

Aus dem Friedrich-Baur-Institut (Ltd. Arzt: Prof. Dr. D. Pongratz) der Medizinischen
Fakultät an der Neurologischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. Th. Brandt) der Ludwig-
Maximilians-Universität München

**Klinische und molekulargenetische Charakterisierung von Patienten mit
Kongenitalen Myasthenen Syndromen**

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

vorgelegt von
In-Ho Song

aus Krefeld

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hanns Lochmüller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J.-U. Walther
Prof. Dr. R. Wank

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Frau Dr. med. Angela Abicht

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2003

Teile dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht in:

1. Abicht A, Stucka R, Song IH, Karcagi V, Kugler K, Baumgarten-Walczak A, Stier C, Pongratz D, Mortier W, Müller-Felber W, Rudel R, Lochmüller H (2000). Genetic analysis of the entire AChR ϵ -subunit gene in 52 congenital myasthenic families. *Acta Myologica*; **19**:23-28.
2. Stucka R, Abicht A, Song IH, Bonsch D, Deufel T, Lochmüller H (2000). A modified alignment of human and rodent 5' untranslated sequences of the acetylcholine receptor epsilon subunit gene revealed additional regions of high homology. *Neuromuscul Disord*; **10**:213-214.
3. Karcagi V, Tournev I, Schmidt C, Herczegfalvi A, Guergueltcheva V, Litvinenko I, Song IH, Abicht A, Lochmüller H (2001). Congenital Myasthenic Syndrome in southeastern European Roma (Gypsies). *Acta Myologica*; **20**:231-237.
4. Abicht A, Stucka R, Schmidt C, Briguet A, Höpfner S, Song IH, Pongratz D, Müller-Felber W, Ruegg MA, 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**:1005-1013.
5. Barisic N, Schmidt C, Sidorova OP, Herczegfalvi A, Gekht BM, Song IH, Stucka R, Karcagi V, Abicht A, Lochmüller H (2002). Congenital myasthenic syndrome (CMS) in three European kinships due to novel splice site mutation (IVS7-2A/G) in the epsilon acetylcholine receptor (AChR) subunit gene. *Neuropediatrics*; **33** (5):249-254.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Azetylcholinrezeptor	1
1.2	Klinik der CMS	1
1.2.1	Vererbungsmodus und Häufigkeit	1
1.2.2	Krankheitsbild	2
1.2.3	Klinische Besonderheiten einzelner CMS-Formen	4
1.2.4	Therapiemöglichkeiten der CMS	5
1.2.4.1	Allgemeines	5
1.2.4.2	Azetylcholinesterase-Inhibitoren und 3,4-Diaminopyridin	5
1.2.4.3	Chinidin	6
1.2.4.4	Besonderheiten	6
1.3	Klassifikation	7
1.4	Diagnostische Kriterien	9
1.4.1	Allgemeines	9
1.4.2	Anamnese und körperliche Untersuchung	10
1.4.3	Tensilontest	11
1.4.4	Laborparamter	11
1.4.5	Muskelbiopsie und Histologie	12
1.4.5.1	Allgemeines	12
1.4.5.2	Morphologische Befunde	12
1.4.6	Elektrophysiologische Untersuchungen	13
1.4.6.1	Repetitive Stimulation	13
1.4.6.2	Mikroelektrophysiologische Untersuchungen am Patienten	14
1.4.7	Molekulargenetische Diagnostik	16
1.4.8	Differentialdiagnosen	19
2	Zielsetzung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Patienten	21
3.2	DNA-Extraktion aus Blut	24
3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR	24
3.4	Etablierung neuer Primer zur molekulargenetischen Untersuchung des Gens der ϵ -Untereinheit der AChR	24
3.4.1	Primer-Design	24
3.4.2	Verwendete ϵ - Primer	25
3.5	Gelelektrophorese und Gelextraktion	25
3.6	Sequenzanalyse	26
3.7	Restriktionsverdau	26
4	Ergebnisse	28

4.1	Überblick über identifizierte Mutationen	28
4.2	Übersicht über Herkunftsländer der CMS-Patienten	30
4.3	Frameshift-Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$	33
4.3.1	Prävalenz und Nachweis der Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$	33
4.3.2	Klinischer Phänotyp der $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten und Vergleich mit anderen CMS-Patienten	34
4.4	Andere ϵ -Mutationen	35
4.4.1	Andere Frameshift-Mutationen und Mutationen, die zu einem Stop-Codon führen	36
4.4.1.1	Mutation $\epsilon 1369\text{delG}$	36
4.4.1.2	Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$	37
4.4.1.3	Mutation $\epsilon 1197\text{delG}$	38
4.4.1.4	Mutation $\epsilon 70\text{insG}$	38
4.4.1.5	Mutation $\epsilon 1132\text{C>T}$	39
4.4.2	Spleiß-Mutationen	40
4.4.2.1	Spleiß-Mutation $\epsilon\text{IVS7+2T>C}$	41
4.4.2.2	Spleiß-Mutation $\epsilon\text{IVS7-2A>G}$	41
4.4.3	Promotormutationen	44
4.4.3.1	Promotormutation $\epsilon\text{-155G>A}$	44
4.4.3.2	Promotormutation $\epsilon\text{-154G>A}$, compound-heterozygot und Mikrodeletion $\Delta 1290\text{bp}$	45
4.4.4	Mutationen, die zu Austausch oder Verlust einer Aminosäure führen (Missense-Mutationen)	47
4.4.4.1	Mutation $\epsilon 1304\text{del3}$	47
4.4.4.2	Mutation $\epsilon 652\text{C>T}$	47
4.4.4.3	Mutation $\epsilon 392\text{del3}$	48
4.4.4.4	Mutation $\epsilon 382\text{T>A}$	48
5	Diskussion	50
5.1	Allgemeines	50
5.2	Abstammung der CMS-Patienten	50
5.3	Nachgewiesene Mutationen der ϵ -Untereinheit des AChR	51
5.3.1	Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$	51
5.3.2	Andere Frameshift-Mutationen und Stopmutationen	53
5.3.3	Spleiß-Mutationen	56
5.3.4	Promotormutationen	57
5.3.5	Missense-Mutationen	58
5.4	CMS-Patienten, bei denen der zugrundeliegende Defekt nicht geklärt ist	61
5.4.1	Weitere CMS-verursachende Gene	63
5.4.2	Weitere CMS-Kandidatengene	64
5.5	Schlussfolgerung aus den eigenen Untersuchungen für Diagnostik und Therapie von CMS-Patienten	66
5.6	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	68
5.7	Mögliche modifizierende Faktoren in der phänotypischen Variabilität von CMS	69
5.8	Ausblick	71

6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis	74
8	Anhang	89
8.1	Abkürzungen	89
8.2	Danksagung	91
8.3	Curriculum Vitae	92
8.4	Ehrenwörtliche Erklärung	94

1 Einleitung

1.1 Der Azetylcholinrezeptor

Der nikotinische Azetylcholinrezeptor (AChR) der Skelettmuskulatur ist ein Neurotransmitter-gesteuerter Ionenkanal, der für die synaptische Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte verantwortlich ist ^{73, 79}. Durch die Bindung von Azetylcholin (ACh) an den Rezeptor öffnet sich ein Kationen-selektiver Kanal. Der resultierende Ionenstrom depolarisiert die muskuläre Membran, was zur Muskelkontraktion führt. Das Kanalprotein existiert in zwei funktionell unterschiedlichen Formen ^{32, 60}. In fetalem und denerviertem Muskel ist der AChR in molarer Stöchiometrie aus den Untereinheiten α_2 , β , γ und δ aufgebaut, während in adulten Muskelzellen die γ -Untereinheit durch die ε -Untereinheit ersetzt wird ^{88, 90}. Jede der Untereinheiten besteht aus vier transmembranen Domänen, die zusammen eine pentamere Struktur um einen zentralen Ionenkanal formen. Die Bindungsstellen für Azetylcholin befinden sich an den Kontaktstellen zwischen α und δ sowie zwischen α und γ/ε ^{73, 111}. Auch Serum-Cholin vermag Azetylcholinrezeptoren zu aktivieren ¹³². Jede Untereinheit wird durch ein distinktes Gen kodiert, dessen Sequenz gut charakterisiert ist ^{12, 13, 75, 94}. Es besteht eine große Homologie zwischen den Untereinheiten verschiedener Spezies.

Der Azetylcholinrezeptor ist an der Pathogenese vieler neuromuskulären Krankheiten beteiligt. Bei der Myasthenia gravis, einer autoimmunen Krankheit, sind Autoantikörper direkt gegen den Azetylcholinrezeptor gerichtet ⁶. Im Gegensatz dazu finden sich bei den kongenitalen myasthenen Syndromen (CMS) in der Regel keine autoimmunen Ursachen.

1.2 Klinik der CMS

1.2.1 Vererbungsmodus und Häufigkeit

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (engl.: Congenital Myasthenic Syndrome = CMS) stellen klinisch und pathogenetisch eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, deren gemeinsamer Defekt eine Störung der neuromuskulären Übertragung im Bereich der Endplatte ist ^{35, 46, 47}. Die meisten Formen werden autosomal-rezessiv vererbt oder treten sporadisch auf. Eine autosomal-dominante Vererbung ist seltener. Zur Prävalenz von CMS-Fällen gibt es keine genauen Daten, im Kindesalter dürfte ihr Anteil bis zu 10% aller Myasthenien ausmachen.

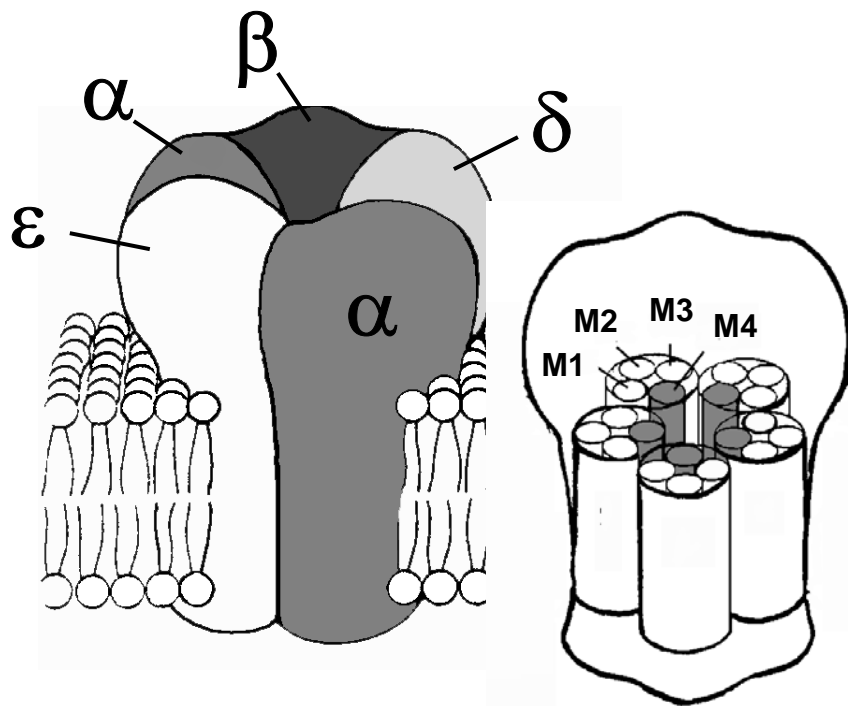


Abbildung 1 :Aufbau des Azetylcholinrezeptors

Der muskuläre AChR ist aufgebaut aus fünf Untereinheiten, die sich zusammenlagern, um eine zentrale Ionenpore zu bilden. Jede AChR-Untereinheit wird durch ein separates Gen, bestehend aus 10-12 Exons, kodiert. Die Untereinheiten sind homolog aufgebaut und bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne von ungefähr 210 Aminosäuren, auf die dann drei transmembrane Domänen (M1-M3), eine lange zytoplasmatische Schleife und eine vierte transmembrane Domäne (M4) mit dem extrazellulären C-Terminus folgen⁷³. Gemeinsam begrenzen die M2-Domänen der fünf Untereinheiten den Ionenkanal. Während der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte entstehen die AChR an der postsynaptischen Membran. Die fetalen AChR in der Zusammensetzung ($\alpha_2\beta\gamma\epsilon$) werden von der 31. Schwangerschaftswoche an durch adulte AChR ($\alpha_2\beta\gamma\epsilon$) ersetzt.

1.2.2 Krankheitsbild

Der Beginn der Symptomatik von CMS liegt in der Regel in der frühen Kindheit, meist in den ersten zwei Lebensjahren. Verlauf und Schweregrad der Erkrankung sind jedoch sehr unterschiedlich³⁵: die Symptomatik reicht vom schweren „floppy-infant“-Syndrom bei Geburt bis zu einer Minimalsymptomatik mit Ptose und leichter muskulärer Schwäche im Erwachsenenalter. Im Säuglingsalter fallen Trinkschwäche, kraftloses Schreien und generalisierte muskuläre Hypotonie, mit oder ohne Ptose auf. In manchen Fällen kommt es –meist ausgelöst durch respiratorische Infekte- zu krisenhaften Verschlechterungen, die zu einer plötzlichen Ateminsuffizienz und zum Kindstod führen können. Die motorische Entwicklung kann verzögert sein. Die Symptomatik kann sich im Verlauf der Kindheit stabilisieren und eine durchaus gute

Prognose haben. Bei älteren Kindern und im Erwachsenenalter steht meist eine abnorme Ermüdbarkeit der Muskulatur bei Belastung im Vordergrund. Dazu kommt oft eine tageszeitabhängige Ptose mit oder ohne Störungen der äußeren Augenmuskulatur. In manchen Fällen ist der Erkrankungsverlauf jedoch weiter progredient und kann zu schwerer Behinderung und Tod in den ersten Lebensjahrzehnten führen.

Elektrophysiologisch findet sich in der repetitiven Nervenstimulation ein pathologisches Dekrement. Nicht immer ist dieses Dekrement in allen Muskeln nachweisbar. Daher sollten neben distalen Muskelgruppen immer auch proximale Muskeln untersucht werden und gegebenenfalls auch eine faziale Stimulation oder eine Einzelfaser-Elektromyographie durchgeführt werden. Anders als bei der autoimmunologisch ausgelösten Myasthenia Gravis lassen sich keine Antikörper gegen AChR nachweisen und die Patienten sprechen nicht auf eine immunsuppressive Therapie an. Ein Teil der Patienten läßt sich mit Azetylcholinesterase-Inhibitoren (AChE-Inhibitoren) befriedigend behandeln ³⁵. Oft ist diese Therapie jedoch nicht oder nicht dauerhaft erfolgreich. Alternativ kann eine Behandlung mit 3,4-Diaminopyridin versucht werden ¹¹⁰. In Einzelfällen kann, nach genauer Charakterisierung des zugrundeliegenden Defektes, das Antiarrhythmikum Chinidin eine therapeutische Alternative darstellen ⁶¹.



Abbildung 2: Zwei an CMS erkrankte Geschwister, die eine typische Ptose zeigen.

1.2.3 Klinische Besonderheiten einzelner CMS-Formen

Anhand des klinischen Bildes auf den zugrundeliegenden molekulargenetischen Defekt zu schließen, dürfte bei der Heterogenität des Krankheitsbildes und der Vielzahl der möglichen Mutationen im allgemeinen schwierig sein. Es gibt einzelne klinische Besonderheiten, die Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden molekularen Defekt zulassen.

Ein repetitives Muskelsummenaktionspotential als Antwort auf einen einzelnen Nervenstimulus spricht für eine Defizienz der AChE oder für das Slow-Channel-CMS (SCCMS) ^{28, 47, 49, 86}.

Ansprechen auf AChE-Inhibitoren: die Mehrzahl der Patienten mit postsynaptischen CMS, denen eine Mutation des AChRs zugrunde liegt, die zu einem Mangel an adulten Rezeptoren an der neuromuskulären Synapse führt (AChR-Defizienz), spricht gut auf eine Behandlung mit AChE-Inhibitoren an. Ein Nichtansprechen auf AChE-Inhibitoren in Verbindung mit verzögerter Pupillenreaktion spricht für eine Defizienz der AChE ^{67, 70, 102}.

Schwäche der Finger- und Handextensoren: eine ausgeprägte selektive Schwäche der Finger- und Handextensoren sowie der zervikalen Muskeln wurde als typisch für ein SCCMS beschrieben ^{28, 45}.

Kongenitales Lambert-Eaton-Syndrom: das erste evozierte Muskelsummenaktionspotential beim Lambert-Eaton-Myasthenen Syndrom hat eine niedrige Amplitude, steigert sich aber um >100% bei hohen Stimulationsfrequenzen ⁸.

Bei CMS mit episodischer Apnoe finden sich rekurrende apnoische Episoden, die spontan entstehen oder durch Fieber, Erbrechen oder Aufregung provoziert werden ^{74, 107}. Zwischen den Attacken können myasthenische Syndrome vollkommen fehlen oder nur in leichter Form vorhanden sein. Ein EMG-Dekrement wird nicht in ruhendem Muskel gefunden, sondern erscheint nach ein paar Minuten der Stimulation bei 10Hz.

Plektin-Defizienz: Die CMS-Unterform, die mit einer Plektin-Defizienz assoziiert ist, wird bei Patienten mit autosomal-rezessiv vererbter Epidermolysis Bullosa Simplex beobachtet ⁹. CMS mit Plektin-Defizienz beginnt in der Kindheit mit Ptose und Ophthalmoparese. Später zeigt sich ein Befall von fazialen, Extremitäten-, und Rumpfmuskeln sowie ein beeinträchtigter Gang und Dysphonie ⁹.

Ethnische Abstammung: eine spezielle Mutation der ϵ -Untereinheit des AChR (ϵ 1267delG) wird oft bei südosteuropäischen CMS-Patienten gefunden, insbesondere bei Roma ^{1, 2, 3, 5, 71, 72}.

Erbgang: ein autosomal-dominanter Erbgang ist ein Hinweis auf ein Slow-Channel-CMS (SCCMS) ^{29, 86, 121}.

Bei den anderen CMS-Formen ist der Phänotyp in der Regel nicht so aussagekräftig im Hinblick auf die Frage, ob der Defekt präsynaptisch, synaptisch oder postsynaptisch lokalisiert ist. In diesen Fällen sind spezielle elektrophysiologische und molekulargenetische Untersuchungen besonders wichtig, um die Ätiologie und/oder genetische Basis der Krankheit zu charakterisieren.

1.2.4 Therapiemöglichkeiten der CMS

1.2.4.1 Allgemeines

Für den einzelnen Patienten ist die genaue Klassifizierung eines kongenitalen myasthenen Syndroms von großer klinischer Bedeutung. Je nach Ursache des Defektes ergeben sich unterschiedliche Konsequenzen hinsichtlich Verlauf, Prognose, Vererbbarkeit und Behandlungsmöglichkeiten ^{35, 47}. Die Erforschung der genauen genetischen Ursachen ist folglich nicht nur von wissenschaftlichem, sondern auch von therapeutischem Interesse. Verschiedene Medikamente stehen zur Behandlung von Kongenitalen Myasthenen Syndromen zur Verfügung.

1.2.4.2 Azetylcholinesterase-Inhibitoren und 3,4-Diaminopyridin

Zum einen stehen bei der Behandlung von CMS Azetylcholinesterase-Inhibitoren (AChE-Inhibitoren) zur Verfügung, die als Standardtherapeutikum gelten ³⁵, zum anderen 3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP) ¹¹¹. Beide Medikamente erhöhen auf unterschiedlichen Wegen die effektive Konzentration von Azetylcholin im synaptischen Spalt der neuromuskulären Endplatte und verbessern so die Aktivierung des AChR und die Transmission an der neuromuskulären Endplatte. Im Gegensatz zu AChE-Inhibitoren wirkt 3,4-DAP nicht an der post- sondern an der präsynaptischen Membran. 3,4-DAP kann in Kombination mit AChE-Inhibitoren gegeben werden ¹¹¹.

Die Mehrzahl der Patienten mit postsynaptischen CMS, denen eine Mutation des AChR zugrunde liegt, die zu einem Mangel an adulten Rezeptoren an der neuromuskulären Synapse führt (AChR-Defizienz), spricht gut auf eine Behandlung mit AChE-Inhibitoren (Mestinon^R) an. Auch bei Patienten mit Fast-Channel-Syndrom ist eine kombinierte Behandlung mit AChE-Inhibitoren und 3,4-DAP oft hilfreich.

Gerade bei den präsynaptischen CMS, bei denen es zu krisenhaften Verschlimmerungen mit respiratorischer Insuffizienz im Säuglingsalter kommen kann, ist eine Therapie mit AChE-Inhibitoren effektiv und lebensnotwendig.

Zu beachten ist, dass diese Therapie jedoch nicht bei allen CMS-Patienten gleich gut anschlägt oder nicht dauerhaft erfolgreich ist.

1.2.4.3 Chinidin

Das Slow-Channel-Syndrom, das refraktär ist gegen die Standardtherapie mit AChE-Inhibitoren und 3,4-DAP, ist unter anderem gekennzeichnet durch ein erhöhtes Ansprechen des AChR auf seinen Transmitter, wodurch sich die Öffnungszeit des Kanals pathologisch verlängert. Deshalb kann es durch eine erhöhte Azetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt unter der Therapie mit AChE-Inhibitoren und 3,4-Diaminopyridin sogar zu einer dramatischen Verschlimmerung der Symptomatik kommen. In Einzelfällen – erst nach genauer Charakterisierung des zugrundeliegenden Defektes – kann das bei Herzrhythmusstörungen verwendete Antiarrhythmikum Chinidin eine neue therapeutische Alternative darstellen ⁶¹.

1.2.4.4 Besonderheiten

Ähnlich wie bei dem Slow-Channel-Syndrom, wird die synaptische CMS-Unterform in Form des AChE-Mangels durch AChE-Inhibitoren und 3,4-Diaminopyridin unter Umständen verschlimmert ³⁵. Dies ist bedingt durch die ohnehin schon zu hohe Konzentration von Azetylcholin im synaptischen Spalt, die durch den verminderten Abbau bei AChE-Mangel entsteht. Während bei den anderen CMS-Formen Therapiemöglichkeiten bestehen, stellt der AChE-Mangel zur Zeit eine Form dar, bei der es derzeit noch keine effektive Therapie gibt.

Es ist wichtig, sich bewusst zu machen, dass die differentialdiagnostische Abgrenzung zur autoimmunen Myasthenia Gravis wichtig ist, da CMS-Patienten nicht auf eine immunsuppressive Therapie oder Plasmaaustausch oder Thymektomie ansprechen ⁷. Solche invasiven und mit Nebenwirkungen behafteten Maßnahmen sind also nutzlos und sollten den Patienten möglichst erspart bleiben.

Wie bei der autoimmunen Myasthenia Gravis ist ferner zu beachten, dass CMS-Patienten bei Narkosen vermehrt gefährdet sind im Hinblick auf respiratorisches Versagen und deshalb der Einsatz von Muskelrelaxantien kritisch zu überdenken ist. Kontraindiziert sind ferner Medikamente und Substanzen, die die neuromuskuläre Erregungsübertragung beeinflussen können, wie Organophosphate, bestimmte Antibiotika (Aminoglykoside) und Antikonvulsiva ³⁵.

1.3 Klassifikation

Allen Formen der CMS gemeinsam ist eine gestörte neuromuskuläre Erregungsübertragung aufgrund eines hereditären Defektes im Bereich der neuromuskulären Endplatte. Die Differenzierung von CMS erfolgte in den vergangenen Jahren durch elektrophysiologische Untersuchungen am Nerv-Muskelpräparat, meist gewonnen aus einer Interkostalisbiopsie. Durch ergänzende morphologische, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen gelang es, einzelne kongenitale myasthene Syndrome weiter zu differenzieren¹⁰⁷, Rückschlüsse auf die vermutliche Pathogenese einzelner Defekte zu ziehen und präsynaptische, synaptische und postsynaptische Syndrome zu unterscheiden^{42, 46, 47}. Diese Einteilung ist nicht als endgültig anzusehen, einige der aufgeführten CMS sind bislang nicht vollständig charakterisiert, neue Formen werden möglicherweise hinzukommen. Es konnte gezeigt werden, dass dem Großteil von CMS postsynaptische Störungen zugrunde liegen.

In der klinischen Praxis hat sich die Einteilung gemäß der ENMC-Konsensus-Konferenzen (European Neuromuscular Centers) von 1995⁸² und 1999³⁶ durchgesetzt, die klinisch einfach erfassbare Merkmale wie Vererbung und klinische Symptomatik berücksichtigt.

Zu den präsynaptischen CMS-Formen zählen CMS mit einem Defekt der Azetylcholin-Resyntese /Verpackung^{62, 74, 77, 107, 117}, CMS mit Vesikelmangel und reduzierter Quantenfreisetzung^{50, 92, 127, 130} und das kongenitale Lambert-Eaton-Syndrom⁸. Die bisher einzige synaptische Form ist die Defizienz der AChE^{31, 68, 98, 99, 102}. Postsynaptische CMS werden unterteilt in CMS mit primären kinetischen Veränderungen des Rezeptors mit/ohne AChR-Defizienz, wozu das Slow-Channel-Syndrom^{27, 28, 56, 109} und Fast-Channel-Syndrom^{41, 109, 118} gehören, und CMS mit primärer AChR-Defizienz mit/ohne geringen kinetische Veränderungen^{14, 42, 46, 47} sowie die Plektin-Defizienz⁹.

Die wichtigsten klinischen und diagnostischen Besonderheiten der verschiedenen CMS-Formen soll anhand der folgenden Tabelle dargestellt werden. Die einzelnen Punkte werden im einzelnen noch näher erläutert.

Tabelle 1: Einteilung der CMS

CMS-Unterform	Anamnese/ Klinik	EMG-Befunde	Therapie	Zusatzuntersuchungen
PRÄSYNAPTISCH				
a) CMS mit einem Defekt der ACh-Resynthese /Verpackung (CMS-EA); AR/S * Mutationen im <i>CHAT</i> -Gen (Cholinazetyltransferase) ^{21, 62, 74, 76, 77, 107, 117}	in Kindheit krisenhafte Verschlechterungen, u.U. mit respiratorischer Insuffizienz (auch CMS mit episodischer Apnoe genannt, CMS-EA); Tendenz zur Besserung	Dekrement nach 10Hz-Stimulation des motorischen Nerven für 5 min (oder nach mehrminütiger Anstrengung vor der 2Hz-Stimulation)	AChE-Inhibitoren: gutes Ansprechen, lebenswichtig im Säuglingsalter	<u>LM und EM:</u> unauffällige Endplattenmorphologie <u>Elektrophysiologie:</u> abnorme Verminderung des EPP nach Stimulation
b) CMS mit Vesikelmangel und reduzierter Quantenfreisetzung ^{50, 91, 127, 130} ; AR/S	typische Klinik mit Beginn in Kindheit; zudem zyanotische Anfälle; bei Erwachsenen milde Form	Dekrement bei 2-3Hz-Stimulation	AChE-Inhibitoren: Besserung der Symptome	<u>EM:</u> synaptische Vesikeldichte an der neuromuskulären Endplatte bis zu 80% verringert
c) Kongenitales Lambert-Eaton-Syndrom ⁸ ; AR/S	muskuläre Hypotonie und Hyporeflexie nach der Geburt; keine Schwäche der fazialen, bulbären und okulären Muskulatur; keine Ptose	Dekrement bei 2-3Hz-Stimulation; Inkrement bei Stimulation mit 20-50 Hz (MSAP niedriger Amplitude, das sich um mehr als >100% steigert bei Stimulation > 10Hz)	AChE-Inhibitoren: evtl. Besserung der Symptome	<u>LM und EM:</u> unauffällige Endplattenmorphologie <u>Mikroelektrophysiologie</u> <u>Untersuchung:</u> gesteigerte quantale Freisetzung Stimulation >10Hz
SYNAPTISCH				
Defizienz der Azetylcholinesterase; AR/S * Mutationen im <i>COLQ</i> -Gen ^{22, 31, 38, 39, 67, 68, 70, 95, 99, 102}	oft schwere klinische Symptome; Neigung zu Lordose und Skoliose; verlangsamte Pupillenreflexe	Dekrement bei 2-3Hz-Stimulation; Repetitives MSAP in ruhendem Muskel bei Einzelfaser-Stimulation	AChE-Inhibitoren: ohne Effekt oder gar Verschlimmerung; keine effektive Therapie bekannt	<u>EM:</u> AChE nicht vorhanden oder stark vermindert <u>Elektrophysiologie:</u> Verlängerung von MEPP und MEPC
POSTSYNAPTISCH				
a) CMS mit primären kinetischen Veränderungen des Rezeptors mit/ohne AChR-Defizienz				
• Slow-Channel Syndrom (SCCMS); AD/S * Mutationen in den Genen der AChR- Untereinheiten (<i>CHRNE, CHRNA, CHRNB, CHRND</i>) ^{27, 29, 40, 45, 56, 86, 104, 109}	Symptombeginn teilweise erst im Erwachsenenalter; typischer Befall von zervikalen Muskeln und Fingerextensoren; Symptomatik variiert von mild zu schwer	repetitives MSAP in ruhendem Muskel bei Einzelfaser-Stimulation; Dekrement bei 2-3-Hz-Stimulation	AChE-Inhibitoren/ 3,4-DAP: beides kann Symptomatik verschlechtern! alternativ in bestimmten Fällen Chinidin	<u>LM und EM:</u> Zeichen der Degeneration; sekundär verminderte Zahl von AChR <u>Elektrophysiologie:</u> verlängerte MEPC; verlängerte Kanalöffnungszeit

Fortsetzung von Tabelle 1: Einteilung der CMS

<ul style="list-style-type: none"> • Fast-Channel Syndrom (FCCMS); AR/S * Mutationen in den Genen der AChR- Untereinheiten (<i>CHRNE</i>, <i>CHRNA</i>, <i>CHRNB</i>, <i>CHRND</i>)^{41, 108, 118} 	milde Schwäche von okulären, zervikalen und Extremitätenmusk. seit der Kindheit; Apnoe-Anfälle mit fluktuierender Ptose; Symptomatik variiert von mild zu schwer	Dekrement bei 2-3Hz-Stimulation	AChE-Inhibitoren: mäßiges bis gutes Ansprechen	<u>Elektrophysiologie:</u> verkürzte MEPC, verkürzte Kanalöffnungszeit
b) CMS mit primärer AChR-Defizienz mit/ohne geringen kinetischen Veränderungen, AR/S * Mutationen in den Genen der AChR- Untereinheiten (<i>CHRNE</i>, <i>CHRNA</i>, <i>CHRNB</i>, <i>CHRND</i>)^{1, 5, 14, 37, 42, 46, 49} 	Ermüdbarkeit und Schwäche seit Geburt oder früher Kindheit mit Beteiligung von okulären, bulbären, Rumpf- und Extremitätenmuskeln; Symptomatik variiert von mild zu schwer	Dekrement bei 2-3Hz-Stimulation	AChE-Inhibitoren: guter Effekt; alternativ und additiv evtl. 3,4-DAP	<u>LM:</u> reduzierte Anzahl von AChR <u>Elektrophysiologie:</u> vermindertes MEPP und MEPC
c) CMS mit Rapsyn-Defizienz, AR * Mutationen im <i>RAPSN</i>-Gen^{11, 34, 103, 106} 	Muskelschwäche seit Geburt; Beteiligung der Atemmuskulatur; Symptomatik variiert von mild zu schwer	Dekrement bei 2-3Hz-Stimulation	AChE-Inhibitoren: gutes Ansprechen; zusätzlich evtl. 3,4-DAP	<u>LM und EM:</u> Nachweis einer AChR- und Rapsyn-Defizienz
d) CMS mit Plektin-Defizienz, AR ⁹	assoziiert mit Epidermolysis bullosa simplex		AChE-Inhibitoren: ohne Effekt; Gutes Ansprechen auf 3,4-DAP	<u>LM und EM:</u> degenerative Veränderungen Plektinmangel im Muskel und in der Haut

* = molekulargenetisch definiert; AR= autosomal rezessiv; AD = autosomal dominant; S = sporadisch; LM = Lichtmikroskop, EM = Elektronenmikroskop; Hz= Hertz; 3,4-DAP = Diaminopyridin; MSAP = Muskel-Summenaktionspotential; MEPP = Miniatur-Endplattenpotential; MEPC= Miniatur-Endplatten-Strom;

Neben den genannten CMS-Formen gibt es einige partiell charakterisierte CMS-Formen, beispielsweise die Familiäre Gliedergürtelmyasthenie⁸¹ und das Myasthene Syndrom mit Gesichtsschädeldeformitäten^{55, 115}, die einige Befunde zeigen, die typisch für CMS sind (Muskelschwäche, Dekrement, Ansprechen auf AChE-Inhibitoren), allerdings in ihrer Pathophysiologie noch nicht genau verstanden werden.

