genen, die für die spezifische Faltung, den Transport oder das Assemblieren von Synapsenproteinen verantwortlich sind, eine gestörte Signaltransduktion an der neuromuskulären Endplatte und damit CMS verursachen.

## C ZIELSETZUNG

Mutationen im *RAPSN* Gen sind Ursache eines postsynaptischen CMS. Eine molekulargenetische und klinische Analyse der Erkrankung hilft bei weitergehenden Therapieplanungen. Oft ist eine sichere Abgrenzung zwischen den einzelnen CMS Formen nur aufgrund klinischer Kriterien nicht möglich. Die genaue Klassifizierung eines CMS ist jedoch für den einzelnen Patienten von großer klinischer Bedeutung. In Abhängigkeit vom genetischen Befund und vom Pathomechanismus der Mutation stehen den Patienten unterschiedliche Therapieoptionen zur Verfügung. Besonders bedeutend ist dies für Patienten, die vom Late-onset Typ des CMS, aufgrund einer Mutation im *RAPSN* Gen betroffen sind. Diesen Patienten kann durch die Diagnose eine unnötige Immuntherapie erspart bleiben. Die Molekulargenetik ersetzt die vor wenigen Jahren noch erforderlichen invasiven Eingriffe (z.B. Biopsie des *M. intercostalis*) zur Klassifizierung des CMS beim jeweiligen Patienten.

Das Ziel der Promotionsarbeit lag in der klinischen und molekulargenetischen Charakterisierung von CMS Patienten mit Mutationen im *RAPSN* Gen aus dem vorhandenen Patientenkollektiv von über 120 unabhängigen CMS Patienten unterschiedlicher Herkunft.

Es sollte gezeigt werden ob und in welcher Häufigkeit Mutationen im *RAPSN* Gen vorkommen, welche klinischen Besonderheiten damit einhergehen (Genotyp-Phänotyp-Korrelation) und ob eine Zuordnung zu bestimmten Patientenpopulationen bzw. ethnischen Gruppen oder Nationalitäten möglich ist.

## **D MATERIAL UND METHODEN**

### **1. PATIENTEN**

#### **1.1. Klinische Daten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein vorhandenes Kollektiv von über 120 unabhängigen Patienten auf Mutationen im Rapsyn-Gen untersucht.

Die Patienten stammten aus Deutschland sowie aus unterschiedlichen anderen europäischen und aussereuropäischen Ländern.

Klinische Daten, die die Diagnose stützten, wurden mittels eines klinischen Erfassungsbogen (s. Anhang) durch die unterschiedlichen Untersucher dokumentiert. Eindeutiges Ausschlußkriterium für die Studie war der Nachweis von AChR Antikörpern sowie klinische Besserung nach Plasmaaustausch oder immunsuppressiver Therapie.

#### **1.2. Patientenmaterial**

Patientenmaterial (EDTA-Vollblut, Muskelgewebe, genomische DNA) wurde von verschiedenen Kliniken aus Deutschland und aus dem Ausland zur molekulargenetischen Untersuchung eingesandt. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Patienten wurde auch Material (EDTA-Vollblut, genomische DNA) von deren Angehörigen und von Normalkontrollen in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Alle durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung der Patienten bzw. mit Zustimmung der Erziehungsberechtigten. Ein positives Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München liegt vor (Projektnummer: 084/00).

### **2. CHEMIKALIEN**

Alle benutzten Chemikalien entsprachen höchsten Reinheitsanforderungen und stammen, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich oder Roth.

### 3. MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

#### **3.1. DNA Extraktion**

Die Extraktion genomischer DNA erfolgte aus venösem EDTA-Vollblut mittels Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) entsprechend den Angaben des Herstellers.

#### **3.2. Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)**

##### 3.2.1. Prinzip der PCR

Bei den zu untersuchenden Genen wurden die gesamten bzw. Teile der kodierenden Regionen, flankierende intronische Regionen und zum Teil auch Promotorregionen der entsprechenden Gene mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaktion = PCR) amplifiziert. Das von Mullis entwickelte Verfahren ermöglicht die exponentielle *in vitro* Vermehrung definierter DNA Stücke.

##### 3.2.2. Primer

Die verwendeten Primer wurden entworfen, basierend auf in der Genbank veröffentlichten Sequenzen des RAPSN Gens (AC074195/gi9799883) und durch die Abteilung von Herrn Dr. G. Arnold, Genzentrum, LMU-München synthetisiert.

##### 3.2.3. PCR Reaktionsbedingungen

Standard-PCR-Protokoll:

Ein typischer PCR-Ansatz enthält in 50 µl Reaktionsvolumen:

5 µl Reaktionspuffer 10x (ThermoPol Puffer; New England Biolabs (NEB))

50 pmol sense Primer

50 pmol antisense Primer

dNTP-Mix (MBI Fermentas oder NEB), Endkonzentration: 0,25 mM je dNTP

100-500 ng genomische DNA

2,5 Units *Taq* DNA-Polymerase (Roche)

Die PCR Bedingungen wurden z.T. durch Zusatz von  $Mg^{2+}$  in unterschiedlichen Konzentrationen, durch unterschiedliche pH Bedingungen und durch Zugabe von 10% Dimethylsulfoxid optimiert.

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) durchgeführt.

Ein typisches PCR Programm umfasst:

1. 94°C : 2min	Denaturierung der DNA
2. 40 Zyklen: (1) 94°C : 15 sec (2) 56°C : 1 min (3) 72°C : 2 min	Aufschmelzen der DNA Doppelstränge Anlagern der Primer (Annealing) Synthese des DNA Doppelstranges (Extension)
3. 72°C : 7 min	Abschließende Extension

**Abb. 3** PCR Programm

#### 3.2.4. Aufreinigung der PCR Produkte

Die PCR Proben wurden durch Gelelektrophorese auf Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen aufgetrennt. Dabei wurden die Konzentrationen der Gele, abhängig von den zu trennenden Fragmentlängen, zwischen 1 und 4% gewählt. Die Gelbereiche mit den gewünschten PCR-Fragmenten wurden ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers extrahiert.

### 3.3. Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte teilweise durch die Abteilung von Herrn Dr. H. Blum, Genzentrum, LMU-München und teilweise durch die Firma Seqlab, Göttingen, mit DNA-Sequenziergeräten der Firma Applied Biosystems (Model 3100 Avant) und fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Terminatoren. Die Sequenzen wurden anschließend auf potentielle Mutationen untersucht. Der Vergleich mit der entsprechenden Wildtypsequenz erfolgte computergestützt online über den Server des National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

**Abb.4** RAPS<sub>N</sub> Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
RP2s	5'- TTGCCCTGGGGCAGGAAGAAGG
RP2a	5'- AGGCCTTGGGCTAGAGGTGCTC
RP <sub>s</sub>	5'- TGAGTGACCCACGGTGCTCAG
RP <sub>a</sub>	5'- CGATCTGCTGCTTGGTCTGGTC
R1s	5'- CATGAGTGCCTAGAGGCACGGA
R1 <sub>a</sub>	5'- TCCGGCCCCAGCCTGACCCTCG
R1seq <sub>a</sub> *	5'- CGGGTACACCCACCTTCAGCAT
R2s	5'- AGGCTGGGGTCCAAGGCTCAGAGT
R2 <sub>a</sub>	5'- GCCACAGGGTGTGTGCCTCA
R3s	5'- GGATGTCACAATGAATGAGCAG
R3 <sub>a</sub>	5'- GGGCTTCCATGGGCTGATTTG
R4s	5'- CTCCAGTGGTGGTGGCAGAGGAGT
R4 <sub>a</sub>	5'- TACTGGCCCCAAGTGGGGAGTGCT
R5s	5'- ACCCTGTGCTTCCCTGTGAGCA
R5 <sub>a</sub>	5'- AGTTCCCCACTTGGGCCCTTGA
R6s	5'- AAGTGGCTGAGACCGGAGCCTA
R6 <sub>a</sub>	5'- TTAAGCCAGCTGGGCCCTAGAGT
R7s	5'- GCAGGCAAGGAAGGAAGAGA
R7 <sub>a</sub>	5'- AGGAGTAAATGGGCCTCTGGCGT

\*zum Sequenzieren, nicht für PCR

### **3.4. Genotypenanalyse**

Die Genotypenanalyse erfolgte mit Hilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker. Die Mikrosatellitenmarker wurden online, basierend auf Informationen der Genome Database (GDB) (<http://gdbwww.gdb.org/>), Généthon (<http://www.genethon.fr/php/index.php>) und University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) ausgewählt. Die Bestimmung der Fragmentlängen erfolgte durch das Labor von Frau Prof. Dr. A. Huebner, Klinik- und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, TU Dresden und die Firma Medigenomix, Martinsried/ München. Die verwendeten Marker in Bezug auf das untersuchte Gen sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Name	Position des Markers (Mb)
<i>D11S986</i>	44,679
<i>D11S4174</i>	45,215
<i>D11S1344</i>	46,123
<i>RAPSN</i>	47,415-47,427
<i>D11S4109</i>	47,558
<i>D11S4076</i>	61,120
<i>D11S1883</i>	63,130

**Abb.5** *RAPSN*-Locus (Chromosom 11)

### **3.5. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus- (RFLP) Analyse**

Veränderungen in der DNA-Sequenz wie Mutationen oder Polymorphismen können primär vorhandene Schnittstellen für Restriktionsenzyme verändern, beseitigen, oder neue Schnittstellen entstehen lassen. Diese Tatsache wird für einen weiteren Nachweis und die Dokumentation von Mutationen und von Polymorphismen mittels RFLP ausgenutzt. Dazu wurden die entsprechenden PCR-Produkte in einem Standardansatz mit 3 µl 10x-Puffer und 1µl Restriktionsenzym (10-20 Units) versetzt und evtl. mit destilliertem Wasser auf 30 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Verdau erfolgte für 2-12 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur. Das Wildtyp- und das veränderte Allel unterscheiden sich bei der anschließenden Agarose-

Gelelektrophorese in der Länge der generierten Restriktionsfragmente. Restriktionsenzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas und NEB bezogen.

Screeninguntersuchungen für die Mutation N88K (264C-->A) in Exon 2 des RAPSN Gens wurden durch Restriktionsverdau des PCR Produkts in allen 120 CMS Familien durchgeführt. Die Mutation N88K schafft eine neue Schnittstelle für BseNI.

Der Nachweis der Mutationen Q3K (7C -> A), A246V (737C -> T) und G291D (872G -> A) wurde in Patienten, Familienangehörigen und 103 gesunden Normalkontrollen durch Verdau mit SduI (Q3K und A246V) beziehungsweise TaqI (G291D) durchgeführt. Dabei bleibt die Mutation von Q3K ungeschnitten ebenso die Wildtypen von A246V sowie G291D.