1.4 Diagnostische Kriterien

1.4.1 Allgemeines

Die Untersuchung von Kongenitalen Myasthenen Syndromen basiert auf klinischen Daten, morphologischen Studien, der Schätzung der Anzahl und Dichte der AChR pro neuromuskulärer Synapse, *in vitro* elektrophysiologischen Untersuchungen von Muskelbiopsien und, wenn möglich, molekulargenetischen Analysen der vererbten Syndrome³⁵. Zu beachten ist, dass einige Untersuchungen weltweit nur an wenigen

medizinischen Instituten durchgeführt werden können, die über die entsprechenden elektrophysiologischen und morphologischen Methoden verfügen.

Die klinische Untersuchung muss detaillierte EMG-Befunde und serologische Befunde einschließen. Die morphologische Untersuchung schließt die genaue Untersuchung der Feinstruktur der Endplatte ein. Zur *in vitro* elektrophysiologischen Untersuchung benötigt man ein intaktes Muskelstück vom Ursprung bis zum Ansatz. Die Interkostalmuskulatur ist dafür besonders gut geeignet. Die *in vitro* elektrophysiologischen Untersuchungen sollen über die Parameter der quantalen Freisetzung, das postsynaptische Ansprechen auf Transmitter-Quanta und die kinetischen Eigenschaften des Kanals des AChR Auskunft geben.

1.4.2 Anamnese und körperliche Untersuchung

Die klinische Anamnese offenbart typischerweise okuläre, bulbäre und/oder respiratorische Symptome, die in der Neonatalperiode durch Schreien und Muskelbewegungen verschlimmert werden. In der Kindheit kommen fluktuierende Lähmungen der Augenmuskulatur, eine abnorme Ermüdbarkeit bei Belastung, eine normale oder verspätete motorische Entwicklung, gelegentlich eine Progression der Symptome in der Adoleszenz oder im Erwachsenenalter und negative Tests auf Anti-AChR-Antikörper hinzu. Einige Syndrome, wie zum Beispiel das Slow-Channel-Syndrom und die familiäre Gliedergürtel-Myasthenie, können sich auch erst in der zweiten oder dritten Lebensdekade manifestieren⁸¹. Bei CMS mit einem Defekt der ACh-Resynthese /Verpackung können die Symptome in der Kindheit episodisch mit schwerer muskulärer Schwäche und krisenhaften Verschlechterungen auftreten, unter Umständen mit respiratorischer Insuffizienz^{35, 127}. Im weiteren Verlauf zeigt sich eine Tendenz zur Besserung. Eine positive Familienanamnese unterstützt die Diagnose CMS. Eine negative Familienanamnese schließt allerdings eine autosomal-rezessive Vererbung, ein inkomplett penetrantes autosomal-dominantes Gen bei einem Elternteil oder eine neue Mutation nicht aus.

Bei der körperlichen Untersuchung ist der wichtigste Hinweis auf eine neuromuskuläre Störung der Transmission die zunehmende tageszeit- und belastungsabhängige Muskelschwäche. Diese kann durch Beobachten einer zunehmenden Ptose bei Blick nach oben, Zeitmessung bei Armabduktion und Zählen der Kniebeugen, die ein Patient durchzuführen vermag, dokumentiert und objektiviert werden. Patienten mit starker Beteiligung der Rumpfmuskulatur entwickeln schnell eine Skoliose, wobei sie im Stehen ihr Gewicht von einem Fuß auf den anderen verlagern. Sowohl bei älteren Patienten mit einem Defekt der AChE an der neuromuskulären Endplatte als auch bei Patienten, die unter einem Slow-Channel-Syndrom leiden, ist eine ausgeprägte

Schwäche der zervikalen und der axial-trunkalen Muskeln sowie der Muskeln der Fingerextensoren möglich³⁵. Bei Patienten mit einem Defekt der AChE an der Endplatte ist zudem der Pupillenreflex verlangsamt³⁵. Die Beteiligung der Augenmuskulatur kann in einigen Fällen von Defekten der AChE, dem Slow-Channel-Syndrom und der Familiären Gliedergürtel-Myasthenie völlig fehlen oder nur mild ausgeprägt sein.

1.4.3 Tensilontest

Diagnostisch hinweisend auf eine Störung der Transmission an der neuromuskulären Endplatte ist ein positiver Tensilontest³⁵. Tensilon® (Edrophoniumchlorid) ist ein in geringer Endkonzentration vorhandener Azetylcholinesterase-Inhibitor. Nach Injektion von 2-10 mg (0,2-1,0ml) Tensilon beobachtet man bei Myastheniekranken bereits nach weniger als einer Minute eine deutliche, allerdings auch nur für einige Minuten anhaltende Besserung der Symptome, wie zum Beispiel Besserung von Ptose oder Kraftzunahme beim Faustschluss. Für die Objektivierung des Tests ist es wichtig, eine quantifizierbare Messgröße für den individuellen Patienten zu ermitteln, deren Messung vor und nach Tensiloninjektion erst die Beurteilung des Tests ermöglicht (z.B. mimische Bewegungen, Ausmaß der Schielstellung, Vorhaltezeit der horizontal gehaltenen Arme im Stehen, Haltezeit des mit 45 Grad von der Unterlage gehobenen Kopfes im Liegen). Wenn es zu erheblichen vegetativen Nebenwirkungen kommt (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, starkes Schwitzen, verstärkte Bronchial- oder Speichelsekretion, Bradykardie), werden 0.5 bis 1 mg Atropin intravenös nachinjiziert (eine Ampulle Atropin sollte deshalb bereitstehen)⁵².

Der Test fällt negativ aus bei Patienten mit einer Defizienz der AChE an der neuromuskulären Endplatte. Der Test ist unregelmäßig positiv bei CMS mit primären kinetischen Veränderungen des Rezeptors mit/ohne AChR-Defizienz (Slow-und Fast-Channel-Syndrom). Ein negativer Edrophonium-Test schließt die Diagnose CMS also nicht aus. Ein positiver Test kann die Diagnose CMS unterstützen, differenziert sie aber nicht von der erworbenen autoimmunen Myasthenia Gravis^{6,7,35}.

1.4.4 Laborparameter

Ein positiver Test auf Anti-AChR-Antikörper ist normalerweise ein Ausschlusskriterium für die Diagnose eines kongenitalen myasthenen Syndroms. Ein negativer Test spricht bei Vorliegen myasthener Symptome nicht zwingend für eine CMS, weil viele junge Patienten mit autoimmuner Myasthenia Gravis seronegativ sind³⁵. Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der Patienten mit Myasthenia Gravis,

die keine AChR-Antikörper haben, MuSK-Antikörper haben (Muskel-Spezifische Kinase) ⁶⁶. Im Fall von CMS sollten solche MuSK-Antikörper ausgeschlossen werden. Die Creatinkinase (CK) liegt im Normbereich und ist im Gegensatz zu Muskeldystrophien nicht erhöht.

Die Anwesenheit von Immunablagerungen (IgG und Komplement) an der neuromuskulären Endplatte spricht für die seronegative autoimmune Myasthenia Gravis. Ein günstiges Ansprechen auf Plasmapherese ist ebenfalls als Hinweis auf eine autoimmune Myasthenia Gravis interpretiert worden ³⁵.

1.4.5 Muskelbiopsie und Histologie

1.4.5.1 Allgemeines

Zur weiteren Charakterisierung der CMS-Patienten dienen morphologische Untersuchungen. Dazu zählen neben histochemischen Routineuntersuchungen die zytochemische und immunzytochemische Lokalisierung der AChE, der Azetylcholinrezeptoren inklusive seiner Untereinheiten, von IgG, C3, C9 und dem Membranattacken-Komplex an der neuromuskulären Endplatte ³⁵. Weiterhin gehört dazu die Schätzung der Größe, der Form und des zweidimensionalen Profils der AChE-reaktiven Endplatten oder der Endplattenregionen. Möchte man das Muskelgewebe noch näher untersuchen, so stehen die quantitative Elektronen-Mikroskopie und Elektronen-Zytochemie zur Verfügung. Die Anzahl der AChR kann mit Hilfe von mit I¹²⁵-markiertem α -Bungarotoxin gemessen werden.

1.4.5.2 Morphologische Befunde

Bei zwei der präsynaptischen CMS-Unterformen, nämlich bei CMS mit einem Defekt der ACh-Resynthese /Verpackung ^{38, 40, 70, 91} und beim Kongenitalen Lambert-Eaton-Syndrom ⁸, sowie beim postsynaptischen Fast-Channel-Syndrom ³⁵ zeigen die Muskelbiopsien keine histochemischen Abnormalitäten. Sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch sind die Endplatten unauffällig. Es finden sich ferner weder Immunablagerungen (IgG oder Komplement) an der neuromuskulären Endplatte noch Auffälligkeiten am AChR. Auch die Immunreaktivität für die Cholin-Azetyltransferase ist normal.

Während sich die Größe der Nervenendigungen, die Länge der präsynaptischen Membran und die postsynaptische Region bei CMS mit Vesikelmangel und reduzierter Quantenfreisetzung normal darstellen, zeigt sich das morphologische Korrelat im Elektronenmikroskop anhand einer Verringerung der synaptischen Vesikeldichte, die an der neuromuskulären Endplatte bis zu 80% verringert ist.

Bei der Defizienz der AChE zeigen konventionelle histologische Untersuchungen des Muskels keine Auffälligkeiten. Histochemisch ist das Fehlen der AChE durch poly- oder monoklonale Antikörper nachweisbar. Die quantitative Elektronenmikroskopie zeigt einen signifikanten Abfall in der Größe der Nervenendigungen und der Länge der präsynaptischen Membran. Viele präsynaptische Membranen werden durch Schwann-Zellen bedeckt, wodurch sich die Oberfläche reduziert, die für die Freisetzung von Azetylcholin zur Verfügung steht. An einigen neuromuskulären Endplatten zeigt sich eine Degeneration der Einfaltungen der postsynaptischen Membran und der Muskelfaserregionen. Die Verteilung der AChR ist reduziert oder normal³³.

Degenerative Zeichen zeigen sich schon lichtmikroskopisch bei den beiden postsynaptischen CMS-Unterformen Slow-Channel-Syndrom und Plektin-Defizienz^{9,35}.

Die CMS mit primärer AChR-Defizienz zeigt charakteristischerweise eine verminderte Dichte von AChR und reduzierte Anzahl von AChR an der Endplatte der Patienten. Dies zeigt sich in der Fluoreszenz-Mikroskopie mit Rhodamin-markiertem α -Bungarotoxin und in der Elektronen-Mikroskopie mit Peroxidase-markierten α -Bungarotoxin, wo die Anzahl der Iod¹²⁵-Bungarotoxinbindungsstellen per Endplatte deutlich verringert ist. Das Elektronenmikroskop zeigt, dass die strukturelle Integrität der meisten Endplatten gut erhalten ist.

Der AChR-Index (definiert als Verhältnis von Länge der postsynaptischen Membran, die auf AChR reagiert, zur Länge des primären synaptischen Spaltes) beträgt nur etwa ein Viertel des Normalen³⁵.

1.4.6 Elektrophysiologische Untersuchungen

Zur genaueren Untersuchung von CMS-Patienten dienen die repetitive Stimulation, die zu den Routineuntersuchungen zählt, und spezielle seltener verwendete mikroelektrophysiologische Untersuchungen, mit deren Hilfe die Einzelkanalkinetik näher untersucht werden kann.

1.4.6.1 Repetitive Stimulation

Die Diagnose CMS wird durch ein Dekrement bei niedrigfrequenter Stimulation (2 Hertz) anhand mindestens eines Muskels oder durch einen abnormalen Jitter und Blockierung im Einzelfaser-EMG bestätigt. Unter einem Dekrement versteht man eine zunehmende Verringerung des durch elektrische Nervenreizung von 2-3 Hertz ausgelösten Muskelaktionspotentials³⁵.

Ein Dekrement findet sich typischerweise bei CMS mit primärer AChR-Defizienz und beim Fast-Channel-Syndrom. Bei anderen CMS-Formen kann das Dekrement fehlen.

So ist es möglich, dass das Dekrement im ruhenden Muskel von CMS-Patienten mit einem Defekt der Azetylcholin-Resynthese/Verpackung nicht nachweisbar ist. In solchen Fällen kann das Dekrement durch prolongierte 10-Hertz-Stimulation oder durch aktive Muskelbewegung für einige Minuten vor der 2-Hertz-Stimulation provoziert werden.

Obwohl sich in der Routine-Elektrophysiologie das myasthenische Dekrement im Muskel, der von der Muskelschwäche betroffen ist, zeigen sollte, findet man es nicht in allen Fällen. Bei solch negativen Fällen zeigt ein Einzelfaser-EMG (EFEMG) häufig den Defekt an der neuromuskulären Übertragung.

Bei dem Einzelfaser-EMG (EFEMG) handelt es sich um ein EMG unter Verwendung einer Nadelelektrode, mit der bei Untersuchung eines normalen Muskels die elektrische Aktivität von bis zu drei Muskelfasern als Einzelspikes abgeleitet werden kann. Dabei wird die elektrische Aktivität einzelner Muskelfasern extrazellulär abgeleitet.

Mit Hilfe des EFEMGs sind Aussagen über den sogenannten Jitter, Blockierungen der Erregungsübertragung sowie über die Muskelfaserdichte innerhalb einer motorischen Einheit möglich. Erhöhte Jitterwerte weisen auf eine Störung der Impulsübertragung hin.

Ein repetitives Muskelsummenaktionspotential als Antwort auf einen einzelnen Einzelfaser-Stimulus wird bei Patienten mit Defizienz der Azetylcholinesterase³⁵ und beim klassischen Slow-Channel-Syndrom gefunden, ferner bei Patienten, die AChE-Hemmer einnehmen oder nach Vergiftung mit Organophosphaten.

Elektromyographische Untersuchungen sollten unter einheitlichen und spezifischen Kriterien durchgeführt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine repetitive Stimulation von zwei distalen und zwei proximalen Muskeln bei einer Frequenz von 2-3Hz erfolgen sollte. Bei Patienten mit negativem Resultat für ein Dekrement wird eine Einzelfasermiographie durchgeführt, um einen Block der neuromuskulären Transmission zu entdecken. Letztlich ist der EMG-Befund bei CMS-Patienten entweder unauffällig, oder es zeigen sich leichtere myopathische Veränderungen. Ausgeprägte myopathische Veränderungen sind selten. Neurogene Veränderungen sprechen gegen ein CMS³⁵.

1.4.6.2 Mikroelektrophysiologische Untersuchungen am Patienten

Neben der Untersuchung des Skelettmuskels mit Hilfe des EMG sind auch *in vitro* elektrophysiologische Untersuchungen wichtig, um die Kongenitalen Myasthenen Syndrome weiter zu differenzieren³⁵. Die pathogenetische Differenzierung erfolgt an einem intakten Nerv-Muskelpräparat, was die Entnahme einer Interkostalis-

muskelbiopsie erfordert. Dazu ist bei Kindern eine Vollnarkose nötig, die im übrigen bei Patienten mit myasthenen Syndromen nicht ohne Risiko ist.

Bei Eintreffen eines Nervenimpulses an der neuromuskulären Endplatte wird Acetylcholin in Quanten freigesetzt. Ein Stromquant entspricht dem Acetylcholin Gehalt eines Vesikels, der die postsynaptischen Rezeptoren durch Diffusion erreicht und in der Folge Ionenkanäle öffnet. Ein Vesikel enthält dabei einige 10.000 Acetylcholinmoleküle. So entsteht ein kurzer synaptischer Strom durch die postsynaptische Membran und ein postsynaptisches Potential. Dies erzeugt wiederum ein Aktionspotential, das sich über die Muskelmembran verteilt und über eine intrazelluläre Kalziummobilisierung eine Kontraktion hervorruft. Gemessen werden können die präsynaptischen Parameter der evozierten quantalen Freisetzung, nämlich die Anzahl der Acetylcholin-Quanta, die durch einen Nervenimpuls freigesetzt werden, die freisetzbaren Acetylcholin-Quanta und die Wahrscheinlichkeit der quantalen Freisetzung. Die im Bereich der postsynaptischen Membran auftretenden Potentiale und Stromflüsse sind das Miniatur-Endplatten-Potential (MEPP), der Miniatur-Endplatten-Strom (MEPC), das Endplattenpotential (EPP) und der Endplattenstrom (EPC). Durch die modernen Möglichkeiten der Geräusch-Analyse und Patch-Clamp-Messungen ist es möglich, die Kinetik von Einzelkanälen näher zu untersuchen ^{35, 44, 84}.

Bei der AChE-Defizienz sind die synaptischen Ströme aufgrund des verminderten Abbaus von Acetylcholin verlängert. Entsprechend sind die Miniatur-Endplatten-Potentiale (MEPPs) und die Miniatur-Endplatten-Ströme (MEPCs) verlängert und evozieren repetitive Muskelfaser-Aktionspotentiale. Prostigmin hat keinen Einfluss auf die gemessenen Werte.

Die beiden postsynaptischen CMS-Unterformen mit primären kinetischen Veränderungen des Acetylcholinrezeptors (Slow-Channel-Syndrom und Fast-Channel-Syndrom) unterscheiden sich konträr hinsichtlich dem Ansprechen der Rezeptoren auf den Transmitter Acetylcholin (Affinität), woraus sich gegensätzliche Veränderungen ergeben, was die Endplattenströme- und -potentiale sowie die Öffnungszeiten des Rezeptorkanals angeht: die verlängerten Abbau-Phasen (Decay-Phasen) im Endplattenpotential (EPP) und Miniatur-Endplatten-Potential (MEPP), die durch Zusatz von Prostigmin weiter verlängert werden können, stellen zusammen mit einer verlängerten Kanalöffnungszeit und normaler Leitfähigkeit die hauptsächlichen Charakteristika für das klassische Slow-Channel-Syndrom dar. Dies steht im Gegensatz zum großen MEPP und EPP mit kurzer Abbau-Zeit, erhöhter Leitfähigkeit und verkürzter Öffnungszeit, wie es beim Fast-Channel-Syndrom gesehen wird ³⁵.

Tabelle 2: Kinetische Abnormalitäten des Azetylcholinrezeptors

	Slow-Channel-Syndrome (SCCMS)	Fast-Channel-Syndrome (FCCMS)
Mechanismen	erhöhte Affinität des AChR für ACh	verminderte Affinität des AChR für ACh
Endplattenströme (MEPC)	Verlängerte Abbau-Phasen von MEPP und EPP (langsamer Abbau) verlängerte Endplattenströme	verkürzte Abbau-Phasen von MEPP und EPP (schneller Abbau) verkürzte Endplattenströme
Kanalöffnungszeit	verlängerte Öffnungszeit verlängerte Aktiveringsepisoden des AChR-Kanal	verkürzte Öffnungszeit (verminderte Rate von Kanalöffnungen)
Kanal im offenen Zustand	stabil	instabil
Kanal im geschlossenen Zustand	instabil	stabil
MEPP-Amplitude	MEPP und MEPC mit verminderter Amplitude (passend zu einer Endplatten-AChR-Defizienz)	MEPP und MEPC mit verminderter Amplitude (MEPP-Amplitude beträgt nur etwa 14% des Normalen)
Kanalleitfähigkeit	normale Leitfähigkeit	erhöhte Leitfähigkeit

Bei der primären AChR-Defizienz zeigt sich eine verminderte Amplitude des Miniatur-Endplatten-Potentials (MEPP) und der Miniatur-Endplatten-Ströme (MEPC), was dem Grad der postsynaptischen AChR-Defizienz entspricht. Die quantale Freisetzung per Nervenimpuls ist oft vergrößert oder liegt über der Norm, wahrscheinlich als adaptive Antwort auf die verminderte postsynaptische Sensitivität. Einzelkanalaufnahmen an der Endplatte^{38, 130} sowie immunozytochemische Untersuchungen⁵⁰ enthüllen oft die Anwesenheit des fetalen AChR, der die γ - (γ -AChR) statt der adulten ϵ -Untereinheit enthält. Patch-Clamp-Aufnahmen der Endplatten des AChR zeigen Kanäle mit zwei verschiedenen Leitfähigkeiten.

1.4.7 Molekulargenetische Diagnostik

Seit 1994 brachte die molekulargenetische Analyse der CMS weiteren Einblick in die zugrundeliegenden Krankheitsmechanismen. Für einige Formen von CMS konnten die zugrundeliegenden genetischen Veränderungen identifiziert werden^{47, 100, 101}.

- Nachweis von Mutationen am Azetylcholinrezeptor (*CHRNA*-Gen und *CHRNB*-Gen auf Chromosom 17p12-13; *CHRNE*-Gen, *CHRND*-Gen und *CHRNG*-Gen auf Chromosom 2q32) und im Promotorbereich als Ursachen für postsynaptische CMS:

Der erste entscheidende Fortschritt in der molekularen Charakterisierung kongenitaler myasthener Syndrome war der Nachweis von pathogenen Mutationen des AChR^{22, 43, 97, 122}. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mutationen des AChR jeweils unterschiedliche Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptorproteins haben. Heterozygote Punktmutationen überwiegen innerhalb der transmembranen, die Kanalpore begrenzenden M2-Regionen verschiedener Untereinheiten und verursachen das Bild eines in der Regel autosomal-dominant vererbten Slow-Channel-Syndroms^{28, 99, 86, 104}. Es ist jedoch auch ein rezessiver Erbgang mit variabler Penetranz möglich⁶⁴. Bei wenigen Patienten wurden auch autosomal-rezessiv vererbte Punktmutationen identifiziert, die zu einer verkürzten Kanal-Öffnungszeit und damit zu einem Fast-Channel-Syndrom führen^{41, 108, 118}. Der Großteil aller autosomal rezessiv vererbten und sporadischen CMS scheint jedoch auf Mutationen vorwiegend der ϵ -Untereinheit des AChR zu beruhen, die über eine verminderte Expression des adulten AChR zum morphologischen Bild eines Mangels an AChR zu führen (AChR-Defizienz)^{1, 5, 17, 85}. Kompensatorisch findet sich in diesen Fällen eine Hochregulation der fetalen γ -Untereinheit, die die Funktion der ϵ -Untereinheit teilweise ersetzen kann.

Ein anderer Mechanismus für die Defizienz eines Genproduktes oder eine inadäquate Genexpression ist bedingt durch Mutationen von regulatorischen Elementen, wie es bei verschiedenen anderen genetischen Krankheiten gesehen wird^{24, 25, 107, 123}. Diese Region enthält zahlreiche Sequenzelemente, wie zum Beispiel sogenannte E-Boxen und N-Boxen, die für eine adäquate Genexpression entscheidend sind. N-Boxen sind verantwortlich für die synapsenspezifische Expression der Untereinheiten des AChR und anderer Gene, wie zum Beispiel die, die für Utrophin und die AChE kodieren⁵⁶. Dieses Promotorelement ist hochgradig konserviert zwischen verschiedenen Spezies, einschließlich dem Menschen^{4, 93}.

Wesentlich seltener sind rezessive Mutationen der α -, β - und δ -Untereinheiten des AChR's beschrieben worden, die Einfluss auf die Expression der jeweiligen Untereinheit haben^{35, 42, 46}.

- Mutationen des *COLQ*-Gens auf Chromosom 3p25 als Ursache des Fehlens von Azetylcholinesterase (AChE) an der Endplatte bei synaptischen CMS:

Die lichtmikroskopisch nachweisbare Defizienz der Azetylcholinesterase (AChE) gilt nach der AChR-Defizienz als häufige Ursache von CMS und wird autosomal-rezessiv vererbt^{31, 99, 102}. Dabei ist jedoch nicht der ubiquitär exprimierte globuläre Anteil des Enzyms betroffen, der die eigentliche katalytische Aktivität enthält, sondern der

muskelspezifisch exprimierte kollagenartige „Schwanz- bzw. Verankerungsteil“, der das Enzym in der Basallamina an der Endplatte verankert und durch ein separates Gen auf Chromosom 3p24 kodiert wird. Dieses Gen (*COLQ*) konnte vor kurzem auf Chromosom 3p24 lokalisiert werden und umfasst 17 Exons. Bis heute konnten 24 unterschiedliche rezessive Mutationen bei 23 unabhängigen Patienten im *COLQ*-Gen identifiziert werden, das auf Chromosom 3p24.2 lokalisiert ist und 17 Exons umfaßt ^{31, 68, 99, 102}.

- Mutationen des *CHAT*-Gens auf Chromosom 10q11.2 als Ursache eines präsynaptischen CMS

Vor wenigen Jahren ist es gelungen, die erste präsynaptische CMS-Form molekular-genetisch zu definieren. Im Gen kodierend für die Cholin-Azetyl-Transferase (*CHAT*) auf Chromosom 10q11.2 wurden bei fünf Patienten zehn rezessive Mutationen nachgewiesen ¹⁰⁷. Auffällig bei allen Patienten waren krisenhafte Verschlechterungen des Krankheitsbildes, die meist im Rahmen von fieberhaften Infekten auftraten und mit episodischen Apnoen einhergingen. Von den insgesamt fünf betroffenen Geschwistern dieser Patienten waren vier im Rahmen derartiger Ateminsuffizienzen verstorben ¹⁰⁷. Weitere Mutationen im *CHAT*-Gen konnten mittlerweile auch bei weiteren CMS-Patienten identifiziert werden ^{74, 77, 117}.

- Mutationen des *RAPSN*-Gens auf Chromosom 11p11.2-p11.1 als Ursache eines postsynaptischen CMS

Neben den schon bekannten Mutationen am Azetylcholinrezeptor konnte eine weitere postsynaptische CMS-Form molekular-genetisch beschrieben werden. Bei acht CMS-Patienten wurden 16 rezessive Mutationen in heterozygoter oder homozygoter Form auf dem Gen, das für das Protein Rapsyn kodiert, nachgewiesen (*RAPSN*) ^{33, 99}. Hinzu kommen Mutationen in der *RAPSN*-Promotorregion, die bei acht CMS-Patienten erst kürzlich aufgedeckt wurden ¹⁰⁶.

Rapsyn ist ein 43 kDa schweres Protein, das wichtig für die Zusammenlagerung der Untereinheiten des AChR an der postsynaptischen Membran ist und wird auf Chromosom 11p11.2-p11.1 kodiert ⁵¹. Die sogenannte „Coiled-coil-Domäne“ im C-terminalen Bereich von Rapsyn dient der Wechselwirkung mit AChR-Untereinheiten ^{11, 108}. Neben typischen myasthenen Symptomen zeigten die Patienten häufig eine Beteiligung der Atemmuskulatur und zeitweilige Beatmungspflichtigkeit.

1.4.8 Differentialdiagnosen

Bei der Diagnostik von Kongenitalen Myasthenen Syndromen können einige Schwierigkeiten auftreten, zumal es einige Abweichungen von typischen Symptomen und Befunden geben kann ³⁵. So manifestieren sich bei manchen CMS-Formen, wie zum Beispiel dem Slow-Channel-Syndrom, die Symptome erst in der zweiten oder dritten Dekade und nicht typischerweise schon im Kleinkindalter. Auch die positive Familienanamnese muss nicht zwingend vorhanden sein, da Neumutationen sowie eine unvollständige Penetranz vorliegen können. Das typische EMG-Dekrement kann eventuell nur in einigen Muskeln nach Stimulation oder gar nicht nachweisbar sein.

Letztlich sind viele Differentialdiagnosen zu beachten ³⁵. In der Neonatalperiode oder im Kleinkindalter sollte man unter anderem an ein mögliches Geburtstrauma, die spinale Muskelatrophie (SMA), kongenitale Myopathien (Nemaline, myotubulär, central core), kongenitale Dystrophien, kongenitale myotone Dystrophie, Möbius-Syndrom und infantilen Botulismus denken.

Im Kindesalter und bei Erwachsenen sollte man folgende Differentialdiagnosen berücksichtigen: mitochondriale Myopathien, Motorneuronenerkrankung, muskuläre Dystrophien, autoimmune Myasthenia gravis, familiäre autoimmune Myasthenia gravis und autoimmune Myasthenia gravis mit repetitivem Muskelsummenaktionspotential.

2 Zielsetzung

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die klinische und molekulargenetische Charakterisierung von Kongenitalen Myasthenen Syndromen (CMS).