Mutation	Ort der Mutation	Primer	Enzym	Ergebnis für Mutante	Wildtyp
<b>N88K</b>	264 C → A	5'- GAGGATGCCGACTTCCTCCTGG -3' 5'- TGGTACCAGGCAGCCCAAGGC -3'	BseNI	77 und 41 bp Fragment	118 bp ungeschnitten
<b>Q3K</b>	7 C → A	5'- CATGAGTGCCTAGAGGCACGGA -3' 5'- TCGATCTGCTGCTTGGTCTGGTCGT -3'	SduI	97 bp ungeschnitten	73 und 24 bp Fragment
<b>A246V</b>	737 C → T	5'- GCAGAGGAGTAGGCCTGAGCCACTGG -3' 5'- TGCATCCCGGTGACCTCACCTC -3'	SduI	88 und 68 bp Fragment	156 bp ungeschnitten
<b>G291D</b>	872 G → A	5'- CCTGGGCAGGTGCAGGCGCTGCT -3' 5'- TACTGGCCCCAAGTGGGAGTGCT -3'	TaqI	104 und 23 bp Fragment	127 bp ungeschnitten

Abb 6. Primer für Rapsyn, Verdau

		<b>Q3K</b>				<b>A246V</b>			<b>G291D</b>	
		▼				▼			▼	
Mensch	MG	<b>Q</b>	DQTKQ ... ESYL	<b>N</b>	LARS ... RPLQ	<b>A</b>	LCLL ... <b>Q</b> ALL	<b>G</b>	VAK ...	
Maus	MG	<b>Q</b>	DQTKQ ... ESYL	<b>N</b>	LARS ... RPLQ	<b>A</b>	LCLL ... VLL	<b>G</b>	VAK ...	
Geflügel	MG	<b>Q</b>	DQTKQ ... <b>E</b> GYL	<b>N</b>	LARS ... RPLQ	<b>A</b>	LCLL ... <b>Q</b> VLL	<b>G</b>	VAK ...	
Xenopus	MG	<b>Q</b>	DQTKQ ... ESYL	<b>N</b>	LARS ... RPLQ	<b>A</b>	LCLL ... <b>V</b> MI	<b>G</b>	VAK ...	
Torpedo	MG	<b>Q</b>	DQTKQ ... <b>E</b> AYL	<b>N</b>	<b>L</b> ARG ... RPLQ	<b>A</b>	LCLL ... VLL	<b>N</b>	<b>I</b> AK ...	
Zeprafisch	MG	<b>Q</b>	DQTKQ ... <b>E</b> GYL	<b>N</b>	LARS ... RPLQ	<b>A</b>	LCLL ... <b>S</b> IYV	<b>G</b>	<b>V</b> GK ...	
C.elegans	MG	<b>Q</b>	<b>F</b> QAKQ ... EAFL	<b>N</b>	<b>L</b> AKA ... <b>R</b> AIH	<b>A</b>	<b>R</b> CMC ... LVLS	<b>S</b>	<b>M</b> AK ...	
				▲						
				<b>N88K</b>						

Abb 7 Alignment der Aminosäuresequenz von RAPSN; Das Glutamin in Codon 3, Asparagin in Codon 88, Alanin in Codon 246 und Glycin in Codon 291 sind hoch konserviert.

## E ERGEBNISSE

Für diese Arbeit wurde das bestehende Patientengut von über 120 nicht verwandten CMS Patienten aus verschiedenen Ländern untersucht.

Das Gen *RAPSN* kodiert für das postsynaptisch exprimierte Protein Rapsyn. Mutationen von *RAPSN* wurden 2002 als CMS-Ursache beschrieben (Ohno, et al. 2002). *RAPSN*-Mutationen führen zu einem postsynaptischen CMS mit sekundärer AChR-Defizienz. Das komplette Rapsyn-Gen wurde – in Anlehnung an die beschriebene klinische Symptomatik der Patienten bei Ohno et al – zunächst insbesondere bei Patienten mit positiver Reaktion auf Esteraseinhibitoren, ohne Ophthalmoparese, mit vereinzelt respiratorischen Krisen v.a. im Rahmen von Infekten untersucht. Zahlreiche weitere Patienten aus dem Kollektiv wurden mittels RFLP auf das Vorliegen der Rapsyn-Mutation N88K getestet.

### 1. MUTATIONSANALYSE

Bei zwölf Patienten aus zehn verschiedenen Familien konnte die Mutation N88K im Rapsyn Gen nachgewiesen werden.

RAPSN <b>N88K</b>	homozygot in	7 Familien	(7 Patienten)
RAPSN <b>N88K</b> und	RAPSN <b>Q3K</b>	in 1 Familie	(2 Patienten)
RAPSN <b>N88K</b> und	RAPSN <b>A246V</b>	in 1 Familie	(1 Patient)
RAPSN <b>N88K</b> und	RAPSN <b>G291D</b>	in 1 Familie	(2 Patienten)

Sieben dieser Patienten sind homozygot für diese rezessive Mutation. Fünf Patienten aus drei Familien sind compound heterozygot für die Mutation N88K und jeweils eine weitere Mutation des Rapsyn Gens, wie Q3K, A246V und G291D. Diese zweiten Mutationen wurden bis dahin noch nicht beschrieben.

Analysen von Familienangehörigen zeigten, dass jede dieser Mutationen heteroallelisch und rezessiv ist. Es handelt sich bei allen um Missense-Mutationen die einen Aminosäureaustausch bewirken. Vielfältige Vergleiche von Aminosäuresequenzen für das Rapsyn Protein zeigten eine strenge Konservierung der korrespondierenden Wildtypsequenz über Artengrenzen hinweg (siehe Abb 7, Seite 24). Keine der oben beschriebenen Mutationen wurde in 206 Normalallelen gefunden.

## 2. HÄUFIGKEIT VON *RAPSN* N88K IN CMS PATIENTEN

Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation N88K des *RAPSN* Gens in 12 (10%) von 120 CMS Patienten vorkam, 10 der 12 Patienten waren untereinander nicht verwandt.

Acht der zehn *RAPSN* N88K Familien sind deutschen oder österreichischen Ursprungs. Eine Familie stammt aus Norditalien und eine aus Großbritannien (siehe Abb 8).

40 der untersuchten CMS Familien stammen aus Zentral- oder Westeuropa. Es fand sich die Mutation N88K in 25 % der Familien dieses Ursprungs. In keiner der anderen Familien, aus Süd- oder Osteuropa (n=60) war diese Mutation nachweisbar. Ebenso wenig in den 10 nichteuropäischen Familien.



**Abb 8** Ursprung der untersuchten *RAPSN* Patienten

### 3 PATIENTEN MIT N88K

Sechs der hier betrachteten Patienten sind weiblich, die anderen sechs sind männlich.

In zwei der 10 Familien fanden sich betroffene Geschwisterkinder. In den anderen 8 Familien fanden sich 7 gesunde Geschwister. Keines der Elternteile zeigte myasthene Symptome.

#### **3.1. Klinik der untersuchten Patienten**

Im Folgenden sollen die untersuchten Patienten einzeln vorgestellt werden.

##### *Patientin 1 (11 Jahre)*

Bei dieser Patientin liegt die Mutation N88K homozygot vor. Sie stammt aus Österreich, wobei beim Großvater eine italienische Ahnenlinie vorliegt. Die Diagnosestellung erfolgte im sechsten Lebensjahr, bei erfolgter Erstmanifestation in der Neonatalperiode.

Während der Schwangerschaft beschrieb die Mutter, im Vergleich zu ihrer ersten Schwangerschaft, verminderte Kindsbewegungen. Postpartal trat für einige Tage ein muskulärer Hypertonus bei der Patientin auf. Eine Trinkschwäche war in den ersten Monaten sehr deutlich ausgeprägt, ebenso eine tagszeitabhängige Ptose im ersten Lebensjahr sowie intermittierendes Schielen und eine rasche Ermüdbarkeit.

Die motorische Entwicklung erfolgte weitgehend normal. Sitzen war mit 8 Monaten, Laufen mit 15 Monaten möglich. Der Patientin fährt in ihrer Freizeit Ski. Sie beschreibt Schmerzen in den Beinen nach Belastung, hierbei finden sich keine Paresen jedoch eine deutliche Ermüdbarkeit der Muskulatur.

Bei ihr ist eine Verschlechterung der Erkrankung unter Infektionen, jedoch ohne das Auftreten von respiratorischen Insuffizienzen beschrieben. Im Alter von 6 Jahren fiel eine Facies Myopathica, mit offenem Mund, erhöhtem Speichelfluß und Hypomimie auf, woraufhin es zur Diagnose eines CMS kam. Es fand sich weiterhin eine generalisierte Schwäche sowie eine Schwäche der Gesichtsmuskulatur. An Nebenerkrankungen wurde ein M. Hirschsprung diagnostiziert.

Zum EMG kann keine Aussage getroffen werden, da es bei ihr nicht durchgeführt wurde. Der Tensilonetest war deutlich positiv und gutes Ansprechen auf Mestinon konnte beobachtet werden.

### Patientin 2 (8 Jahre)

Diese Patientin trägt ebenfalls die Mutation N88K homozygot und ist deutschen Ursprungs. Als erstes Anzeichen der Erkrankung fand sich bei ihr eine ausgeprägte Ptose im Alter von 6 Monaten. Die motorische Entwicklung verlief normal. Krabbeln war mit 9 Monaten und Laufen mit 16 Monaten möglich. Bei dieser Patientin fanden sich keine krisenhaften Verschlechterungen der Erkrankung.

Die bekannte Ptose wurde im Alter von zwei Jahren ophthalmologisch abgeklärt, wobei im Alter von fünf Jahren ein intermittierendes Schielen hinzu kam. Ansonsten zeigte sich ein eher stabiler Befund. Faziale Schwäche, ein offener Mund, jedoch wenig generalisierte Schwäche waren vordergründig. Dysmorphien sind bei ihr keine beschrieben. Im EMG, unter repetitiver Stimulation mit 2-3 Hz, fand sich kein Dekrement.

Das Ergebnis des Tensilontests war fraglich positiv, es erfolgte bisher noch keine Mestinongabe.

### Patientin 3 (55 Jahre)

Diese aus England stammende Patientin ist homozygote Trägerin der Mutation N88K. Im Kindes- und Jugendalter fielen bei ihr keinerlei Symptome eines CMS auf. Sie war im Gegenteil eine aktive Sportlerin (Skifahren). Erst um das zwanzigste Lebensjahr wurde sie symptomatisch, zunächst nur durch intermittierende Doppelbilder sowie eine Ptose. Eine hinzukommende Schwäche der Extremitätenmuskulatur verschlechterte sich krisenhaft nach der Geburt ihres ersten Kindes im Alter von 30 Jahren. Der Verdacht auf ein CMS wurde erst im Alter von 38 Jahren geäußert. Das EMG war zu diesem Zeitpunkt stellenweise Myopathie - verdächtig und ein Tensilontest fiel deutlich positiv aus. Auf eine Dauertherapie mit Acetylcholinesterase-Hemmern (2-3 mg/kg/Tag Pyridostigmin) sprach sie gut an wobei jedoch die fluktuierende Ptose bestehen blieb. Ihr Zustand verschlechterte sich in den kommenden Jahren nicht wesentlich.

Im Alter von 55 Jahren, als die Diagnose eines CMS genetisch gesichert werden konnte, war es der Patientin möglich, eine Gehstrecke von 5 – 10 min zu bewältigen. Das Treppensteigen fiel ihr jedoch schwerer. Ansonsten klagte die Patientin über Depressionen.

### Patient 4 (4 Jahre)

Ebenfalls ein homozygoter Träger der Mutation N88K, bei welchem es im 2. Lebensjahr zur Diagnosestellung kam. Seine Familie stammt aus Deutschland. Die ersten Symptome wurden bereits in der Neugeborenenperiode beschrieben. Nach der Geburt fiel bei diesem Patienten eine Trinkschwäche auf. Die Erreichung der motorischen Meilensteine erfolgte zeitgerecht. Ein intermittierendes Schielen sowie eine Ptose waren seit frühester Kindheit beobachtet worden ebenso die antimongoloide Lidachse. Im Verlauf kam es mehrfach zu respiratorischer Insuffizienz,

Schluckstörungen sowie einer muskulären Hypotonie im Rahmen von Infektionen, welche bisher jedoch noch keine Intubation und Beatmung nötig gemacht haben. Dennoch kam es im Alter von fast vier Jahren zu einer drohenden respiratorischen Dekompensation. Der Patient ist mobil und Rennen bereitet ihm keine größeren Schwierigkeiten.

Im EMG war ein Dekrementnachweis bei Stimulation des N. ulnaris re sowie N. accessorius rechts möglich. Im Tensilontest war eine positive Antwort beschrieben und eine Mestinongabe erfolgte.

Bei seiner Mutter fand sich bis zum Alter von 5 Jahren eine unklare Muskelschwäche, welche sich später jedoch verlor.

#### Patientin 5 (2 Jahre)

Auch die aus Norditalien stammende Patientin ist homozygote Trägerin der Mutation N88K. Bei Geburt war die Patientin durch respiratorische Schwierigkeiten auffällig welche eine Sauerstoffgabe von einigen Stunden erforderten. Weiterhin fielen kongenitale Kontrakturen sowie eine fixierte Kopfschiefhaltung auf. Im Alter von 7 Monaten wurde die Patientin wegen einer respiratorischen Schwäche, welche nach einer Infektion auftrat, vorgestellt. Eine Intubation und Beatmung waren zu diesem Zeitpunkt unumgänglich. Im Alter von 14 Monaten konnte schließlich die Diagnose CMS gestellt werden. Die motorische Entwicklung erfolgte in normalen Parametern. Eine Ptose zeigte sich auch bei dieser Patientin, ebenso eine Trinkschwäche und eine Schwäche der Fazialmuskulatur. Im Verlauf fanden sich krisenhafte Verschlechterungen mit respiratorischen Insuffizienzen bei Fieber. Bisher war jedoch keine Progression der Erkrankung zu verzeichnen.

Im EMG fand sich kein Dekrement. Nach Beginn einer Mestinontherapie mit 10 mg Mestinon zeigte sich eine erhebliche Verbesserung der Symptomatik.

#### Patientin 6 (10 Jahre)

Diese Patientin ist homozygote Trägerin der Mutation N88K. Sie ist deutschen Ursprungs und wurde zwischen dem ersten und zweiten Lebensjahr symptomatisch auffällig. Die Diagnosestellung erfolgte kurze Zeit später. Als erste Symptome fand sich eine infektassoziierte Muskelhypotonie mit Apnoe und Beatmungspflicht. Diese Symptome wurden anfänglich fälschlicherweise als Pneumonie gewertet.

Es kam zu keiner Verzögerung beim Erreichen der motorischen Meilensteine. Dysmorphie Besonderheiten sind bei ihr keine zu finden.

Krisenhafte Verschlechterungen traten im Rahmen von Infektionen auf, hierbei fand sich auch eine respiratorische Insuffizienz, eine Intubation war allerdings nicht nötig. Außerhalb der Krisen zeigte die Patientin eine gute Tendenz zur Besserung. Eine fluktuierende Oberlidptose kann auch bei ihr beobachtet werden, ebenso generalisierte Schwäche. Im EMG fand sich kein Dekrement bei einer

Stimulation mit 3 Hz. Eine Mestinontherapie wurde bisher noch nicht eingeleitet.

Patient 7 (20 Jahre)

Ebenso homozygoter Träger der Mutation N88K, deutschen Ursprungs. Die Erstmanifestation erfolgte bei diesem Patienten im Vorschulalter (3-5J) mit einer belastungsabhängigen Schwäche. Bereits nach 300 m Laufstrecke war der Patient erschöpft. Diese Symptome bestanden auch zwischen Infekten fort. Des Weiteren fand sich bei ihm eine Ptose sowie eine generalisierte Schwäche.

Das genaue Alter der Erkrankungsmanifestation ist aufgrund familiärer Besonderheiten (Patient wuchs bei der älteren Schwester auf, Eltern sind verstorben) nicht eruierbar. Die motorische Entwicklung dieses Patienten erfolgte ohne besondere Auffälligkeiten.

Aufgrund einer Infektazerbation mit krisenhafter Verschlechterung, Luftnot, Kauschwäche und Doppelbildern wurde er im Alter von 10 Jahren vorstellig und musste im Verlauf intubiert und beatmet werden. Im Folgenden wurde die Fehldiagnose einer seronegativen Myasthenia gravis gestellt, welche erst wesentlich später revidiert werden konnte.

In letzter Zeit wurde eine leichte Tendenz zur Besserung beobachtbar. Der Patient fährt Auto, spielt Schlagzeug und nimmt am sozialen Leben seiner Alterstufe teil. Bereits seit Jahren sind keine respiratorischen Insuffizienzen oder krisenhafte Verschlechterungen mehr bei ihm aufgetreten, welche in seiner Kindheit des öfteren beschrieben wurden. Dyspnoe Besonderheiten finden sich bei ihm keine.

Ein deutliches Dekrement war in der repetitiven Stimulation nachweisbar. Im Tensilonstest fand sich eine positive Antwort, ebenso verlief die Mestinontherapie mit dreimal 70 mg/Tag erfolgreich.

### Patientin 8a (19 Jahre)

Bei dieser Patientin deutschen Ursprungs wurden die Mutationen N88K sowie Q3K (C7A) compound heterozygot gefunden. Die Erkrankung manifestierte sich im ersten Lebensjahr durch Apnoeperioden und die Diagnosestellung erfolgte im Alter von 4 Jahren. Das Geburtsgewicht der Patientin lag bei 2220 g. Aufgrund von perinataler Asphyxie war eine Intubation und Kurzzeitbeatmung postnatal nötig. Während des ersten Lebensmonats fiel eine allgemeine muskuläre Hypotonie und Trinkschwäche auf. Die motorischen Meilensteine wurden verzögert erreicht (Sitzen mit 7 Monaten, Laufen mit 24 Monaten). Im Kleinkindalter kam es mehrfach zu respiratorischen Krisen ebenso wurde eine erhöhte Infektanfälligkeit beschrieben. Seit frühester Kindheit ist eine, gegen nachmittags zunehmende, Muskelschwäche bekannt. Zu einer Befundverschlechterung bei der Patientin kam es im 10. Lebensjahr.

Im Alter von 4 und 10 Jahren war kein Dekrement bei repetitiver Stimulation des N. axillaris und medianus nachweisbar. Dahingegen fand sich im Alter von 16 Jahren ein ganz dezentes Dekrement. Eine leichte Ptose konnte nachgewiesen werden, über Doppelbilder klagte sie nicht.

Beim Phänotyp sind Dysmorphiezeichen wie die antimongoloide Lidachse, der hohe Gaumen, der vorragende Unterkiefer, eine einseitige Vierfingerfurche sowie Beugekontrakturen der Finger auffällig.

Der Tensilontest fiel bei der Patientin fraglich positiv aus, die Mestinongabe erzielte gute Ergebnisse. Unter dieser Therapie ist die Patientin im Alltag nur wenig behindert und bewältigt eine Gehzeit von 30 min, wohingegen sie ohne Mestinontherapie zeitweise auf einen Rollstuhl angewiesen und Treppensteigen ihr unmöglich war.

Patient 8b (8 Jahre)

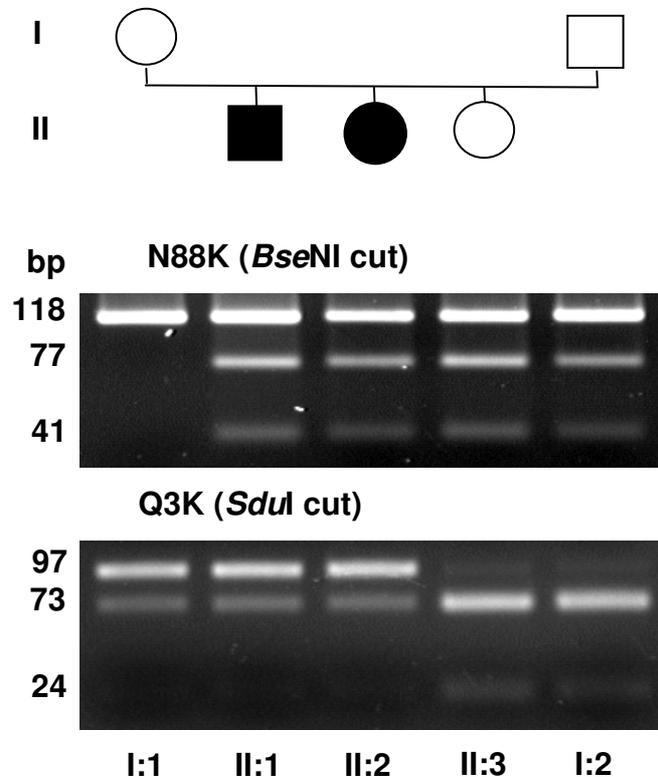
Hierbei handelt es sich um den Bruder der oben beschriebenen Patientin. Dieser ist ebenso compound heterozygoter Träger der Mutationen N88K und Q3K.

Bei ihm manifestierte sich die Erkrankung neonatal mit Trinkschwäche und Arthrogryposis multiplex. In der Postpartalperiode kam es zum Herz-, Kreislauf und Atemstillstand sowie einem zerebralem Anfall. Da die Erkrankung bei seiner Schwester bereits bekannt war, konnte eine sofortige Diagnosestellung und Einleitung einer Mestinontherapie beginnen. Dennoch war der Patient keineswegs asymptomatisch. In der Säuglingszeit stand vor allem eine Saug - und Schluckschwäche im Vordergrund. Nachts und besonders in Rückenlage kam es häufiger zu Apnoephasen. Seit dem zweiten Lebensjahr war eine mimische Schwäche auffällig besonders durch den Speichelfluss aus dem Mund. Auch eine Dyslalie sowie leichte Sprachentwicklungsverzögerung waren bei ihm zu beobachten. Des Weiteren fand sich intermittierendes Schielen. Wie bei seiner Schwester fand sich ein verzögertes Erreichen der motorischen Meilensteine (Sitzen 9 Monate, Laufen 21 Monate). Im Alter von 14 Monaten kam es im Rahmen eines Infektes erneut zur respiratorischen Insuffizienz. Der Patient wurde zyanotisch und eine Intubation war nötig.

Der Patient ist – trotz medikamentöser Behandlung - von der Klinik her wesentlich stärker betroffen als seine ältere Schwester, hat sich aber im Verlauf gut stabilisiert. Aktuell besteht eine Ptose und generalisierte Muskelschwäche. Es ist dem Patienten an manchen Tagen möglich 30 bis 60 Minuten zu gehen, an anderen Tagen ist er - trotz Mestinon-behandlung - auf den Rollstuhl angewiesen. Zudem leidet er unter einem Asthma bronchiale.

An dysmorphen Kennzeichen fällt die lange schmale Kopfform mit spitz zulaufendem Schädel , die großen tief sitzenden Ohren, der hohe gotische Gaumen sowie ein offen stehender Mund auf.

Einem autosomal rezessiven Erbgang entsprechend sind die nicht betroffenen Eltern sowie die nicht betroffene jüngere Schwester nur heterozygote Träger jeweils einer Mutation. Der Vater ist Träger der Mutation N88K, die Mutter hingegen trägt die Mutation Q3K. Dahingegen tragen die beiden betroffenen Geschwister jeweils compound heterozygot beide Mutationen, N88K und Q3K.



**Abb 9** Familie 8 Stammbaun und Verdau

Bei Vorliegen der Mutation N88K kommt es zum Zugewinn einer BseNI Schnittstelle. Daher bleibt im Falle des Wildtyps das PCR Fragment von 118 bp ungeschnitten. Bei Vorliegen der Mutation N88K wird es dagegen in zwei Fragmente der Längen 77 bp und 41 bp geschnitten.

Beim Vorliegen der Mutation Q3K kommt es zum Wegfall einer SduI Schnittstelle. Dadurch bleibt beim Vorliegen der Mutation Q3K das Fragment von 97 bp ungeschnitten.

Im Falles des Wildtyps wird das PCR Fragment von 97 bp in zwei Fragmente von 73 bp und 24 bp geschnitten.

Man erkennt also, dass die gesunden Eltern nur heterozygote Träger jeweils einer der beiden Mutationen sind (Mutter Q3K, Vater N88K), während die betroffenen Geschwister jeweils heterozygot beide Mutationen tragen. Die nicht betroffene Schwester ist wie die Eltern nur heterozygote Trägerin einer Mutation (N88K).