Im Mittelpunkt steht die molekulargenetische Untersuchung der Epsilon-Untereinheit des Azetylcholinrezeptors. Mutationen, die für Kongenitale Myasthenen Syndrome verantwortlich sind, sind präsynaptisch, synaptisch oder postsynaptisch lokalisiert. Im Gegensatz zu den sehr seltenen präsynaptischen Formen kommen postsynaptische Mutationen am häufigsten vor. In den letzten Jahren hat sich zudem mehr und mehr gezeigt, dass das Gen der Epsilon-Untereinheit der Hauptfokus für Mutationen ist, die einer Azetylcholinrezeptor-Defizienz zugrunde liegen.

Dies soll zum einen dem Verständnis der Pathogenese myasthener Syndrome dienen. Zum anderen ist zu hoffen, dass mit Hilfe neuer Erkenntnisse die Diagnose und genetische Beratung von CMS-Patienten auf eine rationale, verlässliche und wenig belastende Basis gestellt werden kann, wie das ja bereits für zahlreiche genetisch definierte Erkrankungen möglich ist. Zudem soll untersucht werden, ob man aus dem gegebenen Phänotyp von CMS-Patienten auf den zugrundeliegenden Genotyp schließen kann und umgekehrt (Genotyp-Phänotyp-Korrelation).

Nicht zuletzt werden auch CMS-Patienten von einer auf den verursachenden Defekt abgestimmten, differenzierten Therapie profitieren, wie es sich derzeit im Bereich einer genetisch definierten Untergruppe von CMS, den Patienten mit einem Slow-Channel-Syndrom, zeigt.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 86 CMS-Patienten aus 71 nicht-verwandten Familien untersucht. Das Alter der Patienten variierte von 0.5 bis 43 Jahren. 45 von ihnen waren weiblich und 41 männlich. Alle Patienten hatten erste Symptome während der ersten drei Lebensjahre (obligatorisches Einschlusskriterium). Definitive Ausschlusskriterien waren der Nachweis von Antikörpern gegen den AChR und ein positives Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie. Zusätzliche Daten, wie das Betroffensein von Geschwistern, unterstützten die Diagnose CMS bei 14 Familien. Alle Patienten wurden von erfahrenen Neuropädiatern untersucht. Die meisten Patienten wurden uns aus neuromuskulären Zentren aus ganz Deutschland, eine Reihe von Patienten jedoch auch von ausländischen (vor allem ungarischen) Kooperationspartnern zugewiesen. Ein Großteil der Patienten war nicht-deutscher Herkunft (vergleiche Tabelle 5). Auch viele der in Deutschland diagnostizierten Patienten kamen aus verschiedenen südosteuropäischen Ländern, die wichtige Einwanderungsländer für Deutschland darstellen.

Klinische Daten aller Patienten wurden mittels eines detaillierten Fragebogens erfasst. 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).

Es wurden verschiedene Daten erhoben, so zum Beispiel zur Familienanamnese (Blutsverwandtschaft, gesunde Familienmitglieder), zur genauen Anamnese (Beginn der Symptome, motorische Entwicklung und Erkrankungsverlauf), zum neurologischen Untersuchungsbefund (Befallsmuster der Muskulatur), zur Elektrophysiologie (Nachweis eines Dekrements), zur Serologie (fehlender Nachweis von Antikörpern gegen den AChR) und zum Ansprechen auf eine Therapie mit AChE-Inhibitoren. Bei fortbestehendem Verdacht auf ein Kongenitales Myasthenes Syndrom ließen wir uns EDTA-Blut zuschicken, woraus DNA zur molekulargenetischen Analyse gewonnen wurde.

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
**Genzentrum München
Dr. Lochmüller
Feodor-Lynen-Str. 25
81377 München**



!!! wichtig !!!
Versand bei Raumtemperatur
also nicht tiefgefroren,
deshalb im Winter Probe sicherheitshalber vor Frost schützen
(z.B. durch Einwickeln des EDTA-Röhrchens in Zellstoff etc.)

bei Säuglingen und in Sonderfällen sind notfalls auch 5 ml
EDTA-Blut ausreichend

**Rückfragen unter 089-2180-6887
Dr. A. Abicht, Dr. H. Lochmüller**

eingesandtes EDTA-Blut:

- Patient
- Verwandte: ...wann immer dies möglich ist,
bitten wir um zusätzliche Blutproben von erkrankten oder nicht erkrankten Familienangehörigen!

WICHTIGE ANGABEN ZUM PATIENTEN

Vorname:
Name:

Geburtsdatum:
männlich
weiblich

Kontaktadresse:
einsendende Klinik:

Ansprechpartner/ überweisender Arzt:

Telefon:

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

...falls ja, wer ist genau betroffen:

Wieviele gesunde Geschwister hat der Patient?

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 Kraftgrad (1-5):
 distal Kraftgrad (1-5):
 Gliedergürtel Schultergürtel (Scapulae alatae ?)
 Beckengürtel
 Axiale Muskulatur (ausgeprägte Skoliose ?)

Gehfähigkeit

- 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 unauffällig
 myopathisch anderes:
 neurogen

Pathologisches Dekrement:

- distale Muskulatur
 nachweisbar (%)
 nicht nachweisbar
 nicht geprüft
 proximale Muskulatur
 nachweisbar: (
 nicht nachweisbar
 nicht geprüft

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:

- normal
 repetitiv
 nicht geprüft

Reaktion auf Einzelreiz:

...leicht zu übersehen, wenn Stimulationsfrequenz über 0,2 Hz oder nach kurzer Willkürkontraktion.

... evtl. weitere Befunde

Einzelner EMG:

NLG:

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:

Tension 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
 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: Da es sich um noch keine Routinediagnostik handelt, ist mit dem Ergebnis unter Umständen erst in mehreren Monaten zu rechnen.

Abbildung 3: Fragebogen zur Evaluation von CMS-Patienten. Fragen zur Anamnese, klinischen Daten und Untersuchungsbefunden.

3.2 DNA-Extraktion aus Blut

Bei allen Patienten wurde genomische DNA aus venösem EDTA-Blut, das bei Raumtemperatur verschickt wurde, extrahiert und molekulargenetisch mit Hilfe der PCR und Sequenzanalyse auf Mutationen des Azetylcholinrezeptors untersucht. Für die DNA-Extraktion wurden die DNA-Extraktionsverfahren der Firma Qiagen und der Firma Promega verwendet. In beiden Fällen erfolgte die Bearbeitung des Patientenblutes entsprechend den Empfehlungen der Hersteller. Die so aus Leukozytenkernen gewonnene DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen.

3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR

Die PCR (engl. Polymerase chain reaction) dient der Amplifizierung von DNA-Abschnitten⁹².

Mit Hilfe der PCR wurden entsprechende Abschnitte der genomischen DNA von CMS-Patienten amplifiziert. Um die PCR-Bedingungen zu optimieren, wurden der pH-Wert und die jeweilige Magnesium- und DMSO (Dimethylsulfoxid)-Konzentration optimiert. In einer typischen PCR-Reaktion benötigte man Reaktionspuffer, 1.25mM jeden Primers, 10mM PCR Nukleotid-Mix (Boehringer Mannheim, Deutschland), 2mM Magnesium, 1µg genomische DNA und 2.5U von der Taq-DNA-Polymerase in einem Reaktionsansatz von 50 µl.

In der PCR-Maschine (Mastercycler personal der Firma Eppendorf) lief ein typisches PCR-Protokoll ab: (1) Denaturierung bei 94°C für 5 Minuten; (2) 35 Zyklen der Denaturierung bei 94°C für 1 Minute, Annealing bei 50°C für 1 Minute und Extension bei 72°C für 1 Minute; sowie am Schluss (3) finale Extension für 7 Minuten. Die PCR-Proben wurden auf ein 2%-Agarosegel geladen und elektrophoretisch nach Größe des PCR-Produkts aufgetrennt.

3.4 Etablierung neuer Primer zur molekulargenetischen Untersuchung des Gens der ε-Untereinheit der AChR

3.4.1 Primer-Design

Die Primer für die verschiedenen PCRs wurden synthetisch hergestellt (Abteilung von Herrn Dr. G. Arnold, Genzentrum, LMU-München) und mit Test-DNA in mehreren Ansätzen optimiert, wobei die verschiedenen Parameter Annealing-Temperatur, Zyklusanzahl, Magnesiumkonzentration und DMSO-Konzentration variiert wurden.

Die Primer wurden so entworfen, dass sie innerhalb der Introns nahe der Intron-Exon-Grenze zu liegen kamen (intronische Primer). So wurde die genetische Analyse aller 12

Exons, der benachbarten Spleiß-Sequenzen und des Promotorbereiches bei CMS-Patienten möglich.

3.4.2 Verwendete ϵ - Primer

Das Gen der ϵ -Untereinheit des AChR besteht aus 12 verschiedenen Exons, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert sind (Gene für AChR β - und ϵ -Untereinheit auf Chromosom 17p12-13; α -, δ und γ -Untereinheit auf Chromosom 2q32). Um diese 12 Exons einschließlich der Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Sequenzen sowie die Promotorregion zu untersuchen, kamen folgende Primerpaare zum Einsatz:

Tabelle 3: Verwendete Primer

PCR	Sequenz des Sense-Primers	Sequenz des Antisense-Primers	durch PCR umfasste Bereiche	Länge des PCR-Produkts	optimale Annealing-Temperatur
1	5'- GAATCTCTGTA CCGCAGGGCT- 3'	5'- AGCCCCTGTCC GTACCGAGAA - 3'	Promotor und Exon 1	565 bp	50°C
2	5'- CACGCAGCA GGATGGCA- 3'	5'- TGCCCTGGAC AAGACCTCACAC - 3'	Exons 2 und 3	667 bp	50°C
3	5'- TGTGAGGTCTT GTCCAGGGCA- 3'	5'- AACATAATCG TCCGGGCCTCG - 3'	Exons 4 und 5	536 bp	50°C
4	5'- AGGTACAGAT GGGAACAGAG - 3'	5'- TCTGGACCCCG TCTAGAAGCG - 3'	Exon 6	306 bp	50°C
5	5'- TCTTCAGCCCGC TGTCAGCTCGGC - 3'	5'- GGCCACGCCCCC ACCCTTCACACT - 3'	Exons 7 und 8	525 bp	56°C
6	5'- TCGGTAGCTGG GAGGAGGAACG - 3'	5'- AAGGCAGCTGG CGGGGAAAACAC - 3'	Exons 9 und 10	534 bp	56°C
7	5'- CACGGAGCGAG CTCGTGTTTGA - 3'	5'- CTGGAGATGG GTGGGAAATTG - 3'	Exons 11 und 12	550 bp	50°C

3.5 Gelelektrophorese und Gelextraktion

Zum Nachweis und zur Auftrennung der amplifizierten Fragmente wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, bei der lineare doppelsträngige DNA im elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt wird. Die entstandenen DNA-Banden konnten mit Hilfe des fluoreszierenden und interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch den Vergleich mit einem DNA-

Längenstandard konnte die Molekülgröße, d.h. die Anzahl der Basenpaare der DNA-Abschnitte, bestimmt werden.

Die so aufgetrennten amplifizierten Fragmente wurden dann mit Hilfe des Gelextraktions-Kit der Firma Qiagen aus dem Agarosegel extrahiert. Dabei wurde gemäß den Vorschriften des Herstellers vorgegangen.

3.6 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR erfolgte direkt anhand der PCR-Produkte. Die DNA-Fragmente, jeweils sense und antisense, wurden mit einem DNA-Sequenziergerät (Modell 377 der Firma Applied Biosystems) und Fluoreszeinkmarkierten Dideoxy-Terminatoren (Firma Perkin-Elmer; Foster City, CA) sequenziert. Die derart sequenzierten Abschnitte wurden sowohl in sense- als auch in antisense-Richtung mit dem Wildtyp verglichen und analysiert. So konnte bei Abweichungen vom Wildtyp bestimmt werden, ob die Veränderungen homozygot oder heterozygot vorliegen, ob es sich um Polymorphismen handelt oder um echte Mutationen. Wenn auch nach Vergleich von sense- und antisense-Richtung immer noch Unsicherheiten bestanden, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt.

Voraussetzung zur Sequenzanalyse war die Kenntnis der Wildtypsequenz des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR (erhältlich bei dem „National Center of Biological Information“ (NCBI) unter den Nummern AF105999 bzw. gi: 4580858) und der mRNA-Sequenz bzw. der Protein-Sequenz der ϵ -Untereinheit des AChR (erhältlich unter den Nummern NM_000080 bzw. gi: 4557462).

3.7 Restriktionsverdau

Mittels Restriktionsanalyse lassen sich Mutationen, die zu Verlust oder Zugewinn einer spezifischen enzymatischen Schnittstelle führen, nachweisen.

Um beispielsweise die Mutation ϵ 1267delG aufzudecken, wurde ein 550/549bp langes Fragment, das die Exons 11 und 12 enthielt, durch PCR amplifiziert, wobei die Primer 5'-CACGGAGCGAGCTCGTGTTTGA-3' und 5'-CTGGAGATGGGTGGGAAATTG-3' verwendet wurden. Die untersuchte Mutation ϵ 1267delG resultiert in dem Verlust einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XagI*. Das mutierte Allel bleibt unverdaut, während das Wildtyp-Allel in zwei Fragmente (355bp und 195bp) zerschnitten wird. Der Restriktionsverdau wird bei 37°C für 4 Stunden durchgeführt unter Zusatz von 15 Units von *XagI* in einem Reaktionsansatz von 20 μ l. Die Fragmente werden der Größe nach aufgetrennt auf einem 2%-Agarosegel, das Ethidiumbromid enthält.

Die Mutationen im Promotorbereich wurden ebenso durch Restriktionsverdau diagnostiziert. Dazu wurde ein 623bp langes Fragment, das die Promotorregion der ϵ -Untereinheit des Azetylcholinrezeptors enthält, durch PCR amplifiziert, wobei die Primer 5'- GAATCTCTGTACCGCAGGGCTA-3' und 5'- AGCCCTGTCCGTACCGAGAA-3' verwendet werden. Sowohl die Mutation ϵ -154G>A als auch ϵ -155G>A führen zum Verlust einer Restriktionsstelle für *MspI*. Das mutierte Allel verbleibt unverdaut, während das Wildtypallel in zwei Fragmente (465bp und 158bp) geschnitten wird. Der Restriktionsverdau wird bei 37°C für zwei Stunden durchgeführt, wobei 15 Units von *MspI* in einem 20 μ l-Reaktionsansatz zugesetzt werden. Die Restriktionsfragmente werden der Größe nach auf einem 2%-Agarosegel, das Ethidiumbromid enthält, aufgetrennt.

4 Ergebnisse

4.1 Überblick über identifizierte Mutationen

Wir analysierten bei unseren CMS-Patienten, ob sich Mutationen am AChR nachweisen ließen. 86 CMS-Patienten aus 71 nicht-verwandten Familien wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dabei wurden 14 verschiedene Mutationen bei 50 CMS-Patienten, die aus 39 nicht-verwandten Familien stammen, gefunden. Dies wird im Überblick in Abbildung 4 und in Tabelle 4 dargestellt.

- Missense-Mutationen oder In-Frame-Aminosäure-Deletionen
- ▲ Frameshift-Mutationen oder Stop-Mutationen
- Spleiß-Mutationen

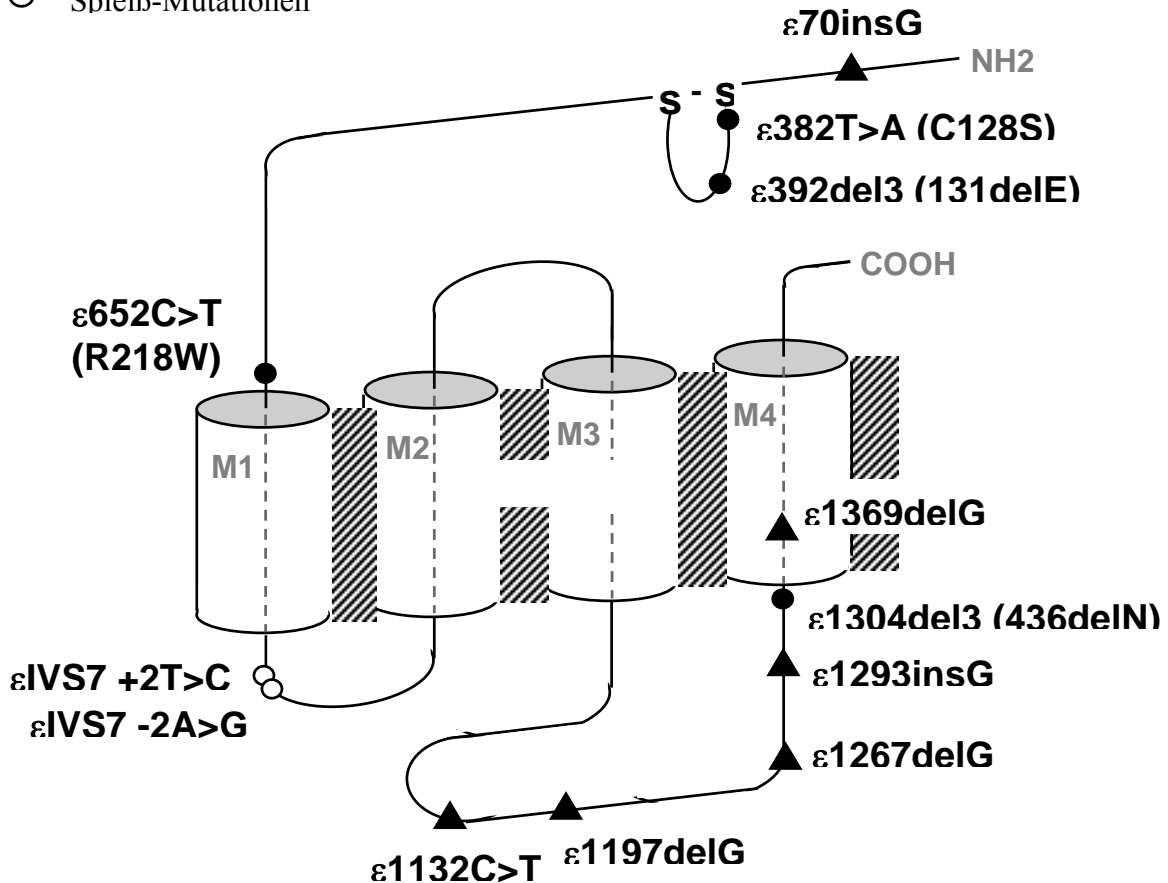


Abbildung 4: AChR mit eingezeichneten Mutationen

Schematisches Diagramm der Polypeptidkette der ε-Untereinheit des AChR, das die Mutationen zeigt, die in unserem Labor bei CMS-Patienten identifiziert wurden. Ausgemalte Kreise stehen für Missense-Mutationen oder Aminosäure-Deletionen ohne Verschiebung des Leserasters, offene Kreise stehen für Spleiß-Mutationen, ausgemalte Dreiecke stehen für Mutationen mit einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift-Mutationen) bzw. für Stop-Mutationen.

Tabelle 4: Überblick über die Mutationen, die im Gen *CHRNE*, kodierend für die ϵ -Untereinheit des AChRs, identifiziert wurden

Loka-tion	Domäne	Mutation	Molekula- rer Effekt	Konsequenz	Angenommener funktioneller Effekt	Lite- ratur	Fam. /Pat.
5'- UTR	Promotor	ϵ -154G>A (compound-heterozygot mit Mikrodeletion Δ 1290)	Nukleotid- austausch	unterbricht N-Box-Motif	niedrige Expression	4	1/1
5'- UTR	Promotor	ϵ -155G>A (homozygot)	Nukleotid- austausch	unterbricht N-Box-Motif	niedrige Expression	96	1/1
Exon 2	Extrazell.	ϵ 70insG (comound-heterozygot mit ϵ IVS7-2A>G)	Frameshift	vorzeitiger Kettenabbruch	trunkiertes Protein, niedrige Expression	93	1/1
Exon 5	extrazell.	ϵ 382T>A (compound-heterozygot mit ϵ 1197delG)	Missense- Mutation	C128S (Cys→Ser)	niedrige Expression	87	1/1
Exon 5	extrazell.	ϵ 392del3 (homozygot)	In-Frame- Deletion	131delE	noch nicht erforscht		2/2
Exon 7	extrazell.	ϵ 652C>T (compound-heterozygot mit ϵ 1304del3)	Missense Mutation	R218W (Arg→Trp)	noch nicht erforscht		1/2
Intron 7	Spleiß- Donor	ϵ IVS7+2T>C (homozygot)	Spleiß- Mutation	aberrantes Spleißen	niedrige Expression	93	1/1
Intron 7	Spleiß- Akzeptor	ϵ IVS7-2A>G (2x homozygot, 2x compound- heterozygot mit ϵ 1293insG, 1x compound-heterozygot mit ϵ 70insG)	Spleiß- Mutation	aberrantes Spleißen	niedrige Expression	10	3/5
Exon 10	intrazell.	ϵ 1132C>T (homozygot)	Stop- Mutation	Q378stop	trunkiertes Protein, niedrige Expression		1/1
Exon 11	intrazell.	ϵ 1197delG (compound-heterozygot mit ϵ 382T>A)	Frameshift	vorzeitiger Kettenabbruch	trunkiertes Protein, niedrige Expression		1/1
Exon 12	intrazell.	ϵ 1267delG (homozygot)	Frameshift	63 Missense Codons	aberrantes Protein, niedrige Expression	1, 2, 3, 5, 68, 69	26/33
Exon 12	intrazell.	ϵ 1293insG (2x homozygot, 2x compound-heterozygot mit ϵ IVS7-2A>G)	Frameshift	3 Missense Codons, gefolgt von einem Nonsense- Codon	aberrantes Protein, niedrige Expression	42, 116	2/4
Exon 12	intrazell. / M4	ϵ 1304del3 (compound-heterozygot mit ϵ 652C>T)	In-Frame- Deletion	436del N (Deletion von Asparagin)	noch nicht erforscht		1/ 2
Exon 12	M 4	ϵ 1369delG (homozygot)	Frameshift	29 Missense Codons	aberrantes Protein, niedrige Expression		1/1

Liste von Mutationen im Gen der ϵ -Untereinheit des AChR, die bei CMS-Patienten identifiziert wurden. Nukleotide und Codons sind so nummeriert, dass sie mit der ersten Aminosäure des reifen Peptids beginnen, entsprechend der veröffentlichten cDNA-Sequenz der ϵ -Untereinheit des AChR. Abkürzungen: intrazell.= intrazellulär, extrazell.= extrazellulär, 5'-UTR = 5'-nichttranslatierte Region, Literaturverweis, Fam./ Pat. = Familien/ Patienten

4.2 Übersicht über Herkunftsländer der CMS-Patienten

Die insgesamt 86 CMS-Patienten, die untersucht wurden, stammen aus 71 Familien. 22 CMS-Patienten aus 21 voneinander unabhängigen Familien kommen aus Deutschland. Der Anteil der deutschen CMS-Familien in unserem Kollektiv beträgt somit nur etwa 30%. Die größte Gruppe von Patienten nicht-deutscher Abstammung stellen die ungarischen Familien dar mit einem Anteil von etwa 24% des Kollektivs aller 71 CMS-Familien. Weiterhin untersuchten wir viele CMS-Familien aus Ländern des ehemaligen Jugoslawien (Mazedonien, Serbien, Kroatien und Kosovo) (14,1%), aus der Türkei (14,1%), aus Griechenland (1,4%), aus Böhmen (heutiges Tschechien) (1,4%) und aus Rumänien (1,4%). Ohne Ungarn mitzurechnen, stammen damit insgesamt 32,4% der Familien aus dem südosteuropäischen Raum. Aus anderen europäischen Ländern (England, Italien) stammen nur 2,8% der CMS-Familien. Einige Familien rekrutierten wir aus nicht-europäischen Ländern, darunter Russland (7,0%), Libyen (2,8) und Kanada (1,4%). In Tabelle 5 und in Abbildung 5 ist die Herkunft aller untersuchten CMS-Familien dargestellt.

Der Anteil der Patienten, bei dem ein Mutationsnachweis gelang, ist in den unterschiedlichen Ländern unterschiedlich hoch. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Anzahl der CMS-Familien aus den jeweiligen Ländern. Aus Abbildung 6 wird erkennbar, dass der Nachweis einer pathogenen CMS-Mutation insbesondere bei Patienten aus dem südosteuropäischen Raum gelang.

Tabelle 5: Übersicht über die Herkunftsländer der CMS-Patienten bzw. CMS-Familien. Angegeben ist jeweils die Gesamtanzahl der Patienten bzw. Familien aus den jeweiligen Ländern (in fetter Schrift). Zusätzlich wird die Anzahl der CMS-Patienten bzw. -Familien gezeigt, bei denen der Nachweis einer Mutation gelang und bei denen dies nicht möglich war.

Herkunftsländer	CMS-Patienten (insgesamt)	CMS-Familien (insgesamt)	CMS-Patienten mit Nachweis einer Mutation	CMS-Familien mit Nachweis einer Mutation	CMS-Patienten ohne Nachweis einer Mutation	CMS-Familien ohne Nachweis einer Mutation
Deutschland	22	21	6	5	16	16
Ungarn	21	17	18	15	3	2
Türkei	12	10	8	7	4	3
Russland	7	5	4	2	3	3
Mazedonien	5	4	2	2	3	2
Serbien	3	3	3	3	0	0
Kroatien	2	1	2	1	0	0
Kosovo	3	2	2	1	1	1
Griechenland	1	1	0	0	1	1
England	1	1	0	0	1	1
Italien	1	1	0	0	1	1
Böhmen (heutiges Tschechien)	1	1	1	1	0	0
Rumänien	2	1	2	1	0	0
Libyen	4	2	2	1	2	1
Kanada	1	1	0	0	1	1
SUMME:	86	71	50	39	36	32

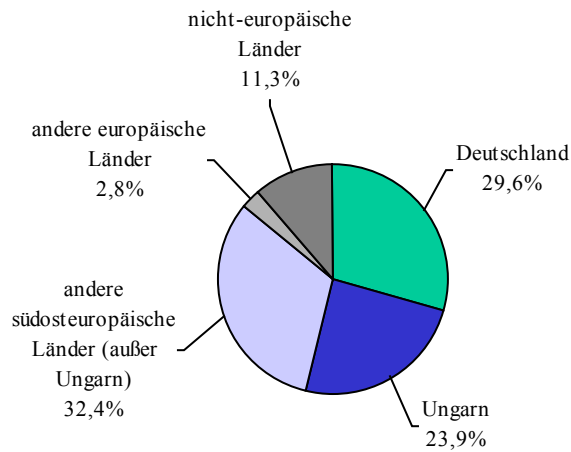


Abbildung 5: Darstellung der Herkunftsländer aller 71 CMS-Familien

„Andere Südosteuropäische Länder außer Ungarn“ umfassen die Türkei, das ehemalige Jugoslawien (Mazedonien, Serbien, Kroatien, Kosovo), Böhmen (heutiges Tschechien), Griechenland und Rumänien; „andere europäische Länder“ umfassen England und Italien; nicht-europäische Länder umfassen Russland, Kanada und Libyen.

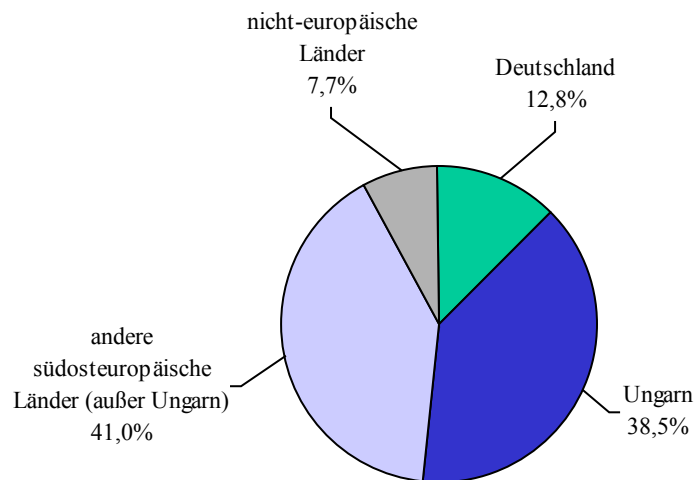


Abbildung 6: Darstellung der Herkunftsländer der 39 CMS-Familien, bei denen Mutationen im kodierenden Bereich des Gens, das für die ϵ -Untereinheit des AChR kodiert, nachgewiesen werden konnte

4.3 Frameshift-Mutation ϵ 1267delG

4.3.1 Prävalenz und Nachweis der Mutation ϵ 1267delG

Die Mutationsanalyse des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR wurde bei 86 CMS-Patienten durchgeführt. Bei 33 Patienten aus 26 nicht-verwandten Familien konnte eine homozygote Deletion eines G-Nukleotids an Position 1267 (ϵ 1267delG) entdeckt werden; das ist das erste Nukleotid in Exon 12 des Gens der ϵ -Untereinheit des Azetylcholinrezeptors.

Alle Familien mit dieser Mutation stammten von Roma ab und/oder kamen aus südosteuropäischen Ländern, namentlich aus Ungarn (18 CMS-Patienten aus 15 nicht-verwandten Familien), Mazedonien (5 CMS-Patienten aus 4 nicht-verwandten Familien), Serbien (3 CMS-Patienten aus 3 nicht-verwandten Familien), dem Kosovo (2 CMS-Patienten aus 1 Familie), der Türkei (3 Patienten aus 1 Familie) und jeweils ein Patient aus Böhmen und Rumänien. Die Mutation ϵ 1267delG wurde bei 58% (26/45) der CMS-Familien, die nicht-deutscher Abstammung sind, gefunden im Vergleich zu 0% (0/26) der Familien mit deutscher Abstammung.

Um andere Mutationen auszuschließen, wurde bei allen Patienten mit der Mutation ϵ 1267delG die komplette kodierende Region des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR sequenziert. Dabei wurde keine andere Mutation entdeckt. Wo es möglich war, wurden die Verwandten der betroffenen Patienten auf die Mutation ϵ 1267delG getestet. Nur betroffene Geschwister erwiesen sich ebenfalls als homozygote Träger der Mutation; alle heterozygoten Träger waren asymptomatisch. Daraus ist zu schließen, dass Heterozygotie für die Mutation ϵ 1267delG entsprechend dem autosomal-rezessiven Erbgang nicht ausreicht, um CMS zu verursachen.