### Patient 9 (17 Jahre)

Dieser deutschstämmige Patient trägt die Mutationen N88K und A246 V compound heterozygot (Abbildung 10). Der Patient wurde schon in der Neonatalperiode durch Trinkschwäche auffällig und konnte diagnostiziert werden. In dieser Zeit fand sich auch eine Zyanose mit Schnappatmung welche eine Intubation nötig machte. Schluckstörungen und Schielen konnten ebenfalls schon früh beobachtet werden. Postpartal fand sich bei ihm weiterhin eine leichte Arthrogyriosis multiplex mit Klumpfuß links, Sichelfuß rechts sowie Kontrakturen von Knie, Fingern und Händen.

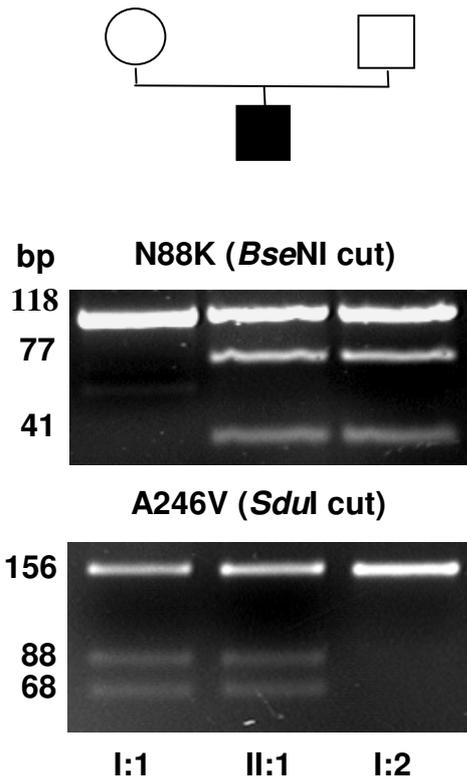
Die motorische Entwicklung erfolgte leicht verzögert, so wurde Laufen erst im Alter von 19 Monaten erlernt. Auch die Entwicklung der Feinmotorik erfolgte verzögert. Im Krankheitsverlauf kam es wiederholt zu krisenhaften Verschlechterungen bei Infekten mit zum Teil respiratorischen Insuffizienzen. Eine Ptose wurde beobachtet, ebenso eine generalisierte Schwäche sowie eine Schwäche der Gesichtsmuskulatur. Im Alter von 15 Jahren war im Rahmen einer myasthenen Krise eine intensivmedizinische Versorgung nötig. Die Krise wurde ausgelöst durch eine Varizelleninfektion.

In der Untersuchung zeigte der Patient ein schwächtiges Muskelprofil bei herabgesetzter grober Kraft und Hypomimie. Weiterhin bestanden ein Strabismus divergens sowie dysmorphologische Auffälligkeiten: ein hoher Gaumen und eine Malokklusion der Zähne. Auch fand sich ein ständig offener Mund, eine gestörte Mundmotorik mit Unfähigkeit die Zunge herauszustrecken und ein erhöhter Speichelfluss.

In der repetitiven Stimulation fand sich proximal ein deutliches Dekrement, der Tensilontest fiel positiv aus. Eine Mestinontherapie zeigte gute Erfolge. Heute nimmt der Patient normal am Schulsport teil.

### **Restriktionsverdau zum Nachweis der beiden Mutationen N88K und A246V (Abbildung 10)**

Bei Vorliegen der Mutation N88K kommt es zum Zugewinn einer *Bse*NI-Schnittstelle. Damit bleibt im Falle des Wildtyps das PCR-Fragment von 118bp ungeschnitten, bei Vorliegen der Mutation N88K wird es dagegen in 2 Fragmente der Längen 77bp und 41bp geschnitten. Bei Vorliegen der Mutation A246V kommt es zum Zugewinn einer *Sdu*I-Schnittstelle, wodurch das PCR-Fragment von 156bp in zwei Fragmente der Längen 88bp und 68bp geschnitten wird. Dementsprechend erkennt man, dass die gesunden Eltern von Patient 9 jeweils nur heterozygote Träger einer der beiden Mutationen sind (Mutter: A246V, Vater N88K), während Patient 9 jeweils heterozygot beide Mutationen trägt. Dies entspricht einem autosomal rezessiven Erbgang



**Abb 10** Familie 9 Stammbaum und Verdau

Patient 10a (6 Jahre)

Dieser Patient deutschen Ursprungs trägt compound heterozygot die Mutationen N88K und G291D (Abbildung 11). Erste Krankheitszeichen fanden sich bei ihm in der Neonatalperiode, in welcher auch die Diagnose eines CMS gestellt wurde. Die in der Neonatalperiode sehr stark ausgeprägte Trinkschwäche wurde im Rahmen einer Sondenernährung überbrückt. Nach einigen Tagen war ein Stillen wieder möglich. Bei der motorischen Entwicklung gab es keinerlei Besonderheiten. Sitzen konnte der Patient im Alter von sieben Monaten und Laufen im Alter von 16 Monaten. Zu Beginn des zweiten Lebensjahres fiel eine Ptose auf und gegen Ende desselben Lebensjahres kam es im Rahmen einer Infektion zur respiratorischen Insuffizienz. Hierbei war eine Reanimation des Patienten nötig.

In einer Untersuchung mit 6 Jahren konnte in einer repetitiven Nervenstimulation ein eindeutiges Dekrement nachgewiesen werden. Eine Mestinontherapie zeigte gute Erfolge. Unter Mestinon (4x7,5mg/Tag) war der Patient klinisch unauffällig. Eine generalisierte Schwäche oder Dysmorphien fanden sich zu diesem Zeitpunkt nicht.

### Patient 10b (4 Jahre)

Hierbei handelt es sich um den jüngeren Bruder des oben beschriebenen Patienten, der ebenfalls compound heterozygot die Mutationen N88K und G291D trägt (Abbildung 11). Die Meilensteine der motorischen Entwicklung wurden von ihm alle zeitgerecht erreicht. Auch die sonstige Entwicklung verlief unauffällig. Im Alter von 4 Jahren trat bei ihm im Rahmen einer Varizelleninfektion eine Ptose sowie eine Kopfhalteschwäche auf. Eine repetitive Stimulation ergab keinen Nachweis eines pathologischen Dekrements. Ebenso wenig fand sich eine generalisierte Muskelschwäche. Eine Behandlung mit Mestinson wurde nicht durchgeführt.

### **Restriktionsverdau zum Nachweis der Mutationen N88K und G291D (Abbildung 11).**

Bei Vorliegen der Mutation N88K kommt es zum Zugewinn einer *Bse*NI-Schnittstelle. Damit bleibt im Falle des Wildtyps das PCR-Fragment von 118bp ungeschnitten, bei Vorliegen der Mutation N88K wird es dagegen in 2 Fragmente der Längen 77bp und 41bp geschnitten. Bei Vorliegen der Mutation G291D kommt es zum Zugewinn einer *Taq*I-Schnittstelle, wodurch das PCR-Fragment von 127bp in zwei Fragmente der Längen 104bp und 23bp geschnitten wird. Dementsprechend erkennt man, dass auch hier die gesunden Eltern jeweils nur heterozygote Träger einer der beiden Mutationen sind (Mutter: G291D, Vater N88K), während die betroffenen Brüder (Patienten 10a und 10b) jeweils heterozygot beide Mutationen tragen. Die nicht betroffene Schwester der Patienten ist wie die Eltern nur heterozygote Trägerin einer der beiden Mutationen (N88K). Dies entspricht einem autosomal rezessiven Erbgang.

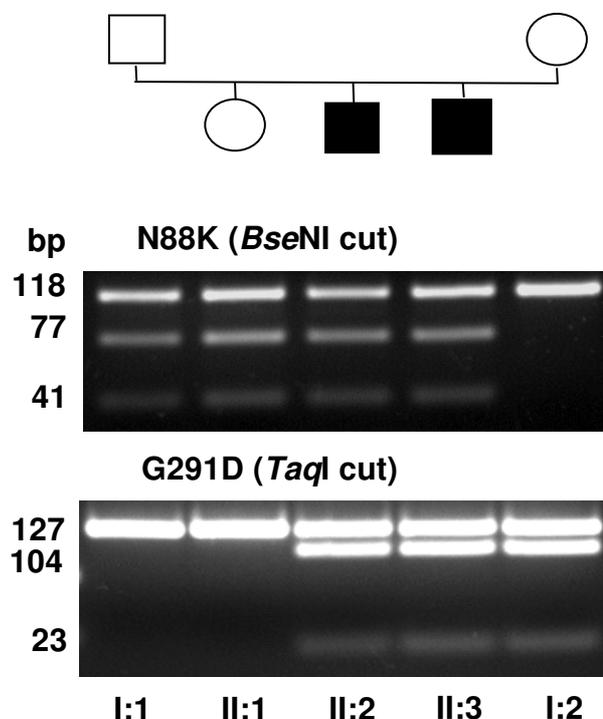


Abb 11 Familie 10 Stammbaum und Verdau

### Zusammenfassung

Zusammenfassend lassen die klinischen Daten der 12 Patienten mit Mutationen im Rapsyn-Gen Folgendes erkennen:

In den meisten Fällen zeigen sich die ersten klinischen Symptome eines CMS während der ersten beiden Lebensjahre. Sechs Patienten waren zum Geburtszeitpunkt asymptomatisch. Sechs andere Patienten wurden dagegen bereits als Neugeborene insbesondere durch Muskelhypotonie und Trinkschwäche auffällig. In einer Familie benötigen beide Geschwisterkinder assistierte Beatmung aufgrund postpartaler Ateminsuffizienz. Ein anderer Patient zeigte bei Geburt eine Arthrogryposis multiplex mit multiplen Gelenkkontrakturen der oberen und unteren Extremität.

Während der ersten Lebensjahre fiel den meisten Eltern eine Ptose des Augenlides, intermittierender Strabismus und tageszeitabhängige Schwäche ihrer Kinder auf. Es kam, bedingt durch die Muskelschwäche, zu häufigem Hinfallen in den ersten Jahren. Dennoch entwickelten sich die meisten Patienten normal. Nur in drei Patienten wurden motorische Entwicklungsmeilensteine leicht verzögert erreicht.

Bezeichnend ist eine - bei 11 Patienten berichtete - durch Stress, Fieber oder Infekte getriggerte krisenhafte Verschlechterung der Muskelschwäche. Der Schweregrad der Symptome außerhalb solcher episodischen Verschlechterungen variierte erheblich. Im Allgemeinen kam es zu keinen schwereren Einschränkungen der alltäglichen Aktivitäten. Drei Patienten betrieben sogar ohne größere Einschränkungen aktiv Sport.

Der Krankheitsverlauf war in allen Betroffenen gutartig, mit keinem oder geringem Fortschreiten der Symptome mit zunehmendem Alter. Allgemein kann man sagen, dass die Häufigkeit und Schwere der krisenhaften Verschlechterungen mit zunehmendem Alter abnahmen. Dennoch entwickelte ein Patient während einer Windpockeninfektion im Alter von 15 Jahren eine schwere myasthene Krise, die eine Intensivmedizinische Betreuung notwendig machte.

Bemerkenswert ist ein gutes Ansprechen auf Anticholinesterase - Medikation, welches bei allen neun Patienten beobachtet wurde, die Pyridostigmin (Mestinon® in einer Dosierung von 1 bis 8 mg/kg/Tag) erhielten. Bei drei Patienten mit leichten Symptomen wurde bisher noch keine Anticholinesterase Therapie begonnen.

Wiederholte klinische Untersuchungen zeigten bei allen Patienten eine variable bilaterale Ptose. Einige Patienten zeigten eine leichte Einschränkung der Augenbewegungen, aber keiner hatte eine ausgeprägte oder fixierte Ophthalmoplegie. Dennoch wurden intermittierende Doppelbilder oder Strabismus bei den meisten Patienten beschrieben. Eine bulbäre Beteiligung wurde bei vielen Patienten auffällig durch Kau- oder Schluckbeschwerden, nasale Sprache und mimische Schwäche. Eine belastungsabhängige Schwäche der Extremitätenmuskeln, bei der hauptsächlich die

proximalen Muskeln involviert waren, wurde ebenso bei den meisten Patienten beobachtet.

Einige Patienten zeigten leichte Dysmorphien mit einer länglichen Gesichtsform, einer Prognathie, einem hohen gotischen Gaumen sowie teilweise distalen Gelenkkontrakturen.

Eine repetetive Nervenstimulationen von zwei distalen und zwei proximalen Muskeln bzw. eine faziale Stimulation wurde bei 11 Patienten durchgeführt. Sieben zeigten ein pathologisches Dekrement, in zumindest einer der Stimulationen, vier zeigten dies nicht.

Das klinische Bild bei einer Patientin, die für N88K homozygot ist, weicht erheblich von den oben beschriebenen ab. Anders als die übrigen Patienten zeigte diese Patientin in Kindheit und Jugend keinerlei Symptome eines CMS und betrieb darüber hinaus auch aktiv Sport. Doppelbilder und leichte generalisierte Schwäche machten sich erst nach dem 20. Lebensjahr bemerkbar. Seither wurde sie erfolgreich mit Pyridostigmin behandelt.

**Abb.12** Klinische Symptomatik der untersuchten Patienten

Nr	Geschlecht	Alter bei Erstmanifestation / Untersuchung	Klinik	Motorische Meilensteine	Episod. Krisen	Symptome bei Untersuchung	Dekrement	Pyridostigmin Therapie	Ursprung
<b>N88K homozygot</b>									
1	weiblich	Neugeb / 11 J	Trinkschwäche, Hypotonie	normal	+	FBS / GS	ND	+	A
2	weiblich	6 Mo / 8 J	Ptose	normal	-	P / FBS	-	ND	D
3	weiblich	20 J / 55 J	Doppelbilder	normal	+	P / FBS / GS	+	+	UK
4	männlich	Neugeb / 4 J	Trinkschwäche, Hypotonie	normal	+, R	P / FBS / GS	+	+	D
5	weiblich	7 Mo / 2 J	Apnoe	normal	+, R	P / FBS / D	-	+	I
6	weiblich	2 J / 10 J	Apnoe	normal	+, R	P / FBS / GS	-	ND	D
7	männlich	3 J / 20 J	belastungsinduzierte Schwäche	normal	+, R	P / GS	+	+	D
<b>N88K + Q3K Compound heterozygot</b>									
8a	weiblich	Neugeb / 19 J	Apnoe	verzögert	+, R	P / FBS / GS / D	+	+	D
8b	männlich	Neugeb / 8 J	Apnoe	verzögert	+, R	P / FBS / GS / D	+	+	D
<b>N88K + A246V Compound heterozygot</b>									
9	männlich	Neugeb / 17 J	Trinkschwäche, A. multiplex	verzögert	+, R	P / FBS / GS / D	+	+	D
<b>N88K + G291D Compound heterozygot</b>									
10a	männlich	Neugeb / 6 J	Trinkschwäche	normal	+, R	P	+	+	D
10b	männlich	4 J / 4 J	Ptose	normal	+	-	-	ND	D

FBS Fazial oder Bulbärschwäche

GS Generalisierte Schwäche

R mit respiratorischen Krisen / Verschlechterungen

D Dysmorphie Züge

P Fluktuierende Ptose

ND Nicht Durchgeführt

### 3.2. Genotyp der Patienten mit RAPSIN N88K

Um die Hypothese zu unterstützen, dass die *RAPSIN* Mutation N88K auf einen Founder Effekt zurückgeführt werden kann, wurde eine Genotypenanalyse durchgeführt. Hierfür wurden zwei polymorphe Mikrosatellitenmarker verwendet, die in der Nähe des *RAPSIN* Gens liegen.

Zusätzlich wurde ein Polymorphismus in Intron 3 (IVS3-11delC) und ein Polymorphismus in Exon 2 (456T/C) analysiert. Beide Polymorphismen wurden homozygot bei allen Patienten gefunden, die auch *RAPSIN* N88K homozygot vorzuweisen hatten. Bei Patienten, welche *RAPSIN* N88K heterozygot trugen, fanden sich beide Polymorphismen auf dem mutierten Allel.

Der am nächsten zum Gen liegende polymorphe Mikrosatellitenmarker D11S4117 zeigte eine Fragmentlänge von 256 bp in den meisten *RAPSIN* N88K Allelen. Nur drei N88K Allele zeigten für D11S4117 eine Länge, die von 256 bp abwich (254 bzw. 258 bp). Diese Abweichung von 2 bp können bei DNA Replikationen vorkommen. Demzufolge ist anzunehmen, dass auch diese Allele sich vom 256 bp Allel ableiten. Folglich wurde ein Founder Allel festgelegt, bestehend aus den beiden intragenen Polymorphismen sowie dem Wert von 256 bp am Marker D11S4117.

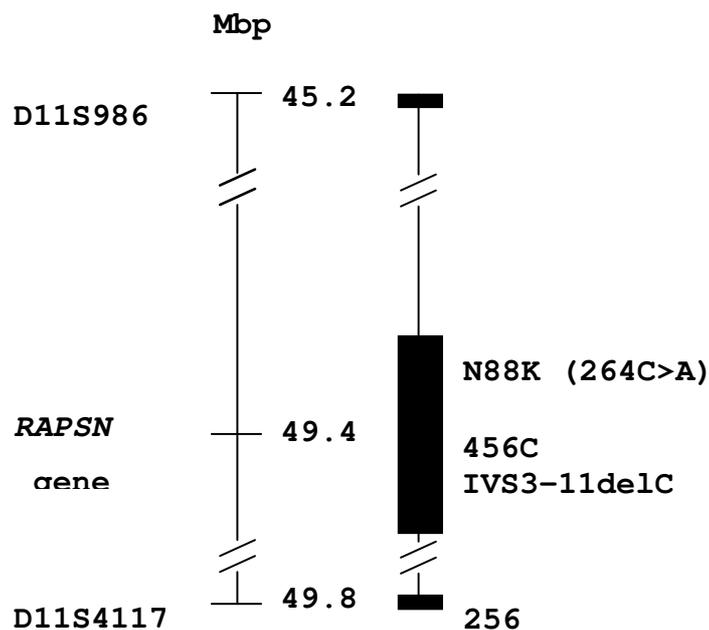


Abb 13 Haplotypenanalyse des Founder Allels für N88K

Dieses Founder - Allel wurde in 14 von 17 Allelen identifiziert, welche die *RAPSIN* N88K Mutation trugen. Allerdings fand es sich nur in 9 von 40 Kontrollallelen. Ein  $\chi^2$  Test indiziert ein starkes Linkageungleichgewicht ( $p < 0,01$ ) für den Founderhaplotyp, wenn *RAPSIN* N88K Allele mit Kontrollgruppen verglichen werden. Der zweite, weiter entfernte Mikrosatelliten Marker (D118986,

Entfernung 4,2 Mb) war nicht in Verbindung mit der Mutation zu bringen. Diese Ergebnisse stellen einen starken Anhaltspunkt dar, dass sich alle untersuchten *RAPSN* N88K Allele von einem gemeinsamen Vorfahren (Founder) herleiten.

## F DISKUSSION

Die meisten postsynaptischen CMS Erkrankungen sind mit kinetischen Veränderungen des AChR, einem Mangel an ihm oder beidem assoziiert. Oft handelt es sich bei den zugrunde liegenden genetischen Defekten um Mutationen der AChR Untereinheiten und hierbei vor allem der epsilon Untereinheit. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass auch *RAPSN* Mutationen ein postsynaptisches CMS bedingen. In dieser Studie (2002) waren alle vier untersuchten Patienten entweder homozygote Träger der Mutation *RAPSN* N88K oder sie trugen diese Mutation heteroallelisch mit einer zweiten Mutation. Daher war die Zielrichtung meiner Promotion die Untersuchung von *RAPSN* N88K bei den in unserem Labor vorhandenen Proben von CMS Patienten.

### 1. MOLEKULARGENETISCHE ERGEBNISSE

Es fand sich hierbei die Mutation *RAPSN* N88K in 12 von 120 Patienten, was 10 % entspricht. Zehn dieser Patienten stammten aus 110 unabhängigen Verwandtschaftsverhältnissen.

Alle untersuchten Familien stammten aus Zentral- oder Westeuropa. In dieser Untergruppe fand sich die Mutation *RAPSN* N88K bei 25% der CMS Familien.

Zusätzlich konnten drei neue Missense - Mutationen identifiziert werden, wovon bis dahin noch keine beschrieben war. Eine Pathogenität dieser Mutationen ist sehr wahrscheinlich: Diese Mutationen waren in 103 gesunden Kontrollen jeweils nicht nachweisbar, fanden sich jedoch zusammen mit der Erkrankung bei den betroffenen Familien.

Überdies sind die Aminosäuren der jeweils von der Mutation betroffenen Positionen (Q3, A246 und G291) stark konserviert im Rapsyn Protein der verschiedenen Arten.

### 2. DIE ROLLE VON RAPSYN

Rapsyn spielt eine wichtige Rolle beim Clustering des AChR an der postsynaptischen Membran der neuromuskulären Endplatte.

Die Primärstruktur von Rapsyn enthält eine Myristolierte Aminoendung, die nötig ist für die Membranassoziation des Proteins, sieben Tetratricopeptid - Wiederholungen, nötig für die Rapsyn Selbst - Assoziation, eine Coiled - coil Domäne, die die Interaktion mit dem AChR vermittelt, eine Cystein reiche Ring H2 Domäne und eine Serin - Phosphorylierungsstelle.

A246 ist die erste Aminosäure des Tetratricopeptid Repeats 7 (Codons 246 bis 279).

Kurz zuvor beschriebene Mutationen an der Position L14 und N88K liegen ebenfalls in einem

Tetratricopeptid Repeat und vermindern das Co-Clustering des AChR mit Rapsyn. G291 liegt in der hauptsächlich hydrophoben oder positiv geladenen Verbindungsregion, zwischen dem letzten Tetratricopeptid Repeats und der Coiled-Coil Domäne. Wenn G hier durch das negativ geladene D an Position 291 ausgetauscht wird, kann dies die Sekundärstruktur von Rapsyn verändern und herbei die Interaktion mit dem AChR verändern.

Q3 folgt dem Glycin in Codon 2, welches absolut unabdingbar für die Myristoylierung von Rapsyn ist. Ersetzt man nun das neutrale Q durch das positiv geladene K könnte dies den Prozess beeinflussen. Jedoch wurde die Pathogenität dieser Mutationen nicht explizit durch funktionelle Studien bewiesen.

Nur *RAPSN* N88K scheint eine häufige Mutation zu sein. Dieses Ergebnis ist ähnlich zum postsynaptischen CMS aufgrund von AChR Mutation. Während die meisten AChR Mutationen nur in einzelnen oder einer kleinen Zahl von Familien gefunden wurden (private Mutationen), wurde eine, sich wiederholende Mutation der epsilon Untereinheit des AChR (epsilon 1267delG), in einem hohen Anteil von CMS Patienten identifiziert, insbesondere bei Südosteuropäischen Patienten oder Roma.

Im Allgemeinen lässt sich die molekulare Diagnose erleichtern wenn wiederkehrende Mutationen durch einfachen Restriktions - Fragment - Längen - Polymorphismus ausfindig gemacht werden können.

Europäische Patienten mit positiver Antwort auf Anticholinesterase - Therapie sollten früher im diagnostischen Prozess auf die Mutation N88K untersucht werden. Es ist möglich, dass *RAPSN* N88K in einem hohen Anteil dieser Patienten gefunden werden kann und somit andere Testreihen unnötig werden.