Bei einer ungarischen Familie mit der Mutation ϵ 1267delG waren sowohl der Vater als auch zwei Kinder von der Krankheit betroffen, während die Mutter der Familie gesund war. Da ein Elternteil sowie die Kinder erkrankt waren, hätte man einen dominanten Erbgang annehmen können. Die Sequenzanalyse ergab aber, dass der Vater sowie die betroffenen Kinder homozygote Träger der Mutation ϵ 1267delG waren, während die Mutter heterozygote Trägerin für die Mutation ϵ 1267delG war.

Auch in diesem Fall handelt es sich folglich um einen autosomal-rezessiven Erbgang, der aufgrund der besonderen Allelkombination mit einem autosomal-dominanten Erbgang hätte verwechselt werden können („pseudo-dominant“) ⁶². Ähnliche Fälle wurden schon für andere autosomal-rezessive Erkrankungen beschrieben, so zum Beispiel für die Stargardts Erkrankung und die Friedreich-Ataxie ²³. Ein derartiges Vererbungsmuster findet sich bei Familien, bei denen eine hohe Frequenz der mutierten Allels vorhanden ist.

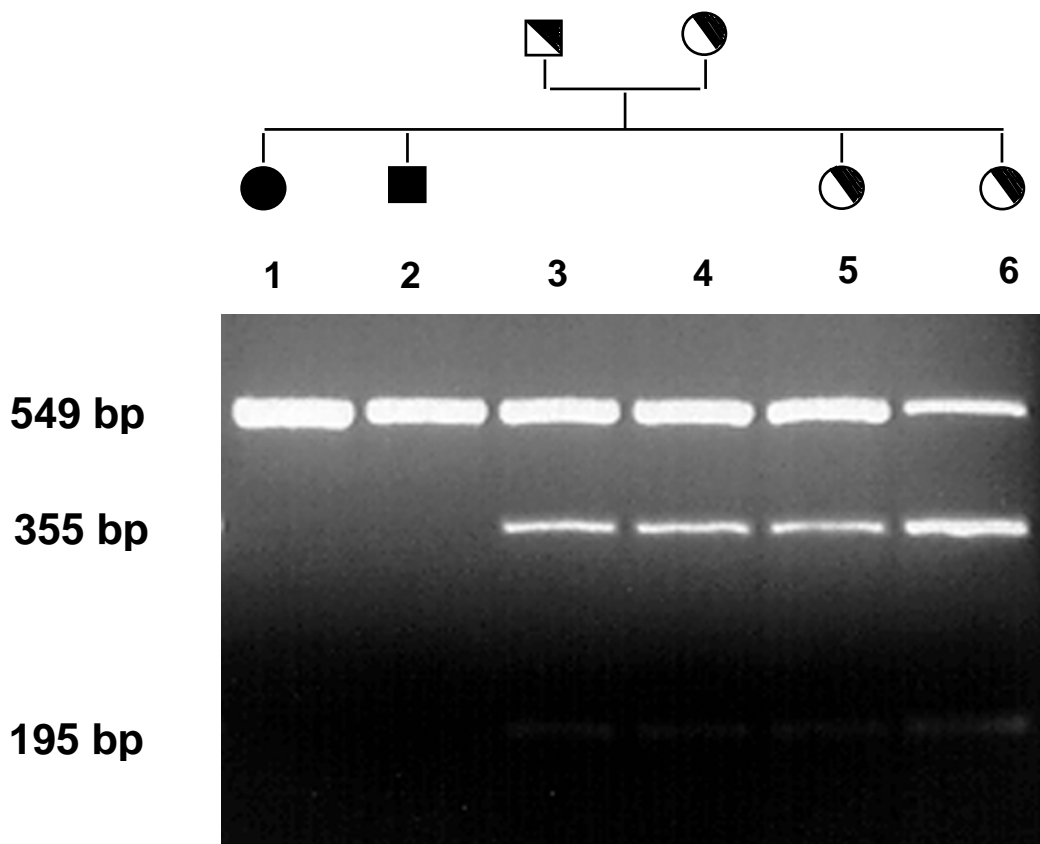


Abbildung 7: ϵ 1267delG –Restriktionsverdau: Restriktionsenzym-Analyse bei zwei Patienten mit der Diagnose eines CMS (Patienten 1 und 2), ihren asymptomatischen Eltern (3, 4) und Geschwistern (5,6). Ein PCR-Fragment der Länge 550bp (549 beim mutierten Allel), das die Exons 11 und 12 der ϵ -Untereinheit des AChR enthält, wurde amplifiziert. Im Restriktionsverdau mit *XagI* entstehen zwei Fragmente von 355bp und 195bp bei der Wildtyp ϵ -Untereinheit. Die Mutation ϵ 1267delG resultiert in dem Verlust einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XagI*. Sowohl die Wildtyp- als auch die mutierten Fragmente werden bei den asymptomatischen Eltern (3,4) und den asymptomatischen Geschwistern beobachtet (5,6), was auf die Heterozygotität für die Mutation ϵ 1267delG hinweist. Beide Patienten (1,2) sind homozygot für ϵ 1267delG.

4.3.2 Klinischer Phänotyp der ϵ 1267delG-Patienten und Vergleich mit anderen CMS-Patienten

Bei allen Patienten begannen die Symptome in der frühen Kindheit, in der Regel in den ersten Lebensmonaten, mit fluktuierender Ptose, Schwäche beim Schreien und Schwierigkeiten beim Saugen. Atemversagen in der frühen Kindheit, verursacht durch Stress oder Infektionen, wurde bei einem Patienten berichtet. Todesfälle sind nicht bekannt. Bei allen Patienten zeigte sich eine Ptose. Eine bulbäre Schwäche präsentierte

sich bei sehr vielen Patienten in Form von Schwierigkeiten beim Kauen und Schlucken und Befall der Gesichtsmuskulatur. Eine Ophthalmoparese, die bei 29 der 31 Patienten beobachtet wurde, reichte von leichter bis starker Einschränkung der Augenbeweglichkeit. Belastungsabhängige, generalisierte Muskelschwäche der Extremitätenmuskulatur wurde bei den meisten Patienten festgestellt. Dennoch waren die meisten Patienten gehfähig. Der natürliche Verlauf der Krankheit war bei allen Patienten gutartig. Mit dem Alter zeigte sich keine oder eine nur geringe Verschlechterung. Eine signifikante Besserung der Symptome mit dem Alter wurde bei einem Patienten berichtet. Bemerkenswert ist das positive Ansprechen auf Azetylcholinesterase-Inhibitoren bei allen Patienten. Bei einigen Patienten aber waren Residualsymptome refraktär gegen eine Langzeitbehandlung mit Pyridostigmin (Mestinon, im Bereich von 1- 8 mg/kg/Tag). Eine repetitive Stimulation von zwei distalen und zwei proximalen Muskeln wurde bei 19 Patienten durchgeführt. 17 zeigten ein pathologisches Dekrement in mindestens einem der stimulierten Muskeln. Von den zwei Patienten mit negativem Resultat für ein Dekrement, wurde einer durch Einzelfaser-Elektromyographie getestet, wo sich ein Block der neuromuskulären Übertragung zeigte; beim zweiten Patienten, einem einjährigen Baby, wurden keine weiteren Tests (Einzelfaser-Elektromyographie, repetitive Stimulation facialer Muskeln) durchgeführt.

Tabelle 6: Häufigkeit der klinischen Symptome bei 33 Patienten mit der Mutation ϵ 1276delG

Ptose	100%	33 von 33 Patienten
Positiver Effekt von AChE-Inhibitoren	100%	32 von 32 Patienten
Keine signifikante Verschlechterung mit dem Alter	97%	31 von 32 Patienten
Beginn der Symptome im Alter von < 2 Jahren	94%	29 von 31 Patienten
Ophthalmoparese	94%	29 von 31 Patienten
EMG-Dekrement	89%	17 von 19 Patienten
Generalisierte Schwäche	87%	27 von 31 Patienten
Schwäche der bulbären oder facialen Muskulatur	86%	25 von 29 Patienten
Verzögerte motorische Entwicklung	30%	7 von 23 Patienten
Unfähigkeit zu gehen (Rollstuhlabhängigkeit)	0%	0 von 33 Patienten

4.4 Andere ϵ -Mutationen

Eine Mutationsanalyse des gesamten Gens der ϵ -Untereinheit des AChR wurde bei allen 45 CMS-Familien durchgeführt, die negativ für die Mutation ϵ 1267delG waren. Nukleotidaustausche wurden im Gegensatz zu unwichtigen Polymorphismen als

potentiell pathogene Mutationen angesehen, wenn sie: (1) unter 100 Kontrollchromosomen nicht zu finden waren; (2) homozygot oder compound-heterozygot bei betroffenen Kindern vorhanden waren, aber nicht bei deren gesunden Verwandten gefunden werden konnten, (3) voraussichtlich einen Aminosäureaustausch verursachen und Aminosäuren betreffen, die durch verschiedene Spezies konserviert sind.

Die klinische Untersuchung der CMS-Patienten, welche andere Mutationen als $\epsilon 1276\text{delG}$ tragen, zeigte einen Phänotyp, der kompatibel ist mit anderen Mutationen der ϵ -Untereinheit, die zu einer Rasterverschiebung oder zu einer niedrigen Expression führen (Frameshift- oder Low-Expressor-Mutationen). Der Phänotyp dieser Mutationen ist dem Phänotyp der Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ sehr ähnlich. So zeigten alle Patienten einen frühen Beginn der Krankheit bei Geburt oder in den ersten Lebensjahren. Myasthene Symptome umfassten bilaterale Ptose, bulbäre Schwäche und ermüdbare generalisierte Schwäche von Beinen und Armen, die vor allem proximale Muskeln betraf. Ebenso sprachen alle Patienten auf eine Therapie mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren an. Die meisten Patienten zeigten einen relativ gutartigen nicht-progressiven Verlauf des CMS. Phänotypische Besonderheiten und Auffälligkeiten werden bei den jeweiligen Mutationen im folgenden näher erläutert.

4.4.1 Andere Frameshift-Mutationen und Mutationen, die zu einem Stop-Codon führen

Abgesehen von der Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ konnten bei sieben der 86 CMS-Patienten Frameshift-Mutationen in homozygoter oder heterozygoter Form nachgewiesen werden. Bei den Frameshift-Mutationen kann man solche durch Insertion und solche durch Deletion eines Nukleotids unterscheiden: 5 CMS-Patienten wiesen Insertionen eines Nukleotids auf (Mutationen $\epsilon 67\text{insG}$ und $\epsilon 1293\text{insG}$), 2 CMS-Patienten dagegen Deletionen eines Nukleotids ($\epsilon 1197\text{delG}$, $\epsilon 1369\text{delG}$).

Bei einem Patienten gelang der Nachweis einer ein Stop-Codon betreffenden Mutation, was ebenso wie die Frameshift-Mutationen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und somit zu einer verminderten Expression des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR führt

4.4.1.1 Mutation $\epsilon 1369\text{delG}$

Während die meisten anderen CMS-Patienten einen relativ gutartigen nicht-progressiven Verlauf des CMS zeigten, präsentierte sich eine deutsche Patientin mit einem stärker ausgeprägten Phänotyp mit schwerer Beeinträchtigung des Gehvermögens und intermittierendem Gebrauch eines Rollstuhls. Nach Beginn der Symptome im ersten Lebensjahr fiel die Patientin durch eine verzögerte motorische Entwicklung, deutliche tageszeitliche Schwankungen, fluktuierende Ptose und die

Beteiligung bulbärer Muskeln auf. Die Patientin sprach gut auf eine Mestinontherapie an. Die molekulargenetische Analyse ergab bei dieser Patientin eine homozygote Deletion eines G-Nukleotids im Bereich von Exon 12 ($\epsilon 1369\text{delG}$). Mutationsanalysen der Eltern und der gesunden Schwester der Patientin zeigten, dass diese jeweils nur heterozygote Träger der Mutation $\epsilon 1369\text{delG}$ sind. Die bei der deutschen Patientin gefundene Mutation $\epsilon 1369\text{delG}$ betrifft das Exon 12. $\epsilon 1369\text{delG}$ betrifft die vierte transmembrane Domäne (M4-Region), wo es einen Frameshift verursacht.

4.4.1.2 Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$

Die Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$ zeigte sich in homozygoter und compound-heterozygoter Form bei jeweils zwei Geschwisterpaaren aus zwei voneinander unabhängigen Familien.

Familie 1: Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$, homozygot:

Die homozygote Insertion eines Guanins nach dem Nukleotid 1293 ($\epsilon 1293\text{insG}$) zeigte sich bei zwei Geschwistern aus einer libyschen Familie. Die 20-jährige Schwester hatte typische CMS-Symptome gezeigt mit Beginn der Symptomatik vor dem ersten Lebensjahr, geringer Progredienz der Symptome, einer deutlich belastungsabhängigen generalisierten Muskelschwäche, okulären Symptomen in Form einer fluktuierenden Ptose und eingeschränkter Bulbusbeweglichkeit, einem EMG-Dekrement sowie einem positiven Tensilontest. Der jüngere Bruder, der zum Zeitpunkt der Diagnose erst zwei Jahre alt war, hatte dagegen bis zu diesem Alter keine myasthenen Symptome entwickelt.

Die Sequenzanalyse des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR bei den Eltern und den übrigen zwei Geschwistern zeigte, dass beide Eltern und ein Geschwister heterozygote Träger der Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$ sind. Ein Geschwister erwies sich als homozygot gesund.

Familie 2: Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$, compound-heterozygot mit Mutation $\epsilon \text{IVS7-2 A>G}$:

In heterozygoter Form wurde die Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$ bei zwei russischen Geschwistern (ältere Schwester und jüngerer Bruder) zusammen mit der heterozygoten Mutation $\epsilon \text{IVS7-2A>G}$ nachgewiesen, wobei die Mutter der russischen Patienten heterozygot für Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$ ist. Vom Vater lag keine DNA vor.

Beide Patienten zeigten ähnliche CMS-Symptome mit einem Beginn nach der Geburt, einer unauffälligen motorischen Entwicklung, einer geringen Progression der Symptome, generalisierter Muskelschwäche mit Betonung proximaler Muskeln, Ptose und eingeschränkter Bulbusbeweglichkeit. Während der Tensilon-Test bei der älteren Schwester deutlich positiv ausfiel, war die Antwort auf Mestinongabe beim jüngeren Bruder nicht so klar.

Die Insertion eines G-Nukleotids an der Position 1293 in Exon 12 ($\epsilon 1293 \text{ insG}$) führt zu einem Frameshift in der intrazellulären zytoplasmatischen Schleife der ϵ -Untereinheit. $\epsilon 1293 \text{ insG}$ führt in der Folge zu 3 Missense-Codons, gefolgt von einem Nonsense-Codon.

4.4.1.3 Mutation $\epsilon 1197 \text{ delG}$

Mutation $\epsilon 1197 \text{ delG}$, compound-heterozygot mit der Mutation $\epsilon 382 \text{ T>A}$:

Die Sequenzanalyse bei einer deutschen CMS-Patientin zeigte zwei heterozygote Mutationen, nämlich die heterozygote Deletion von einem Basenpaar an Position 1197 ($\epsilon 1197 \text{ delG}$) und einen Aminosäureaustausch durch eine Missense-Mutation in Exon 5 ($\epsilon 382 \text{ T>A}$). Die Mutation $\epsilon 382 \text{ T>A}$ wird unter Punkt 4.3.4.4 „Mutation $\epsilon 382 \text{ T>A}$ “ näher beschrieben.

Die Patientin fiel im ersten Lebensjahr auf durch Schwäche der okulären (fluktuierende Ptose und eingeschränkte Bulbusbeweglichkeit) und bulbären Muskeln (nasale, zum Teil verwaschene Sprache), die tageszeitlichen Schwankungen unterworfen waren; ferner durch eine verzögerte motorische Entwicklung, eine deutliche Facies myopathica, einen positiven Tensilon-Test und ein EMG-Dekrement. Anti-AChR-Antikörper waren nicht nachweisbar.

Mutationsanalysen der Eltern zeigten, dass die nicht erkrankten Eltern und der gesunde Bruder der Patientin jeweils nur Träger einer der beiden heterozygoten Mutationen sind: Der Vater und Bruder sind Träger der Mutation $\epsilon 1198 \text{ delG}$, die Mutter ist Trägerin der Mutation $\epsilon 128 \text{ C>S}$.

Die heterozygot bei der deutschen Patientin gefundene Deletion eines G-Nukleotids an Position 1197 ($\epsilon 1197 \text{ delG}$) ist in Exon 11 lokalisiert und verantwortlich für einen Frameshift in der intrazellulären zytoplasmatischen Schleife.

4.4.1.4 Mutation $\epsilon 70 \text{ insG}$

Mutation $\epsilon 70 \text{ insG}$, compound-heterozygot mit Mutation $\epsilon \text{ IVS7-2A>G}$:

In heterozygoter Form konnte die Insertion eines Guanins an Position 70 in Exon 2 ($\epsilon 70\text{insG}$) zusammen mit der heterozygoten Mutation $\epsilon\text{IVS7-2A>G}$ bei einem männlichen Patienten nachgewiesen werden. Die Großmutter mütterlicherseits stammte aus Ungarn, der Großvater mütterlicherseits aus Griechenland und der Großvater väterlicherseits aus Bulgarien.

Die Anamnese und klinische Untersuchung zeigte typische CMS-Symptome mit einem Beginn der Symptome im ersten Lebensjahr, einer nur gering verzögerten motorischen Entwicklung, einer leichten zervikalen Muskelschwäche, einem typischen Dekrement im EMG, keinem Nachweis von Antikörpern gegen den AChR sowie einem positiven Tensilon-Test.

Die Mutationsanalyse von sieben direkten Familienangehörigen ergab, dass der Vater, die Großmutter väterlicherseits sowie die ein Jahr ältere Schwester des Patienten jeweils heterozygot für $\epsilon 70\text{insG}$ sind. Als heterozygote Träger der Mutation $\epsilon\text{IVS7-2A>G}$ erwiesen sich die Mutter des Patienten sowie der Großvater mütterlicherseits. Die Großmutter mütterlicherseits und der Großvater väterlicherseits trugen keine Mutation. Die Insertion des Guanin-Nukleotids an Position 70 des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR ($\epsilon 70\text{insG}$) ist in Exon 2 lokalisiert. Die Mutation $\epsilon 70\text{insG}$ führt zu einer Rasterverschiebung innerhalb der extrazellulären Domäne des AChR.

4.4.1.5 Mutation $\epsilon 1132\text{C>T}$

Bei einem türkischen Patienten gelang der Nachweis eines homozygoten Austausches von C nach T in Exon 12 an Position 1132 ($\epsilon 1132\text{C>T}$).

Die Symptome des Patienten umfassten eine deutliche Belastungsabhängigkeit, eine eingeschränkte Bulbusbeweglichkeit, fluktuierende Ptose und einen deutlich positiven Tensilon-Test. Zudem traten bei ihm rezidivierende Pneumonien auf. Der Patient verstarb an pulmonalen Komplikationen in Folge einer Aspiration im Alter von zwei Jahren. Die Mutation $\epsilon 1132\text{C>T}$, die die lange zytoplasmatische Schleife der ϵ -Untereinheit betrifft, verursacht ein Stop-Codon in Exon 10 und führt so zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und zu einer verminderten Expression des Gens der ϵ -Untereinheit.

Die klinischen Symptome und Untersuchungsergebnisse der acht Patienten mit unterschiedlichen Frameshift-Mutationen bzw. Stop-Mutationen werden in den Tabellen 7 und 8 zusammengefasst:

Tabelle 7: Klinische Symptome und Untersuchungsbefunde bei 8 Patienten mit unterschiedlichen Frameshift-Mutationen bzw. mit Stop-Mutationen (ohne Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$).

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Mutation	$\epsilon 70\text{insG}$, heterozygot mit $\epsilon\text{IVS7-2A>G}$	$\epsilon 1293\text{insG}$, homozygot	$\epsilon 1293\text{insG}$, homozygot	$\epsilon 1293\text{insG}$ 2x heterozygot mit $\epsilon\text{IVS7-2A>G}$	$\epsilon 1293\text{insG}$ 2x heterozygot mit $\epsilon\text{IVS7-2A>G}$	$\epsilon 1197\text{delG}$ 1x heterozygot mit $\epsilon 382\text{T>A}$	$\epsilon 1369\text{delG}$, homozygot	$\epsilon 1132\text{C>T}$ Stop-Codon, homozygot
Abstammung	Ungarn	Libyen	Libyen	Russland	Russland	Deutschland	Deutschland	Türkei
Alter	4.5 Jahre	19 Jahre	3 Jahre	21 Jahre	17 Jahre	19 Jahre	15 Jahre	verstorben
Geschlecht	M	W	M	W	M	W	W	M
Krankheitsbeginn	1.LJ	vor 1.LJ	vor 1.LJ	Nach Geburt	nach Geburt	1.LJ	1.LJ	1.LJ
Entwicklungsverzögerung	-	+	+	-	-	+	-	+
Muskelschwäche								
-generalisiert	+	++	++	+	+	-	-	++
-selektiv	+/-	+	+	+/-	+/-	++	++	+
-Ophthalmop.	++	++	++	++	++	+	-	+
EMG-Dekrement	++	+	+	+	+	+	+	+
Anti-AChR-Antikörper	-	-	-	-	-	-	-	-
Besserung auf AChE-Inhibitoren	++	++	++	+	++	++	++	+

Tabelle 8: Häufigkeit der klinischen Symptome bei 8 Patienten mit unterschiedlichen Frameshift-Mutationen bzw. mit Stop-Mutationen (ohne Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$).

Ptose	100%	8 von 8 Patienten
Beginn der Symptome im Alter von < 2 Jahren	100%	8 von 8 Patienten
EMG-Dekrement	100%	8 von 8 Patienten
Positiver Effekt von AChE-Inhibitoren	100%	8 von 8 Patienten
Ophthalmoparese	88%	7 von 8 Patienten
Keine signifikante Verschlechterung mit dem Alter	75%	6 von 8 Patienten
Generalisierte Schwäche	63%	5 von 8 Patienten
Schwäche der bulbären oder fazialen Muskulatur	63%	5 von 8 Patienten
Verzögerte motorische Entwicklung	50%	4 von 8 Patienten
Unfähigkeit zu gehen (Rollstuhlabhängigkeit)	13%	1 von 8 Patienten

4.4.2 Spleiß-Mutationen

Sechs der untersuchten 86 CMS-Patienten haben Mutationen an sogenannten Spleiß-Stellen. Spleiß-Stellen sind intronische Sequenzabschnitte, die der Intron-Exon-Grenze direkt benachbart sind. Sie sind wichtige Erkennungsstellen für die sogenannten

Speißosome, die verantwortlich sind für die regelrechte Entfernung der jeweiligen Introns.

4.4.2.1 Spleiß-Mutation ϵ IVS7+2T>C

Bei einer türkischen CMS-Patientin konnte ein homozygoter Basenaustausch von T nach C in Intron 7 nachgewiesen werden. Dieser liegt zwei Basenpaare entfernt von der Grenze des Exon 7 (ϵ IVS7+2T>C).

Das türkische Mädchen ist das zweite Kind gesunder Eltern. Der Vater und die Mutter sind Cousin und Cousine ersten Grades. Eine Muskelerkrankung sowie andere vererbte Erkrankungen sind in der Familie nicht bekannt. An Symptomen zeigten sich seit der neonatalen Manifestation sporadische Trinkschwierigkeiten sowie eine auffallende Ptose, die seit Geburt besteht und im Verlauf des Tages zunimmt. Es fand sich außer der okulären Symptomatik noch eine bulbäre Muskelschwäche. Der Test auf Anti-AChR-Antikörper war negativ.

Mutationsanalysen der konsanguinen nicht erkrankten Eltern ergaben, dass sie jeweils heterozygote Träger der Mutation ϵ IVS7+2T>C sind.

Die in homozygoter Form gefundene Mutation ϵ IVS7+2T>C betrifft die Spleiß-Donor-Stelle in Intron 7. Die Spleiß-Donor-Stelle umfasst die ersten Basenpaare des 5'-Endes des Introns, die fast immer mit GU (Guanin- Uracil) beginnen.

4.4.2.2 Spleiß-Mutation ϵ IVS7-2A>G

Der homozygote Basenaustausch von Adenin nach Guanin in Intron 7, zwei Basenpaare von der Grenze zu Exon 8 entfernt (ϵ IVS7-2A>G), konnte bei drei voneinander unabhängigen europäischen Familien nachgewiesen werden.

Drei männliche und zwei weibliche Patienten im Alter von 4.5 bis 21 Jahren aus drei nicht-verwandten Familien aus Kroatien (Patienten 1 und 2), Ungarn (Patient 3) und Russland (Patienten 4 und 5) wurden klinisch untersucht. Bei allen Patienten zeigten sich eine Ptose, Ophthalmoparese und eine milde generalisierte ermüdbare Muskelschwäche. Die Symptome begannen bei Geburt oder in der frühen Kindheit. Die Krankheit manifestierte sich bei den betroffenen kroatischen Geschwister in Form von schwachem Schreien und Saugen nach der Geburt. Die Bewegungen im Mutterbauch während der Schwangerschaft waren schwach ausgeprägt. Die ersten Symptome des betroffenen ungarischen Jungen (Patient 3) umfassten eine milde Dyspnoe und rekurrende respiratorische Infektionen in der frühen Kindheit. Bei beiden russischen Geschwistern wurde eine Ptose in früher Kindheit bemerkt. Eine generalisierte Muskelschwäche wurde bei dem Jungen mit drei Jahren, bei seiner Schwester erst mit

elf Jahren festgestellt. Bei dem betroffenen Jungen ging die generalisierte Muskelschwäche mit leichten Schwierigkeiten beim Schlucken in der frühen Kindheit einher. Die motorische Entwicklung war bei den ungarischen und russischen Patienten normal (Patienten 3-5), während sie bei den kroatischen Patienten verzögert war. Bei der körperlichen Untersuchung präsentierten sich alle Patienten mit Ptose, Ophthalmoparese und generalisierter Muskelschwäche. Bei allen Patienten konnte eine Schwäche der zervikalen Muskeln und der Muskeln der Handextensoren nachgewiesen werden. Während diese Schwäche bei den ungarischen und russischen Patienten mild ausgeprägt war, erschien die Schwäche der zervikalen Muskeln sowie der Muskeln der Handextensoren bei den kroatischen Geschwistern stärker ausgeprägt zu sein, vor allem bei dem kroatischen Jungen. Eine leichte Progression der Muskelschwäche der unteren Extremitäten wurde bei den Nachfolgeuntersuchungen bei den kroatischen und russischen Geschwistern gesehen.

Tabelle 9: Klinische Symptome bei den Patienten mit Spleiß-Mutationen

Patient	1	2	3	4	5
Mutation	IVS7-2A>G, homozygot	IVS7-2A>G, homozygot	IVS7-2A>G + 70insG	IVS7-2A>G + 1293insG	IVS7-2A>G + 1293insG
Abstammung	Kroatien	Kroatien	Ungarn	Russland	Russland
Alter (in Jahren)	4.5	6	4.5	21	17
Geschlecht	M	W	M	W	M
Krankheitsbeginn	0	0	1	0	(0)
Entwicklungs- verzögerung	+	+	-	-	-
Muskelschwäche					
- generalisiert	+	+	+	+	+
- selektiv	++	++	+/-	+/-	+/-
- Ophthalmoparese	++	++	++	++	++
Dekrement im EMG	++	++	++	+	++
Anti-AChR-AK	-	-	-	-	-
Besserung auf Pyridostigmin	++	++	++	+	++

Die molekulargenetische Analyse ergab folgendes für die drei Familien:

Familie 1 (Kroatien): ϵ IVS7-2A>G, homozygot:

Die Sequenzanalyse der kroatischen Patienten zeigte eine homozygote Punktmutation, die die konservierte Spleiß-Akzeptor-Stelle von Intron 7 betrifft (ϵ IVS7-2A>G). Die gesunden Eltern erwiesen sich als heterozygote Träger für die Mutation ϵ IVS7-2A>G. Nachgewiesen wurde dies durch den Verdau eines 523bp langen PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym *Eco52I*. Die Mutation führt zu einer Restriktionsstelle für *Eco52I*, während der Wildtyp ungeschnitten bleibt.

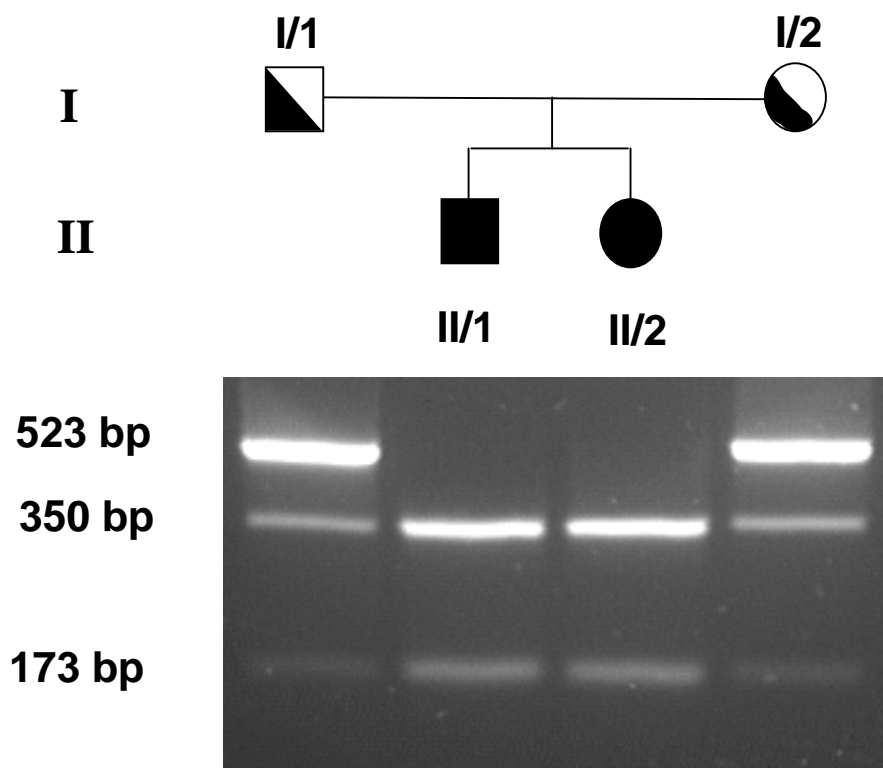


Abbildung 8: Restriktionsverdau zum Nachweis der Spleiß-Mutation ϵ IVS7-2A>G bei einem CMS-Patienten (II/1), seiner betroffenen Schwester (II/2) und seinen nicht betroffenen Eltern (I/1, I/2). Ein PCR-Fragment mit einer Länge von 523bp, das die Exons 7 und 8 der ϵ -Untereinheit des AChR sowie deren angrenzende Intronabschnitte enthält, wurde amplifiziert. Im Falle des Wildtyps enthält das 523bp lange PCR-Fragment keine *Eco52I*-Schnittstelle. Die Mutation ϵ IVS7-2A>G führt zu einer Schnittstelle für *Eco52I*, wodurch das 523bp lange Fragment in zwei Fragmente von 350bp und 173bp geschnitten wird. Der Patient (II/1) sowie seine Schwester (II/2) weisen nur mutiertes Fragment (ϵ IVS7-2A>G) auf. Sowohl das ungeschnittene als auch die geschnittenen Fragmente sind bei dem nicht betroffenen Vater (I/1) und der nicht betroffenen Mutter (I/2) zu erkennen, was deren Heterozygotität für die Mutation ϵ IVS7-2A>G zeigt.