### 3. DIE FOUNDER - MUTATION N88K

Genotypanalysen unserer *RAPSN* N88K Familien lassen vermuten, dass die Mutation sich von einem gemeinsamen Vorfahren (Founder) herleiten lässt. Jedoch stammen die Familienvorfahren weder aus einer gemeinsamen geographischen Lokalisation noch teilen sie religiöse oder andere Charakteristika.

In Ergänzung dazu zeigen nur polymorphe Marker in, oder sehr nahe zum Gen, ein Linkage Ungleichgewicht zu der Mutation. Daher lässt sich die Hypothese vertreten, dass die Mutation vor vielen tausend Jahren entstanden ist. Dennoch war es uns nicht möglich das genaue Alter der Mutation zu bestimmen.

#### 4. PHÄNOTYP DER PATIENTEN

Die Entdeckung der häufig auftretenden Mutation N88K erlaubt auch Genotyp – Phänotyp - Korrelationen. Die klinische Analyse unserer Patienten zeigte einen typischen Phänotyp für *RAPSN* N88K. Wie auch schon bei anderen CMS Patienten beobachtet, zeigen die meisten *RAPSN* N88K Patienten eine frühe Manifestation der Erkrankung und myasthene Symptome einschließlich bilateraler Ptose, Bulbärschwäche und einer, bei Ermüdung auftretenden generalisierten Schwäche von Arm und Beinmuskeln. Zudem zeigten alle *RAPSN* N88K Patienten eine positive Antwort auf Anticholinesterase Medikation. Alle N88K Patienten zeigten einen milden, nichtprogressiven Verlauf ihrer CMS Erkrankung. Im Gegensatz dazu zeigen die meisten Patienten mit primärem AChR Mangel eine komplette oder fixierte Ophthalmoplegie, welche bei keinem der *RAPSN* N88K Patienten zu finden war.

Viele Patienten berichteten über intermittierende Doppelbilder oder Strabismus als Zeichen von vorübergehenden Augenbewegungsstörungen. Interessanterweise waren Episoden von plötzlicher schwerer Schwäche, ausgelöst durch Stress, Fieber oder Infektionen in *RAPSN* N88K Patienten häufig. Oft waren diese Episoden begleitet von respiratorischem Versagen.

Respiratorische Krisen und Atemversagen treten häufig bei präsynaptischem CMS auf, verursacht durch Mutationen im *CHAT* Gen, was für diese Form von CMS zur Bezeichnung „CMS mit episodischen Apnoen“ geführt hat. Darüber hinaus wurden respiratorische Krisen aber auch - wenngleich viel seltener - bei den meisten anderen Formen von CMS beobachtet. Die Beobachtungen lassen vermuten, dass episodische Apnoen auch häufig in dem Patientenkollektiv der CMS Patienten mit einer zugrundeliegenden *RAPSN* Mutation sind.

Die Schwere der Erkrankung variiert beachtlich unter den *RAPSN* N88K Patienten, reichend von einmaligen Episoden von generalisierter Schwäche während Infektionserkrankungen in der Kindheit als einzigem Symptom, bis hin zu permanenter generalisierter Schwäche mit häufigen Exazerbationen begleitet von schweren respiratorischem Versagen.

Interessanterweise zeigte eine unserer *RAPSN* N88K Patienten Symptome erst im Erwachsenenalter. Im Allgemeinen wird die Diagnose CMS vermutet, wenn sich myasthene Symptome bei Geburt oder in früher Kindheit zeigen. Dennoch sind sehr seltene Fälle von Erstmanifestationen von CMS, bei Mutationen der alpha oder epsilon Untereinheit des AChR, im Erwachsenenalter beschrieben. CMS Patienten, welche die ersten Symptome im Erwachsenenalter präsentieren, könnten leicht als Patienten mit seronegativer Myasthenia gravis fehldiagnostiziert werden.

## 5. WEITERFÜHRENDE ERGEBNISSE ZUR FOUNDER – MUTATION N88K

Auch in weiteren Studien in Frankreich und den USA bzw. aus unserem Labor konnte ein Founder Effekt für *RAPSN* N88K in größeren Patientenkollektiven bestätigt werden.

In unserem Labor, ebenso wie in der Arbeitsgruppe Hantai, wurden Mikrosatelliten Marker für die Haplotypanalyse benutzt um einen möglichen Foundereffekt nachzuweisen. Ein anderer Ansatz war der Nachweis mit intragenen Markern mit Zuhilfenahme einzelner Single-nucleotide - Polymorphismen (SNPs). Dabei fand sich, dass nur intra-, oder extragene Marker in naher Umgebung des *RAPSN* Gens eine Verbindung mit der Mutation zeigten. Hieraus könnte gedeutet werden, dass es sich bei N88K um eine sehr alte Mutation handelt. Dennoch ist die genaue Bestimmung des Mutationszeitpunktes erschwert, da das *RAPSN* Gen in der Nähe des Centromers von Chromosom 11 liegt. In der Centromerregion ist die Rekombinationsrate stark erniedrigt. Laut geschichtlicher Daten migrierten alte Völker um 2000 v.Chr., woraufhin die Indo-Europäischen Populationen und Sprachen entstanden. Von daher entstand die *RAPSN* Mutation vermutlich vor diesem Ereignis.

Die Mutation N88K wurde in Patienten des europäischen und indischen Subkontinents beschrieben, jedoch nicht bei Patienten aus der afrikanischen Sub-Sahara oder Asien.

In einer Nordamerikanischen Studie mit Patienten kaukasischer Herkunft fanden sich identische intragene SNPs sowie Mikrosatellitenmarker. Der Marker D11S4109 zeigte jedoch vier verschiedene Genotypen in diesem Patientenkollektiv, woraufhin ein zusätzliches Founderereignis vermutet wurde. Da Mikrosatellitenmarker jedoch schneller mutieren als SNPs ist es durchaus möglich, dass es sich hierbei um das gleiche, von uns beschriebene, Allel handelt.

## 6. WEITERFÜHRENDE ERGEBNISSE ZU *RAPSN* MUTATIONEN

Seit Fertigstellung der experimentellen Arbeiten wurden auch weitere Mutationen im *RAPSN* Gen beschrieben. Es hat sich herausgestellt, dass die Mutation N88K im deutschen Patientenkollektiv die häufigste Mutation, noch vor Mutationen der epsilon Untereinheit des AChR ist. Dies kann Auswirkung auf die genetische Beratung von Patienten haben. Durch frühzeitiges Abklären einer Mutation in *RAPSN* kann teurere und invasive Diagnostik vermieden sowie frühzeitig ein adäquates Therapieschema begonnen werden.

Es wurden verschiedene Mutationstypen beschrieben.

## 1) Missense Mutationen.

Hierbei wird die Fähigkeit des AChR, an der neuromuskulären Endplatte Cluster zu bilden, herabgesetzt. Die dadurch nun weiter verteilte Lokalisation der Rezeptoren führt zu einer herabgesetzten Signalübertragung an der Endplatte.

## 2) Trunkierende Mutationen:

Diese Mutationen führen zu einem vorzeitigem Translationsstop wodurch eine Ausbildung des intakten Proteins unterbleibt.

Auch die Spleißmutation (IVS1-15C>A), welche außerhalb der üblichen Spleißstellen liegt, fällt in diese Gruppe.

2004 wurde von unserer Arbeitsgruppe außerdem eine Mikrodeletion beschrieben, welche wahrscheinlich durch homologe Rekombination entstanden ist.

## 7. WEITERFÜHRENDE ERGEBNISSE ZUM PHÄNOTYP VON RAPSN PATIENTEN

In einer weiterführenden Studie aus England konnte, im Bezug auf den Phänotyp, eine Einteilung in frühes und spätes Auftreten der Symptome („disease onset“) getroffen werden. Hierbei fallen Patienten des early-onset Typs durch Arthrogryposis multiplex congenita ( charakterisiert durch schwere Gelenkkontrakturen, Muskelschwäche und Fibrose), recurrente Apnoen sowie episodische Krisen auf. Es findet sich meist eine Besserung der klinischen Symptome im Laufe der Kindheit. Oft fallen die Patienten durch Gelenkkontrakturen und Dysmorphien des Gesichtschädels (langer Gesichtsschädel, tiefliegende Ohren, hoher Gaumen, zeltförmiger Mund) auf.

Demgegenüber steht der sich im Erwachsenenalter manifestierende late-onset Phänotyp bei welchem es oft zu einer Verwechslung mit einer seronegativen Myasthenia gravis kommen kann. Es zeigte sich ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit Acetylcholinesterase.

Als in unserem Patientengut Patientin 3 diagnostiziert wurde, war diese Einteilung noch nicht bekannt. Die Patientin entspricht aber voll und ganz dem late onset Typ. Auch Sie wurde anfänglich als Myasthenia gravis fehldiagnostiziert.

## 8. WICHTIGE DIAGNOSTISCHE ASPEKTE

Bei allen bisher veröffentlichten Studien bezüglich des *RAPSN* Gens fällt auf, dass sie zumeist mit der Mutation N88K einhergehen, welche als eine sehr häufige Mutation betrachtet werden kann.

Patienten mit CMS aufgrund einer *RAPSN* Mutation sind vor allem charakterisiert durch einen

benignen Krankheitsverlauf sowie einer Erstmanifestation in den ersten Lebensjahren. Eine Ausnahme bildet hierbei der late – onset Typ. Die allermeisten Patienten zeigen Fazial- und/oder Bulbärschwäche sowie oft leichte faziale Dysmorphien. Dabei ist ein hoher Gaumen und ein längliches Gesicht typisch, bei Neugeborenen kann eine Arthrogyriosis multiplex bestehen. Auch ein pathologisches Dekrement in der repetitiven Nervenstimulation findet sich als elektrophysiologischer Hinweis auf eine neuromuskuläre Erregungsübertragungsstörung in einer großen Patientenzahl. Eine Oberlidptose, welche allerdings nicht sehr stark ausgeprägt ist, findet sich ebenso. Eine fluktuierende, nicht fixierte Ophthalmoparese manifestierte sich mit dem Auftreten von Doppelbildern oder Strabismus. Im Gegensatz dazu findet sich bei CMS Patienten welche von einer Mutation der epsilon-Untereinheit des AChR betroffen sind, immer eine Ptose mit fixierter Ophthalmoparese. Bei Patienten mit *CHAT* Mutation findet sich im Bezug auf die Augenbeteiligung oft nur eine Ptose.

Das häufige Auftreten episodischer Apnoen, insbesondere im Rahmen von respiratorischen Infekten, wurde ursprünglich als typisch für Patienten mit *CHAT*- Mutationen beschrieben. Die Beobachtungen an Patienten mit *RAPSN*-Mutationen zeigen, dass in dieser Patientengruppe ebenfalls lebensbedrohliche respiratorische Insuffizienzen vorkommen.

Gelenkkontrakturen oder Dysmorphien des Gesichtsschädels können Hinweise auf eine *RAPSN*-Mutation sein. Bei Patienten mit *CHAT* Mutationen wurden sie nie beobachtet.

Einen weiteren sehr wichtigen Aspekt für die Diagnostik liefert die ethnische Herkunft des Patienten, da zahlreiche Mutationen besonders häufig in bestimmten Bevölkerungsgruppen gefunden wurden. So ist ein *RAPSN*-assoziiertes CMS zum Beispiel charakteristisch bei einer Mittel- oder Westeuropäischen Herkunft, wohingegen sich Mutationen der epsilon Untereinheit des Acetylcholinrezeptors häufiger bei Süd-Osteuropäern finden.

Das gute Ansprechen auf eine Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie ist ebenso typisch wie die oben beschriebenen Charakteristika im Verlauf der Erkrankung. Da sich die Klinik bei *RAPSN* Patienten ähnelt und sich die Mutation N88K als eine häufige Mutation herausgestellt hat, sollte man bei Verdacht auf eine CMS mit dieser Symptomatik unbedingt das *RAPSN* Gen mituntersuchen sowie eine Therapie mit Acetylcholinesterasehemmern beginnen, wovon die meisten Patienten sehr profitieren.

Aus den Daten zu Vorkommen und Häufigkeit von CMS-Mutationen sowie Genotyp-Phänotyp-Korrelationen lassen sich Diagnose, Prognose und Therapie von CMS-Patienten verbessern.

Klinisch gut charakterisierte Patienten, bei denen durch vorangegangene Untersuchungen die derzeit

bekanntem Ursachen von CMS ausgeschlossen werden konnten, bieten eine gute Möglichkeit, mittels weiterer genetischer Untersuchungen neue Kandidatengene zu identifizieren.

## 9. KONSEQUENZEN FÜR DIE PATIENTEN

Je nach Lokalisation des Defektes im Bereich der neuromuskulären Endplatte unterscheiden sich die einzelnen Unterformen der CMS hinsichtlich Verlauf, Prognose, Vererbarkeit und Behandlungsmöglichkeiten. Beispielsweise können sich Patienten die von einer Mutation im *RAPSN* Gen betroffen sind, im Rahmen respiratorischer Infekte krisenhaft verschlechtern. Dasselbe gilt für Patienten mit Mutationen des *CHAT* Gens, bei welchen die Verschlechterung bis hin zu episodischen Apnoen und plötzlichem Kindstod führen kann. Eine Behandlung mit AChE-Hemmern ist auch bei geringer Schwäche indiziert, da dies das Risiko für akute respiratorische Verschlechterungen reduziert. Bei anderen Formen ist eine Behandlung mit AChE-Hemmern dagegen langfristig nicht erfolgreich, in bestimmten Fällen kann sich die Symptomatik durch AChE-Hemmer sogar dramatisch verschlechtern. Damit haben der Nachweis einzelner Mutationen und deren funktionelle Charakterisierung bei CMS-Patienten häufig direkte therapeutische Konsequenzen, bisweilen auch im Hinblick auf neuartige Behandlungsmöglichkeiten. Die genaue Klassifizierung eines CMS ist für den einzelnen Patienten daher von großer klinischer Bedeutung.

Trotz einzelner Merkmale, welche für bestimmte Untergruppen des CMS charakteristisch sind, gelingt doch in vielen Fällen eine sichere Abgrenzung der Unterformen anhand der Klinik noch nicht. Daher kam bisher der Biopsie des *M. intercostalis* ein hoher Stellenwert zu. Diese recht invasive Diagnostik brachte allerdings auch größere Belastungen sowie Risiken für den Patienten mit sich.

Aus den oben beschriebenen Fortschritten der Molekulargenetik ergeben sich neue Perspektiven für eine nicht-invasive, auf molekulargenetischer Analyse basierende Diagnostik von CMS.

Von besonderer Bedeutung – aufgrund des Risikos für das plötzliche Auftreten einer respiratorischen Insuffizienz - erscheint auch die Testung asymptomatischer Geschwisterkinder. Bei Patienten mit einem „Late-Onset“-Phänotyp besteht die Gefahr, dass diese Erkrankung fälschlich für eine seronegative autoimmune Myasthenie gehalten wird und ineffektiv mit Immunsuppressiva therapiert wird. So bleibt zu hoffen, dass in Zukunft eine schnellere, weniger invasive Diagnostik und Charakterisierung der Subtypen zum Nutzen der Patienten möglich sein wird.

## G LITERATURVERZEICHNISS

Abicht, A., Lochmüller, H. (2002) Kongenitale myasthene Syndrome, in Rieß, O., Schöls, L. (Hrsg.) Neurogenetik, Stuttgart, Kohlhammer, 512-516

Abicht, A., Stucka, R., Schmidt, C., Briguet, A., Hopfner, S., Song, I. H., Pongratz, D., Müller-Felber, W., Ruegg, M. A. and Lochmüller, H. (2002) A newly identified chromosomal microdeletion and an N-box mutation of the AChR epsilon gene cause a congenital myasthenic syndrome. *Brain* **125**, 1005-13.

Anlar, B., Ozdirim, E., Renda, Y., Yalaz, K., Aysun, S., Topcu, M., Topaloglu, H. (1996) Myasthenia gravis in childhood, *Acta Paediatr* **85**, 838-842

Beeson, D., Higuchi, O., Palace, J., Cossins, J., Spearman, H., Mawell, S., Newsom-Davis, J., Burke, G., Fawcett, P., Motomura, M., Müller, J.S., Lochmüller, H., Slater, C., Vincent, A., Yamanashi, Y. (2006) Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy, *Science* **313** (5795), 1975-8

Burden, S. (1998) The formation of neuromuscular synapses, *Genes and Development* **12**, 133-148

Burke, G., Cossins, J., Maxwell, S., Owens, G., Vincent, A., Robb, S., Nicolle, M., Hilton-Jones, D., Newsom-Davis, J., Palace, J. and Beeson, D. (2003) Rapsyn mutations in hereditary myasthenia: distinct early- and late-onset phenotypes. *Neurology* **61**, 826-8.

Burke, G., Cossins, J., Maxwell, S., Robb, S., Nicolle, M., Vincent, A., Newsom-Davis, J., Palace, J. and Beeson, D. (2004) Distinct phenotypes of congenital acetylcholine receptor deficiency. *Neuromuscul Disord* **14**, 356-64.

Byring, R. F., Pihko, H., Tsujino, A., Shen, X. M., Gustafsson, B., Hackman, P., Ohno, K., Engel, A. G. and Udd, B. (2002) Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. *Neuromuscul Disord* **12**, 548-53.

Chevessier, F., Faraut, B., Ravel-Chapuis, A., Richard, P., Gaudon, K., Bauché, S., Prioleau, C., Herbst, R., Goillot, E., Ioos, C., Azulay, J.P., Attarian, S., Leroy, J.P., Fournier, E., Legay, C., Schaeffer, L., Koenig, J., Fardeau, M., Eymard, B., Pouget, J., Hantai, D. (2004) MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome, *Hum Mol Genet* **13**(24), 3229-40

- Donger, C., Krejci, E., Serradell, A.P., Eymard, B., Bon, S., Nicole, S., Chateau, D., Gary, Faredau, M., Massoulié, J., Guicheney, P. (1998) Mutation in the human acetylcholinesterase associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with endplate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic), *Am J Hum Genet* **63**(4): 967-75
- Dunne, V. and Maselli, R. A. (2003) Identification of pathogenic mutations in the human rapsyn gene. *J Hum Genet* **48**, 204-7.
- Dunne, V. and Maselli, R. A. (2004) Common founder effect of rapsyn N88K studied using intragenic markers. *J Hum Genet* **49**, 366-9.
- Engel, A.G. and Ohno, K. (2002) Congenital Myasthenic Syndromes, *Adv Neurol* **88**, 203-215
- Engel, A.G., Ohno, K, Sine, S (2002) The spectrum of congenital myasthenic syndromes, *Mol Neurobiol* **26**, 347-367
- Engel, A.G., Ohno, K. and Sine, S.M. (2003) Sleithing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* **4** (5): 339-52
- Engel, A. G. and Sine, S. M. (2005) Current understanding of congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Pharmacol* **5**, 308-21.
- Glass, D.J., De Chiara, T.M, Stit, T.N., DiStefano, P.S., Valenzela, D.M., Yancopoulos, G.D. (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation and is a functional receptor for agrin, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **61**, 435-44
- Huebsch, K. A. and Maimone, M. M. (2003) Rapsyn-mediated clustering of acetylcholine receptor subunits requires the major cytoplasmic loop of the receptor subunits. *J Neurobiol* **54**, 486-501.
- McConville, J. and Vincent, A. (2002) Diseases of the neuromuscular junction. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 296-301.
- Müller, J. S., Abicht, A., Burke, G., Cossins, J., Richard, P., Baumeister, S. K., Stucka, R., Eymard, B., Hantai, D., Beeson, D. and Lochmüller, H. (2004a) The congenital myasthenic syndrome mutation RAPSN N88K derives from an ancient Indo-European founder. *J Med Genet* **41**, e104.
- Müller, J. S., Abicht, A., Christen, H. J., Stucka, R., Schara, U., Mortier, W., Huebner, A. and

- Lochmüller, H. (2004b) A newly identified chromosomal microdeletion of the rapsyn gene causes a congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord* **14**, 744-9.
- Müller, J. S., Mildner, G., Muller-Felber, W., Schara, U., Krampfl, K., Petersen, B., Petrova, S., Stucka, R., Mortier, W., Bufler, J., Kurlemann, G., Huebner, A., Merlini, L., Lochmüller, H. and Abicht, A. (2003) Rapsyn N88K is a frequent cause of congenital myasthenic syndromes in European patients. *Neurology* **60**, 1805-10.
- Müller, J.S., Herczegfalvi, A., Vilchez, J.J., Colomer, J., Bachinski, L.L., Mihaylova, V., Santos, M., Schara, U., Deschauer, M., Shevell, M., Poulin, C., Dias, A., Soudo, A., Hietala, M., Äärimaa, T., Krahe, R., Karcagi, V., Huebner, A., Beeson, D., Abicht, A. and Lochmüller, H. (2007) Phenotypical spectrum of DOK 7 mutations in congenital myasthenic syndromes, *Brain* **130**(6), 1497-1506
- Ohno, K., Brengman, J., Tsujino, A. and Engel, A.G. (1998) Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen – like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme, *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(16), 9654-9
- Ohno, K., Tsujino, A., Brengman, J.M., Harper, C.M., Bajzer, Z., Udd, B., Beyring, R., Robb, S., Kirkham, F.J. and Engel, A.G. (2001) Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(4), 2017-22
- Ohno, K., Engel, A. G., Brengman, J. M., Shen, X. M., Heidenreich, F., Vincent, A., Milone, M., Tan, E., Demirci, M., Walsh, P., Nakano, S. and Akiguchi, I. (2000) The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol* **47**, 162-70.
- Ohno, K., Engel, A. G., Shen, X. M., Selcen, D., Brengman, J., Harper, C. M., Tsujino, A. and Milone, M. (2002) Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. *Am J Hum Genet* **70**, 875-85.
- Ohno, K., Tsujino, A., Brengman, J. M., Harper, C. M., Bajzer, Z., Udd, B., Beyring, R., Robb, S., Kirkham, F. J. and Engel, A. G. (2001) Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2017-22.
- Ramarao, M.K., Cohen, J.B. (1998) Mechanism of nicotinic acetylcholine receptor cluster formation by rapsyn , *Proc Natl Acad Sci USA*; **95**, 4007-4012

- Ramarao, M.K., Bianchette, M.J., Lannen, J., Cohen, J.B. (2001) Role of Rapsyn tetratricopeptide repeat and coiled-coil domains in self association and nicotinic acetylcholine receptor clustering, *BiolChem* **276**,7475-83
- Richard, P., Gaudon, K., Andreux, F., Yasaki, E., Prioleau, C., Bauche, S., Barois, A., Ioos, C., Mayer, M., Routon, M. C., Mokhtari, M., Leroy, J. P., Fournier, E., Hainque, B., Koenig, J., Fardeau, M., Eymard, B. and Hantai, D. (2003) Possible founder effect of rapsyn N88K mutation and identification of novel rapsyn mutations in congenital myasthenic syndromes. *J Med Genet* **40**, e81.
- Ohno, K. and Engel, A. G. (2004a) Congenital myasthenic syndromes: gene mutations. *Neuromuscul Disord* **14**, 117-22.
- Ohno, K. and Engel, A. G. (2004b) Lack of founder haplotype for the rapsyn N88K mutation: N88K is an ancient founder mutation or arises from multiple founders. *J Med Genet* **41**, e8.
- Schmidt, C., Abicht, A., Krampfl, K., Voss, W., Stucka, R., Mildner, G., Petrova, S., Schara, U., Mortier, W., Bufler, J., Huebner, A. and Lochmuller, H. (2003) Congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation in the gene encoding choline acetyltransferase. *Neuromuscul Disord* **13**, 245-51.
- Sieb, J. P., Kraner, S., Rauch, M. and Steinlein, O. K. (2000) Immature end-plates and utrophin deficiency in congenital myasthenic syndrome caused by epsilon-AChR subunit truncating mutations. *Hum Genet* **107**, 160-4.
- Tsujino, A., Maertens, C., Ohno, K., Shen, X.M., Fukuda, T., Harper, C.M., Cannon, S.C. and Engel, A.G. (2003) myasthenic syndrome caused by mutations of SCN4A sodium channel, *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(12), 7377-82
- Vincent, A., Newland, C., Croxen, R., Beeson, D. (1997) Genes at the junction-candidates for congenital myasthenic syndromes, *Trends Neurosci* **20**(1), 15-22
- Wood, S.J., Slater, C.R. (2001) Safety factor at the neuromuscular junction, *Prog Neurobiol* **64**, 393-429

# F ANHANG

## 1. Fragebogen zur klinischen Erfassung von CMS-Patienten

### ERFASSUNGSBOGEN ZUR DIAGNOSTIK KONGENITALER MYASTHENER SYNDROME

AM FRIEDRICH-BAUR-INSTITUT, ZIEMSENSTR. 1A, 80336 MÜNCHEN, LTD. ARZT PROF. D. PONGRATZ

**Probenversand zur  
Molekulargenetischen  
Diagnostik:**

**10 ml EDTA-BLUT**

zu senden an  
**Labor für Molekulare Myologie  
AG Prof. Lochmüller  
Marchioninistr. 17  
81377 München**

- Versand bei **Raumtemperatur**  
- bei Säuglingen sind 5 ml EDTA-Blut ausreichend

Nach Möglichkeit bitten wir um Beilegung eines **gelben Überweisungsscheins**. Falls eine Kostenübernahme unklar/nicht möglich ist, bitten wir um einen entsprechenden Vermerk bzw. um Rücksprache.

Rückfragen unter 089-2180-78180 / Fax -78184  
Dr. A. Abicht, J. Müller, Dr. H. Lochmüller  
Hanns.Lochmueller@med.uni-muenchen.de  
Angela.Abicht@med.uni-muenchen.de  
Juliane\_Simona.Mueller@med.uni-muenchen.de

EDTA-Blutprobe von Patient:

**Vorname:**

**Name:**

männlich

weiblich

**Geburtsdatum:**

Falls möglich, bitten wir um zusätzliche Blutproben von erkrankten oder nicht erkrankten Familienangehörigen!

EDTA-Blutproben von Familienangehörigen:

Vater:

Mutter:

Geschwister:

Kontaktadresse des Einsenders:

**Klinik:**

**Ansprechpartner/ überweisender Arzt:**

**Telefon:**

**e-mail:**

### WICHTIGE ANGABEN ZUM PATIENTEN

#### 1. FAMILIENANAMNESE

Aus welchem Land stammt die Familie?

-----

Ist Blutsverwandschaft in der Familie bekannt?

ja

nein

keine Information

Sind andere Familienmitglieder erkrankt?:

ja

nein

keine Information

Wieviele gesunde Geschwister hat der Patient?

-----

...bitte zeichnen Sie einen Stammbaum aus dem hervorgeht, wieviele Geschwister der Patient hat und welche Familienangehörigen betroffen sind:

bitte Rückseite beachten...

## 2. ANAMNESTISCHE ANGABEN

- Erstmanifestation:  neonatal  
 im ersten Lebensjahr  
 Kindheit: mit Jahren  
 Jugend: mit Jahren  
 später: mit Jahren
- Motorische Entwicklung:  normal  
 verzögert  
Laufen erlernt mit Mon.
- Erkrankungsverlauf:  
 deutlich progredient  
 nicht oder nur gering progredient  
 Tendenz zur Besserung
- Krisenhafte Verschlechterungen (z.B. im Rahmen von Infekten):  
 nein  
 ja  
mit respiratorischer Insuffizienz:  ja  nein  
 in früher Kindheit

## 3. NEUROLOGISCHER UNTERSUCHUNGSBEFUND

- Paresen:  
 generalisiert  
 selektive Muskelgruppen  rein okuläre Paresen  
 andere:  
 konstant  
 deutlich belastungsabhängig  
 tageszeitliche Schwankung
- Betroffene Muskelgruppen:  
 okuläre Muskulatur  fluktuierende Ptosis  
 eingeschränkte Bulbusbeweglichkeit  
 Bulbäre Muskulatur  Schluckstörungen  
 nasale Sprache  
 Kauschwäche  
 mimischer Schwäche  
 Atemmuskulatur  Vitalkapazität:  
 Extremitäten  proximal Kraftgrad (1-5):  
 distal Kraftgrad (1-5):  
 Gliedergürtel  Schultergürtel (Scapulae alatae ?)  
 Beckengürtel  
 Axiale Muskulatur (ausgeprägte Skoliose ?)
- Gefähigkeit  
 voll erhalten  eingeschränkt  stark / völlig eingeschränkt  
Gehstrecke ca.:
- Muskeleigenreflexe:  
 normal  abgeschwächt
- Muskuläre Trophik:  
 normal  Atrophien

- Kongenitale Kontrakturen:  nein  ja  
Dysmorphie Stigmata:  nein  ja:

## 4. ELEKTROPHYSIOLOGIE

- EMG  
 nicht durchgeführt  myopathisch  
 unauffällig  neurogen  
 anderes:
- Pathologisches Dekrement:  
 distale Muskulatur  
 nachweisbar ( %)  
 nicht nachweisbar  
 nicht geprüft  
 proximale Muskulatur  
 nachweisbar: ( %)  
 nicht nachweisbar  
 nicht geprüft
- Reaktion auf Einzelreiz:  
 normal  
 repetitiv  
 nicht geprüft
- ... evtl. weitere Befunde  
Einzelfaser EMG: NLG:
- Anmerkung:  
Pathologisches Dekrement:  
...bei einigen Formen des kongenitalen myasthenen Syndroms nur in zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch schwachen Muskeln nachweisbar (evtl. induzierbar durch repetitive Beübung oder 10 Hz-Stimulation über mehrere Minuten!).  
Reaktion auf Einzelreiz:  
...leicht zu übersehen, wenn Stimulationsfrequenz über 0,2 Hz oder nach kurzer Willkürkontraktion.

## 5. LABOR / MUSKELBIOPSIE

- Muskelbiopsie durchgeführt:  nein  ja, Befund:

Serum Creatinkinase (CK):

## 5. AZETYLCHOLIN-REZEPTOR-ANTIKÖRPER

- Azetylcholin-Rezeptor-Antikörper:  nachweisbar  
 nicht nachweisbar  
 nicht untersucht

## 6. ANSPRECHEN AUF AZETYLCHOLINESTERASE HEMMER:

- Tensilon Test:  klinisch  deutlich positiv  
 mit EMG  fraglich positiv/negativ  
 negativ  
 nicht durchgeführt
- langfristige Mestinontherapie:  erfolgreich  
 ohne Effekt  
 nur anfangs erfolgreich  
 nicht durchgeführt

## 6. WEITERE THERAPIE:

- Immunsuppressive Therapie, Plasmaaustausch, Immunglobuline...  
 nicht durchgeführt  
 ohne Erfolg versucht wurde:  
 erfolgreich behandelt mit:

...ÜBER ERGÄNZENDE KRANKENBERICHTE SIND WIR SEHR DANKBAR

Vielen Dank für die Beantwortung unserer Fragen! Sollte der Nachweis einer entsprechenden Mutation gelingen, geht ihnen selbstverständlich ein Befund zu! Wir bitten allerdings um Geduld: Je nach Umfang der erforderlichen Untersuchungen ist mit dem Ergebnis unter Umständen erst in mehreren Monaten zu rechnen.

## 2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Austria (Österreich)
Abb	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholinrezeptor / -en
Aminosäuren:	
A	Alanin
D	Asparaginsäure
G	Glycin
K	Lysin
L	Leucin
N	Asparagin
Q	Glutamin
V	Valin
bp	Basenpaar / -e
C. elegans	Caenorhabditis elegans (Nematode)
CHAT	Cholin - Acetyltransferase
CMS	Congenital myasthenic syndrome
ColQ	Collagen tail (kollagenartigen Verankerung)
D	Deutschland
D	dysmorphe Züge
DNA	Desoxy-ribonucleic-Acid (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosid - Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin - Tetraacetat
EMG	Elektromyogramm
engl	englisch

FBS	Facial- oder Bulbärschwäche
FöFoLe	Förderprogramm für Forschung und Lehre
g	Gramm
GS	generalisierte Schwäche
Hz	Hertz
I	Italien
J	Jahre
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LMU	Ludwig – Maximilians – Universität
M2 – Region	zweite Transmembranregion der AChR Untereinheiten
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumkationen
mg	Milligramm
min	Minute / -en
M.intercostalis	Musculus intercostalis
MLU	Martin – Luther - Universität
Mo	Monat
MuSK / MUSK	Muskelspezifische Kinase / Gen
µl	Mikroliter
ND	Nicht durchgeführt
NEB	New England Biolabs
Neugeb	Neugeborenenperiode
N. ulnaris	Nervus ulnaris
P	fluktuierende Ptose
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase – Ketten – Reaktion)

R	mit respiratorische Krisen
Rapsyn / RAPSN	receptor associated protein of the synapse / Gen
RFLP	Restriktionsfragmentlängen - Polymorphismus
SCCMS	Slow Channel CMS
SCN4A	Gen kodierend für den spannungsabhängigen Natriumkanal
SNPs	Single-nucleotid- exchange - polymorphism
synapt.	Synaptisch / -er
Tab	Tabelle
Taq	Thermus Aquaticus Polymerase
TU	Technische Universität
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
VACHT	vesikuläre Acetylcholintransferase
v.Chr.	vor Christus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

### **3. Danksagung**

Danken möchte ich allen, die mich vielfältig unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Angela Abicht für ihre weitreichende Unterstützung, die Überlassung von Bildmaterialien für Vortragszwecke im Rahmen des Promotionsstudiums sowie ganz besonders für ihre engagierte Weiterbetreuung meiner Arbeit nach Ausscheiden meines ursprünglichen Doktorvaters.

Auch danken möchte ich meinem ursprünglichen Doktorvater Prof. Dr. Hanns Lochmüller, der mir das Thema überlassen hat, mit großem Einsatz für meine wissenschaftliche Ausbildung gesorgt hat und mir stets ein Ansprechpartner war. Ich möchte mich für die geduldige und ermutigende Betreuung bedanken.

Prof. Dr. Dr. Heesemann und der LMU München danke ich für die Aufnahme in den Promotionsstudiengang Molekulare Medizin und die damit verbundene finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Frau Dr. Juliane Müller verdanke ich eine kritische und zielstrebige Betreuung. Vielen Dank für die wertvolle Unterstützung im Verlauf der Promotion.

Für die gute Einarbeitung in das Forschungsgebiet und die anregenden Diskussionen möchte ich mich bei Frau Dr. Carolin Schmidt bedanken.

Ich danke auch allen Mitarbeitern des Institutes für wissenschaftliche Anregungen und die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Siegbert, Irmgard, Gunnar und Jorge, die mich jederzeit uneingeschränkt unterstützt und motiviert haben und somit wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

## **5. Ehrenwörtliche Erklärung**

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den .....

.....  
(Gina A. Mildner)

Dissertation eingereicht am:.....