Familie 2 (Ungarn): Mutation ϵ IVS7-2A>G, compound-heterozygot mit Mutation ϵ 70insG:

In heterozygoter Form konnte die Mutation ϵ IVS7-2A>G zusammen mit einer heterozygoten Insertion in Exon 2 (ϵ 70insG) bei einem männlichen Patienten aus Ungarn nachgewiesen werden. Die genetische Analyse ergab, dass der Patient die Spleiß-Mutation ϵ IVS7-2A>G von seiner Mutter und seinem Großvater mütterlicherseits, der griechischer Abstammung ist, geerbt hat (zu Mutationen ϵ 70insG siehe 4.1.1.4).

Familie 3 (Russland): Mutation ϵ IVS7-2A>G, compound-heterozygot mit Mutation ϵ 1293insG:

In ähnlicher Weise sind die russischen Geschwister compound-heterozygot für die Spleiß-Mutation in Intron 7 (ϵ IVS7-2A>G) und für eine andere Frameshift-Mutation in Exon 12 (ϵ 1293insG). Die Frameshift-Mutation wurde auch heterozygot bei der nicht-betroffenen Mutter entdeckt. DNA des Vaters war für die genetische Analyse nicht erhältlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei fünf unserer CMS-Patienten an der Spleiß-Akzeptor-Stelle in Intron 7 die Mutation ϵ IVS7-2A>G nachgewiesen werden konnte.

4.4.3 Promotormutationen

Bei einer russischen Patientin und einem deutschen Patienten gelang der Nachweis von Mutationen im Bereich der sechs Basenpaare umfassenden, sogenannten N-Box, in der 5' gelegenen Promotorregion des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR (*CHRNE*). Die N-Box, deren Wildtyp-Sequenz 5'-CCGGAA-3' lautet, ist 152 Basenpaare vom Exon 1 des Gens der ϵ -Untereinheit entfernt.

4.4.3.1 Promotormutation ϵ -155G>A

Die Sequenzanalyse erbrachte bei der russischen Patientin an Position -155 einen homozygoten Austausch eines Guanins zu einem Adenin (ϵ -155G>A). Die Mutation ϵ -155G>A verändert die Wildtyp-Sequenz der N-Box von 5'-CC G GAA-3' zu 5'-CC A GAA-3' und betrifft die dritte Position des konservierten 6 Basenpaare umfassenden Core der N-Box-Sequenz.

Die Patientin zeigte einen Beginn der Symptomatik nach der Geburt, eine normale motorische Entwicklung ohne auffällige Verzögerungen. Der Verlauf der Krankheit war

allenfalls gering progredient, es gab keine episodischen Krisen. Was die Muskelschwäche angeht, so war sie generalisiert, belastungsabhängig, umfasste eine Ptose sowie bulbäre Symptome. Die Extremitäten waren vor allem proximal betroffen. Die Untersuchungen ergaben ein Dekrement im EMG. Es zeigte sich ferner ein guter Effekt von AChE-Inhibitoren.

4.4.3.2 Promotormutation ϵ -154G>A, compound-heterozygot und Mikrodeletion Δ 1290bp

Innerhalb der 5' gelegenen Promotorregion des AChR- ϵ -Gens ergab die Sequenzanalyse bei einem deutschen Patienten einen heterozygoten Austausch von G nach A an der Nukleotidposition -154 (ϵ -154G>A). Diese Mutation betrifft die vierte Position der konservierten 6bp umfassenden N-Box-Sequenz, die durch die Mutation von 5'-CCG G AA-3' zu 5'- CCG A AA- 3' verändert wird.

Um zusätzliche Mutationen auszuschließen, wurde die gesamte kodierende Region des ϵ -Gens des Patienten sequenziert. Dabei wurde keine andere Mutation gefunden. Die Mutation ϵ -154G>A wurde weder bei 42 nicht-verwandten CMS-Patienten noch bei 50 Normalkontrollen entdeckt. Restriktionsanalysen zeigten, dass die gesunde Mutter und eine gesunde Schwester heterozygote Träger der Mutation sind. Drei weitere gesunde Geschwister sind nicht Träger der Mutation.

Beginnend in früher Kindheit präsentierte sich der 36-jährige deutsche CMS-Patient klinisch mit myasthenen Symptomen einschließlich Ptose, Ophthalmoparese sowie milder fazialer Muskelschwäche und Schwäche der Extremitätenmuskulatur. Zahlreiche serologische Testungen ergaben keinen Nachweis von Anti-AChR-Antikörpern. Zur Zeit präsentiert er sich mit ausgeprägter bilateraler Ptose, einer deutlich eingeschränkten Augenmotilität und belastungsabhängiger generalisierter Muskelschwäche, welche mehr die proximalen als die distalen Muskeln betrifft. Die repetitive Stimulation von einem proximalen Motornerven (*N. accessorius*) zeigte ein Dekrement des Muskelsummenaktionspotentials von 30%, was für eine gestörte neuromuskuläre Übertragung spricht. Der Patient sprach gut auf Azetylcholinesterase-Inhibitoren an. Zur Zeit erhält er Pyridostigminbromid (10mg/kg/Tag). Eine vorangegangene immunsuppressive Therapie mit Azathioprin (100mg/Tag) über einen Zeitraum von 6 Jahren war nicht erfolgreich und wurde nach der molekularen Diagnose eines CMS abgebrochen. Die Eltern und alle fünf Geschwister des Patienten (drei weiblich, zwei männlich) sind klinisch unauffällig.

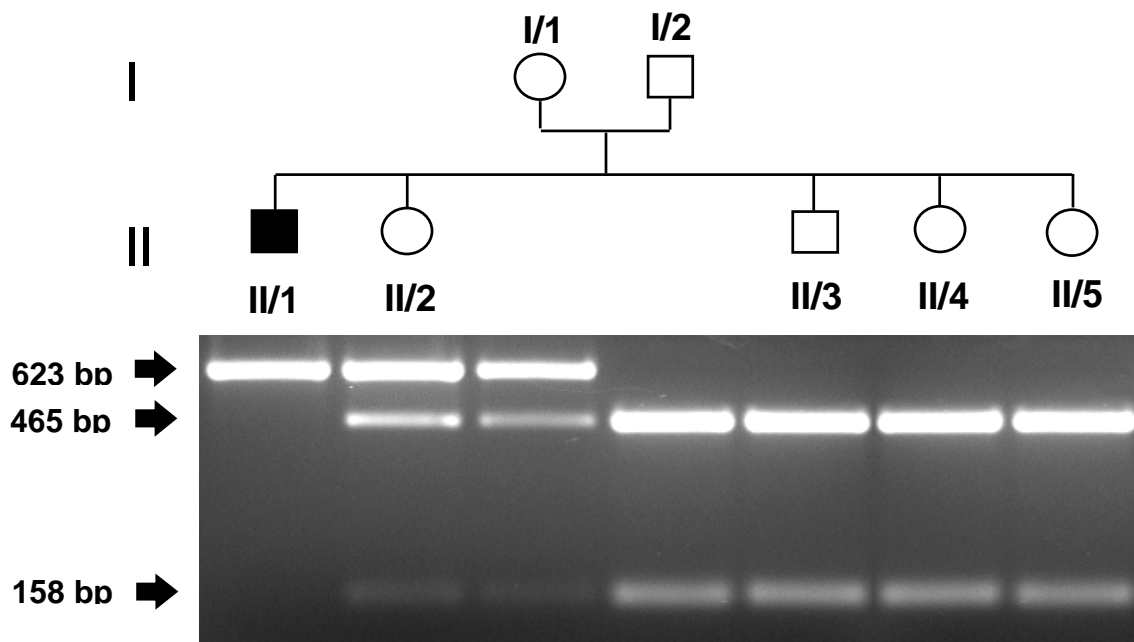


Abbildung 9: Restriktionsverdau zum Nachweis der Promotormutationen ϵ -154G>A bei einem CMS-Patienten (II/1), seinen nicht betroffenen Eltern (I/1, I/2) und vier nicht-betroffenen Geschwistern (II/2-5). Ein PCR-Fragment mit einer Länge von 632bp, das die Promotorregion der ϵ -Untereinheit des AChR enthält, wurde amplifiziert. Der Restriktionsverdau *MspI* erbrachte im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Längen 465bp und 158bp. Die Mutation ϵ -154G>A führt zu einem Verlust der *MspI*-Schnittstelle, wodurch das 632bp-Fragment ungeschnitten bleibt. Der Patient (II/1) weist nur mutiertes Fragment (ϵ -154G>A) auf. Sowohl das ungeschnittene als auch die geschnittenen Fragmente sind bei der nicht betroffenen Mutter (I/1) und bei einer nicht betroffenen Schwester (II/2) zu erkennen, was deren Heterozygotität für die Mutation ϵ -154G>A zeigt. Der Vater (I/2) sowie drei weitere nicht betroffene Geschwister (II/3-5) weisen nur Wildtyp-Fragmente auf und sind damit keine Träger der Mutation (ϵ -154G>A). Zusätzliche Anmerkung: Weitere Untersuchungen, die nicht Teil der vorgelegten Arbeit sind, ergaben bei dem Patienten eine heteroallelele Mikrodeletion von 1290bp im Bereich des AChR- ϵ -Gens ($\epsilon\Delta$ 1290bp). Siehe auch Diskussion.

Tabelle 10: Klinische Symptome bei den Patienten mit Promotormutationen

Patient	1	2
Promotormutation	ϵ -155G>A homozygot	ϵ -154G>A, compound-heterozygot mit Mikrodeletion Δ 1290bp
Abstammung	Russland	Deutschland
Alter (in Jahren)	40	36
Geschlecht	W	M
Krankheitsbeginn	Neonatal	1.LJ
Entwicklungs- verzögerung	+	+
Muskelschwäche		
- generalisiert	+	+
- selektiv	++	++
- Ophthalmoparese	+	++

4.4.4 Mutationen, die zu Austausch oder Verlust einer Aminosäure führen (Missense-Mutationen)

Bei fünf CMS-Patienten wurden vier verschiedene Mutationen in homo- oder heterozygoter Weise entdeckt, die zu einem Austausch oder Verlust einer Aminosäure führen. Dabei handelt es sich um die Mutationen $\epsilon 382T>A$, $\epsilon 652C>T$, $\epsilon 392del3$ und $\epsilon 1304del3$. Welche pathophysiologischen Veränderungen sich durch die Mutationen ergeben, muss noch weiter untersucht werden.

4.4.4.1 Mutation $\epsilon 1304del3$

Mutation $\epsilon 1304del3$, compound-heterozygot mit Mutation $\epsilon 652C>T$:

Die molekulargenetische Analyse des AChR bei zwei deutschen Schwestern ergab jeweils zwei heterozygote Mutationen im Bereich der kodierenden Sequenz der ϵ -Untereinheit des AChR, nämlich eine Deletion von drei Basenpaaren an Position 1304 ($\epsilon 1304del3$) in Exon 12 und eine Punktmutation in Exon 7 an Position 652 ($\epsilon 652C>T$). Die Mutation $\epsilon 652C>T$ wird direkt im Anschluss unter Punkt 4.3.4.2 näher erläutert.

Typische Symptome bei den zwei deutschen Schwestern umfassten eine deutliche tageszeitliche Schwankung der Muskelschwäche, eine eingeschränkte Bulbusbeweglichkeit, eine fluktuierende Ptose, einen Befall bulbärer Muskeln in Form einer nasalen Sprache und mimischer Schwäche, eine leicht proximal betonte Muskelschwäche, ein distales EMG-Dekrement sowie einen deutlich positiven Tensilon-Test. Ansonsten gab es keine Auffälligkeiten. Die Gehfähigkeit war voll erhalten, Muskel-eigenreflexe und Muskelatrophie waren normal, Anti-AChR-Antikörper waren nicht nachweisbar.

Mutationsanalysen zeigten, dass die nicht erkrankten Eltern jeweils nur Träger einer der beiden heterozygoten Mutation sind (Vater: $\epsilon 652C>T$, Mutter: $\epsilon 1304del3$).

Die Deletion von drei Basenpaaren an Position 1304 in Exon 12 ($\epsilon 1304del3$) ist verantwortlich für die Deletion der Aminosäure Asparagin und betrifft die zytoplasmatische Schleife an der Grenze zur vierten transmembranen Domäne (M4).

4.4.4.2 Mutation $\epsilon 652C>T$

Mutation $\epsilon 652C>T$, compound-heterozygot mit Mutation $\epsilon 1304del3$:

Wie in Punkt 4.3.4.1 „Mutation $\epsilon 1304del3$ “ bereits erwähnt, ergab die Sequenzanalyse bei zwei deutschen Schwestern die compound-heterozygoten Mutationen $\epsilon 652C>T$ und $\epsilon 1304del3$. Die klinischen Symptome, Befunde und die molekulargenetische Analyse der Familienangehörigen wurden schon dargestellt.

Die Mutation $\epsilon 652C>T$ führt zu einem Aminosäureaustausch von einem Arginin zu einem Tryptophan ($\epsilon R218W$), was die extrazelluläre Domäne der ϵ -Untereinheit betrifft.

4.4.4.3 Mutation $\epsilon 392del3$

Bei zwei türkischen Patienten (neun und 15 Jahre alt), die aus nicht miteinander verwandten Familien kommen, fand sich jeweils eine homozygote Deletion von drei Nukleotiden in Exon 5 ($\epsilon 392del3$).

Beide Patienten zeigten einen Erkrankungsbeginn in der Neonatalperiode, eine deutliche tageszeitliche Schwankung der Symptome mit Betonung einer Ptose, einem Befall bulbärer Muskeln, einem positiven Tensilon-Test sowie einer geringen Progredienz der Symptome. Bei einem der Patienten war die Einschränkung der Bulbusbeweglichkeit besonders ausgeprägt, und die Muskelschwäche betraf sowohl proximale als auch distale Muskeln. Bei dem anderen Patienten waren häufige respiratorische Probleme in Form obstruktiver Bronchitiden auffällig.

Die Untersuchung der Familie des zwölf Jahre alten Patienten zeigte, dass der Vater, die Mutter und der gesunde jüngere Bruder des Patienten jeweils heterozygote Träger der Mutation $\epsilon 392del3$ sind. Ein weiteres Geschwister des Patienten war im Alter von fünf Monaten plötzlich verstorben. DNA des verstorbenen Kindes zur genetischen Analyse lag nicht vor.

Die gefundene Deletion der drei Basenpaare CCA an Position 392 in Exon 5 des ϵ -Gens führt zu einer Deletion der Aminosäure Glutaminsäure in der extrazellulären Domäne der ϵ -Untereinheit.

4.4.4.4 Mutation $\epsilon 382T>A$

Mutation $\epsilon 382T>A$, compound-heterozygot mit Mutation $\epsilon 1197delG$

Die Sequenzanalyse bei einer deutschen CMS-Patientin enthüllte zwei heterozygote Mutationen, nämlich einen Aminosäureaustausch in Exon 5 an Position 382 ($\epsilon 382T>A$) und eine Deletion von einem Basenpaar an Position 1197 in Exon 11 ($\epsilon 1197delG$). Die Mutation $\epsilon 1197delG$, die auffälligen klinischen Befunde und die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung wurden unter dem Punkt 4.3.1.3 „Mutation $\epsilon 1197delG$ “ bereits näher beschrieben.

Die bei der deutschen Patientin gefundene Mutation $\epsilon 382T>A$ führt zu einem Austausch der Aminosäure Cystein gegen Serin in Exon 5 und betrifft die N-terminale Domäne der ϵ -Untereinheit.

Tabelle 11: Zusammenfassung der klinischen Symptome und Untersuchungsbefunde der fünf Patienten mit Missense-Mutationen der ϵ -Untereinheit des AChR

Patient	1	2	3	4	5
Mutation	ϵ 1304del3, heterozygot mit Mutation ϵ 652C>T	ϵ 652C>T, heterozygot mit Mutation ϵ 1304del3	ϵ 392del3, homozygot	ϵ 392del3, homozygot	ϵ 382T>A, heterozygot mit Mutation ϵ 1197delG
Abstammung	Deutschland	Deutschland	Türkei	Türkei	Deutschland
Alter	11	7	7	14	19
Geschlecht	W	W	M	M	W
Krankheits- beginn	1.LJ	1.LJ	neonatal	neonatal	1.LJ
Entwicklungs- verzögerung	+	+	+	+	+
Muskelschwäche -generalisiert	++	++	+	+	+
-selektiv	+	+	++	++	++
-Ophthalmoparese	++	+	++	++	+
EMG-Dekrement	+	+	+	-	+
Anit-AChR- Antikörper	-	-	-	-	-
Besserung auf Pyridostigmin	++	++	unbekannt	+	++

Tabelle 12: Häufigkeit der klinischen Symptome bei den 5 CMS-Patienten mit Missense-Mutationen der ϵ -Untereinheit des AChR

Ptose	100%	5 von 5 Patienten
Beginn der Symptome im Alter von < 2 Jahren	100%	5 von 5 Patienten
Ophthalmoparese	100%	5 von 5 Patienten
Keine signifikante Verschlechterung mit dem Alter	100%	5 von 5 Patienten
Schwäche der bulbären oder fazialen Muskulatur	100%	5 von 5 Patienten
Verzögerte motorische Entwicklung	100%	5 von 5 Patienten
Positiver Effekt von AChE-Inhibitoren	80%	4 von 5 Patienten
EMG-Dekrement	80%	4 von 5 Patienten

5 Diskussion

5.1 Allgemeines

Bei den Kongenitalen Myasthenen Syndromen handelt es sich um seltene vererbte Störungen der neuromuskulären Übertragung, die durch klinische und genetische Heterogenität gekennzeichnet sind ⁴⁹. Zur Prävalenz von CMS gibt es keine genauen Daten. CMS-Fälle machen etwa 10% aller Myasthenien aus. Im Kindesalter dürfte das Vorkommen von kongenitalen Myasthenien noch häufiger sein ⁷.

Aufgrund der Häufigkeit von Mutationen in der ϵ -Untereinheit untersuchten wir die gesamte kodierende Region und den Promotor der ϵ -Untereinheit des AChR bei 71 nicht-verwandten CMS Familien und entdeckten 14 verschiedene Mutationen.

Die Mutationen, die bei Patienten mit deutscher Abstammung gefunden wurden, sind in der Regel compound-heterozygot. Sie sind entlang der gesamten Länge des Gens der ϵ -Untereinheit verteilt und können verschiedene funktionelle Konsequenzen haben, die zum Teil noch untersucht werden müssen.

5.2 Abstammung der CMS-Patienten

Auffällig ist eine inhomogene Verteilung der Herkunft unserer Patienten, die unter Punkt 4.2 aufgezeigt wurde. Der Anteil der deutschen CMS-Familien beträgt nur etwa 30%. Dagegen stellen Familien nicht-deutscher Herkunft mit etwa 70% den Großteil unseres Patientenguts dar. Dieser hohe Anteil an ausländischen Patienten entspricht nicht der epidemiologischen Situation in Deutschland. Eine gewisse Selektion der Patienten fand sicherlich aufgrund der Tatsache statt, dass uns eine Reihe von Patienten direkt von Kooperationspartnern aus dem Ausland zugewiesen wurde. Hierbei steuerte insbesondere unser ungarischer Kooperationspartner viele Patienten bei. Jedoch waren auch unter den Patienten, die uns aus deutschen Zentren zugewiesen wurden, überdurchschnittlich viele Patienten aus Südosteuropa. Eine der Ursachen dafür ist sicherlich, dass diese Länder und insbesondere die Länder des ehemaligen Jugoslawiens (Serbien, Kroatien, Mazedonien und Kosovo) nach den Kriegereignissen auf dem Balkan wichtige Einwanderungsländer für Deutschland darstellen. Anzumerken ist, dass auch andere Arbeitsgruppen Mutationen in Genen, die für die ϵ -Untereinheit des AChR kodieren, häufig bei CMS-Patienten nachweisen konnten, die einen ähnlichen ethnischen Background haben ⁴⁷.

CMS treten in der südosteuropäischen Bevölkerung möglicherweise überdurchschnittlich häufig auf, was mit einem eventuell höheren Maß an Konsanguinität innerhalb kleiner homogener Populationen (zum Beispiel in der Volksgruppe der Roma) in diesem Raum zusammenhängen könnte ⁶⁹. Da es aufgrund

der relativen Seltenheit der CMS bislang keine gesicherten epidemiologischen Daten gibt, lässt sich diese Vermutung jedoch nicht mit Sicherheit belegen.

Auffällig ist weiterhin, dass ein positiver Mutationsnachweis insbesondere bei Patienten aus dem südosteuropäischen Raum und weniger bei deutschen CMS-Patienten gelang (vergleiche Abbildung 6). Ursache hierfür ist zum einen das häufige Vorkommen der Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ in der Bevölkerungsgruppe der Roma. Für diese Mutation gibt es inzwischen Hinweise für das Vorliegen eines Founder-Effektes⁷⁵. In der mitteleuropäischen Bevölkerung, in der sich im Rahmen dieser Arbeit nur wenige pathogene Mutationen im Bereich des Gens der ϵ -Untereinheit identifizieren ließen, liegen dagegen möglicherweise häufiger Mutationen in anderen CMS-Genen vor.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Mutationen, die einen primären AChR-Mangel verursachen, die häufigste Ursache für autosomal-rezessive CMS sind^{5, 35, 42, 47}; eine große Anzahl von Mutationen wurde im Gen der ϵ -Untereinheit des AChR entdeckt^{42, 46, 47}. Zwei Gründe sprechen dafür, dass Mutationen häufig im ϵ -Gen des AChR lokalisiert sind. Zum einen übersteigt der GC-Gehalt im ϵ -Gen (61,2%) den von Genen der anderen AChR-Untereinheiten bei weitem, was die Anfälligkeit der DNA für Veränderungen erhöht. Zum anderen kann das Fehlen der adulten ϵ -Untereinheit zum Teil durch Expression der fetalen γ -Untereinheit kompensiert werden. Die meisten Nullmutationen anderer Untereinheiten sind wahrscheinlich tödlich infolge des Fehlens einer substituierenden Untereinheit⁴³. Eine weitere Ursache für ein besonders häufiges Vorkommen einer Mutation in bestimmten Bevölkerungsgruppen könnte in einem umweltbedingten Selektionsvorteil heterozygoter Genträger bedingt sein. Dies ist beispielsweise so bei der erhöhten Malariaresistenz heterozygoter beta-Thalassämieträger im Mittelmeerraum. Allerdings findet sich für Mutationen der ϵ -AChR-Untereinheit diesbezüglich kein Anhalt.

5.3 Nachgewiesene Mutationen der ϵ -Untereinheit des AChR

5.3.1 Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$

Bei insgesamt 40 CMS-Patienten aus 31 unabhängigen Familien konnten Frameshift-Mutationen nachgewiesen werden. Dies sind 80% (40/50), bezogen auf die 50 CMS-Patienten, bei denen Mutationen nachgewiesen wurden. Ein Frameshift in der Nukleotidsequenz führt zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zu einer fehlerhaften Translation mit einer Peptidkette bei der die Abfolge und/oder die Anzahl

der aufeinander folgenden Aminosäuren verändert ist. Damit ist der Nachweis einer Frameshift-Mutation immer ein starker Hinweis auf die Pathogenität einer Mutation.

Eine spezielle Frameshift-Mutation, die in Exon 12 zum Verlust eines G-Nukleotids führt ($\epsilon 1267\text{delG}$), konnten wir bei besonders vielen CMS-Patienten homozygot nachweisen. Tatsächlich gelang der Nachweis dieser Mutation bei 33 (38%) von 86 Patienten, die aus 26 (37%) von 71 nicht-verwandten Familien kommen. Die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ war bei 100 Normalkontrollen nicht nachweisbar. Andere Mutationen wurden bei den Patienten nicht gefunden. Das heterozygote Auftreten der Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ reichte entsprechend dem autosomal-rezessiven Erbgang nicht aus, um ein CMS zu verursachen. Die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ betrifft die lange zytoplasmatische Schleife der ϵ -Untereinheit des AChR, in der Mutationen besonders zahlreich auftreten. Es kommt zu einer Rasterverschiebung nach Codon 422 mit 63 darauf folgenden Missense-Codons, auf die ein Stop-Codon folgt. Die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ könnte aufgrund ihrer Nähe zur Spleiß-Akzeptor-Stelle aber auch zu abweichenden Spleißprodukten führen²⁹.

Die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ ist schon vorher von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden: Croxen *et al.* identifizierten sie zuerst bei fünf Familien, die aus verschiedenen Ländern (Pakistan, Indien, Ägypten, Griechenland) stammen²⁶. Middleton *et al.* entdeckten die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ bei drei griechischen und zwei türkischen Familien, wobei vier Familien von Roma abstammten⁸³.

Middleton *et al.* waren es auch, die durch *in vitro* Expressionsstudien die Pathogenität der Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ erhärten konnten. Sie konnten durch Messung der verminderten Zahl von α -Bungarotoxin-Bindungsstellen und durch das biphasische Bindungsverhalten von ACh an den mutierten AChR zeigen, dass die mutierte ϵ -Untereinheit in erheblich geringerem Ausmaß oder gar nicht in das AChR-Pentamer eingebaut wird⁸³.

Auch in unserem Patientengut kommen alle $\epsilon 1267\text{delG}$ -Familien ursprünglich aus südosteuropäischen Ländern oder stammen von Roma ab^{5, 61}. Die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ wurde bei über 50% (26/45) der Familien nicht-deutscher Abstammung gefunden, dagegen in keiner Familie, die aus Deutschland stammte (0/26).

Die klinische Untersuchung unserer Patienten erbrachte einen Phänotyp für die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$, der dem von Patienten mit anderen Frameshift-Mutationen oder Missense-Mutationen mit niedriger Expression (Low-Expressor-Mutation) der ϵ -Untereinheit ähnelt⁵. Wie derartige CMS-Patienten auch, so zeigten unsere $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten einen frühen Erkrankungsbeginn und eine myasthene Symptomatik, einschließlich bilateraler Ptose, bulbärer Schwäche und ermüdbarer generalisierter Muskelschwäche der Arm- und Beinmuskeln. Zudem sprachen alle $\epsilon 1267\text{delG}$ -

Patienten günstig auf eine Medikation mit Azetylcholinesterase-Inhibitoren an, obwohl sich einige Symptome in der Langzeitbehandlung als refraktär erwiesen. Die meisten $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten zeigten einen milden, nicht-progressiven Verlauf des Krankheitsbildes. Eine Ophthalmoparese fand sich in über 90% der Fälle. Unter den CMS-Patienten, bei denen die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ nicht entdeckt wurde, betrug die Häufigkeit eines okulären Motilitätsdefekts dagegen nur ungefähr 50%¹. Es wurden noch andere klinische Zeichen analysiert, um zwischen $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten und anderen Formen differenzieren zu können. Bei keinem der $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten waren zervikale, skapuläre oder die Muskeln der Fingerextensoren betroffen, wie man es typischerweise beim Slow-Channel-CMS (SCCMS) finden würde.

Bei $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten wurde über keine repetitive Muskelantwort im Einzelfaser-EMG berichtet. Ein hoher Gaumen wurde bei einigen $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten gesehen. Faziale Malformationen jedoch, wie sie bei iranischen CMS-Patienten gefunden wurden, wurden nicht beschrieben⁵⁵. Der Schweregrad der Krankheit unter den $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten war bemerkenswert variabel, angefangen von Ptose und Befall der extraokulären Muskulatur als dem einzigen Symptom, bis hin zu einer ausgeprägten generalisierten Muskelschwäche, die zu deutlicher körperlicher Behinderung führt. Um die Faktoren für einen schwereren Phänotyp zu überprüfen, wurden zwei Patienten mit stark eingeschränktem Gehvermögen analysiert. Beide Patienten, die mittlerweile 13 und sieben Jahre alt sind, zeigten eine Verzögerung der motorischen Entwicklung in der Kindheit, die nur bei sieben von 23 $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten gefunden wurde. Im Gegensatz dazu hatten alle Patienten mit normaler motorischer Entwicklung in den ersten zwei Lebensjahren einen milden Phänotyp.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind sowohl von wissenschaftlichem als auch von klinischem Interesse. Patienten südosteuropäischer Abstammung sollten auf die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ getestet werden, bevor andere Tests zur Anwendung kommen. Wir stellen die Hypothese auf, dass die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ zu einem hohen Prozentsatz bei diesen Patienten gefunden wird, was andere Untersuchungen überflüssig machen würde. Unsere Ergebnisse unterstützen die These, dass die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ eine häufige Ursache von CMS bei Patienten aus der Volksgruppe der Roma ist^{5, 72}. Die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ verursacht einen milden Phänotyp, der charakterisiert ist durch eine Ophthalmoplegie und ein gutes Anprechen auf Azetylcholinesterase-Inhibitoren.

5.3.2 Andere Frameshift-Mutationen und Stopmutationen

Bei sieben (8,1%) von 86 Patienten, die aus fünf (7,0%) von 71 nicht-verwandten Familien kommen, konnten verschiedene andere Frameshift-Mutationen gefunden werden. Darunter waren zwei Insertionen ($\epsilon 70\text{insG}$ und $\epsilon 1293\text{insG}$) sowie zwei

Deletionen ($\epsilon 1197\text{delG}$, $\epsilon 1369\text{delG}$) von jeweils einem Basenpaar. Darüber hinaus fand sich eine Stop-Mutation ($\epsilon 1132\text{C}>\text{T}$).

In homozygoter Form wurde die Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$ bei zwei libyschen Geschwistern nachgewiesen, in heterozygoter Form zusammen mit der Mutation $\text{IVS7-2A}>\text{G}$ bei zwei russischen Geschwistern. Eine G-Insertion nach dem Nukleotid 1293 in Exon 12 des ϵ -Gens ($\epsilon 1293\text{insG}$) führt dabei zu einem Frameshift, der die lange zytoplasmatische Schleife zwischen M3 und M4 betrifft.

Bei einem ungarischen Patienten konnte eine G-Insertion an Position 70 in Exon 2 ($\epsilon 70\text{insG}$) in heterozygoter Form nachgewiesen werden. Die Mutation $\epsilon 70\text{insG}$ betrifft die N-terminale extrazelluläre Domäne des AChR und verursacht durch die Rasterverschiebung einen vorzeitigen Abbruch der Peptidkette.

Die zwei Deletionen $\epsilon 1197\text{delG}$ und $\epsilon 1369\text{delG}$ wurden jeweils bei deutschen Patienten entdeckt. $\epsilon 1197\text{delG}$ betrifft Exon 11 und somit die lange zytoplasmatische Schleife, während $\epsilon 1369\text{delG}$ die vierte transmembrane Domäne (M4) betrifft und dort eine Rasterverschiebung verursacht.

Bei einem türkischen Patienten gelang der Nachweis des homozygoten Austausches von C nach T in Exon 12 ($\epsilon 1132\text{C}>\text{T}$), der zur Einfügung eines Stop-Codons und somit zwangsweise zum Kettenabbruch führt.

Das alleinige heterozygote Auftreten einer Mutation reichte entsprechend dem autosomal-rezessiven Erbgang der Krankheit nicht aus, um CMS zu verursachen.

Die Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$ wurde bereits von Engel *et al.* in heterozygoter Form zusammen mit $\epsilon 1101\text{insT}$ als compound-heterozygote Mutation beschrieben⁴³. Ihm gelang der Nachweis der Mutation durch folgende Untersuchungen: (1) Zum einen waren keine anderen Mutation in den Genen der α -, β -, δ - und ϵ -Untereinheit des AChR nachweisbar, (2) die Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$ war unter 100 Normalkontrollen nicht zu finden. (3) Hinzu kamen die Ergebnisse aus Expressionsstudien mit dem Nachweis einer stark verminderten Expression von mutierten AChR an der Oberfläche von bestimmten embryonalen Zellen⁴³.

Die Mutation $\epsilon 70\text{insG}$ ist ebenfalls bereits von einer anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden⁹⁷. Für die Pathogenität von $\epsilon 70\text{insG}$ spricht die Insertion eines G-Nukleotids, die zu einer Rasterverschiebung führt. Ihre Pathogenität wurde durch Expressionsstudien bewiesen⁹⁷. Auch die Familienanalyse bei unserem Patienten spricht für die Pathogenität von $\epsilon 70\text{insG}$, denn alle heterozygoten Träger sind gesund, homozygote Träger sind krank und Familienmitglieder, die keine der beiden heterozygoten Mutationen tragen, sind ebenfalls gesund.

Die Mutation $\epsilon 1369\text{delG}$ ist bislang noch nicht durch andere Arbeitsgruppen bei Patienten mit kongenitaler Myasthenie beschrieben worden. Der Vergleich mit

ähnlichen beschriebenen Mutationen, die zu einem Kettenabbruch im Bereich der langen zytoplasmatischen Schleife der ϵ -Untereinheit des AChR führen, legt eine Pathogenität der Mutation nahe ⁹⁷.

Für die Pathogenität von $\epsilon 1197\text{delG}$ spricht der Erbgang – der kranke Patient erhält je eine heterozygote Mutation von seinen gesunden Eltern, die jeweils heterozygote Träger einer Mutation sind- und die Rasterverschiebung, die durch die Deletion entsteht.

Die Stopmutation $\epsilon 1132\text{C}>\text{T}$ ist bislang nicht durch andere Arbeitsgruppen bei Patienten mit kongenitaler Myasthenie beschrieben worden. Der Vergleich mit ähnlichen beschriebenen Mutationen, die zu einem Kettenabbruch im Bereich der großen zytoplasmatischen Schleife der ϵ -Untereinheit des AChR führen, legt eine Pathogenität der identifizierten Stop-Mutation nahe ⁹⁷.

Was diese Untersuchung betrifft, so stammen die Patienten mit anderen Frameshift- und Stopmutationen außer $\epsilon 1267\text{delG}$ aus den verschiedensten Ländern, namentlich aus Ungarn, Libyen, Russland, Deutschland und der Türkei. Diese anderen Frameshift- und Stopmutationen außer $\epsilon 1267\text{delG}$ wurden bei 8,9% (4/45) der Familien nicht-deutscher Abstammung gefunden, verglichen mit 3,7% (1/27) der Familien deutscher Abstammung.

Die klinische Analyse der Patienten mit Frameshift- oder Stopmutationen enthüllte einen Phänotyp, der dem von Patienten mit anderen Frameshift-Mutationen oder Missense-Mutationen mit niedriger Expression (Low-Expressor-Mutation) der ϵ -Untereinheit ähnelt. Typische Symptome umfassten einen frühen Erkrankungsbeginn und myasthenische Symptome, einschließlich bilateraler Ptose, bulbärer Schwäche und ermüdbarer generalisierter Muskelschwäche der Arm- und Beinmuskeln. Bei fast allen Patienten zeigte die Gabe von Azetylcholinesterase-Inhibitoren einen günstigen Effekt. Eine Ophthalmoparese fand sich in 88% der Fälle (7/8). Der klinische Verlauf war bei 75% der Patienten mild. Zwei Patienten zeigten allerdings einen auffällig schweren Verlauf. Die deutsche Patientin mit der homozygoten Mutation $\epsilon 1369\text{delG}$ wurde im Alter von 10 Jahren rollstuhlpflichtig, und der türkische Patient mit der Stopmutation $\epsilon 1132\text{C}>\text{T}$ verstarb infolge einer Aspiration.

Bei keinem Patienten waren zervikale, skapuläre oder die Muskeln der Fingerextensoren betroffen, wie man es typischerweise beim Slow-Channel-CMS (SCCMS) finden würde ³⁵.

Faziale Malformationen wurden ebenso wie bei den Patienten mit der Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ nicht beschrieben ⁵⁵.

5.3.3 Spleiß-Mutationen

Neben Frameshift- und Stopmutationen in der kodierenden Region des ϵ -AChR-Gens identifizierten wir in einigen Patienten auch Mutationen im Bereich der Exon-angrenzenden Intronbereiche, die Spleiß-Stellen betrafen.

Spleiß-Stellen sind bestimmte im Intron gelegene Basenpaare nahe der Intron-Exon-Grenze der prä-mRNA, an denen beim letzten Schritt zur Bildung einer gereiften, funktionellen mRNA die Introns entfernt und die Exons verknüpft werden.

Die Spleiß-Mutation ϵ IVS7-2A>G des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR wurde bei drei unabhängigen europäischen CMS-Familien nachgewiesen. Zwei kroatische Geschwister sind homozygot für diese Mutation, und drei Patienten aus unabhängigen ungarischen und russischen Familien sind compound-heterozygot für ϵ IVS7-2A>G sowie für die Insertion eines Basenpaares an der Nukleotidposition 70 oder 1293 des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR.

Der Krankheitsverlauf war bei allen Patienten relativ mild und vergleichbar mit dem von Patienten mit anderen bereits beschriebenen AChR- ϵ -Mutationen, die zu verminderter Expression des Rezeptors führen^{5, 35, 97}.

Ein früher Beginn der generalisierten Muskelschwäche, die in erster Linie die proximalen Muskeln betraf, eine Ptose und Ophthalmoparese unterschiedlichen Ausmaßes waren bei allen Patienten zu finden. Die zwei kroatischen Geschwister zeigten zusätzlich klinische Symptome in Form einer leichten Entwicklungsverzögerung und einer betonten proximalen Muskelschwäche, die die zervikalen Muskeln und die Muskeln der Hand- und Fingerextensoren betraf.

Die bei den kroatischen Geschwistern deutlicher hervortretende selektive Schwäche der Hals-, Hand- und Fingerstreckmuskulatur besteht für gewöhnlich nicht bei CMS mit AChR-Mangel, sondern wird häufiger bei älteren Patienten mit SCCMS oder AChE-Mangel gefunden³⁵. Im Gegensatz dazu sprechen der autosomal-rezessive Erbgang, die Abwesenheit eines repetitiven Muskelsummenaktionspotentials, das gute Ansprechen auf AChE-Inhibitoren und der relativ milde Krankheitsverlauf gegen die Diagnose eines SCCMS³⁵.

Heterozygote oder seltenere homozygote rezessive Mutationen des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR verursachen häufig eine verminderte Expression des AChR an der neuromuskulären Endplatte³⁵. Beide Frameshift-Mutationen (ϵ 70insG und ϵ 1293insG), die in heterozygoter Form nachgewiesen wurden, wurden schon vorher beschrieben. Beide verursachen wahrscheinlich ein unreifes Translationsprodukt.

Vieles spricht für eine pathogene Rolle der Mutation ϵ IVS7-2A>G bei CMS-Patienten: (1) die Mutation wurde nicht in 100 Kontrollchromosomen nachgewiesen, (2) die Mutation wurde bei drei unabhängigen Familien entdeckt, (3) die Mutation betrifft das

hochkonservierte vorletzte Nukleotid am 3'-Ende von Intron 7 und dadurch die Spleiß-Akzeptor-Sequenz^{19, 20}, (4) die Mutation wurde entweder homozygot in einer blutsverwandten Familie oder heterozygot mit bekannten Frameshift-Mutationen in zwei nicht-verwandten Familien nachgewiesen, (5) die Mutation kosegregiert mit dem klinischen Phänotyp in allen Familienmitgliedern und (6), was am wichtigsten ist, die Mutation führt zu einem einzelnen aberranten Spleiß-Produkt des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR¹⁰. Die Analyse mit Hilfe der RT-PCR aus dem Muskel des kroatischen Jungen zeigte die Exklusion von Exon 8 aus der muren mRNA, was zu 14 Missense-Codons nach Codon 247 führt, dem ein Stop-Codon folgt¹⁰. Dies bewirkt eine stark reduzierte Expression der ϵ -Untereinheit an der Synapse. Ähnlich konnte bei einer anderen Spleiß-Mutation gezeigt werden, dass sie zu einer Defizienz des AChR führt^{15, 97}.

Bei einer türkischen CMS-Patientin konnte die Spleiß-Donor-Mutation ϵ IVS7+2T>C homozygot nachgewiesen werden. In heterozygoter Form wurde diese Mutation schon vorher von Ohno *et al.* auch bei türkischen Patienten beschrieben⁹⁷. Wie schon für andere Mutationen auch, so konnte für die Mutation ϵ IVS7+2T>C die Pathogenität erwiesen werden: Mit Hilfe von *in vivo* Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Mutation dazu führt, dass das mutierte ϵ -Gen in geringem Ausmaß oder gar nicht exprimiert wird⁹⁷.

Letztlich gelang allerdings nicht der Nachweis, ob es durch die Spleiß-Donor-Mutation ϵ IVS7+2T>C zu einer Retention von Intron 7 (ϵ IVS7+2T>C + Intron 7) oder zu einem Skipping (Entfernung) von Exon 7 (ϵ IVS7+2T>C – Exon 7) kommt, da beide Varianten die oben beschriebenen pathogenen Veränderungen bewirken können⁹⁷. Um diesen Nachweis in unserem Patienten zu führen, wäre Muskelgewebe des Patienten nötig gewesen.

5.3.4 Promotormutationen

Eine AChR-Defizienz oder inadäquate Genexpression kann bedingt sein durch Mutationen in regulatorischen Abschnitten eines Gens. N-Boxen sind solche regulatorischen Elemente im Bereich von Promotoren, die verantwortlich sind für die synapsenspezifische Expression von Genen. Promotormutationen, die andere Krankheiten verursachen, sind beschrieben worden, so zum Beispiel im Fall der Hämophilie^{24, 25, 123}. Der Promotor der ϵ -Untereinheit des AChR ist zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert und überaus wichtig für die synapsenspezifische Genexpression. Von Mutagenese-Untersuchungen an der Maus ist bekannt, dass Mutationen des N-Box-Elements und andere Promotor-Mutationen direkt die Genexpression an der Endplatte betreffen^{33, 57, 116}.

Bei einer russischen Patientin in unserem Patientengut wurde die Promotormutation ϵ -155G>A entdeckt, die die Position 3 der N-Box betrifft. Ohno *et al.* identifizierten diese Mutation ϵ -155G>A schon vorher bei einem türkischen Jungen⁹⁶. Bei einem unserer deutschen Patienten gelang der Nachweis der hemizygoten Promotormutation ϵ -154G>A, die die vierte Position der konservierten 6 bp umfassenden N-Box-Sequenz betrifft. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde die Mutation ϵ -156C>T beschrieben, die die Position 2 der N-Box betrifft⁹³.

In allen Fällen aus der Literatur sowie in unseren Untersuchungen kosegregiert das mutierte Allel mit dem Phänotyp eines Kongenitalen Myasthenen Syndroms auf autosomal-rezessive Weise. Homozygote Träger der Mutation zeigen myasthene Symptome, während heterozygote Träger nicht betroffen sind.

Der Effekt der spezifischen Punktmutation ϵ -156G>A im N-Box-Motif unseres Patienten, der die Sequenz CCGGAA zu CCGAAA verändert, wurde in zwei weiteren Untersuchungen analysiert. Dabei konnte mit Hilfe von *in vivo* Expressionsstudien mit AChR- ϵ -Promotorkonstrukten nachgewiesen werden, dass die hemizygoten N-Box-Mutation ϵ -154G>A zu einer schweren Reduktion der Expression der ϵ -Untereinheit des AChR im Skelettmuskel des Patienten führt⁴. Diese Ergebnisse stimmen mit den Arbeiten anderer überein⁹³.

5.3.5 Missense-Mutationen

Die bei einer deutschen CMS-Patientin gefundene heterozygote Mutationen ϵ 382T>A führt zu einem Aminosäureaustausch von Cystein nach Serin an Position 128 (ϵ 128C>S). Milone *et al.* lieferten wichtige Hinweise auf die Pathogenität der Mutation ϵ 382T>A^{85, 87}. Mit Hilfe von Expressionsstudien an Embryonalzellen zeigten sie, dass ϵ 382T>A dazu führt, dass die mutierte ϵ -Untereinheit in geringerem Ausmaß als normal oder gar nicht (Nullmutation) in den an der Zelloberfläche liegenden AChR inkorporiert wird⁸⁷. Die von der Mutation betroffene schwefelhaltige Aminosäure Cystein bildet normalerweise eine Disulfidbrücke mit einem anderen Cystein (ϵ C142) in der extrazellulären Domäne der ϵ -Untereinheit. Beide Cysteine sind in allen Subtypen und Spezies der AChR-Untereinheiten als auch in allen Untereinheiten der AChR-Superfamilie konserviert^{89, 128}. Der Verlust dieser strategisch wichtigen Aminosäure¹¹⁹ verhindert die Ausbildung der konservierten Disulfidschleife in der extrazellulären Domäne der ϵ -Untereinheit. Dies könnte die korrekte Zusammenlagerung der fünf Untereinheiten des AChR beeinträchtigen⁵⁹.

Die molekulargenetische Analyse des AChR bei zwei deutschen Schwestern ergab jeweils zwei heterozygote Mutationen im Bereich der kodierenden Sequenz der ϵ -Untereinheit des AChR, nämlich eine Deletion von drei Basenpaaren an Position 1304

(ϵ 1304del3) in Exon 12 und eine Punktmutation in Exon 7 an Position 652, die zu einem Aminosäureaustausch von einem Arginin zu einem Tryptophan führt (ϵ R218W). Dies betrifft die extrazelluläre Peptidstelle nahe der ersten transmembranen Domäne (M1).

Ohno *et al.* entdeckten mit der Mutation P245L eine Mutation, die ebenfalls der M1-Domäne benachbart ist ¹⁰⁵, allerdings den intrazellulären Bereich betrifft, welcher C-terminal von M1 gelegen ist. Bei der von Ohno *et al.* gefundenen Missense-Mutation kommt es zur Mutation eines Prolins an Aminosäureposition 245 (ϵ P245L). Das mutierte P245 ist Teil einer palindromischen Sequenz, von der man annimmt, dass sie das C-terminale Ende der transmembranären M1-Domäne markiert. Die strukturelle Funktion von Prolin könnte darin liegen, die M1-Domäne in der zytoplasmatischen Membran zu verankern und auf diesem Wege die notwendige Mobilität der M2-Domäne zu gewährleisten, die die Kanalpore begrenzt. Funktionelle Charakterisierungen der Mutation ϵ P245L ergaben, dass sie zu einer verlängerten Kanalöffnungszeit und damit zu einem Slow-Channel-Syndrom führt ¹⁰⁵.

Auch die von uns identifizierte Mutation ϵ R218W könnte aufgrund der Nachbarschaft zur M1-Domäne eine entscheidende Rolle bei der Verankerung der M1-Domäne spielen und damit Folgen für die kinetischen Eigenschaften des AChR-Kanals haben.

Für die Pathogenität der Mutation ϵ 652C>T im compound-heterozygoten Zustand spricht neben dem Erbgang, dass eine hoch konservierte Aminosäure der ϵ -Untereinheit des AChRs betroffen ist, wie der Vergleich mit verschiedenen Spezies (Kalb, Ratte, Maus) und den homolog aufgebauten anderen Untereinheiten (α , β , γ und δ) zeigt.

Weitere Untersuchungen müssen folgen, um die Pathogenität sicher beweisen zu können und in Zukunft die sichere genetische Beratung und Diagnostik in dieser Familie zu ermöglichen.

Bei zwei türkischen Patienten aus jeweils getrennten Familien fand sich die homozygote Deletion von 3 Nukleotiden in Exon 5 (ϵ 392del3), die zum Verlust der polaren Aminosäure Glutaminsäure an der Position 131 führt.

Die Mutation ϵ 392del3 liegt in der N-terminalen extrazellulären Proteindomäne der ϵ -Untereinheit innerhalb einer konservierten Disulfid-Schleife und ist bislang nicht durch andere Arbeitsgruppen bei Patienten mit kongenitaler Myasthenie beschrieben worden. Die Mutation ϵ 392del3 ließ sich in 100 untersuchten Chromosomen von Normalkontrollen nicht nachweisen.

Die Disulfid-Schleife ist entscheidend für die korrekte Zusammenlagerung der fünf Untereinheiten des AChR, was Milone *et al.* durch den molekulargenetischen Nachweis der Mutation ϵ 128C>S belegen konnten ⁸⁷. Bei dieser Mutation kommt es durch den

Austausch von T nach A an Nukleotidposition 382 in Exon 5 des ϵ -Gens zu einem Austausch der Aminosäure Cystein nach Serin an Aminosäureposition 128 (ϵ 128C>S)⁸⁷. Normalerweise ist das mutierte Cystein an Position 128 an einer Disulfid-Brücke mit einem anderen Cystein an Position 142 beteiligt. Beide Cysteine sind in allen Untereinheiten des AChR, durch alle Spezies als auch durch alle Untereinheiten der AChR-Superfamilie von Ionenkanälen konserviert^{89, 128}. Andere Untersuchungen zeigten, dass eine intakte Disulfid-Brücke wichtig ist für die regelrechte Zusammenlagerung der einzelnen Untereinheiten des AChR zu einem Pentamer⁵⁸. Die analoge Mutation α 128C>S in der alpha-Untereinheit hat ähnliche Folgen wie die Mutation ϵ 128C>S, indem sie auch zu einer Unterbrechung im Prozess der Zusammenlagerung der Untereinheiten führt⁵⁹. Letztlich konnte mit Hilfe von Expressionsuntersuchungen gezeigt werden, dass es sich bei der Mutation ϵ C128S um eine Null-Mutation handelt, bei der es die mutierte ϵ -Untereinheit nicht in das Oberflächenpentamer inkorporiert wird⁸⁹.

Die von uns identifizierte Mutation ϵ 392del3 liegt also in der strategisch wichtigen Disulfid-Schleife. Ebenso wie die von Milone *et al.* entdeckte Mutation ϵ 128C>S könnte ϵ 392del3 die korrekte Zusammenlagerung der fünf Untereinheiten des AChR beeinträchtigen und so das klinische Bild eines CMS erzeugen. Für die Pathogenität der bei unseren CMS-Patienten gefundenen Mutation ϵ 392del3 spricht zudem, dass sie auf 100 untersuchten Chromosomen von Normalkontrollen nicht nachweisbar war und dass Vater, Mutter und jüngerer Bruder des einen Patienten gesunde heterozygote Träger der Mutation sind, während unsere compound-heterozygote Patienten erkrankt sind. Diese Befunde stützen die Hypothese, bei den Patienten die pathogene Mutation identifiziert zu haben. Um die pathophysiologischen Folgen noch näher zu untersuchen, sind allerdings weitergehende elektrophysiologische Untersuchungen notwendig.

Die molekulargenetische Analyse des AChR bei zwei deutschen Schwestern ergab jeweils zwei heterozygote Mutationen im Bereich der kodierenden Sequenz der ϵ -Untereinheit des AChR, nämlich eine Deletion von drei Basenpaaren an der Nukleotidposition 1304 (ϵ 1304del3) in Exon 12 und eine Punktmutation in Exon 7 an Stelle 652 (ϵ 652C>T). Die Mutation ϵ 1304del3 ist verantwortlich für die Deletion der Aminosäure Asparagin und betrifft die zytoplasmatische Schleife an der Grenze zur vierten transmembranen Domäne (M4).

Die Mutation ϵ 1304del3 ist bisher noch nicht von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden, und die Pathogenität von ϵ 1304del3 ist noch unklar. Andere Mutationen in ähnlicher Lage, die keine Rasterverschiebung verursachen, sondern den Verlust von nur einer Aminosäure bewirken, sind bisher nicht identifiziert worden.

Milone *et al.* identifizierten eine Mutation, die auch in der langen zytoplasmatischen Schleife lokalisiert ist und die auch zu einer Veränderung der Primärstruktur des AChR führt, ohne eine Rasterverschiebung zu verursachen. Es handelt sich um die Mutation $\epsilon 1254\text{ins}18$ ⁸⁵. $\epsilon 1254\text{ins}18$ verursacht die Duplikation von 18 Nukleotiden an den Positionen 1237 bis 1254 in Exon 11, die eine Duplikation der Codons für Serin-Threonin-Arginin-Asparagin-Glutamin-Glutamat an den Positionen 413 bis 418 in der langen zytoplasmatischen Schleife zwischen M3 und M4 voraussagt. Interessanterweise ergaben morphologische und elektrophysiologische Untersuchungen, dass die Mutation $\epsilon 1254\text{ins}18$ sowohl zu einer verminderten Expression von AChR an der motorischen Endplatte (Low-Expressor-Mutation) als auch zu kinetischen Veränderungen im Sinne eines Fast-Channel-Syndroms führt⁸⁵.

Bisher sind nur wenige Mutationen bekannt, die das autosomal-rezessiv vererbte Fast-Channel-Syndrom verursachen. Beschriebene Mutationen liegen an verschiedenen Stellen der Gene, welche für die α - oder die ϵ -Untereinheiten kodieren^{41, 108}. Die typischen klinischen Symptome und Untersuchungsbefunde bei CMS-Patienten mit Fast-Channel-Syndrom – wie auch bei der von Milone *et al.* beschriebenen Patientin mit der Mutation $\epsilon 1254\text{ins}18$ - umfassen eine milde Schwäche von okulären, zervikalen und Extremitätenmuskeln seit der frühen Kindheit, eventuell Apnoe-Anfälle mit fluktuierender Ptose, ein Dekrement im EMG bei 2-3Hz-Stimulation und ein unauffälliges histologisches Bild in der Muskelbiopsie. Der Tensilon-Test bei Patienten mit Fast-Channel-Syndrom ist nur unregelmäßig positiv. Die kombinierte Behandlung mit AChE-Inhibitoren und 3,4-DAP kann oft hilfreich sein.

Auch unsere beiden CMS-Patienten zeigten einen autosomal-rezessiven Erbgang, worauf die molekulargenetische Analyse der DNA der Eltern und der Geschwister wichtige Hinweise gab, eine Manifestation der Symptome in früher Kindheit, einen Befall von bulbären und Extremitätenmuskeln sowie eine Ptose. Auch fand sich ein Dekrement bei niedrigfrequenter Stimulation, ein positiver Tensilon-Test und ein unauffälliges histologisches Bild in der Muskelbiopsie. Die Pathogenität und die genauen funktionellen Konsequenzen der Mutation $\epsilon 1304\text{del}3$ müssen letztendlich aber auch in diesem Fall durch weitere Charakterisierungen geklärt werden.

5.4 CMS-Patienten, bei denen der zugrundeliegende Defekt nicht geklärt ist

Von den insgesamt 86 CMS-Patienten, die untersucht worden sind, wurden bei 50 Patienten (knapp 60%) verschiedene Mutationen im Gen der ϵ -Untereinheit des AChR gefunden. Bei den restlichen 36 Patienten jedoch erbrachte die molekulargenetische Untersuchung ϵ -Gens keine positiven Befunde.

Bei den CMS-Patienten, bei denen der zugrundeliegende Defekt nicht geklärt ist, gilt es, zwei grundsätzlich unterschiedliche Fragestellungen zu unterscheiden. Zum einen stellt sich die klinische Frage, wie diesen Patienten ohne molekulargenetische Diagnose geholfen werden kann. Zum anderen gilt es zu erforschen, ob Defekte in anderen Genen CMS verursachen können.

Im klinischen Alltag ist eine frühe Diagnose eines CMS, die auf Anamnese, klinischer Untersuchung und relativ einfachen Laboruntersuchungen basiert, sehr wichtig für ein betroffenes Kind und seine Familie aufgrund von: (1) Vermeidung überflüssiger diagnostischer Untersuchungen, wie zum Beispiel wiederholter Muskelbiopsien, (2) Unterbrechung oder Vermeidung ineffektiver und potentiell schädlicher Therapien, wie zum Beispiel Thymektomie und immunsuppressive Therapie¹³¹, (3) das Bewusstsein über und die Prävention von potentiell lebensgefährlichen Komplikationen, wie zum Beispiel respiratorisches Versagen im Zusammenhang mit fieberhaften Infekten des Respirationstraktes und eventuell (4) Beginn einer speziellen Therapie mit zum Beispiel AChE-Hemmern. Die klinische Diagnose eines CMS wird unterstützt durch eine positive Familienanamnese.

Sporadische Fälle von CMS können diagnostische Unsicherheiten verursachen, zum Beispiel im Falle von autoimmuner Myasthenia Gravis im Kindesalter mit negativen Testergebnissen auf Antikörper gegen den Azetylcholinrezeptor⁷. In der Tat kann nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass einigen der sporadischen Fälle, die hier beschrieben worden sind, eine autoimmune Myasthenia Gravis mit negativem Anti-AChR-Antikörper-Titer zugrunde liegt. Erst kürzlich beschrieben wurden Auto-Antikörper gegen das Protein MuSK, die ebenfalls zu einem myasthenen Syndrom führen können⁶⁶. Dennoch spricht das Auftreten von Symptomen in den ersten Lebensjahren stark für einen ursächlichen genetischen Defekt. Hinzu kommt, dass eine Vielzahl von CMS-Fällen übersehen wird, wenn man die Einschlusskriterien bedenkt, die oben beschrieben worden sind. Aktuelle Veröffentlichungen erweiterten das klinische Spektrum von neuromuskulären Übertragungsstörungen, die sich als „floppy infant“ oder auch unter dem Bild eines „plötzlichen Kindstods“ präsentieren^{35, 78}.

Bei manchen Formen von CMS, wie zum Beispiel dem AChE-Mangel, dem Slow-Channel-CMS und der Plektinopathie, können phänotypische Besonderheiten auf die korrekte Diagnose hinweisen³⁵.

Dennoch benötigt die Mehrzahl von CMS-Fällen weitergehende morphologische und *in vitro* elektrophysiologische Untersuchungen, die nur an spezialisierten Einrichtungen möglich sind. Für einige Patienten bieten direkte genetische Tests eine zusätzliche oder auch alternative diagnostische Möglichkeit. Eine genauere Klassifikation von CMS-Patienten könnte es auch ermöglichen, genotypisch-phänotypische Korrelationen von

bestimmten Defekten zu studieren und CMS-Patienten mit einem bestimmten Defekt hinsichtlich der zugrundeliegenden Ursachen besser zu beraten.

5.4.1 Weitere CMS-verursachende Gene

Bisher sind sieben verschiedene Gene bekannt, deren Defekte CMS verursachen können. Dazu gehören die Gene, die die AChR-Untereinheiten kodieren, das *COLQ*-Gen^{68, 98, 99, 102}, das *CHAT*-Gen, welches die Cholin-Azetylcholin-Transferase kodiert^{107, 117}, sowie das *RAPSN*-Gen^{34, 103}.

Die weitaus meisten postsynaptischen CMS-Fälle sind durch Mutationen im Gen der ϵ -Untereinheit bedingt. Andrew Engel identifizierte AChR-Mutationen in über 100 Familien⁴⁶⁻⁴⁸. Über 70% dieser Mutationen identifizierte er in ϵ , fast 20% in α , noch gut 5% im Gen der β -Untereinheit und nur etwa 1% im Gen der δ -Untereinheit. Bei unseren 34 verbliebenen CMS-Patienten, bei denen der zugrundeliegende Defekt noch nicht geklärt ist, könnten die Gene kodierend für die α -, β - und δ -Untereinheiten des AChR untersucht werden. Das Gen der β -Untereinheit ist ebenso wie das der ϵ -Untereinheit auf Chromosom 17p12-13 lokalisiert. Die Gene der α - und δ -Untereinheit liegen gemeinsam auf Chromosom 2q32.

Die lichtmikroskopisch nachweisbare Defizienz der Azetylcholinesterase (AChE) gilt nach der AChR-Defizienz als die zweithäufigste Ursache von CMS und wird autosomal-rezessiv vererbt. Dabei ist jedoch nicht der ubiquitär exprimierte globuläre Anteil des Enzyms betroffen, der die eigentliche katalytische Aktivität enthält, sondern der muskelspezifisch exprimierte kollagenartige „Schwanz- bzw. Verankerungsteil“, der das Enzym in der Basallamina an der Endplatte verankert und durch ein separates Gen auf Chromosom 3p24 kodiert wird. Dieses *COLQ*-Gen konnte vor kurzem auf Chromosom 3p24 lokalisiert werden und umfasst 17 Exons. Bis heute konnten 24 unterschiedliche Mutationen (Missense-, Frameshift- und Stopmutationen) bei 23 unabhängigen Patienten identifiziert^{68, 98, 99, 102}.

Vor wenigen Jahren ist es gelungen, die erste präsynaptische CMS-Form molekulargenetisch zu definieren¹⁰⁷. Im Gen kodierend für die Cholin-Azetyl-Transferase (*CHAT*) auf Chromosom 10q11.2⁷⁶ wurden bei fünf Patienten zehn rezessive Mutationen nachgewiesen¹⁰⁷. Auffällig bei allen Patienten waren krisenhafte Verschlechterungen des Krankheitsbildes, die meist im Rahmen von fieberhaften Infekten auftraten und mit episodischen Apnoen einhergingen. Von den insgesamt fünf betroffenen Geschwistern dieser Patienten waren vier im Rahmen derartiger

Ateminsuffizienzen verstorben. Mittlerweile gelang es unserer und anderen Arbeitsgruppen, auch bei anderen CMS-Patienten weitere Mutationen im *CHAT*-Gen zu identifizieren^{74, 77, 117}.

Plektin ist ein Protein, das normalerweise an Hemidesmosomen der Haut, am Sarkolemm, der postsynaptischen Membran und der nukleären Membran in Muskelzellen vorhanden ist. Plektin wird auf Chromosom 8q24 kodiert. Die CMS-Unterform, die mit einer Plektin-Defizienz assoziiert ist, wird bei Patienten mit autosomal-rezessiv vererbter Epidermolysis Bullosa Simplex beobachtet. Bisher wurde die Plektin-Defizienz nur bei einer Patientin beschrieben⁹.

Neben den schon bekannten Mutationen am AChR konnte eine weitere postsynaptische CMS-Form vor kurzem molekulargenetisch beschrieben werden. Bei acht CMS-Patienten wurden 16 rezessive Mutationen in heterozygoter oder homozygoter Form auf dem Gen, das für das Protein Rapsyn kodiert, nachgewiesen^{34, 103}. Hinzu kommen Mutationen in der *RAPSN*-Promotorregion, die bei acht CMS-Patienten erst kürzlich aufgedeckt wurden¹⁰⁶. Rapsyn ist ein 43 kDa schweres Protein, das wichtig für die Zusammenlagerung der Untereinheiten des AChR an der postsynaptischen Membran ist und auf Chromosom 11p11.2-p11.1 liegt¹⁸. Das postsynaptische Protein Rapsyn ist essentiell für die Zusammenlagerung und die Verankerung der AChR in der postsynaptischen Membran¹¹³. Die betroffenen CMS-Patienten zeigten neben typischen myasthenen Symptomen häufig eine Beteiligung der Atemmuskulatur und zeitweilige Beatmungspflichtigkeit.

5.4.2 Weitere CMS-Kandidatengene

Bei der großen Anzahl von CMS-Fällen, die von Andrew Engel und seinen Mitarbeitern in den USA, sowie von Beeson und seinen Mitarbeitern in Großbritannien untersucht wurden, wurde ein primärer Defekt des AChR bei mindestens 60% der untersuchten Patienten gefunden. Deshalb sind Defekte in anderen funktionellen oder strukturellen Proteinen der neuromuskulären Endplatte wahrscheinlich seltener.

Eine Reihe weiterer Gene kodieren für synapsenspezifische Proteine, deren Defekte potentiell CMS verursachen können, ohne dass ein solcher Zusammenhang bisher bewiesen wurde („Kandidatengene“)^{23, 35, 129}. Solche Kandidatengene umfassen beispielsweise die Gene, die für MuSK, Agrin oder β -Dystroglykan kodieren^{114, 125, 126}. Die Mutationssuche in diesen Genen könnte, zumindest in geeigneten Familien mit mehreren betroffenen und nicht betroffenen Mitgliedern, mittels begrenzter Kopplungs-

analyse durch Ausschluss oder nähere Eingrenzung einzelner Genloci vereinfacht werden.

Eng verknüpft mit der Cholin-Azetyl-Transferase (ChAT) ist die vesikuläre Azetylcholintransferase (VACHT): Die Cholin-Azetyl-Transferase (ChAT) katalysiert die präsynaptische Synthese von ACh aus Cholin und Acetyl-CoA. Der entstandene Transmitter ACh wird mit Hilfe des vesikulären ACh-Transporters (VACHT) in die präsynaptischen Vesikel transportiert, die durch elektrische Depolarisation ACh in den synaptischen Spalt freisetzen.

ChAT und VACHT sind nicht nur funktionell miteinander verbunden, sondern liegen auch auf demselben Genlocus: das menschliche *VACHT*-Gen liegt nämlich intronisch innerhalb des ChAT-Genlocus auf Chromosom 10q11.2⁷⁶. Mutationen im Gen des vesikulären ACh-Transporters auf Chromosom 10q11.2 sind beim Menschen bisher noch nicht identifiziert worden.

CMS verursachen könnten auch Defekte in Proteinen, die wichtig sind für die Aggregation der AChR an der neuromuskulären Endplatte. Dazu gehören die muskelspezifische Kinase (MuSK) und Agrin.

MuSK gehört zu einer bestimmten Art von Zelloberflächenrezeptoren, nämlich zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die dadurch charakterisiert sind, dass sie eine zytoplasmatische Domäne mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität besitzen. Die Aktivität der Kinase wird durch die Bindung eines Liganden am extrazellulären Bereich des Rezeptors reguliert. MuSK wird nur in Skelettmuskel exprimiert und ist auf Chromosom 9q31.3-q32 kodiert¹²⁴.

Agrin (vom griechischen Wort „agrein“ = versammeln) ist ein 1940 Aminosäuren umfassendes Protein und ein wichtiger Bestandteil der synaptischen Basallamina. Es ist ebenfalls an der Aggregation von AChR und anderen postsynaptischen Proteinen beteiligt⁶⁵. Das humane *AGRIN*-Gen liegt auf dem Chromosom 1pter-p32¹¹⁴. McMahan *et al.*⁸⁰ sowie Gautam *et al.*⁵³ erzeugten Agrin-Knockout-Mäuse und zeigten, dass die neuromuskuläre Differenzierung bei diesen Mäusen schwer beeinträchtigt ist.

Glass *et al.* fanden heraus, dass Mäuse, denen entweder Agrin oder MuSK fehlen, einen ähnlichen Defekt an der neuromuskulären Endplatte präsentieren⁵⁴. De Chiara *et al.* zeigten an Knockout-Mäusen, dass MuSK notwendig ist für die Formierung der neuromuskulären Endplatte *in vivo*³⁰.

Lin *et al.* analysierten frühe Stufen der postsynaptischen Differenzierung in Muskeln von mutierten Mäusen, denen Agrin, MuSK, Rapsyn oder motorische Nerven fehlen⁷⁴. Sie fanden heraus, dass der Defekt bei MuSK-Mutanten durch die fehlende Initiation der postsynaptischen Differenzierung bedingt ist, während die Beeinträchtigung bei

Agrin-Mutanten durch den Verlust der Agrin-abhängigen Unterstützung des postsynaptischen Apparates entsteht.

5.5 Schlussfolgerung aus den eigenen Untersuchungen für Diagnostik und Therapie von CMS-Patienten

Um die Diagnose eines CMS zu sichern, waren bislang aufwendige und invasive Untersuchungen (Interkostalisbiopsie, weitere morphologische, histologische und elektrophysiologische Charakterisierungen) nötig. Bei unseren CMS-Patienten konnte in über 50% der Fälle die Diagnose durch eine alleinige molekulargenetische Untersuchung gesichert werden. Diesen Patienten konnte damit meistens eine Muskelbiopsie erspart werden. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass beim Vorliegen von typischen klinischen Symptomen eines CMS eine primäre molekulargenetische Diagnostik per PCR zu erwägen ist.

Bei der molekulargenetischen Diagnostik wird man vor allem bei Hinweisen auf die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ (starke Ophthalmoparese, Roma-Abstammung) eine entsprechende primäre genetische Diagnostik per PCR und Restriktionsverdau durchführen. Im Falle des Nachweises eines homozygoten Vorliegens der Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$, was in der genannten Bevölkerungsgruppe bei über 50% der Patienten zu erwarten ist, kann die Diagnose als gesichert angesehen werden^{1, 5, 72}. Eine weitere Analyse der ϵ -Untereinheit unter Einschluss aller kodierenden Abschnitte, Spleiß-Stellen und der Promotorregion ermöglicht bei einer Reihe von weiteren Patienten eine molekulargenetische Sicherung des CMS.

Seltenere Orte für CMS-verursachende Mutationen sind die Gene der α ,- β - und δ -Untereinheit des AChR sowie das *COLQ*-Gen, das *CHAT*-Gen und das *RAPSN*-Gen.

Bei großen informativen Familien könnte es sinnvoll sein, Kopplungsanalysen unter Verwendung polymorpher Marker durchzuführen, um die Genorte der bekannten CMS-Gene auszuschließen oder näher einzugrenzen.

Ein anderer Versuch, Kandidatengene im Fall von CMS zu bestimmen, ist die Untersuchung von Genprodukten an der neuromuskulären Endplatte, wie es anfangs bei der Erforschung postsynaptischer CMS gemacht wurde. Zu diesem Zweck wurden bei Patienten mit myasthenen Symptomen interkostale Muskelbiopsien durchgeführt und die entsprechenden Endplattenregionen morphologisch und elektrophysiologisch untersucht³⁵. Nach dem Nachweis einer postsynaptischen AChR-Defizienz erfolgte die molekulargenetische Erforschung von Genen, die für diese Defizienz verantwortlich sein könnten. So gelang der Nachweis von Mutationen in den Genen, die für die Untereinheiten des AChR kodieren und für viele Fälle von CMS verantwortlich sind⁴⁸.

Dies ist im Gegensatz zu Kopplungsanalysen von CMS-Familien ein völlig anderer Ansatz zur Erforschung von Kandidatengen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 86 CMS-Patienten aus 71 nicht-verwandten Familien untersucht. Dabei wurden 14 verschiedene Mutationen bei 50 CMS-Patienten, die aus 39 nicht-verwandten Familien stammen, gefunden. Bei 36 CMS-Patienten aus 32 nicht-verwandten Familien erbrachte die Sequenzanalyse keinen Hinweis auf eine Mutation in den kodierenden Abschnitten des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR oder der entsprechenden Promotorregion.

Bei 33 Patienten aus 26 nicht-verwandten Familien konnte eine homozygote Deletion eines G-Nukleotids an Position 1267 (ϵ 1267delG) entdeckt werden.

Der Häufigkeitsvergleich der wichtigsten klinischen Daten und Untersuchungsergebnisse der Patienten mit Nachweis einer ϵ -Mutation und ohne Nachweis einer ϵ -Mutation ergibt mehr Unterschiede als Gemeinsamkeiten. Mit ähnlicher oder identischer Häufigkeit finden sich bei den untersuchten CMS-Patienten eine verzögerte motorische Entwicklung (46,5% zu 51,9%).

Dagegen zeigt vor allem das Auftreten der Ophthalmoparese eine große Diskrepanz. CMS-Patienten mit ϵ -Mutation zeigen in über 90% der untersuchten Fälle eine Ophthalmoparese, während sie bei CMS-Patienten ohne ϵ -Mutation nur in knapp 50% zu finden ist.

Unterschiede zeigten sich auch bei dem Schweregrad der Erkrankung. In der Regel verlief die Krankheit bei den Patienten mit ϵ -Mutation gutartig. Bei über 90% dieser Patienten nämlich zeigte sich keine signifikante Verschlechterung im Alter. Bei den Patienten ohne nachweisbare ϵ -Mutation dagegen verlief die Erkrankung in nur 60 bis 70% der bekannten Fälle gutartig. Aus dem Verlauf und Schweregrad der Erkrankung direkt auf eine bestimmte Mutationsart zu schließen, ist natürlich nicht möglich. Allerdings können krisenhafte Verschlechterungen des Krankheitsbildes, die im Rahmen von fieberhaften Infekten auftreten und mit episodischer Apnoe einhergehen, ein wichtiger Hinweis für die erst kürzlich molekulargenetisch definierte präsynaptische CMS-Unterform mit Mutationen im Gen kodierend für die Cholin-Azetyl-Transferase (ChAT) auf Chromosom 10q11.2 sein.

Bei über 95% der CMS-Patienten mit ϵ -Mutation begannen die typischen Symptome der CMS noch vor Vollendung des zweiten Lebensjahres, während dies bei den CMS-Patienten ohne ϵ -Mutation nur in etwa drei Viertel der Fälle vorkam. Eine Erstmanifestation nach dem 2. Lebensjahr ist kein Ausschlusskriterium für ein CMS. Bei den meisten CMS-Patienten manifestierte sich die Krankheit zwar noch vor dem zweiten Lebensjahr, aber bei manchen CMS-Formen, wie zum Beispiel dem Slow-

Channel-Syndrom, zeigen sich die Symptome erst in der zweiten oder dritten Dekade und nicht typischerweise schon im Kleinkindalter.

Auch das Fehlen des typischen EMG-Dekrement ist nicht als absolutes Ausschlusskriterium zu werten, auch wenn ein Dekrement wesentlich häufiger bei den CMS-Patienten mit ϵ -Mutation (92%) als bei den CMS-Patienten ohne ϵ -Mutation (68%) zu finden ist. Ähnlich verhält es sich mit der Verteilung der myasthenen Symptome. Die Muskelschwäche der Patienten mit Nachweis einer ϵ -Mutation wurde in 85% als generalisiert und in 80% als bulbär oder fazial beschrieben, während die Häufigkeit bei den Patienten ohne Nachweis einer ϵ -Mutation für beide Verteilungsmuster der Paresen bei knapp 65% lag. Auch hier lässt sich kein wirklicher Hinweis für oder gegen eine bestimmte CMS-Mutation ableiten.

	Patienten mit ϵ -Mutation	Patienten ohne ϵ -Mutation
Ptose	100%	77 %
Nicht nachweisbare Anti-AChR-Antikörper	100%	100%
Positiver Effekt von AChE-Hemmern	98%	79 %
Keine signifikante Verschlechterung im Alter	92%	67%
Beginn der Symptome im Alter von < 2 Jahren	96%	74 %
Ophthalmoparese	92%	52 %
Dekrement	92%	68 %
Generalisierte Schwäche	85%	64 %
Schwäche der bulbären oder fazialen Muskulatur	80%	64 %
Verzögerte motorische Entwicklung	47%	51 %

Tabelle 13: Vergleich der klinischen Symptome und Untersuchungsbefunde der CMS-Patienten mit und ohne Nachweis einer ϵ -Mutation

5.6 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Im Rahmen dieser Arbeit gelang bei 50 CMS-Patienten der Nachweis von insgesamt 14 verschiedenen Mutationen im Gen *CHRNE*, das für die ϵ -Untereinheit des AChR kodiert. Bei 36 CMS-Patienten konnten bislang keine Mutationen in kodierenden Teilen dieses Gens gefunden werden.

Damit liegen sehr vielen CMS jeweils Mutationen zugrunde, die nur in einzelnen Patienten bzw. Familien auftreten. In den meisten Fällen, in denen eine entsprechende Mutation jeweils nur in einem einzelnen Patienten gelang, war eine aussagekräftige Genotyp-Phänotyp-Korrelation daher nicht möglich. Beim Vergleich von Geschwistern einer Familie mit gleichem Genotyp zeigte sich ein meist relativ ähnlicher Phänotyp.

Allerdings war der Schweregrad der Erkrankung häufig auch unter Geschwistern unterschiedlich ausgeprägt (z.B. bei der Mutation $\epsilon 1293\text{insG}$ in Familie 1). Aufgrund der relativen Seltenheit der Erkrankung war es erfreulich, dass sich immerhin einzelne Mutationen auch in mehreren CMS-Familien wiederfanden, wenn auch häufig in heterozygoter Form mit einer jeweils unterschiedlichen zweiten compound-heterozygoten Mutation. Auch hier fiel auf, dass die Ausprägung der Erkrankung variabel sein konnte (z.B. bei der Mutation $\epsilon\text{IVS7-2A>G}$).

Eine Sonderstellung nimmt dagegen die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ ein, die in der südosteuropäischen Bevölkerung bzw. in der Bevölkerungsgruppe der Roma überzufällig häufig zu finden ist. Bei dieser Patientengruppe war daher eine aussagekräftige Genotyp-Phänotyp-Korrelation möglich. Es zeigte sich, dass Patienten mit der homozygoten Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ einen relativ einheitlichen Phänotyp aufwiesen (vergleiche auch Ergebnisteil 4.3.2.), der sich allerdings in vielen Punkten nicht wesentlich von dem anderer Patienten mit Frameshift-Mutationen der ϵ -Untereinheit des AChR unterschied (vergleiche Tabelle 6 und 7). Patienten mit der homozygoten Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ zeichnete neben einem positiven Ansprechen auf eine Therapie mit AChE-Inhibitoren, einer Erstmanifestation in den ersten zwei Lebensjahren und einem meist milden, nicht-progressiven Verlauf insbesondere das regelhafte Vorliegen einer oft ausgeprägten Ophthalmoparese aus. Jedoch fand sich auch hier eine phänotypische Variabilität, wieder insbesondere im Schweregrad der Erkrankung. Verglichen wurde auch der Phänotyp der 50 CMS-Patienten mit nachgewiesener ϵ -Mutation mit dem Phänotyp der 36 Patienten ohne Nachweis einer ϵ -Mutation (Tabelle 13). Dabei fällt beispielsweise in der ersten Gruppe das deutlich häufigere Vorliegen einer Ptose, einer Ophthalmoparese, eines früheren Erkrankungsbeginns und eines häufiger positiven Ansprechen auf AChE-Inhibitoren auf. Diese Unterschiede lassen sich zum Teil sicher damit erklären, dass in der Gruppe ohne Nachweis einer AChR ϵ -Mutation Patienten mit synaptischen oder präsynaptischen Syndromen und entsprechend anderen Phänotypen verborgen sein könnten.

5.7 Mögliche modifizierende Faktoren in der phänotypischen Variabilität von CMS

Die beobachtete phänotypische Heterogenität könnte in bislang nicht identifizierten modifizierenden Faktoren begründet sein. In Frage kommen genetische, epigenetische oder peristatische Faktoren.

Genetische Faktoren lassen sich in intragenische und extragenische modifizierende Faktoren einteilen. Intragenische modifizierende Faktoren könnten beispielsweise Polymorphismen innerhalb der kodierenden Region, im Promotorbereich, im

Intronbereich oder im 3'-Bereich des ϵ -Gens sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle 12 Exons des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR, die Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Sequenzen sowie ein Teil der Promotorregion untersucht. Somit bleibt offen, ob in den nicht sequenzierten Abschnitten noch Mutationen oder Polymorphismen mit Einfluss auf die Expression des ϵ -Gens vorliegen. Nicht auszuschließen sind auch Mutationen in „splice enhancer“-Sequenzen, die einen Einfluss auf die Reifung der mRNA haben.

Außerhalb des ϵ -Gens liegende, extragenische Faktoren könnten in Genen angesiedelt sein, die beispielsweise für Proteine kodieren, die einen Einfluss auf die Funktion der neuromuskulären Endplatte haben, oder auch solche Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, die an der Regulation der ϵ -Untereinheit des AChR beteiligt sind, wie zum Beispiel der N-Box-bindende Faktor GABP α/β ^{96, 122}.

Eine modifizierende Wirkung könnte auch von interagierenden Proteinen wie zum Beispiel Rapsyn oder Agrin ausgehen. Beide Proteine sind essentiell für die korrekte Aggregation von AChR an der neuromuskulären Endplatte ^{65, 113}. Ein weiteres Beispiel für ein Protein mit eventuell modifizierender Wirkung wäre das ACh-bindende Protein, das in den synaptischen Spalt der neuromuskulären Endplatte freigesetzt wird und dort AChR-Agonisten und kompetitive Antagonisten wie ACh, Nikotin, d-Tubocurarin und α -Bungarotoxin binden kann ¹⁶. Dieses ACh-bindende Protein spielt eine physiologische Rolle bei der Modulation der synaptischen Transmission an der neuromuskulären Endplatte.

Neben den genetischen Veränderungen könnten auch epigenetische Faktoren, wie das DNA-Methylierungsmuster oder eine spezifische Chromtinstruktur im ϵ -Gen den Schweregrad von CMS beeinflussen. So ist bekannt, dass der Methylierungsgrad von CpG-Islands in Promotorbereichen mit der Genaktivität korreliert ist ^{69, 95}. Da wir im ϵ -Promotorbereich keine ausgedehnten CpG-Islands vorgefunden haben, gehen wir allerdings nicht davon aus, dass ein modifizierender Einfluss durch Methylierungen besteht.

Ebenfalls Einfluss auf die Transkription haben der Azetylierungsgrad und das Azetylierungsmuster spezifischer Lysinreste in Histonproteinen ⁶³. Die Analyse dieser Modifizierungen ist technisch aufwändig und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Eine genetische Veranlagung allein muss nicht krankheitsauslösend sein. Es können Auslöser in Form von Umweltfaktoren hinzukommen oder vorliegen. Viele der

untersuchten CMS-Patienten kommen aus südosteuropäischen Ländern. Unterschiede im Klima, der Ernährung oder der Qualität der medizinischen Versorgung könnten hier eine Rolle spielen.

5.8 Ausblick

Seit 1994 ermöglichte die molekulare Analyse von CMS klare Erkenntnisse über die Krankheitsmechanismen und zeigte funktionell wichtige Domänen des AChR sowie weiterer synapsenassoziierter Proteine (ColQ, ChAT, Rapsyn) auf. In den kommenden Jahren werden molekulare Defekte möglicherweise noch in weiteren CMS-Formen identifiziert werden können.

Da CMS durch verschiedene strukturelle oder funktionelle Abnormalitäten an der Synapse bedingt sind, ist eine präzise elektrophysiologische und /oder genetische Klassifikation der CMS für Patienten sehr wichtig. Genetische Beratung und unter Umständen pränatale Diagnostik können nur durchgeführt werden, wenn eine exakte Diagnostik auf molekularer Ebene verfügbar ist. Außerdem hat die exakte Klassifizierung kongenitaler myasthener Syndrome für die betroffenen Patienten große Bedeutung, da sich daraus unterschiedliche Konsequenzen hinsichtlich Prognose und Behandlungsmöglichkeiten ergeben. Die Analyse ursächlicher genetischer Defekte wird die Grundlage für eine sichere und verlässliche Einordnung von CMS bilden und möglicherweise die bisher erforderlichen invasiven Verfahren ablösen. Darüber hinaus sind durch die genaue Kenntnis des ursächlichen Defektes und der pathophysiologischen Zusammenhänge in Zukunft auch neue Therapiemöglichkeiten für die CMS-Patienten zu erwarten.

6 Zusammenfassung

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (CMS) bilden klinisch und pathogenetisch eine heterogene Gruppe von relativ seltenen hereditären Erkrankungen des Kindesalters. Sie werden durch unterschiedliche genetische Defekte im Bereich der neuromuskulären Endplatte verursacht und manifestieren sich mit variabler Symptomatik, bei der eine belastungs- und tageszeitabhängige Muskelschwäche das herausragende Kennzeichen ist.

Man unterscheidet synaptische, prä- und postsynaptische CMS-Formen. Während der letzten Jahre hat sich gezeigt, dass die postsynaptischen Störungen bei weitem überwiegen, vor allem solche, bei denen die Mutationen in den Untereinheiten des Azetylcholinrezeptor (AChR) liegen. Dabei haben sich vor allem Mutationen im Gen, das für die Epsilon (ϵ)-Untereinheit des AChR kodiert, als besonders häufig erwiesen. Der Hauptschwerpunkt dieser Arbeit lag deshalb auf der genauen Untersuchung des Gens kodierend für die ϵ -Untereinheit bei unseren CMS-Patienten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 86 CMS-Patienten aus 71 nicht-verwandten Familien mit Hilfe eines Fragebogens rekrutiert und anschließend molekulargenetisch untersucht. Unter den 71 CMS-Familien waren 21 Familien, die aus Deutschland stammten, und 50 Familien nicht-deutscher Abstammung. Alle Patienten zeigten typische CMS-Symptome.

Die zwölf Exons des Gens der ϵ -Untereinheit des AChR einschließlich der Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Sequenzen sowie die Promotorregion wurden sequenziert. Bei 40 der 86 CMS-Patienten wurden unterschiedliche Frameshift-Mutationen entdeckt, die zu einer verminderten Expression des AChR führen.

Die Frameshift-Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ wurde bei 33 Patienten aus 26 nicht-verwandten Familien entdeckt. Alle $\epsilon 1267\text{delG}$ -Patienten stammen aus der Volksgruppe der Roma oder kommen aus südosteuropäischen Ländern. Die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ wurde bei 58% (26/45) der CMS-Familien, die nicht-deutscher Abstammung sind, gefunden im Vergleich zu 0% (0/26) der Familien mit deutscher Abstammung.

Bei sechs CMS-Patienten zeigten sich Spleiß-Mutationen, deren Pathogenität aus Muskel-RNA bewiesen wurde. Bei zwei Patienten konnten Promotormutationen nachgewiesen werden, die ebenfalls zu einer beeinträchtigten AChR-Expression führen. Bei sechs Patienten fanden sich Missense-Mutationen, die nicht vorbeschrieben sind und deren pathophysiologische Konsequenzen noch geklärt werden müssen.

Bei 36 CMS-Patienten aus unserer 86 CMS-Patienten umfassenden Population konnten keine Mutationen im Gen der ϵ -Untereinheit des AChR gefunden werden. Mutationen

anderer Gene könnten verantwortlich sein für CMS bei diesen Patienten. Die Mutationsuche in diesen Genen könnte, zumindest in geeigneten Familien mit mehreren betroffenen und nicht betroffenen Mitgliedern, mittels begrenzter Kopplungsanalyse durch Ausschluss oder nähere Eingrenzung einzelner Genloci vereinfacht werden.

Wir finden bei Patienten mit Mutationen im ϵ -Gen des AChR häufiger eine Ptose, eine Ophthalmoparese, ein als generalisiertes oder als bulbär und fazial beschriebenes Krankheitsbild, ein Dekrement, einen gutartigen Verlauf, sowie eine Krankheitsmanifestation vor Vollendung des zweiten Lebensjahres. Krisenhafte Verschlechterungen findet man dagegen häufiger bei CMS-Patienten, die keine Mutationen im ϵ -Gen haben. Mutationen im *CHAT*-Gen könnten dafür verantwortlich sein.

Da CMS durch verschiedene strukturelle oder funktionelle Abnormalitäten an der Synapse bedingt sind, ist eine präzise elektrophysiologische und/oder genetische Klassifikation der CMS wichtig für Patienten. Genetische Beratung und pränatale Diagnostik können nur durchgeführt werden, wenn eine exakte Diagnostik auf molekularer Ebene verfügbar ist. Außerdem hat die exakte Klassifizierung kongenitaler myasthener Syndrome für die betroffenen Patienten große Bedeutung, da sich daraus unterschiedliche Konsequenzen hinsichtlich Prognose, Vererbbarkeit und Behandlungsmöglichkeiten ergeben. Die Analyse ursächlicher genetischer Defekte wird die Grundlage für eine sichere und verlässliche Einordnung von CMS bilden und möglicherweise die bisher erforderlichen invasiven Verfahren ablösen. Darüber hinaus sind durch die genaue Kenntnis des ursächlichen Defektes und der pathophysiologischen Zusammenhänge in Zukunft auch neue Therapiemöglichkeiten für CMS-Patienten zu erwarten.

7 Literaturverzeichnis

- 1) Abicht A, Lochmüller H (2002). Kongenitale myasthene Syndrome. In: Rieß O, Schöls L (Hrsg.). Neurogenetik. Stuttgart: Kohlhammer; 512-516.
- 2) Abicht A, Müller-Felber W, Fischer P, Jakob I, Kurz, Rudel R, Mortier W, Pongratz D, Lochmüller H (1997). Congenital myasthenic syndromes: clinical and genetic analysis of 18 patients. *Eur J Med Res*; 2:515- 522.
- 3) Abicht A, Stucka R, Karcagi V, Herczegfalvi A, Horvath R, Mortier W, Schara, U, Ramaekers V, Jost W, Brunner, J, Jansen G, Seidel U, Schlotter B, Müller-Felber W, Pongratz D, Rüdél R, Lochmüller H (1999). A common mutation (ϵ 1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology*; 53:1564-1569.
- 4) Abicht A, Stucka R, Schmidt C, Briguet A, Höpfner S, Song IH, Pongratz D, Müller-Felber W, Ruegg MA, Lochmüller H (2002). A newly identified chromosomal microdeletion and an N-box mutation of the AChR epsilon gene cause a congenital myasthenic syndrome. *Brain*; 125:1005-1013.
- 5) Abicht A, Stucka R, Song IH, Karcagi V, Kugler K, Baumgarten-Walczak A, Stier C, Pongratz D, Mortier W, Müller-Felber W, Rüdél R, Lochmüller H (2000). Genetic analysis of the entire AChR ϵ -subunit gene in 52 congenital myasthenic families. *Acta Myologica*; 19:23-28.
- 6) Andrews PI, Massey JM, Sanders DB (1993). Acetylcholine receptor antibodies in juvenile myasthenia gravis, *Neurology*; 43:977-982.
- 7) Anlar B, Ozdirim E, Renda Y, Yalaz K, Aysun S, Topcu M, Topaloglu H (1996). Myasthenia gravis in childhood. *Acta Paediatr*; 85:838-842.
- 8) Bady B, Chauplannaz G, Carrier H (1987). Congenital Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 50:476-478.
- 9) Banwell BL, Russel J, Fukudome T, Shen XM, Stillig G, Engel AG (1999). Myopathy, myasthenic syndrome, and epidermolysis bullosa simplex due to plectin deficiency. *J. Neuropathol Exp Neurology*; 58:832-846.

- 10) Barisic N, Schmidt C, Sidorova OP, Herczegfalvi A, Gekht BM, Song IH, Stucka R, Karcagi V, Abicht A, Lochmüller H. Congenital myasthenic syndrome (CMS) in three European kinships due to novel splice site mutation (IVS7-2A/G) in the epsilon acetylcholine receptor (AChR) subunit gene (2002). *Neuropediatrics*; 33 (5):249-254.
- 11) Bartoli M, Ramarao MK, Cohen, JB (2001). Interactions of the rapsyn RING-H2 domain with dystroglycan. *J Biol Chem*; 276:24911-24917.
- 12) Beeson D, Brydson M, Betty M, Jeremiah S, Povey S, Vincent A, Newsom-Davis J (1993). Primary structure of the human muscle acetylcholine receptor. CDNA cloning of the gamma and epsilon subunits. *Eur J Biochem*; 215:229-238.
- 13) Beeson D, Brydson M, Newsom-Davis J (1989). Nucleotide sequence of human muscle acetylcholine receptor beta-subunit. *Nucleic Acids Res*; 17:4391.
- 14) Beeson D, Palace J, Vincent A (1997). Congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Neurol*; 10:402-407.
- 15) Berman SA, Bursztajn S, Bowen B, Gilbert W (1990): Localization of an acetylcholine receptor intron to the nuclear membrane. *Science*; 247:212-214.
- 16) Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmanns M, van der Oost John, Smit AB, Sixma TK (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*; 411:269-276.
- 17) Brengman JM, Ohno K, Milone M, Shen X-M, Friedman JRL, Feldman RG, Engel AG (2000). Identification and functional characterization of eight novel acetylcholine receptor (AChR) mutations in six congenital myasthenic syndrome (CMS) kinships. *Neurology*; 54 (Suppl 3):P03.064.
- 18) Buckel A, Beeson D, James M, Vincent A (1996). Cloning of cDNA encoding human rapsyn and mapping of the RAPSN gene locus to chromosome 11p11.2- p11.1. *Genomics*; 35:613- 616
- 19) Bursset M, Seledtsov IA, Solovyev VV (2000). Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res*; 28:4364-4375.

- 20) Buset M, Seledtsov IA, Solovyev VV (2001). SpliceDB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. *Nucleic Acids Res*; 29:255-259.
- 21) Byring RF, Pihko H, Tsujino A, Shen XM, Gustafsson B, Hackman P, Ohno K, Engel AG, Udd B (2002). Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. *Neuromuscul Disord*; 12:548-553.
- 22) Chan RY, Boudreau Lariviere C, Angus LM, Makal FA, Jasmin BJ (1999). An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse- and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:4627- 4632.
- 23) Christodoulou K, Tsingis M, Deymeer F, Serdaroglu P, Ozdemir C, Al-Shehab A, Bairactaris C, Mavromatis I, Mylonas I, Evoli A, Kyriallis K, Middleton LT (1997). Mapping of the familial infantile myasthenia (congenital myasthenic syndrome type Ia) gene to chromosome 17p with evidence of genetic homogeneity. *Hum Mol Genet*; 6: 635-640.
- 24) Cremers FP, Van De Pol DJ, Van Driel M, Den Hollander AI, Van Haren FJ, Knoers NV, Tijmes N, Bergen AA, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers AJ, Deutman AF, Hoyng CB (1998). Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet*; 7:355-362.
- 25) Crossley M, Brownlee GG (1990). Disruption of a C/EBP binding site in the factor IX promoter is associated with haemophilia B. *Nature*; 345: 444-446.
- 26) Croxen R, Beeson D, Newland C, Betty M, Vincent A, Newsom-Davis J (1998). A single nucleotide deletion in the epsilon subunit of the acetylcholine receptor (AChR) in five congenital myasthenic syndrome patients with AChR deficiency. *Ann NY Acad Sci*; 841:195-198.
- 27) Croxen R, Hatton C, Shelley C, Brydson M, Chauplannaz G, Oosterhuis H, Vincent A, Newsom-Davis J, Colquhoun D, Beeson D (2002). Recessive inheritance and variable penetrance of slow-channel congenital myasthenic syndromes. *Neurology*; 59:162-168.

- 28) Croxen R, Newland C, Beeson D, Oosterhuis H, Chauplannaz G, Vincent A, Newsom-Davis J (1997). Mutations in different functional domains of the human muscle acetylcholine receptor alpha subunit in patients with the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet*; 6:767-774.
- 29) Croxen R, Newland C, Betty M, Vincent A, Newsom-Davis J, Beeson D C, Betty M (1999). Novel functional epsilon-subunit polypeptide generated by a single nucleotide deletion in acetylcholine receptor deficiency congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol*; 46:1076-1082.
- 30) De Chiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM (1997). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell*; 85:501- 512.
- 31) Donger C, Krejci E, Serradell AP, Eymard B, Bon S, Nicole S, Chateau D, Gary F, Fardeau M, Massoulié J, Guicheney P (1998). Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet*; 3:967-975.
- 32) Duclert A, Changeux JP (1995). Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiol Rev*; 75:339- 368.
- 33) Duclert A, Savatier N, Schaeffer L, Changeux JP (1996). Identification of an element crucial for the sub-synaptic expression of the acetylcholine receptor epsilon-subunit gene. *J Biol Chem*; 271:17433-17438.
- 34) Dunne V, Maselli RA (2003). Identification of pathogenic mutations in the human rapsyn gene. *J Hum Genet*; 48:204-207.
- 35) Engel AG (1994). Myasthenic Syndromes. In: Engel A., Franzini-Amstrong C, (Hrsg.). *Myology: Basic and Clinical*, 2. Aufl., New York: Mac Graw-Hill;1798-1835.
- 36) Engel AG (2001). 73rd ENMC International Workshop: Congenital myasthenic syndromes. 22-23 October, 1999. *Neuromuscul Disord*; 11:315-321.

37) Engel AG, Hutchinson DO, Nakano S, Murphy L, Griggs RC, Gu Y, Hall ZW, Lindstrom J (1993). Myasthenic syndromes attributed to mutations affecting the epsilon subunit of the acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci*; 681:496-508.

38) Engel AG, Lambert EH, Gomez MR (1977). A new myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency, small nerve terminals, and reduced acetylcholine release. *Ann Neurol*; 1:315-330.

39) Engel AG, Lambert EH, Mulder DM, Gomez MR, Whitaker JN, Hart Z, Sahashi K (1981). Recently recognized congenital myasthenic syndromes: (a) end-plate acetylcholine (ACh) esterase deficiency (b) putative abnormality of the ACh induced ion channel (c) putative defect of ACh resynthesis or mobilization – clinical features, ultrastructure and cytochemistry. *Ann N Y Acad Sci*; 377:614-639.

40) Engel AG, Lambert EH, Mulder DM, Torres CF, Sahashi K., Bertorini TE, Whitaker JN (1982). A newly recognized congenital myasthenic syndrome attributed to a prolonged open time of the acetylcholine-induced ion channel. *Ann Neurol*; 11:553-569.

41) Engel AG, Nagel A, Walls TJ, Harper CM, Waisburg HA (1993). Congenital myasthenic syndromes: I. Deficiency and short open-time of the acetylcholine receptor. *Muscle Nerve*; 16:1284-1292.

42) Engel AG, Ohno K (2002). Congenital Myasthenic Syndromes. *Adv Neurol*; 88:203-215.

43) Engel AG, Ohno K, Bouzat C, Sine SM, Griggs RC (1996). End-plate acetylcholine receptor deficiency due to nonsense mutations in the epsilon subunit. *Ann Neurol*; 40:810-817.

44) Engel AG, Ohno K, Milone M, Sine SM (1998). Congenital myasthenic syndromes. New insights from molecular genetic and patch-clamp studies. *Ann N Y Acad Sci*; 841:140-156.

45) Engel AG, Ohno K, Milone M, Wang HL, Nakano S, Bouzat C, Pruitt JN 2nd, Hutchinson DO, Brengman JM, Bren N, Sieb JP, Sine SM (1996). New mutations in acetylcholine receptor subunit genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet*; 5:1217- 1227.

- 46) Engel AG, Ohno K, Sine SM (2002). The spectrum of congenital myasthenic syndromes. *Mol Neurobiol*; 26:347-367.
- 47) Engel AG, Ohno K, Sine SM (2003). Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade. *Muscle Nerve*; 27:4-25.
- 48) Engel AG, Ohno K, Sine SM (2003). Neurological diseases: Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction; 4:339-52.
- 49) Engel AG, Ohno K, Sine SM (1999). Congenital Myasthenic Syndromes, *Neurobiological Review. Arch Neurol*; 56:163-167.
- 50) Engel AG, Walls TJ, Nagel A, Uchitel O (1990). Newly recognized congenital myasthenic syndromes: I. Congenital paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release. II. High-conductance fast-channel syndrome. III. Abnormal acetylcholine receptor (AChR) interaction with acetylcholine. IV. AChR deficiency and short channel-open time. *Prog Brain Res*; 84:125-137.
- 51) Froehner SC, Luetje CW, Scotland PB, Patrick J (1990). The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron*; 5:403-410.
- 52) Fröscher W., *Lehrbuch Neurologie*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1991, S.808.
- 53) Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, Sanes JR (1996). Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*; 85:525-535.
- 54) Glass D, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, De Chiara TM, Yancopoulos GD (1996). Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell*; 85:513- 523.
- 55) Goldhammer Y, Blatt I, Sadeh M, Goodman RM (1990). Congenital myasthenia associated with facial malformations in Iraqi and Iranian Jews. A new genetic syndrome. *Brain*; 113:1291-1306.

- 56) Gomez CM, Maselli R, Gammack J, Lasalde J, Tamamizu S, Cornblath DR, Lehar M, Mc Namee M, Kuncel RW (1996). A beta-subunit mutation in the acetylcholine receptor channel gate causes severe slow-channel syndrome. *Ann Neurol*; 39:712-723.
- 57) Gramolini AO, Angus LM, Schaeffer L, Burton EA, Tinsley JM, Davies KE, Changeux JP, Jasmin BJ (1999). Induction of utrophin gene expression by heregulin in skeletal muscle cells: role of the N-box motif and GA binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:3223-3227.
- 58) Green WN, Claudi T (1993). Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially. *Cell*; 74:57-69.
- 59) Green WN, Wanamaker CP (1997). The role of the cystine loop in acetylcholine receptor assembly. *J Biol Chem*; 272:20945-20953.
- 60) Hall ZW, Sanes JR (1993): Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*; 72:99-121.
- 61) Harper CM, Engel AG (1998). Quinidine sulfate therapy for the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol*; 43:480-484.
- 62) Hart ZH, SK, Lambert EH, Engel AG, Lindstrom JM (1979). A congenital, familial myasthenic syndrome caused by a presynaptic defect of transmitter resynthesis or mobilisation. *Neurology*; 29:556-557.
- 63) Hasan S, Hottiger MO (2002). Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication. *J Mol Med*; 80:463-474.
- 64) Herczegfalvi A, Abicht A, Karcagi V, Lochmüller H (2000). Case report: Congenital myasthenic syndrome in a gypsy family showing a pseudodominant pattern of inheritance. *Acta Myologica*; 19:49-51.
- 65) Hoch W (1999). Formation of the neuromuscular junction, Agrin and its unusual receptors. *Eur J Biochem*; 265:1-10.

- 66) Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A (2001). Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*; 7:365-368.
- 67) Hutchinson DO, Walls TJ, Nakano S, Camp S, Taylor P, Harper CM, Groover RV, Peterson HA, Jamieson DG, Engel AG (1993). Congenital endplate acetylcholinesterase deficiency. *Brain*; 116:633-653.
- 68) Ishigaki K, Nicolle D, Krejci E, Leroy JP, Koenig J, Fardeau M, Eymard B, Hantai D (2003). Two novel mutations in the COLQ gene cause endplate acetylcholinesterase deficiency. *Neuromuscul Disord*; 13:236-244.
- 69) Jain PK (2003). Epigenetics: the role of methylation in the mechanism of action of tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci*; 983:71-83.
- 70) Jennekens FG, Hesselmanns LF, Veldman H, Jansen EN, Spaans F, Molenaar PC (1992). Deficiency of acetylcholine receptors in a case of end-plate acetylcholinesterase deficiency: a histochemical investigation. *Muscle Nerve* 1992; 15:63-72.
- 71) Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F (2001). Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. *BMC Med Genet*; 2:5.
- 72) Karcagi V, Tournev I, Schmidt C, Herczegfalvi A, Guergueltcheva V, Litvinenko I, Song IH, Abicht A, Lochmüller H (2001). Congenital Myasthenic Syndrome in southeastern European Roma (Gypsies). *Acta Myologica*; 20:231- 237.
- 73) Karlin A, Akabas MH (1995). Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron*; 15:1231-1244.
- 74) Kraner S, Laufenberg I, Strassburg HM, Sieb JP, Steinleiden OK (2003). Congenital myasthenic syndrome with episodic apnea in patients homozygous for a ChAT missense mutation. *Arch Neurol*; 60:761-763.
- 75) Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee KF (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature*; 410:1057-1064.

- 76) Mallet J, Houhou L, Pajak F, Oda Y, Cervini R, Bejanin S, Berrard S (1998). The cholinergic locus: ChAT and VAcHT genes. *J Physiol Paris*; 92:145-147.
- 77) Maselli RA, Chen D, Mo D, Bowe C, Fenton G, Wollmann RL (2003). Choline acetyltransferase mutations in myasthenic syndrome due to deficient acetylcholine resynthesis. *Muscle Nerve*; 27:180-187.
- 78) McConkey PP, Mullens AJ (2000). Congenital myasthenic syndrome: a rare, potentially treatable cause of respiratory failure in a “floppy” infant. *Anaesth Intensive Care*; 28:82-86.
- 79) McConville J, Vincent A (2002). Diseases of the neuromuscular junction. *Curr Opin Pharmacol*; 2:296-301.
- 80) McMahan UJ (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 55:407-418.
- 81) McQuillen MP (1966). Familial limb-girdle myasthenia. *Brain*; 89:121-132.
- 82) Middleton LT (1996). 34th ENMC International Workshop: Congenital myasthenic syndromes, 10-11 June 1995. *Neuromuscul Disord*; 6:133-136.
- 83) Middleton L, Ohno K, Christodoulou, Brengman J, Milone M, Neocleous V, Serdaroglu P, Deymeer F, Ozdemir C, Mubaidin A, Horany K, Al-Shehab A, Mavromatis I, Mylonas I, Tsingis M, Zamba E, Pantzaris M, Kyriallis K, Engel AG (1999). Chromosome 17p-linked myasthenic stem from defects in the acetylcholine receptor epsilon-subunit gene. *Neurology*; 53:1076-1082.
- 84) Milone M, Hutchinson DO, Engel AG (1994). Patch-clamp analysis of the properties of acetylcholine receptor channels at the normal human endplate. *Muscle Nerve*; 17:1364-1369.
- 85) Milone M, Ohno K, Fukudome T, Shen XM, Brengman J, Griggs RC, Engel AG (1998). Congenital myasthenic syndrome caused by novel loss-of-function mutations in the human AChR epsilon subunit gene. *Ann N Y Acad Sci*; 841:184-188.

- 86) Milone M, Wang HL, Ohno K, Fukudome T, Pruitt JN, Bren N, Sine SM, Engel AG (1997). Slow-channel myasthenic syndrome caused by enhanced activation, desensitization, and agonist binding affinity attributable to mutation in the M2 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit. *J Neurosci*; 17:5651-5665.
- 87) Milone M, Wang HL, Ohno K, Prince R, Fukudome T, Shen XM, Brengman JM, Griggs RC, Sine SM, Engel AG (1998). Mode switching kinetics produced by a naturally occurring mutation in the cytoplasmic loop of the human acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron*; 20:575-588.
- 88) Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, Sakmann B (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature*; 321:406-411.
- 89) Mishina M, Tobimatsu T, Imoto K, Tanaka K, Fujita Y, Fukuda K, Kurasaki M, Takahashi H, Morimoto Y, Hirose T (1985). Location of functional regions of acetylcholine receptor alpha-subunit by site directed mutagenesis. *Nature*; 313:364-369.
- 90) Missias AC, Mudd J, Cuningham JM, Steinbach JH, Merlie JP, Sanes JR (1997). Deficient development and maintenance of postsynaptic specializations in mutant mice lacking an „adult” acetylcholine receptor subunit. *Development*; 124:5075-5086.
- 91) Mora M, Lambert EH, Engel AG (1987). Synaptic vesicle abnormality in familial infantile myasthenia. *Neurology*; 37:206-214.
- 92) Mullis KB (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*; 48:579-582.
- 93) Nichols P, Croxson R, Vincent A, Rutter R, Hutchinson M, Newsom-Davis J, Beeson D (1999). Mutation of the acetylcholine receptor promoter ϵ -subunit in congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol*; 45:439-443.
- 94) Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Tanabe T, Shimizu S, Kikuyotani S, Kayano T, Hirose T, Inayama S (1983). Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha-subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature*; 305:818-823.

- 95) Novik KL, Nimmerich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S (2002). Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues Mol Biol*; 4:111-128.
- 96) Ohno K, Anlar B, Engel AG (1999). Congenital myasthenic syndrome caused by a mutation in the Ets-binding site of the promotor region of the acetylcholine receptor epsilon subunit gene. *Neuromuscul Disor*; 10:131-135.
- 97) Ohno K, Anlar B, Ozdirim E, Brengman JM, DeBleecker JL, Engel AG (1998). Myasthenic syndromes in Turkish kinships due to mutations in the acetylcholine receptor. *Ann Neurol*; 44:234-241.
- 98) Ohno K, Brengmann JM, Felice KJ, Cornblath DR, Engel AG (1999). Congenital end-plate acetylcholinesterase deficiency caused by a nonsense mutation and an A→G splice-donor-site mutation at position + 3 of the collagenlike-tail-subunit gene (ColQ): How does G at position + 3 result in aberrant splicing?. *Am J Hum Genet*; 65:635- 644.
- 99) Ohno K, Brengman J, Tsujino A, Engel AG (1998). Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:9654-9659.
- 100) Ohno K, Engel AG (2002). Congenital myasthenic syndromes: gene mutations. *Neuromuscul Disord*; 12:807-811.
- 101) Ohno K, Engel AG (2002). Congenital myasthenic syndromes: genetic defects of the neuromuscular junction. *Curr Neurol Neurosci Rep*; 2:78-88.
- 102) Ohno K, Engel AG, Brengman JM, Shen XM, Heidenreich F, Vincent A, Milone M, Tan E, Demirci M, Walsh P, Nakano S, Akiguchi I (2000). The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol*; 47:162-170.
- 103) Ohno K, Engel AG, Shen XM, Selcen D, Brengman J, Harper CM, Tsujino A, Milone M (2002). Rapsyn Mutations in Humans Cause Endplate Acetylcholine-Receptor Deficiency and Myasthenic Syndrome. *Am J Hum Genet*; 70:875-885.

- 104) Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, Brengman JM, Bouzat C, Sine SM, Engel AG (1995). Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the ϵ subunit. *Proc Natl Acad Sci*; 92:758- 762.
- 105) Ohno K, Quiram PA, Milone M, Wang HI, Harper MC, Pruitt JN 2nd, Brengman JM, Pao L, Fischbeck KH, Crawford TO, Sine SM, Engel AG (1997). Congenital myasthenic syndrome due to heteroallelic nonsense/ missense mutations in the acetylcholine receptor epsilon subunit gene: identification and functional characterization of six new mutations. *Hum Mol Genet*; 6: 753-766.
- 106) Ohno K, Sadeh M, Blatt I, Brengmann JM, Engel AG (2003). E-box mutations in the RAPSN promotor region in eight cases with congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet*; 12:739-48.
- 107) Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Harper CM, Bajzer Z, Udd B, Beyring R, Robb S, Kirkham FJ, Engel AG (2001). Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98:2017-2022.
- 108) Ohno K, Wang HL, Milone M, Bren N, Brengman JM, Nakano S, Quiram P, Pruitt JN, Sine SM, Engel AG (1996). Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor ϵ subunit. *Neuron*; 17:157-170.
- 109) Oosterhuis HJ, NDJ, Wokke JH, Molenaar PC, Weerden TV, Oen BS, Jennekens FG, Veldman H, Wray DW et al (1987). The slow channel syndrome. Two new cases. *Brain*; 110:1061-1079.
- 110) Palace J, Wiles CM, Newsom-Davis J (1991). 3,4-Diaminopyridine in the treatment of congenital (hereditary) myasthenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 54:1069-1072.
- 111) Quiram PA, Ohno K, Milone M, Patterson MC, Pruitt NJ, Brengmann JM, Sine SM, Engel AG (1999). Mutation causing congenital myasthenia reveals acetylcholine receptor β/δ subunit interaction essential for assembly. *J Clin Invest*; 104:1403- 1410.

- 112) Ramarao MK, Bianchetta MJ, Lanke J, Cohen, JB (2001). Role of rapsyn tetrapeptide repeat and coiled-coil domains in self-association and nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Biol Chem*; 276:7475-7483.
- 113) Ramarao MK, Cohen, JB (1998). Mechanism of nicotinic acetylcholine receptor cluster formation by rapsyn. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:4007-4012.
- 114) Rupp F, Payan D, Magill-Solc C, Scheller RH (1991). Structure and expression of a rat agrin. *Neuron*; 6:811-823.
- 115) Sadeh M, Blatt I, Goldhammer Y (1993). Single fiber EMG in a congenital myasthenic syndrome associated with malformations. *Muscle Nerve*; 16:177-180.
- 116) Schaeffer L, Duclert N, Huchet-Dymanus M, Changeux JP (1998). Implication of a multisubunit Ets-related transcription factor in synaptic expression of the nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO*; 17:3078-3090.
- 117) Schmidt C, Abicht A, Krampfl K, Voss W, Stucka R, Mildner G, Petrova S, Schara U, Mortier W, Bufler J, Huebner A, Lochmüller H (2003). Congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation in the gene encoding choline acetyltransferase. *Neuromuscul Disord*; 13:245-251.
- 118) Shen XM, Ohno K, Fukudome T, Tsujino A, Brengman JM, De Vivo DC, Packer RJ, Engel AG (2002). Congenital myasthenic syndrome caused by low-expressor fast-channel AChR delta subunit mutation. *Neurology*; 59:1881-1888.
- 119) Shen XM, Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Gingold M, Sine SM, Engel AG (2003). Mutation causing severe myasthenia reveals functional asymmetry of AChR signature cysteine loops in agonist binding and gating. *J Clin Invest*; 111:497-505.
- 120) Sieb JP, Kraner S, Schrank B, Reitter B, Goebel TH, Tzartos SJ, Steinlein OK (2000). Severe congenital myasthenic syndrome due to homozygosity of the 1293insG ϵ -acetylcholine receptor subunit mutation. *Ann Neurol*; 48:379-383.
- 121) Sine SM, Ohno K, Bouzat C, Auerbach A, Milone M, Pruitt JN, Engel AG (1995). Mutation of the acetylcholine receptor alpha subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity. *Neuron*; 15:229-239.

- 122) Stucka R, Abicht A, Song IH, Bonsch D, Deufel T, Lochmüller H (1999). A modified alignment of human and rodent 5' untranslated sequences of the acetylcholine receptor epsilon subunit gene revealed additional regions of high homology (2000). *Neuromuscul Disord*; 10:213-214.
- 123) Timms KM, Hockett LE, Belmont JW, Shapira SK, Gibbs RA (1998). DNA deletion confined to the iduronate-2-sulfatase promoter abolishes IDS gene expression. *Hum Mutat*; 11:121-126.
- 124) Valenzuela DM, Stitt TN, DiSteffano PS, Rojas E, Mattsson K, Compton DL, Nunez L, Park JS, Stark JL, Gies DR (1995). Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*; 15:573-584.
- 125) Vincent A, Beeson D, Lang B (2000). Molecular targets for autoimmune and genetic disorders of neuromuscular transmission. *Eur J Biochem*; 267:6717-6728.
- 126) Vincent A, Newland C, Croxen R, Beeson D (1997). Genes at the junction-candidates for congenital myasthenic syndromes. *Trends Neurosci*; 20:15-22.
- 127) Wallis TJ, Engel AG, Nagel AS, Harper CM, Trastek VF (1993). Congenital myasthenic syndrome associated with paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release. *Ann N Y Acad Sci*; 681:461-468.
- 128) Wang HL, Ohno K, Milone M, Brengman JM, Evoli A, Batocchi AP, Middleton LT, Christodoulou K, Engel AG, Sine SM (2000). Fundamental gating mechanism of nicotinic receptor channel revealed by mutation causing a congenital myasthenic syndrome. *J Gen Physiol*; 116:449- 460.
- 129) Witzemann V, Schwarz H, Koenen M, Berberich C, Villarroel A, Wernig A, Brenner HR, Sakmann B (1996). Acetylcholine receptor epsilon-subunit deletion causes muscle weakness and atrophy in juvenile and adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:13286-13291.

130) Wokke JH, Jennekens FG, Molenaar PC, Van den Oord CJ, Oen BS, Busch HF (1989). Congenital paucity of secondary synaptic clefts (CPSC) syndrome in 2 adults sibs. *Neurology*; 39: 648-654.

131) Youssef S (1983). Thymectomy for myasthenia gravis in children. *J Pediatr Surg*; 18:537.

132) Zhou M, Engel AG, Auerbach A (1999). Serum choline activates mutant acetylcholine receptors that cause slow channel congenital myasthenic syndromes, *Proc Natl Sci USA*; 96:10466-10471.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Folgende Abkürzungen wurden der Einfachheit und Übersichtlichkeit halber häufig verwendet (alphabetisch geordnet).

Abb.	Abbildung
AChE / <i>ACHE</i>	Azetylcholinesterase / <i>Gen für globulären Anteil der Azetylcholinesterase</i>
AChR	Azetylcholinrezeptor/en (nikotinerg)
bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ChAT / <i>CHAT</i>	Cholin-Azetyltransferase / <i>Gen</i>
ColQ / <i>COLQ</i>	Collagen tail (kollagenartige Verankerung) / <i>Gen</i>
CMAP	Compound muscle action potential (Summenmuskelaktionspotential)
CMS	Congenital myasthenic syndrome (Kongenitale/s myasthene/s Syndrom/e)
CMS-EA	CMS mit episodischen Apnoen
FCCMS	Fast-Channel CMS
SCCMS	Slow-Channel CMS
DAP	Diaminopyridin
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EMG	Elektromyographie
EFEMG	Einzelfaser-Elektromyographie
ENMC	European Neuromuscular Centers
EDTA	Ethylenediamino tetraacido acid (Ethylendiamino-Tetraessigsäure)
EPP	Endplate potential (Endplattenpotential)
Hz	Hertz

kb	Kilobasen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MEPC	Miniature endplate current (Minatur-Endplattenstrom)
MEPP	Miniature endplate potential (Miniatur-Endplattenpotential)
Mg ²⁺	Magnesiumkationen
min	Minuten
mM	milli Mol
MuSK	Muskelspezifische Kinase
µg	mikro Gramm
µl	mikro Liter
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
Rapsyn / <i>RAPSN</i>	Receptor-assoziiated protein of the synapse / <i>Gen</i>
RNA	Ribonuklein acid (Ribonukleinsäure)
mRNA	Messenger ribonuklein acid
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
Tab.	Tabelle
VAcHT / <i>VACHT</i>	vesikuläre Azetylcholintransferase / <i>Gen</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8.2 Danksagung

Diese medizinische Dissertationsarbeit mit dem Thema „Genetische Diagnostik von Kongenitalen Myasthenien“ wurde im Mai 1999 am Friedrich-Baur-Institut und Genzentrum in München unter der Aufsicht von Professor Dr. Hanns Lochmüller und der Betreuung von Dr. Angela Abicht aufgenommen.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Hanns Lochmüller und meiner Betreuerin Frau Dr. Angela Abicht für ihre umfassende Unterstützung, Motivation, der Möglichkeit, genetische Zusammenhänge zu erforschen und auf dem Gebiet der Erforschung von neuromuskulären Krankheiten tätig sein zu können.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Genzentrums und des Friedrich-Baur-Instituts, die am Zustandekommen dieser Dissertation beteiligt sind. Damit meine ich im besonderen Frau Dr. Carolin Schmidt für ständige Diskussion und Dr. Rolf Stucka als kompetenten Ansprechpartner und alle anderen, die mir helfend zur Seite standen.

Mein besonderer Dank möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie aussprechen, im einzelnen meinen Eltern, meiner Schwester sowie meiner ganzen Verwandtschaft in Südkorea. An dieser Stelle danke ich auch all meinen lieben Freunden, die mir ebenfalls immer helfend zur Seite standen.

8.3 Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: *Song*
Vorname: *In-Ho*
Geburtsdatum: *18. Juli 1974*
Geburtsort: *Krefeld*
Staatsangehörigkeit: *deutsch*
Religion: *römisch-katholisch*
Familienstand: *ledig*

SCHULBILDUNG

Aug 1981 – Juni 1982 Grundschule in Leverkusen
Sept 1982 – Juli 1985 Grundschule in München
Sept 1985 – Juli 1994 Luitpoldgymnasium in München
Juli 1994 Allgemeine Hochschulreife

DIENSTZEITEN

Sept 1994 – Okt 1995 Zivildienst als Sanitäter im Rettungsdienst beim Arbeiter-Samariter-Bund in München

HOCHSCHULBILDUNG

Nov 1995 Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, Medizinische Fakultät, Fachrichtung Humanmedizin
April 1998 Ärztliche Vorprüfung
März 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2001 Zweites Amerikanisches Staatsexamen (United States Medical Licensing Examination, USMLE, Step 2)
Sept 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dez 2001- Nov 2002 Praktisches Jahr
 • Neurologie, Klinikum Grosshadern, München
 • Innere Medizin, Beth Israel Hospital (Harvard Medical School), Boston, USA
 • Chirurgie, Asan Medical Center, Seoul, Korea
Dez 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

STIPENDIEN

Juli 1994	Stipendium der Bayerischen Hochbegabtenförderung
Juli 2001	Stipendium für Austauschprogramm im Rahmen des Praktischen Jahres mit der Harvard Medical School in Boston, USA
Aug 2002	Stipendium der Dr.-Democh-Maurmeier-Stiftung
Aug 2002	Stipendium von „e-fellows“ (online-Internetstipendium)

PROMOTION

Mai 1999	Aufnahme der Dissertationsarbeit am Friedrich-Baur-Institut und Genzentrum unter PD Dr. Lochmüller. Thema: „Genetische Diagnostik von Kongenitalen Myasthenen Syndromen“
Sept 2000	Posterpreis für Posterpräsentation auf der 73.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie in Baden-Baden

SPRACHEN

Englisch	sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Koreanisch	gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Latein	gute Kenntnisse in Übersetzen und Interpretation

Hobbies

Taekwondo:	Beginn 1984
Basketball:	Mitglied der Schulmannschaft
Verein:	Vorstandsmitglied des Vereins „Association of Korean Interchange“ (AKIN e.V.) zur Förderung der deutsch-koreanischen Beziehungen
Sonst:	Lesen, Kino, Sprachen, Politik

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Berlin, den

.....
(In-Ho Song)

Dissertation eingereicht am: