

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

Molekulargenetische Analyse von postsynaptischen
kongenitalen myasthenen Syndromen

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

vorgelegt von
Friederike Sophie Hoellen
aus
Marburg
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Danek
Prof. Dr. A. Zachoval
Prof. Dr. H. Hartl

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Juliane Simona Müller

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 4.12.2008

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. **Friederike Hoellen**, Henning Christian Schenk, Vidosava Rakocevic Stojanovic, Vedrana Milic Rasic, Slobodanka Todorovic, Angela Abicht, Hanns Lochmüller, Klaus Krampfl, Juliane S. Müller
A novel mutation of the M2 domain of the acetylcholine receptor β -subunit causes a mild form of slow-channel myasthenic syndrome.
Neuromuscular Disorders 2008, eingereicht zur Veröffentlichung

2. Mihaylova V, Müller JS, Vilchez JJ, Salih MA, Kabiraj MM, D'Amico A, Bertini E, Wölfle J, Schreiner F, Kurlemann G, Rasic VM, Siskova D, Colomer J, Herczegfalvi A, Fabriciova K, Weschke B, Scola R, **Hoellen F**, Schara U, Abicht A, Lochmüller H.
Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes.
Brain. 2008 Mar;131(Pt 3):747-59.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	2
2	Einleitung	3
2.1	CMS	3
2.2	Die neuromuskuläre Endplatte	3
2.3	Klassifizierung der CMS	5
2.4	Präsynaptische Formen der CMS	6
2.5	Synaptische Formen der CMS	6
2.6	Postsynaptische Formen der CMS	7
2.6.1	Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR)	8
2.6.1.1	Aufbau des AChR	8
2.6.1.2	Kinetik des nikotinischen Acetylcholinrezeptors	9
2.6.2	Genetische Defekte des Acetylcholinrezeptors	10
2.6.2.1	Acetylcholinrezeptor-Mangel	10
2.6.2.2	Das Slow-Channel-Syndrom	11
2.6.2.3	Das Fast-Channel-Syndrom	12
2.6.2.4	Mutationen in RAPSN	12
2.7	Identifizierung neuer Kandidatengene: Das APC-Gen	14
2.8	Zielsetzung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Patienten	16
3.2	Molekulargenetische Methoden	17
3.2.1	DNA-Isolierung	17
	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	17
3.2.1.1	Prinzip der PCR	17
3.2.1.2	Standard-PCR-Protokoll	18
3.2.2	Aufreinigung des PCR-Produkts	18
3.2.3	Analyse der Nukleotidsequenzen	19
3.2.4	Restriktionsenzymatischer Verdau	19
3.2.5	Klonierung: Einführung von Mutationen in den Vektor β AChR/CMV2	20
3.2.6	Ligation	21
3.2.7	Transformation von E.coli	21
3.2.8	Bakterienkultur	21
3.2.9	Extraktion von Plasmid DNA aus E.coli	21
3.2.10	Zellkultur	22
3.2.11	α -Bungarotoxin-Färbungen, Mikroskopie	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Analyse des CHRNA1-Gens	24
4.1.1	Patientin A: Die Mutation β T265S	24
4.1.1.1	Klinik	24
4.1.1.2	Mutationsanalyse	26
4.1.1.3	Funktionelle Charakterisierung der Mutation β T265S	26
4.1.2	Patientin B: Die Mutationen β Y149X und β R220C	29
4.1.2.1	Klinik	30
4.1.2.2	Mutationsanalyse	31
4.1.2.3	Funktionelle Charakterisierung der Mutation β R220C	31

4.1.3	Patientin C: Die Aminosäurevarianten β Y15C und β V91M.....	34
4.1.3.1	Klinik	34
4.1.3.2	Mutationsanalyse	35
4.1.3.3	Funktionelle Charakterisierung des Aminosäureaustauschs β Y15C 35	
4.1.4	Patientin D: Die Aminosäurevarianten β I80M und β I397T	37
4.1.4.1	Klinik	37
4.1.4.2	Mutationsanalyse	38
4.1.5	Patientin E: Die Aminosäurevariante β I397T.....	38
4.1.5.1	Klinik	38
4.1.5.2	Mutationsanalyse	39
4.2	Analyse des RAPSN-Gens.....	39
4.2.1	Patientin A : Die Mutationen N88K und S201R	41
4.2.1.1	Klinik	41
4.2.1.2	Mutationsanalyse	41
4.2.2	Patientinnen B und C: homozygote Träger der Mutation N88K.....	43
4.2.2.1	Klinik	43
4.2.2.2	Mutationsanalyse	43
4.2.3	Patientinnen D und E: Heterozygote Träger der Mutation N88K	43
4.2.3.1	Klinik	43
4.2.3.2	Mutationsanalyse	44
4.3	Analyse des CHRNE-Gens	44
4.3.1	Patienten A, B und C: Die Mutation 1267delG	46
4.3.1.1	Klinik	46
4.3.1.2	Mutationsanalyse	46
4.3.2	Patient D: Die Mutation ϵ C142Y.....	47
4.3.2.1	Klinik	47
4.3.2.2	Mutationsanalyse	47
4.3.3	Patienten E-H: Die homozygote Mutation 723delC	48
4.3.3.1	Klinik	48
4.3.3.2	Mutationsanalyse	48
4.4	Analyse des APC-Gens.....	48
5	Diskussion.....	49
5.1	Mutationen in der β -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors	49
5.1.1	Die Mutation β T265S: Eine Slow-Channel-Mutation	50
5.1.1.1	Klinische Indizien für ein Slow-Channel-Syndrom	50
5.1.1.2	Vererbungsmodus des Slow-Channel-Syndroms	51
5.1.1.3	Kinetische und morphologische Merkmale des Slow-Channel- Syndroms	51
5.1.1.4	Verwandte Mutationen im klinischen Vergleich.....	52
5.1.1.5	Molekularbiologische Charakterisierung der Mutation β T265S	55
5.1.2	Die Mutation β R220C	57
5.1.2.1	Molekularbiologische Charakterisierung der Mutation β R220C	57
5.1.2.2	Klinik und Morphologie im Vergleich mit korrespondierenden Mutationen.....	57
5.1.3	Die Aminosäurevariationen β Y15C und β V91M.....	59
5.1.3.1	Molekularbiologische Charakterisierung der Aminosäurevariationen β Y15C und β V91M	59
5.1.3.2	Klinik und Morphologie im Vergleich.....	60
5.1.4	Die Aminosäurevarianten β I80M und β I397T	60
5.1.5	Bedeutung der identifizierten <i>CHRNA1</i> -Mutationen	61

5.2	Mutationen in der ϵ -Untereinheit des AChRs	62
5.3	Mutationen in RAPSN	65
5.4	Bedeutung molekulargenetischer Analysen für Klinik und Therapie von CMS 68	
6	Literatur	72
7	Anhang.....	75
7.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	75
7.2	Primersequenzen	78
7.3	Genbank-Zugangsnummern.....	80
7.4	Fragebogen zur klinischen Erfassung von CMS-Patienten	81
7.5	Danksagung	82
7.6	Lebenslauf	83
8	Ehrenwörtliche Erklärung.....	85

1 Zusammenfassung

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (engl.: Congenital Myasthenic Syndrome = CMS) stellen eine heterogene Gruppe relativ seltener genetisch-bedingter neuromuskulärer Erkrankungen dar. Die einzelnen Erkrankungen dieser Gruppe unterscheiden sich untereinander bezüglich Pathogenese, Molekulargenetik und klinischer Symptomatik. Gemeinsames Merkmal der CMS ist die gestörte neuromuskuläre Erregungsübertragung an der motorischen Endplatte, der ein genetischer Defekt synapsenassoziierter Proteine zugrunde liegt. Sogenannte postsynaptische Defekte können die vier Untereinheiten des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (AChR) betreffen, oder aber Rezeptor-assoziierte Bindungsproteine, beispielsweise das Protein Rapsyn. Neben funktionellen Defekten, die die Kinetik des Kanalproteins beeinflussen, wird die Bildung von AChR-Komplexen durch strukturelle Defekte der beteiligten Proteine gestört. Die Morphologie der sogenannten AChR-Cluster kann mit Hilfe spezieller Färbemethoden mikroskopisch untersucht werden und lässt Rückschlüsse auf die funktionelle Integrität der neuromuskulären Erregungsübertragung durch synaptische Transmitter zu.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits beschriebene CMS-Mutationen detektiert, sowie neue Mutationen in den bekannten CMS-Genen *CHRNA1* und *CHRNE*, die für die β -Untereinheit bzw. die ϵ -Untereinheit des AChRs kodieren, sowie in *RAPSN*, das für das Ankerprotein Rapsyn kodiert, identifiziert. Des Weiteren wurde anhand eines großen CMS Patientenkollektivs, bei dem kein molekulargenetisches Korrelat für die Erkrankung gefunden werden konnte, ein neues potentiell Kandidatengen, das *APC*-Gen (*APC* = Adenomatöse Polyposis Coli), analysiert. Die Analyse klinischer Daten sowie der Vergleich mit in der Literatur beschriebenen molekulargenetischen und klinischen Befunden ermöglichen Hypothesen zur Korrelation von Geno- und Phänotyp und bilden die Grundlage für verbesserte Diagnostik und Therapie des einzelnen Patienten.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Teile des *APC*-Gens (*APC* = Adenomatöse Polyposis Coli) mit synapsenassozierten Proteinen interagieren. Bei 82 Patienten mit CMS ungeklärter Ätiologie wurden die für die Interaktion relevanten Teile des *APC*-Gens auf Mutationen untersucht. In unserem Patientenkollektiv konnten in diesem CMS-Kandidatengen allerdings keinerlei genetische Abweichungen gegenüber Normalkontrollen detektiert werden.

Fünf CMS-Patienten weisen Mutationen im *CHRNE*-Gen auf, die in einer Defizienz der ϵ -Untereinheit des AChRs resultieren. Es handelt sich dabei um die häufige Frameshift-Mutation 1267delG in homozygoter und compound heterozygoter Form in

Kombination mit der Mutation 734delC und der Spleißmutation IVS7-2A>G, sowie um die bereits beschriebene Mutation 723delC und die bisher noch nicht publizierte Mutation C142Y.

Bei fünf weiteren CMS-Patienten konnten Mutationen des *RAPSN*-Gens identifiziert werden, das für das AChR-assoziierte Protein Rapsyn kodiert. Dabei sind alle Patienten zumindest heterozygote Träger der Mutation N88K. Die heterozygote Mutation S201R im Zusammenspiel mit N88K präsentierte sich klinisch interessanterweise mit dem Bild einer Gliedergürtelmyasthenie. Die Punktmutation V165M wurde bereits beschrieben, E94K hingegen nicht.

Die Analyse der β -Untereinheit des AChRs (*CHRNA1*-Gen) ergab eine dominante Mutation, β T265S. Die erwachsene Patientin weist das typische klinische Bild eines sogenannten Slow-Channel-Syndroms auf. Das morphologische Expressionsmuster von AChR mit dem Gendefekt β T265S wurde anhand von Klonierungsstudien untersucht. Die Ergebnisse sind mit dem für einen kinetischen Defekt charakteristischen Bild vereinbar. Bei einer weiteren Patientin konnten die compound heterozygoten Mutationen β R220C und β Y149X nachgewiesen werden. Die Pathogenität von β R220C wurde durch entsprechende Expressionsstudien belegt, β Y149X resultiert in einem Transkriptionsabbruch. Des Weiteren fanden sich die Aminosäureaustausche β Y15C, β V91M, β I80M sowie β I397T. Bei diesen Varianten kann die Hypothese der Pathogenität jedoch nicht gestützt werden, da sich in den jeweiligen Familien identische Genotypen mit gesundem Phänotyp fanden. Keine dieser Mutationen wurde bisher publiziert, wobei in der Literatur gegenwärtig insgesamt lediglich fünf *CHRNA1*-Mutationen beschrieben werden. Angesichts der vorliegenden Ergebnisse sollte das *CHRNA1*-Gen bei CMS-Patienten mit variabler klinischer Symptomatik verstärkt untersucht werden.

Im molekulargenetischen Vergleich der gefundenen Mutationen mit bereits beschriebenen Mutationen fiel auf, dass verschiedene CMS-Mutationen sich häufig in bestimmten Lokalisationen der Primärstruktur des Proteins konzentrieren. Zudem finden sich Mutationen in den einzelnen Untereinheiten des AChRs oft in korrespondierenden Aminosäuren. Klinische Daten weisen in manchen Fällen Parallelen auf, der Vergleich zeigt jedoch auch, dass identische Genotypen phänotypisch eine hohe Heterogenität aufweisen können. Neben der gezielten molekulargenetischen Diagnostik ermöglichen die vorliegenden Analysen eine bessere Interpretation der Symptomatik sowie eine gezielte Steigerung der Effizienz von Therapieversuchen und damit die Möglichkeit einer besseren Betreuung des Patienten durch den Kliniker.

2 Einleitung

2.1 CMS

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (engl. Congenital myasthenic syndrome = CMS) stellen eine Gruppe relativ seltener neuromuskulärer Erkrankungen dar, die bezüglich Klinik, Pathogenese und Genetik ein heterogenes Bild bieten. Gemeinsames Merkmal der CMS ist ein Defekt der neuromuskulären Erregungsübertragung durch Transmissionsstörungen an der motorischen Endplatte [1]. Dieser beruht auf Mutationen synapsenassoziierter Gene, die in autosomal-rezessiver, seltener auch autosomal-dominanter oder sporadischer Form auftreten. Die Erkrankung manifestiert sich typischerweise bereits im Neugeborenen- bis Kleinkindesalter, bei einigen Subtypen auch erst im Erwachsenenalter mit belastungsabhängiger Muskelschwäche. Die Prävalenz der CMS wird auf 1:500 000 in Europa geschätzt [2], wobei ca. 10% aller Myasthenien im Kindesalter auf CMS zurückzuführen sind [3]. Seit 1994 bietet die molekulargenetische Analyse eine Möglichkeit der Diagnostik der CMS, die hinsichtlich der Charakterisierung der zugrundeliegenden Pathogenese, der Identifizierung relevanter Genloci und somit für Therapie, Prognose und genetische Beratung von eminenter Bedeutung ist. Neben der Untersuchung neuer Mutationen in bereits identifizierten CMS-relevanten Genen, spielt auch die Entdeckung anderer Gene, die an der Pathogenese beteiligt sind, eine entscheidende Rolle. Dabei ist die phänotypische Ausprägung, die aus einem Defekt in einem spezifischen Gen resultiert, in hohem Maße variabel [2]. Die Untersuchung der Korrelation von Genotyp und Phänotyp ist hinsichtlich der Diagnostik von großer praktischer Relevanz. Ergänzend zur Molekulargenetik ermöglichen die Analyse elektrophysiologischer Phänomene und die morphologische Typisierung Erkenntnisse über die pathophysiologischen Konsequenzen einer identifizierten Mutation [4].

2.2 Die neuromuskuläre Endplatte

Die Physiologie der neuromuskulären Erregungsübertragung, sowie Struktur und Funktion der motorischen Endplatte, bilden die Basis der wissenschaftlichen Erkenntnisse, die über die Pathogenese neuromuskulärer Erkrankungen gewonnen werden konnten. Andererseits konnten, ausgehend von pathologischen Phänomenen der synaptischen Signaltransmission, deren molekulargenetischer Defekt identifiziert wurde, Rückschlüsse gezogen werden auf die Funktion der betroffenen molekularen Strukturen [5]. Die Hypothese der chemisch synaptischen Übertragung durch Neurotransmitter basiert auf den experimentellen Erkenntnissen des Pharmakologen

Otto Loewi aus dem Jahre 1920. Der Skelettmuskel ist aus Muskelfasern aufgebaut, die von einem Motoneuron innerviert werden, dessen Zellkern im Vorderhorn des Rückenmarks oder im Hirnstamm sitzt. Die neuromuskuläre Endplatte stellt eine spezifische Form der Synapse dar, die einen neuronalen elektrischen Impuls in einen chemischen Reiz übersetzt und eine Transmitter-gesteuerte Reizweiterleitung an die Muskelfaser ermöglicht. Die Synapse wird morphologisch in drei Teile gegliedert: Der präsynaptische Teil, der der Nervenendigung entspricht und myelinisiert, d.h. von Schwann'schen Zellen ummantelt ist, der synaptische Spalt, und der postsynaptische Teil, die Membran der Muskelfaser [5]. Läuft ein Aktionspotential, das durch axonale spannungsgesteuerte Natriumkanäle weitergeleitet wird, in die präsynaptische Endigung der neuromuskulären Endplatte ein, kommt es zu einer Depolarisation, die einen spannungsabhängigen Kalziumeinstrom triggert. Dieser bewirkt eine exocytotische Freisetzung von Quanten von Acetylcholin aus präsynaptischen Acetylcholinvesikeln in den synaptischen Spalt durch Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Die postsynaptische Depolarisation, die durch das Quantum von Acetylcholin aus einem einzigen Vesikel generiert wird, bezeichnet man als minimales Endplattenpotential (MEPP). Die MEPP Amplitude korreliert positiv mit der variablen Menge des in einem Vesikel enthaltenen Acetylcholin [5]. Die Synthese des Transmitters Acetylcholin aus Acetyl-CoA und Cholin wird präsynaptisch durch das Enzym Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) katalysiert. Acetylcholin diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an postsynaptische nikotinische Acetylcholinrezeptoren, ligandenaktivierte Ionenkanäle. Die Bindung von zwei Molekülen Acetylcholin bewirkt durch die Öffnung des Kanals in der Muskelfaser einen selektiven Einstrom von Kationen und es entsteht ein Endplattenpotential (EPP). Dieses Endplattenpotential aktiviert spannungsabhängige Natriumkanäle ($Na_v1.4$), die sich am Grund der postsynaptischen Falten befinden. Der Quotient aus EPP-Amplitude und der Differenz von Schwellenpotential und Membranpotential wird als „Safety Factor“ bezeichnet [5]. Die Aktivierung der $Na_v1.4$ -Kanäle ist das entscheidende Kriterium für das Erreichen des Schwellenpotentials, das eine Kontraktion der Muskelfaser einer motorischen Einheit auslöst [4]. Nach erfolgter Impulsweiterleitung diffundiert Acetylcholin von seinem Rezeptor ab und wird im synaptischen Spalt durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE), das in der Basallamina verankert ist, hydrolytisch in Acetat und Cholin gespalten. Cholin wird in die präsynaptische Nervenendigung rückresorbiert (Abb. 1).

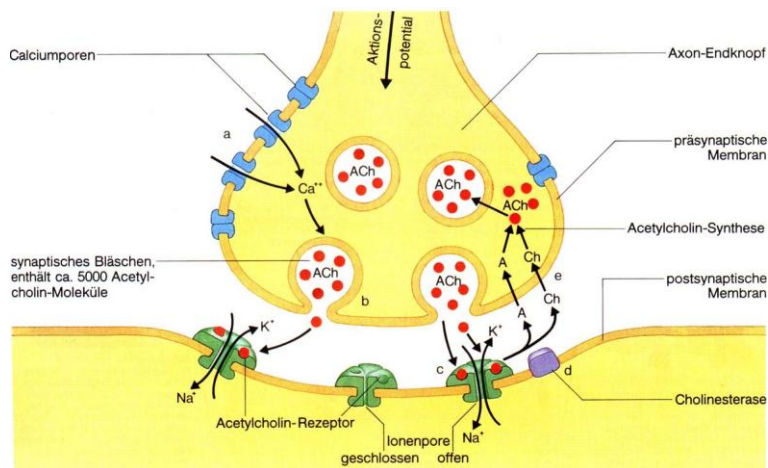


Abb. 1 (Quelle: www-public.tu-bs.de/8080...nmsynapsen.html.jpg)

Der „Safety Factor“ wird durch mehrere Faktoren bestimmt: die Quantität der in einem präsynaptischen Vesikel enthaltenen Acetylcholin Moleküle, das freigesetzte Acetylcholin Quantum, die Konzentration von Acetylcholinesterase im synaptischen Spalt, die Geometrie der Synapse, die Dichte der postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren und $Na_v1.4$ -Kanäle und deren Verteilungsmuster sowie kinetische Eigenschaften des Ionenkanals [4].

2.3 Klassifizierung der CMS

Entsprechend der Morphologie der Synapse werden die CMS hinsichtlich der Pathophysiologie in drei Subtypen klassifiziert: die präsynaptische, die synaptische und die postsynaptische Form. Präsynaptische Defekte können zurückgeführt werden auf inadäquate Dichte und Größe der Acetylcholin Vesikel, eine insuffiziente Freisetzung des Acetylcholins oder eine mangelhafte Resynthese des Neurotransmitters. Im synaptischen Spalt kann der Abbau des Transmitters gestört sein. Postsynaptisch kann die Effizienz des freigesetzten Acetylcholins durch fehlerhafte Interaktion mit dem Acetylcholinrezeptor, durch funktionelle oder quantitative Defekte des Rezeptors oder der Kinetik des Ionenkanals sowie des $Na_v1.4$ -Kanals beeinträchtigt sein. All diese Faktoren führen zu einer Herabsetzung der Amplitude des Endplattenpotentials, das Schwellenpotential wird nicht mehr überschritten, die Kontraktion der Muskelfaser als Reaktion auf einen adäquaten Reiz unterbleibt. Langfristig resultiert daraus eine Verminderung des Schwellenpotentials, bedingt durch die Plastizität der synaptischen Komponenten.

Dadurch kann, bei geringgradiger neuronaler Aktivität, eine suffiziente Funktion der neuromuskulären Erregungsleitung zunächst noch aufrechterhalten werden, während es bei hoher oder lang andauernder neuronaler Reizfrequenz zur charakteristischen belastungsinduzierten Muskelschwäche kommt. Dieses Phänomen kann klinisch in der Elektromyographie als pathologisches Dekrement registriert werden [6].

2.4 Präsynaptische Formen der CMS

In einem Kollektiv von 205 CMS Patienten waren in einer Studie der Mayo Clinic 7% der Erkrankungen auf einen Proteindefekt auf Ebene der Präsynapse zurückzuführen [4]. Bisher konnte einer dieser präsynaptischen Defekte molekulargenetisch genau identifiziert werden. Er betrifft das Enzym Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), das von dem Gen *CHAT* auf Chromosom 10q11.2 kodiert wird und präsynaptisch die Resynthese des Neurotransmitters Acetylcholin aus Acetyl-CoA und Cholin katalysiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Enzym an der Reifung der Synapse beteiligt ist [7]. Es wurden vierzehn verschiedene autosomal-rezessiv vererbliche Mutationen im *CHAT* Gen beschrieben [8]. Durch den resultierenden Proteindefekt ist die katalytische Aktivität der ChAT herabgesetzt oder gänzlich aufgehoben und es liegt ein präsynaptischer ACh-Mangel vor [9]. Klinisch imponiert charakteristischerweise bereits im Kindesalter ein schweres Krankheitsbild mit Exazerbationen in Form von episodischer Apnoe und transienter Bulbärparalyse, die lethal verlaufen können. Im symptomfreien Intervall tritt in der elektrophysiologischen Diagnostik erst bei einer Stimulation mit 5 Hz über mehrere Minuten ein Dekrement auf. Der Mestinon®-Test ist positiv. Diese pathologischen Befunde sprechen pathogenetisch für einen Defekt der ACh Resynthese oder des „Packings“ der präsynaptischen Transmitter-Vesikel mit einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren relativen Volumenreduzierung [2]. Weitere präsynaptische Defekte gehen mit einem Mangel an Acetylcholin-Vesikeln einher [10] oder gleichen nach elektrophysiologischen Kriterien dem Lambert-Eaton-Syndrom [2], wobei für diese Formen bisher noch kein molekulargenetisches Korrelat gefunden werden konnte.

2.5 Synaptische Formen der CMS

Im Jahre 1977 gelang es der Arbeitsgruppe um Andrew G. Engel erstmals, ein pathophysiologisches Korrelat für einen Subtyp der Kongenitalen myasthenen Syndrome zu identifizieren. Es handelt sich dabei um eine Verminderung des Enzyms Acetylcholinesterase im synaptischen Spalt [11]. Aus der Herabsetzung der katalytischen Aktivität resultiert eine persistierende hohe ACh-Konzentration im

synaptischen Spalt nach erfolgter Depolarisation der Muskelmembran, was neben einer Dauerstimulierung der postsynaptischen Ionenkanäle in Form eines Depolarisationsblocks langfristig zu einer Zerstörung der subsynaptischen Membran, der Acetylcholinrezeptoren und der spannungsgesteuerten Natriumkanäle führt [4]. Die verlängerte Öffnungsdauer der Kationenkanäle ermöglicht einen Einstrom von Calciumionen, die in der Muskelmembran lytische Enzyme (Caspasen) aktivieren, welche die postsynaptische Basallamina zerstören [6].

Dabei ist der zugrundeliegende genetische Defekt nicht in den katalytischen Untereinheiten der Acetylcholinesterase selbst lokalisiert, sondern in dem kollagenartigen Ankerprotein ColQ (engl.: collagenic tail subunit of asymmetric acetylcholinesterase), das von dem Gen *COLQ* auf Chromosom 3p25 kodiert wird, und das Enzym in der subsynaptischen Basallamina verankert [12].

2.6 Postsynaptische Formen der CMS

Die postsynaptisch lokalisierten Myasthenien stellen pathogenetisch die häufigste Manifestationsform der CMS dar, wobei es sich in den meisten Fällen um einen Defekt des Acetylcholinrezeptors handelt [4]. In einer vergleichenden Studie von 526 CMS-Patienten mit identifizierten CMS-Mutationen war der Defekt bei 447 Patienten, d.h. 84,98% in postsynaptischen Proteinen lokalisiert [9]. Der thematische Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit wurde auf diesen Typ der CMS gelegt.

Die molekulargenetischen Defekte des Acetylcholinrezeptors treten in zwei Manifestationsformen auf: Der Defekt kann quantitativer Natur sein, d.h. es resultiert eine verminderte Expression des Acetylcholinrezeptors [4], oder es liegt eine kinetische Anomalie des ligandengesteuerten Ionenkanals vor, die sich entweder als sogenanntes „Fast-Channel-Syndrom“ oder als „Slow-Channel-Syndrom“ äußert.

Bisher konnten neun Gene identifiziert werden, die an der Genese postsynaptischer Formen der CMS beteiligt sind.

Genetische Defekte wurden in allen Untereinheiten des adulten nikotinischen AchRs beschrieben, d.h. im für die α -, β -, δ - und ϵ -Untereinheit kodierenden Gen (*CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNB1*, *CHRND* und *CHRNE*) [9] sowie für die embryonale γ -Untereinheit (*CHRNA1*) [13], für das Ankerprotein Rapsyn (*RAPSM*) [9] für den spannungsabhängigen postsynaptischen Natriumkanal *SCN4A* (engl.: skeletal muscle sodium channel $Na_v1.4$) [14] und für die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinase MuSK (Muscle-specific-Kinase) [15]. Vor kurzem gelang es unserer Arbeitsgruppe in internationaler Kooperation, ein neues Gen, *DOK-7*, zu

identifizieren, das im Falle eines genetischen Defekts eine entscheidende Rolle in der Genese postsynaptischer Formen von CMS spielt [16].

(Abb. 2)

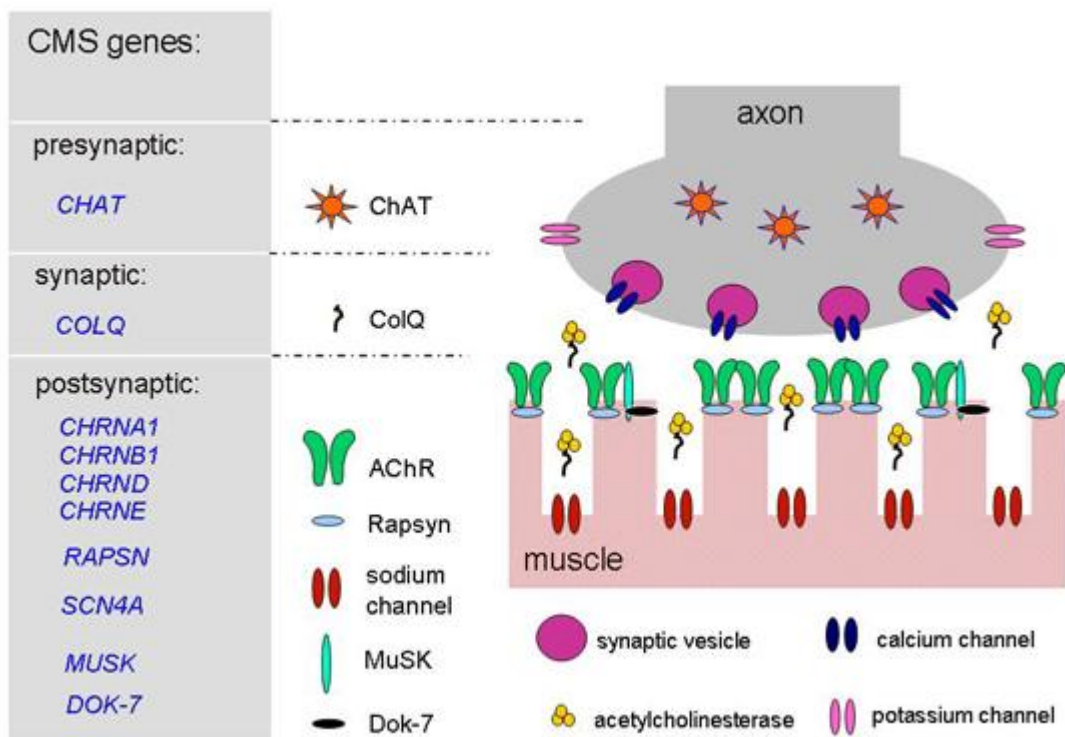


Abb.2 (Quelle: modifiziert aus [17])

2.6.1 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR)

2.6.1.1 Aufbau des AChR

Als Zielprotein der Autoimmunantikörper, die der Myasthenia gravis zugrunde liegen, war der nikotinische Acetylcholinrezeptor der neuromuskulären Endplatte stets Fokus intensiver Untersuchungen. Torpedo californica (Zitterrochen) verfügen über ein elektrisches Organ (Elektroplax), welches aus umgewandelten Muskeln besteht und reich an Acetylcholin-Rezeptoren ist. Studien an Membranfragmenten des elektrischen Organs haben maßgeblich zum Erkenntnisgewinn von Morphologie und Funktion des nikotinischen Acetylcholinrezeptors beigetragen. Aspekte der Kinetik

der Kanalpore konnten mit Hilfe von Neurotoxinen wie α -Bungarotoxin, D-Tubocurarin oder cholinergen Agonisten aufgeklärt werden. Die Patch-Clamp Methode ermöglichte Erkenntnisse über die Ionenleitfähigkeit des Kanals für spezifische Moleküle.

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor der neuromuskulären Endplatte ist eine ionotrope Kanalpore in der postsynaptischen Membran. Er ist auf den Scheitelpunkten der postsynaptischen Falten, die sich in den synaptischen Spalt vorwölben, lokalisiert. Es handelt sich um ein pentameres zylindrisches integrales Membranprotein. Die Untereinheiten, α , β , δ , ϵ zeichnen sich durch ihre homologe Primärstruktur sowie die Symmetrie ihrer Konfiguration im Acetylcholinrezeptor aus. Die α -Untereinheit ist im Rezeptor zweimal vertreten ($\alpha_2\beta\delta\epsilon$). Entwicklungsphysiologisch existieren zwei verschiedene Isoformen des Acetylcholinrezeptors: Beim fetalen Acetylcholinrezeptor ist die ϵ -Untereinheit des adulten Rezeptors durch die γ -Untereinheit ersetzt. Elektrophysiologisch weist der adulte Acetylcholinrezeptor, im Vergleich zur embryonalen Isoform, kürzere Kanalöffnungszeiten und eine um 50% höhere Ionenleitfähigkeit auf. Etwa ab der 33. Schwangerschaftswoche, wird die Expression der embryonalen Isoform des Acetylcholinrezeptors herunterreguliert und durch die ϵ -Untereinheit ersetzt [13]. Eine Ausnahme stellt hierbei die Augenmuskulatur dar, in deren synaptischen Strukturen der embryonale Typ des Acetylcholinrezeptors exprimiert wird [18]. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein genetischer Defekt der adulten ϵ -Untereinheit durch die Re-Expression der fetalen γ -Untereinheit teilkompensiert werden kann [5]. Jede Untereinheit besitzt vier Transmembran-Domänen (M1, M2, M3, M4), wobei die Carboxyl- und die Aminogruppe des Proteins extrazellulär lokalisiert sind. Die These, dass es sich um transmembranöse Moleküle handelt, wurde zunächst durch die Erkenntnis gestützt, dass der Abbau der Untereinheiten durch Trypsin sowohl von extra-, als auch von intrazellulärer Seite katalysiert wird [19].

2.6.1.2 Kinetik des nikotinischen Acetylcholinrezeptors

Die Signaltransduktion an der neuromuskulären Endplatte erfolgt in drei Schritten: Der Neurotransmitter bindet an seinen Rezeptor, es folgt die Signalübertragung zwischen Bindungsdomäne und Ionenkanal und die Ionenleitfähigkeit des Kanals wird verändert. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor gehört zur Familie der sogenannten Cys-Loop-Rezeptoren, die sich durch fünf Proteinuntereinheiten auszeichnen, deren Domänen von Cysteinen flankiert werden. Diese Cysteine gehen untereinander kovalente Bindungen ein und es entsteht eine Schleife zwischen

Bindungs- und Kanaldomäne. Innerhalb von wenigen Mikrosekunden wird die Ligandenbindung an den Kanal übertragen. Die α -Untereinheiten des Acetylcholinrezeptors besitzen hoch affine Bindungsstellen für Acetylcholin, d.h. die Kanalöffnung wird durch die Bindung von zwei Molekülen Acetylcholin pro Heteropentamer getriggert. Der Ligand bindet zwischen einer α - und einer ϵ - oder δ -Untereinheit. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung der Kanalpore, die die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht und einen selektiven Kationenstrom ermöglicht. Der Einstrom von Natrium- und Kalziumionen in die postsynaptische Membran generiert eine Depolarisation der Muskelfasermembran [19], [20]. Bei andauernder Überflutung mit Acetylcholin kommt es, ähnlich wie beim Prozess der pharmakologisch induzierten Toleranzentwicklung, zu einer Desensibilisierung des Acetylcholinrezeptors [19].

2.6.2 Genetische Defekte des Acetylcholinrezeptors

In allen fünf Untereinheiten des Acetylcholinrezeptors sind Gendefekte identifiziert worden, die jeweils verschiedene Domänen der jeweiligen Untereinheit betreffen können. Dabei sind die Untereinheiten auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert: Das Gen kodierend für die α -Untereinheit liegt auf Chromosom 2q24-q32, die β -Untereinheit auf Chromosom 17p13.1, die γ -Untereinheit auf Chromosom 2q37 [13], die δ -Untereinheit auf Chromosom 2q33-q34 und die ϵ -Untereinheit auf Chromosom 17p13-p12 [8]. Die zugrundeliegenden Mutationen umfassen funktionell zwei Entitäten: entweder gehen sie mit einer verminderten Expression des Rezeptors einher, oder sie verändern die kinetischen Eigenschaften der Kanalpore. Mutationen, die die Kinetik betreffen, imponieren als sogenannte „Slow-Channel-Mutation“ oder als „Fast-Channel-Mutation“. Die Veränderungen der Reaktion, die dabei im Vergleich zum Wildtyp bei Bindung von Acetylcholin an seinen Rezeptor auftreten, sind bei diesen beiden Subtypen gegensätzlich ausgerichtet. Beide induzieren jedoch einen Defekt in der neuromuskulären Erregungsübertragung, der letztendlich mit einer belastungsabhängigen Muskelschwäche vergesellschaftet ist [5].

2.6.2.1 Acetylcholinrezeptor-Mangel

Eine verminderte Expression des Acetylcholinrezeptors beruht in den meisten Fällen auf einer compound heterozygoten, manchmal auch homozygoten, autosomalrezessiven Mutation in einer der Untereinheiten. Dabei wurden die meisten Mutationen in der ϵ -Untereinheit nachgewiesen. Eine Hypothese zur hohen Prävalenz von Mutationen in der ϵ -Untereinheit besagt, dass eine kompensatorische

Reexpression der korrespondierenden fetalen γ -Untereinheit erfolgt. Mutationen in den anderen Untereinheiten sind hingegen vermutlich oft bereits intrauterin oder im frühen Säuglingsalter lethal. Zudem weist die ϵ -Untereinheit eine Guanosin-Cytosinreiche Region auf, die die DNA besonders vulnerabel für Mutationen macht [20], [9]. Dabei existieren verschiedene Typen von Mutationen. Zu den Defekten, die einen frühzeitigen Transkriptionsabbruch induzieren, gehören Spleiß-Mutationen, Nonsense-Mutationen (Punktmutationen, die für ein Stop-Codon anstelle einer Aminosäure kodieren), und Frameshift-Mutationen. Letztere tritt beispielsweise häufig als homozygote Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ in der ϵ -Untereinheit bei südosteuropäischen Roma auf. Zudem sind Missense-Mutationen identifiziert worden, die einen Aminosäureaustausch induzieren, der die Vereinigung der Untereinheiten zum pentameren Rezeptor vereitelt [4]. Bei manifestem Acetylcholinrezeptor-Mangel resultiert eine Verminderung des Endplattenpotentials. Es resultieren eine kompensatorisch erhöhte Dichte neuromuskulärer Endplatten sowie eine erhöhte Freisetzung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt [5].

2.6.2.2 Das Slow-Channel-Syndrom

Bisher konnten 21 verschiedene Mutationen identifiziert werden, aus denen Slow-Channel-CMS resultieren. Sie sind in den vier Untereinheiten des Acetylcholinrezeptors lokalisiert und weisen meist einen autosomal-dominanten Erbgang auf. Es handelt sich um Missense-Mutationen, die als Gain-of-Function-Mutationen meist die M2 Transmembran-Domäne der Kanalpore, oder die extrazelluläre ACh-Bindungsdomäne der α -Untereinheit betreffen [4]. Der kinetische Defekt des Slow-Channel Syndroms ist durch eine erhöhte Acetylcholin-Affinität des AChRs, eine erhöhte Öffnungsrate sowie eine herabgesetzte Schließrate der Kanalpore bei Bindung des Liganden gekennzeichnet. Die Kanalöffnungszeit ist verlängert, während der Aktivierung treten vermehrt spontane Öffnungseignisse ein. Die Dissoziation von Acetylcholin von seinem Rezeptor ist dabei herabgesetzt. Diese Faktoren resultieren in einem Depolarisationsblock, der sich klinisch in belastungsabhängiger Muskelschwäche äußert. Die erhöhte Ionenleitfähigkeit ermöglicht neben einem Natriumeinstrom einen Einstrom von Kalziumionen, die durch postsynaptische Akkumulierung und Enzyminduktion zur graduellen Zerstörung postsynaptischer Strukturen beitragen [21], [22]. Morphologisch erscheint in der Muskelbiopsie zunächst ein quantitativ regelhaftes AChR-Expressions Level, mit dem Fortschreiten der Erkrankung imponiert jedoch eine Zerstörung der

postsynaptischen Falten mit Verlust der AChR, eine Erweiterung des synaptischen Spalts sowie Apoptose subsynaptischer Nuclei [20]. Demzufolge beruht das pathologische Erscheinungsbild nicht allein auf einem Depolarisationsblock. Die allmähliche irreversible Zerstörung postsynaptischer Strukturen führt zu einem funktionellen Defizit der neuromuskulären Erregungsübertragung, es resultiert eine therapieresistente Endplatten-Myopathie.

2.6.2.3 Das Fast-Channel-Syndrom

Fast-Channel-Syndrome stellen die seltenste Entität der CMS dar. Bisher wurden 13 Fast-Channel Mutationen beschrieben, sie betreffen die Transmembran-Domänen der α - und δ -Untereinheit sowie den zytoplasmatischen Loop zwischen M3 und M4 der ϵ - Untereinheit [20]. Abgesehen von einer Insertions- und einer Deletions-Mutation handelt es sich um Missense-Mutationen [8]. Fast-Channel-CMS beruhen auf Gain-of-Function-Mutationen mit autosomal-rezessivem Erbgang. Pathophysiologisch setzen sie die Öffnungswahrscheinlichkeit des AChR herab, wobei die Schließrate erhöht ist. Das Schwellenpotential wird nicht überschritten, das in die Synapse einlaufende Aktionspotential kann nicht an die motorische Einheit weitergeleitet werden. Unter pathophysiologischen Gesichtspunkten stellen Slow- und Fast-Channel-Syndrom Gegensätze dar.

2.6.2.4 Mutationen in RAPSN

Rapsyn ist ein peripheres cytoplasmatisches Membranprotein, das mit Acetylcholinrezeptoren in der postsynaptischen Membran kolokalisiert ist. Über β -Dystroglykan vermittelt Rapsyn die Verbindung zwischen Acetylcholinrezeptor und Cytoskelett. Desweiteren ist Rapsyn eine Komponente des RATL-Komplexes (RATL = rapsyn-associated transmembrane linker). Über diesen Komplex können die extrazelluläre Domäne von MuSK und das intrazellulär lokalisierte Rapsyn unter dem Einfluss von Agrin interagieren. So wird die Verankerung des Acetylcholinrezeptors in der postsynaptischen Membran gewährleistet. Die Signalkaskade der Agrin-induzierten Aktivierung von MuSK und anschließender Aggregation von AChRs unter Kopplung an Rapsyn wird durch viele Komponenten gesteuert, darunter Dok-7. Ein genetischer Defekt in *Dok-7* führt daher zu einem Defekt der Synaptogenese durch verminderte Bildung von AChR Clustern [16].

Rapsynaggregate binden auch direkt an cytoplasmatische Domänen des Acetylcholinrezeptors und vernetzen diese zu sogenannten „Mikroclustern“. Dabei

besitzt jede der fünf Untereinheiten des Acetylcholinrezeptors das Potential, mit Rapsyn zu interagieren. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass insbesondere die δ -Untereinheit beim Prozess der membranassoziierten Cluster-Bildung durch den AChR und Rapsyn eine entscheidende Rolle spielt. Mutationen der δ -Untereinheit können die Bindung des AChRs an Rapsyn kompromittieren und resultieren letztendlich in einem Defekt der neuromuskulären Erregungsübertragung [23]. Die adulte neuromuskuläre Endplatte weist ein charakteristisches quantitatives 1:1 Verhältnis von Rapsynproteinen und Acetylcholinrezeptoren auf [5], [24] (Abb. 3).

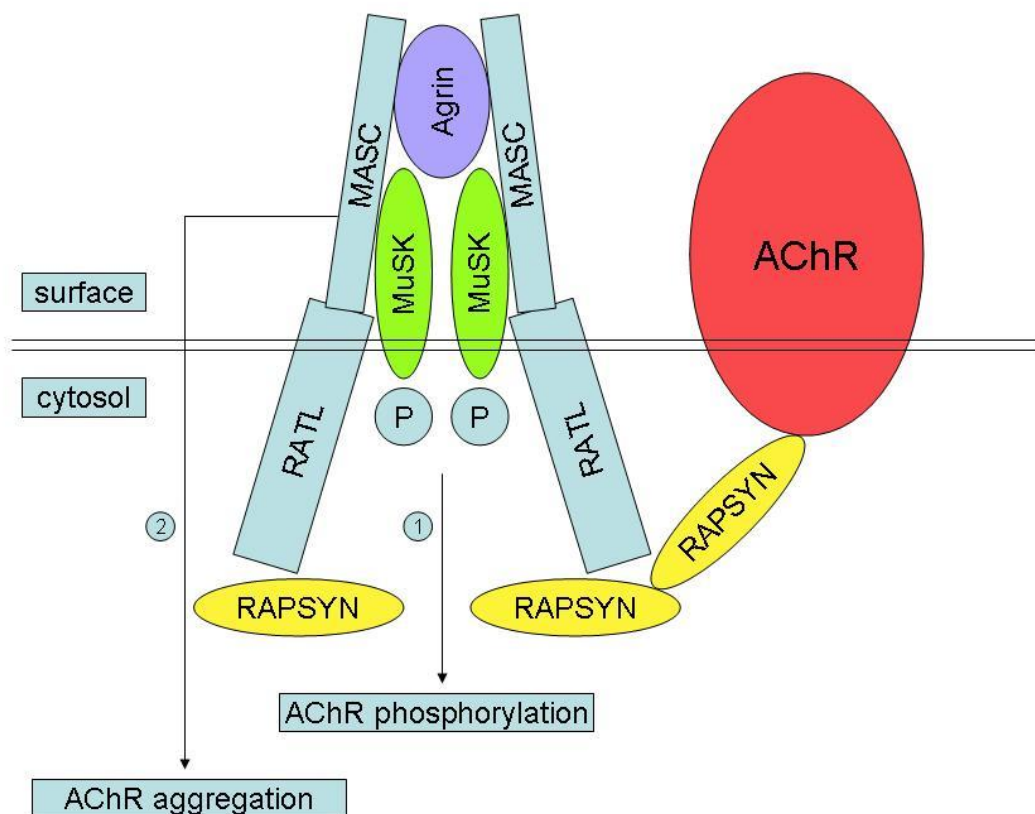


Abb.3 (Quelle: modifiziert aus [24])

Das Gen *RAPSN* ist auf Chromosom 11p14.2-p11.1 lokalisiert [8]. Defekte des Ankerproteins Rapsyn resultieren in verminderter AChR Cluster Bildung und letztendlich in einem relevanten Mangel an Acetylcholinrezeptoren an der postsynaptischen Membran. Eine entscheidende Rolle spielt die *RAPSN* Mutation N88K. Diese Mutation weisen bisher nahezu alle CMS Patienten, bei denen ein CMS auf der Basis eines genetischen Defekts des *RAPSN* Gens diagnostiziert wurde, zumindest heterozygot auf. Eine Ausnahme bildet eine homozygote Mutation der E-Box im *RAPSN* Promotor, die bisher nur bei einer jüdischen Population im Nahen Osten beschrieben wurde. Erst kürzlich identifizierte unsere Arbeitsgruppe zwei *RAPSN*-CMS Patienten, die nicht N88K aufweisen, sondern deren genetischer Defekt in zwei anderen heterozygoten *RAPSN* Mutationen besteht [25].

2.7 Identifizierung neuer Kandidatengene: Das APC-Gen

Seit 1999 wurden fünf neue Gene entdeckt, die neben den Untereinheiten des AChRs an der Pathogenese von CMS beteiligt sind: *CHAT*, *RAPSN*, *SCN4A*, *MUSK* sowie *Dok-7*. Anhand der Analyse bekannter CMS-Gene kann bei etwa 50% der CMS Patienten der genetische Defekt identifiziert werden. Das heterogene Erscheinungsbild der Erkrankung sowie die Komplexität der bekannten Strukturen und Komponenten der Signalkaskade, die der neuromuskulären Erregungsübertragung und der Synaptogenese zugrunde liegen, legen die Notwendigkeit der Identifizierung neuer Gene nahe. Mögliche Kandidatengene werden im Tiermodell analysiert [9].

Ein möglicherweise in die Pathogenese der CMS involviertes Gen ist das *APC*-Gen (engl.: adenomatous polyposis coli Gen) auf Chromosom 5q21. Bereits vor längerer Zeit wurden Mutationen des Tumor-Suppressor-Gens *APC* als Ursache der familiären Tumorerkrankung FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis coli) identifiziert [26], [26], [27], [28]. Wang et al. konnten zeigen, dass das *APC* Gen eine Rolle in der Synaptogenese spielt. *APC* ist an der Agrin-induzierten AChR Co-Aggregation mit Rapsyn beteiligt, die über MuSK (Muskel-spezifische Rezeptor-Tyrosinkinase) vermittelt wird. MuSK katalysiert eine Tyrosin-Phosphorylierung der AChR- β -Untereinheit, die den Prozess des AChR Clusters und die Verankerung des Rezeptors am postsynaptischen Zytoskelett einleitet. Dabei kommt es zu einer Agrin-abhängigen direkten Interaktion zwischen *APC* und dem cytoplasmatischen Teil der β -Untereinheit des AChRs. Die relevanten Aminosäuren befinden sich in Position 1998-2170 von *APC* [29]. Die Analyse der funktionellen Pathogenität von Mutationen im *RAPSN* Gen, das für das Ankerprotein Rapsyn kodiert, sowie im *MUSK* Gen,

verdeutlichen die pathophysiologischen Konsequenzen eines Defekts der AchR-Aggregation, AChR-Clusterbildung und Verankerung des AChRs in der Membran [30], [15]. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass Mutationen im *APC* Gen, das im Prozess der Synaptogenese mit MuSK und Rapsyn interagiert, eine ähnliche postsynaptische Form von CMS auslösen könnten.

2.8 Zielsetzung

Die molekulargenetische Charakterisierung von CMS ist von essentieller Bedeutung für die klinische Erfassung, Betreuung, Therapie und genetische Beratung des einzelnen Patienten.

Die Gesamtheit der bisher identifizierten CMS-Mutationen weist ein großes Spektrum, sowohl der einzelnen Mutationen als auch der betroffenen Gene, auf. Dabei imponiert auch das klinische Erscheinungsbild durch seine Heterogenität.

Aus der großen Variabilität der verschiedenen CMS Mutationen ergibt sich die Aufgabe, auf der einen Seite neue Typen von Mutationen sowie neue Gene zu identifizieren, die Eingang in das Mutations-Screening betroffener Patienten finden. Auf der anderen Seite ermöglicht die Entdeckung bereits identifizierter Mutationen, die Pathogenität dieser Mutationen zu konsolidieren und diese genauer zu charakterisieren. Anhand von möglichst großen Patientenkollektiven können schließlich Aussagen über Häufigkeit und populationsspezifische Verteilung einzelner Mutationen gemacht werden.

Trotz einzelner spezieller phänotypischer Merkmale gelingt eine sichere Abgrenzung der verschiedenen CMS-Subtypen allein anhand des klinischen Erscheinungsbildes bisher nicht [9]. Das wachsende Spektrum identifizierter Mutationen ermöglicht jedoch einen Vergleich genetischer und klinischer Daten, mit dem Ziel, eine Kausalbeziehung zwischen Genetik, Pathophysiologie und Klinik zu erheben und im Einzelfall die genetischen Differenzialdiagnosen anhand klinischer Befunderhebung einzugrenzen. Die Differenzierung von anderen neuromuskulären Erkrankungen trägt zu einer raschen Diagnostik bei, die vor allem unter dem Gesichtspunkt der Therapie zum Tragen kommt. Bei 16 von Burke et al. Untersuchten *RAPSN*-CMS Patienten, betrug die durchschnittliche Latenz zwischen Symptommanifestation und Diagnosestellung 3 Jahre [31]. Die häufige Fehldiagnose einer seronegativen Myasthenia gravis bei Late-Onset CMS Formen resultiert in falschen Therapieansätzen mit Immunsuppressiva, die mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sind. Bei schweren CMS-Formen mit lebensbedrohlichen krisenhaften

Exazerbationen ist eine frühzeitige adäquate Therapie von essentieller Bedeutung, falsche Therapieansätze können durch verbesserte diagnostische Möglichkeiten vermieden werden [32].

Auf dem Gebiet der Grundlagenforschung in der Neurophysiologie kann die molekulargenetische Analyse von CMS zudem entscheidend zum Verständnis der Vorgänge an der Synapse während Synaptogenese und neuromuskulärer Signaltransmission beitragen [20].

Unser Labor verfügt über ein Kollektiv von über 350 an CMS erkrankten Patienten, die untereinander nicht verwandt sind und unterschiedliche ethnische Herkunft aufweisen. Die Patienten sollen auf die bekannten CMS-Mutationen gescreent werden, die häufige postsynaptische Formen von CMS hervorrufen. Dafür werden die Gene *CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRNE* sowie *RAPSN* durch PCR und direkte Sequenzierung analysiert. Um die Hypothese einer eventuellen Beteiligung des Gens *APC* an der Entstehung von CMS näher zu beleuchten, soll bei ausgesuchten Patienten das relevante Nukleotidfragment von *APC* anhand von PCR und direkter Sequenzierung auf Mutationen untersucht werden. Ausgewählte Mutationen sollen anschließend durch in vitro Zellkulturexperimente näher charakterisiert werden, um zum einen die Pathogenität der Mutation zu konsolidieren und zum anderen den Pathomechanismus des Proteindefekts an der neuromuskulären Endplatte aufzuklären.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Patientenmaterial (venöses EDTA-Vollblut oder isolierte genomische DNA) wurde von verschiedenen Kliniken aus Deutschland und aus dem Ausland zur molekulargenetischen Untersuchung eingesandt. Klinische Daten der Patienten wurden mittels eines Fragebogens (s. Anhang) standardisiert erfasst und gegebenenfalls durch zusätzlich vorliegende Untersuchungsbefunde ergänzt. Ergänzend zu den zu untersuchenden Patienten wurde auch Material (venöses EDTA-Vollblut oder isolierte genomische DNA) von deren Angehörigen sowie von gesunden Probanden als Normalkontrollen in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen. Normalkontrollen wurden dabei nach Möglichkeit nach ähnlicher ethnischer Herkunft gewählt. Alle durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung des Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten. Ein positives Votum

der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München liegt vor (Projektnummer:084/00).

3.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.1 DNA-Isolierung

Zur Mutationsanalyse wurde die genomische DNA der Patienten aus venösem EDTA Vollblut gewonnen. Die Extraktion erfolgte mittels Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.2.2 Prinzip der PCR

Die PCR dient der exponentiellen in vitro Amplifizierung definierter DNA-Regionen. Die Nukleotidsequenzen der für die Mutationsanalyse relevanten Genabschnitte wurden mithilfe der zugänglichen Genbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) ermittelt. Entsprechend der Nukleotidsequenz des zu untersuchenden Genabschnitts wurden Oligonukleotid-Primer entworfen, die in sense und antisense Richtung die kodierenden Exons und Teile flankierender Introns sowie die Promotor-Region begrenzen. Die Synthese der Oligonukleotid-Primer erfolgte in der Abteilung von Dr. G. Arnold (Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München) sowie durch die Firma Metabion (Martinsried).

Eine Liste aller verwendeten PCR-Primer findet sich im Anhang.

3.2.2.1 Standard-PCR-Protokoll

Die DNA-Amplifizierung erfolgt typischerweise in 50 µl Reaktionsvolumen:

5 µl Reaktionspuffer 10x (ThermoPol Buffer; New England Biolabs (NEB, Frankfurt))

50 pmol sense Primer

50 pmol antisense Primer

dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot oder NEB, Frankfurt), Endkonzentration:
0,25 mM je dNTP

100-500 ng genomische DNA

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

Teilweise wurde das Primer Annealing durch Zusatz von zehnpromentigem Dimethylsulfoxid (DMSO) optimiert.

Als Instrumentarium für den PCR-Reaktionsablauf diente ein Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf).

Typischer Reaktionsablauf einer PCR:

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

Schmelz- und Annealingtemperatur wurden entsprechend der Länge und der Basenabfolge der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz variiert.

3.2.3 Aufreinigung des PCR-Produkts

Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese auf Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gelen aufgetrennt. Entsprechend der Fragmentlänge der zu extrahierenden Proben wurde eine Agarose-Konzentration zwischen 2 und 4 % gewählt, wobei zur besseren Auftrennung kurzer Fragmente hohe Agarose-Konzentrationen verwendet wurden. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung zwischen 90 und 120 Volt für etwa 45 Minuten. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-phenylphenanthridiniumbromid) wird durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt. Die fluoreszierenden DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit

(Qiagen, Hilden) oder Nucleic Acid Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert.

3.2.4 Analyse der Nukleotidsequenzen

Zur Analyse der DNA Primärstruktur wurde die 1975 von Fred Sanger entwickelte enzymatische Sequenzierungsmethode angewandt [33]. Die Sequenzierung der zu untersuchenden PCR-Produkte übernahmen das Labor von Dr. H. Blum (Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München) sowie die Firma Medigenomix (Martinsried) mit Sequenziergeräten der Firma Applied Biosystems (Modell 3100 Avant Sequencer) und fluoreszenzmarkierten Dideoxy-Terminatoren (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA).

Anschließend erfolgte die Untersuchung der Basenabfolge der Nukleotidsequenzen anhand des Kongruenzabgleichs mit den entsprechenden Wildtypsequenzen aus der elektronischen Gendatenbank des Servers des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.2.5 Restriktionsenzymatischer Verdau

Restriktionsendonukleasen haben die Eigenschaft, an spezifische Oligonukleotidsequenzen zu binden und den DNA-Strang an definierten Stellen zu spalten. Wird die Basenabfolge dieser Oligonukleotidsequenz im Rahmen einer Punktmutation, Insertion oder Deletion verändert, geht die Bindungsstelle der Restriktionsnuklease sowie die Schnittstelle verloren, oder es werden im Vergleich zum Wildtyp neue Bindungs- und Schnittstellen generiert. So können mittels Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) Analyse die Genotypen von Wildtyp und Mutation unterschieden werden. Bei der enzymatischen Reaktion entstehen DNA-Fragmente, die sich in Anzahl und Länge unterscheiden und mittels Gelelektrophorese differenziert werden können. Zum enzymatischen Verdau wurden 25 µl des zu analysierenden PCR-Produkts mit 3 µl 10x Puffer und 0.5 µl (5-10 Units) Restriktionsenzym versetzt, und entsprechend den Angaben des Herstellers 2-12 h bei der für das spezifische Enzym optimalen Reaktionstemperatur inkubiert. Die verwendeten Restriktionsendonucleasen stammen von der Firma NEB (New England Biolabs, Frankfurt) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

3.2.6 Klonierung: Einführung von Mutationen in den Vektor β AChR/CMV2

Die cDNAs der Untereinheiten des AChRs liegen jeweils einzeln im Expressionsvektor pRC/CMV2 (Invitrogen) vor, es handelt sich dabei um murine cDNAs der α -, β -, δ - und ϵ - Untereinheiten. Um die Pathogenität der Mutationen β T265S, β R220C und β Y15C zu analysieren, wurden diese in den Vektor pRC/CMV2 eingefügt. Die Aminosäuresequenzen der AChR β -Untereinheit von Maus und Mensch sind zu 89% identisch. Die Mutationen wurden durch PCR-Mutagenese eingeführt. cDNA Fragmente der β -Untereinheit, die die jeweilige Mutation enthalten, wurden zunächst durch PCR-Amplifikation mit Hilfe je eines Mismatch Primers generiert. Der Mismatch Primer enthält gleichzeitig eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym A (Fnu4HI, Earl und PdiI), die auch in der Wildtyp-Sequenz der β -Untereinheit vorhanden ist. Die entstehenden PCR-Fragmente wurden so entworfen, dass eine zweite Schnittstelle für ein weiteres Restriktionsenzym B (Eco91I bzw. HindIII) vorhanden ist, die im gesamten Konstrukt nur einmal vorkommt. Durch den Restriktionsverdau des amplifizierten PCR-Fragments mit den Restriktionsenzymen A und B entsteht ein Fragment A, das durch die entsprechenden enzymatischen Schnittstellen begrenzt wird, und die generierte Mutation enthält. Wird der Plasmid-Vektor ebenfalls einem Restriktionsverdau mit den Enzymen A und B unterzogen, so kann das entsprechende Fragment aus dem Vektor gegen das mutierte Fragment A aus der PCR ausgetauscht werden. Die Klonierung erfolgte nach dem Prinzip der 3-Fragment-Ligation.

Die Mutation β T265S wurde an den Restriktionsstellen der Enzyme Eco91I und Fnu4HI, in der Nukleotidsequenz des *CHRNA1* Gens, in das Konstrukt eingefügt. Das entsprechende PCR-Fragment wurde mit dem Primer 5'-ccaacag**gcag**caagaacacaCtgag-3' ('**gcag**': spezifische Bindestelle des Enzyms Fnu4HI; C ist die Mutation) amplifiziert.

Für die Mutation β R220C wurden die Schnittstellen von Eco91I und Earl benutzt, die PCR erfolgte mit dem Primer 5'-ccaggtaga**agag**aggctt**Gc**Accg-3' ('**gaagag**': spezifische Bindestelle des Enzyms Earl; **A** ist die Mutation, **G** ist ein zweiter eingefügter Mismatch). Ein zweiter Mismatch (**G**) musste an dieser Stelle eingefügt werden, da sich die cDNA Sequenz von Mensch und Maus in dieser Nukleotidposition unterscheiden und das betroffene Basentriplett für verschiedene Aminosäuren kodiert. Durch diesen zweiten Mismatch entsteht ein Basentriplett, das dem humanen Kodon entspricht.

Die Klonierung von β Y15C erfolgte an den Schnittstellen HindIII und PdiI im Konstrukt. Als PCR-Primer für β Y15C diente 5'-cctcccgc**gccggc**ctcaccgagctatca**Cag**-3' ('**gccggc**': spezifische Bindestelle des Enzyms PdiI; **C** ist die Mutation).

Bei den erhaltenen Klonen wurde das eingefügte Teilstück sequenziert, um das Vorhandensein der Mutation zu bestätigen und um unerwünschte Sequenzveränderungen aus der PCR auszuschließen.

3.2.7 Ligation

Die Ligation von Insert und Vektor bei einer Klonierung wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden bei 8 Stunden bei 16°C inkubiert. Vor der Transformation des Ligationsansatzes in E.coli wurde die Ligase 20 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

3.2.8 Transformation von E.coli

Unter Transformation versteht man das Verfahren zur Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien. Die Transformation der kompetenten E.coli DH5α-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) wurde nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt (Hitzeschock bei 42 °C über 45 Sekunden).

3.2.9 Bakterienkultur

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Bakterienstamm E.coli DH5α verwendet. Die Bakterien wurden bei 37 °C in LB (Luria-Bertani)-Medium kultiviert. Das LB-Medium wurde mit Ampicillin (Endkonzentration 0.01% Ampicillin) versetzt, da der Plasmidvektor pRC/CMV2 eine Ampicillin-Resistenz besitzt. So erfolgt eine Selektion transformierter Bakterienzellen.

3.2.10 Extraktion von Plasmid DNA aus E.coli

Die gewünschte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen, Hilden; 2.5 ml Bakterienkultur) anhand des Protokolls der Herstellers extrahiert.

3.2.11 Zellkultur

Zur Analyse der Morphologie der Expression von Acetylcholinrezeptoren, die Mutationen in der β -Untereinheit tragen, wurde die humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie HEK 293 verwendet. Expressionsstudien wurden für die Mutationen β T265S, β R220C, β Y15C und β V91M durchgeführt. HEK Zellen wurden mit der jeweiligen Plasmid-cDNA der mutanten murinen AchR β -Untereinheit im Vektor pRC/CMV2 und der Wildtyp α -, δ -, ϵ - Untereinheit kotransfiziert. Die Transfektion mit der Wildtyp- β -Untereinheit diente als Normalkontrolle. Die Zellkultur erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM-Medium (supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, Glutamin sowie den Antibiotika Penicillin und Streptomycin). Die Medien und Reagenzien für die Zellkultur stammen von den Firmen Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) sowie PAA Laboratories GmbH (Cölbe).

Die Transfektion erfolgte nach einem standardisierten Protokoll (Sambrook and Russel in „Molecular Cloning“, Verlag CSHL Press). HEK 293-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 6-well-Platten auf Glasdeckgläschen ausgesät (10^5 bis 3×10^5 Zellen pro Well). Ein Wechsel des Kulturmediums (2ml Medium pro Well) erfolgte 1 Stunde vor der Transfektion. Die DNA-Calciumphosphat-Kopräzipitate wurden folgendermaßen vorbereitet: Für 2 ml Kulturmedium wurden 200 μ l Transfektionsmix angesetzt. Die Plasmid-DNA wurde mit 10 μ l Calciumchloridlösung versetzt und mit 0,1x TE auf ein Endvolumen von 100 μ l gebracht. Anschließend wurden 100 μ l 2x HEPES/Saline dazugegeben, die Mischung 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf die Zellen getropft. 12-16 Stunden nach Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt.

Für die Transfektion der HEK 293-Zellen mit den AchR-Untereinheiten wurden Plasmidmengen im Verhältnis $\alpha : \beta : \delta : \epsilon = 2 : 1 : 1 : 1$ (5 μ g : 2,5 μ g : 2,5 μ g : 2,5 μ g) eingesetzt, entsprechend der pentameren Struktur des AchR Wildtyps ($\alpha_2\beta\delta\epsilon$).

0,1x TE: 1 mM Tris-Cl pH 7,6
 0,1 mM EDTA
 sterilfiltriert

CaCl₂: 2,5 M CaCl₂
 sterilfiltriert

2x HEPES/Saline: 140 mM NaCl
 1,5 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O
 50 mM HEPES

*pH 7,05 mit NaOH einstellen
sterilfiltriert*

3.2.12 α -Bungarotoxin-Färbungen, Mikroskopie

Zur Fluoreszenzmarkierung von AChR wurde AlexaFluor®594-konjugiertes α -Bungarotoxin (Molecular Probes/Invitrogen) verwendet. Die Zellen wurden für die Fluoreszenzmikroskopie auf unbeschichteten Glasdeckgläschen kultiviert.

Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert (20 min bei Raumtemperatur), 1x mit PBS gewaschen und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 2 μ g/ml AlexaFluor®594-Bungarotoxin in PBS inkubiert. Um isoliert die AChR-Expression an der Zelloberfläche untersuchen zu können, erfolgte keine Permeabilisierung der Zellmembran vor der Inkubation mit Bungarotoxin. Für die Analyse der gesamten Expression der AChR, einschließlich der intrazellulären Expression, wurden die Zellen vor der Färbung 15 min mit 0.2% Triton X-100 behandelt und anschließend in PBS gewaschen. Eine spezifische Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne erfolgte vor der Färbung mit Bungarotoxin durch 15-minütiges Inkubieren mit Bisbenzimid (Fluka, Taufkirchen) und anschließendem Waschen in PBS. Nach der Färbung wurden die Deckgläschen 5-mal mit PBS gewaschen, mit Dako® Fluorescent Mounting Medium (Dako, Hamburg) eingedeckt, getrocknet und mit Nagellack versiegelt.

Die Zellen wurden mit einem Leica DM RBD Mikroskop und einer Zeiss AxioCam HR Kamera analysiert und fotografiert (Protokoll siehe [23]).

4 Ergebnisse

Unser CMS-Patientenkollektiv umfasst gegenwärtig 363 voneinander unabhängige Patienten. Bei 178 Patienten konnten ursächliche Mutationen identifiziert werden. Bisher wurden bei 25 Patienten Mutationen im *RAPSN*-Gen nachgewiesen (6,89% des Gesamtkollektivs), 104 Patienten sind Träger von Mutationen im *CHRNE*-Gen (28,7% des Gesamtkollektivs), insgesamt 47 Patienten sind Träger von Mutationen in *CHRND*, *CHRNA1*, *CHAT*, *DOK-7* oder *COLQ* (12,95% des Gesamtkollektivs). Im Rahmen dieser Arbeit wurden in unserem Patientenkollektiv erstmals zwei Patienten mit Mutationen im *CHRNA1*-Gen detektiert (0,55% des Gesamtkollektivs), je 5 Patienten weisen Mutationen in *RAPSN* und *CHRNE* auf. Ein erweitertes Screening der Patienten auf Mutationen im selten betroffenen *CHRNA1*-Gen erbrachte in zwei Fällen ein positives Ergebnis.

4.1 Analyse des *CHRNA1*-Gens

Bei 60 CMS-Patienten, bei denen zunächst Mutationen in den häufig betroffenen CMS-Genen *CHRNE* und *RAPSN* ausgeschlossen worden waren, wurde die β -Untereinheit des AChRs auf Mutationen untersucht. Das *CHRNA1*-Gen umfasst 11 Exons, die bei jedem Patienten vollständig per direkter Sequenzanalyse gescreent wurden. Bei fünf Patienten konnten Mutationen in der β -Untereinheit identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die pathogenen Missense-Mutationen β T265S und β R220C, die Nonsense-Mutation β Y149X sowie die Mutationen β Y15C, β V91M, β I80M, β I397T, deren pathogenetische Relevanz noch unklar ist. Keine dieser Mutationen ist bisher publiziert worden.

4.1.1 Patientin A: Die Mutation β T265S

4.1.1.1 Klinik

Bei Patientin A handelt es sich um eine 43-jährige Frau serbo-kroatischer Herkunft aus einer nicht-konsanguinen Familie, die von einer späten Manifestationsform von CMS betroffen ist. Auch die Mutter der Patientin ist erkrankt und trägt die gleiche

Mutation, die Symptomatik zeigt sich sehr ähnlich, ist jedoch milder ausgeprägt. Ein Bruder sowie die beiden Kinder der Patientin sind nicht betroffen. Im Rahmen der ersten Schwangerschaft im Alter von 38 Jahren, zeigten sich bei der Patientin etwa 45 Tage post partum erstmalig Symptome in Form von spontaner schwerer Schwäche der Arm- und Nackenmuskulatur. Im Verlauf wurden zehn Monate später im Rahmen einer neurologischen Untersuchung eine leichte Ptosis, leichte belastungsabhängige Schwäche der Gesichts- und Nackenmuskeln sowie der proximalen und distalen Armmuskulatur festgestellt. Es zeigte sich ein Abduktionsdefizit der Oberarme mit maximaler Abduktion von 60°, sowie eine Schwäche der Fingerextensoren (Abb.5). Des Weiteren traten einige Episoden respiratorischer Probleme auf. Laborchemisch wurden keine Anti-AchR Antikörper nachgewiesen, die Serum-Kreatinkinase zeigte normale Werte. Wiederholte Tests mit Cholinesterase-Inhibitoren (Neostigmin, Prostigmin®) hatten keinen eindeutig positiven Effekt. Eine dauerhafte Medikation mit Pyridostigmin (Mestinon®, 120 mg/d) erbrachte keine Besserung der Symptomatik. Im Elektromyogramm konnte die Übertragungsstörung objektiviert werden: Bei repetitiver Nervenstimulation zeigte sich ein eindeutiges pathologisches Dekrement. Bei der Stimulation des N. ulnaris durch Einzelreize wurde ein biphasisches CMAP (Summenaktionspotential; engl.: compound muscle action potential) detektiert, die Nervenleitgeschwindigkeit erbrachte normale Werte. In einer aktuellen klinischen Untersuchung zeigten sich eine asymmetrische Schwäche der Finger- und Handextensoren sowie eine starke Ermüdbarkeit der Nackenmuskulatur.

Auch bei der Mutter der Patientin traten die Symptome erstmals im Rahmen einer Schwangerschaft im Alter von 26 Jahren auf. Die Myasthenie zeigte sich in Form von belastungsabhängiger Schwäche der Arm- und Nackenmuskulatur und war im Verlauf nicht progredient. Zuletzt fielen bei der 69-jährigen Patientin eine okuläre Symptomatik mit leichter Hemiptosis und Strabismus, sowie eine Kraftminderung der Handextensoren. Elektrophysiologische Tests erbrachten bei Mutter und Tochter ähnliche Ergebnisse.

Durch eine dauerhafte Therapie mit Fluoxetin konnte eine Besserung der klinischen Symptomatik erzielt werden.

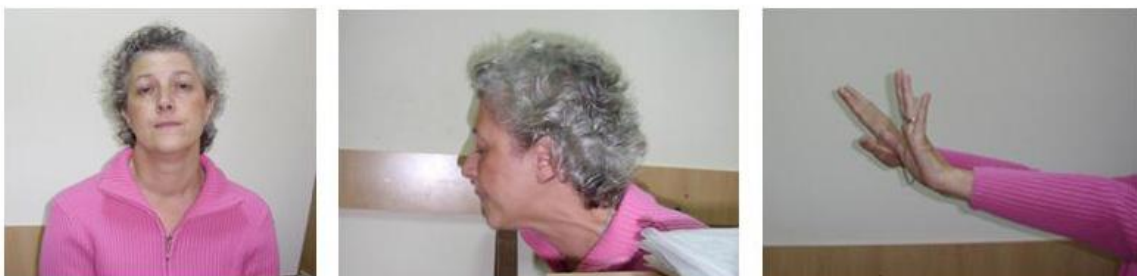


Abb.5

Patientin A: links: Ptose; Mitte: Schwäche der Nackenmuskeln; rechts: Schwäche der Handextensoren

4.1.1.2 Mutationsanalyse

Zunächst wurden bei Patientin A Mutationen der α - und ε -Untereinheit sowie die häufige *RAPSN* Mutation N88K ausgeschlossen. Durch direkte Sequenzierung konnte schließlich auf einem Allel die Missense-Mutation β T265S nachgewiesen werden, die auf einem C>G Basenaustausch des Nukleotids 794 in Exon 8 beruht. Die Analyse der mütterlichen DNA erbrachte das gleiche Ergebnis. Die Mutation kann anhand eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus mit Hilfe des Enzyms HpyCH4III detektiert werden. Das Enzym schneidet spezifisch das Wildtyp-Allel, Mutations-tragende Allele bleiben intakt. In 100 gesunden unabhängigen Normalkontrollen wurde diese Sequenzvariation nicht nachgewiesen. Bei den gesunden Probanden handelt es sich in 50 Fällen um Südosteuropäer. Diese Auswahl diente dem Ausschluss eines Populations-spezifischen Polymorphismus.

4.1.1.3 Funktionelle Charakterisierung der Mutation β T265S

Die Mutation betrifft eine Aminosäure in der Mitte der M2 Transmembran Domäne der β -Untereinheit des AChRs. Das relevante Threonin ist evolutionär über Speziesgrenzen hinweg, sowie in verschiedenen humanen Subtypen des AChRs und in den verschiedenen Untereinheiten eines AChRs, hoch konserviert (Abb. 6). In der entsprechenden Domäne sind bereits mehrere Mutationen, sowohl in der β -Untereinheit als auch in den anderen Untereinheiten, beschrieben worden.

Die Pathogenität der Missense-Mutation β T265S sollte anschließend in funktionellen Studien belegt werden. Dazu wurde die Mutation in den entsprechenden cDNA-Vektor (β AChR-pRC/CMV2) mittels PCR-Mutagenese eingeführt.

Die Expression der mutierten β -Untereinheit wurde in *in vitro*-Experimenten getestet. Dabei wurde β T265S-pRC/CMV2 zusammen mit den anderen Untereinheiten (α AChR-pRC/CMV2, δ AChR-pRC/CMV2 und ε AChR-pRC/CMV2) in HEK-293-Zellen transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die AChR an der Zelloberfläche von nicht permeabilisierten Zellen sowie intrazellulär in permeabilisierten Zellen mittels fluoreszenzmarkiertem α -Bungarotoxin (AlexaFluor®594- α -Bungarotoxin)

gefärbt. Als Vergleich dienten HEK 293-Zellen, die mit den Wildtyp-Untereinheiten transfiziert wurden.

Die Experimente zeigten, dass Rezeptoren, welche die mutierte β -Untereinheit enthalten, an der Zelloberfläche exprimiert werden. Dabei lässt sich fluoreszenzmikroskopisch kein objektiverer Unterschied des AChR-Expressionsmusters zwischen β T26H und 5S transfizierten Zellen und den Wildtyp-AChR-exprimierenden Zellen feststellen. Sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante wurde ein ähnliches, punktiertes Färbungsmuster erhalten. Die markierten AChR konzentrieren sich an der Zellmembran, das perlschnurartige Muster entspricht der Anordnung der AChR in Aggregaten. Intrazellulär sowie im Zellkern ist lediglich eine unspezifische Background-Färbung zu erkennen. Die Färbungsintensitäten waren vergleichbar. Die Mutation β T26S führte nicht zu einer vom Wildtyp abweichenden Lokalisation des Rezeptors in der Zelle (Abb.7). Eine mikroelektrophysiologische Untersuchung (Patch-Clamp-Methode) des defizitären AChRs zeigte ein Ergebnis, das den charakteristischen elektrophysiologischen Gegebenheiten eines Slow-Channel-Syndroms entspricht (herzlichen Dank für die Durchführung der Experimente an PD Dr. Klaus Krampfl und Mitarbeiter, Department of Neurology, Hannover Medical School, Hannover, Germany).

β -subunit

T265S



β -subunit

T265S



```
human          ...ALLTL T VFLLL...
bovine         ...ALLTL T VFLLL...
mouse          ...ALLTL T VFLLL...
rat            ...ALLTL T VFLLL...
xenopus laevis ...ALLAV T VFLLL...
dog            ...ALLTL T VFLLL...
danio rerio    ...VLLTL T VFLLL...
torpedo        ...ALLAV T VFLLL...
takifugu rubripes ...VLIAL T VFMLL...

 $\alpha$ -subunit human ...ALLSL T VFLLV...
 $\delta$ -subunit human ...VLLAQ S VFLLL...
 $\epsilon$ -subunit human ...VLLAQ T VFLLL...
 $\gamma$ -subunit human ...VLLAQ T VFLLL...
CHRN2 human    ...VLLAL T VFLLL...
CHRN3 human    ...VLVSL T VFLLV...
CHRN4 human    ...VLLAL T VFLLL...

CHRN5 human    ...VLLAQ T VFLLL...
```

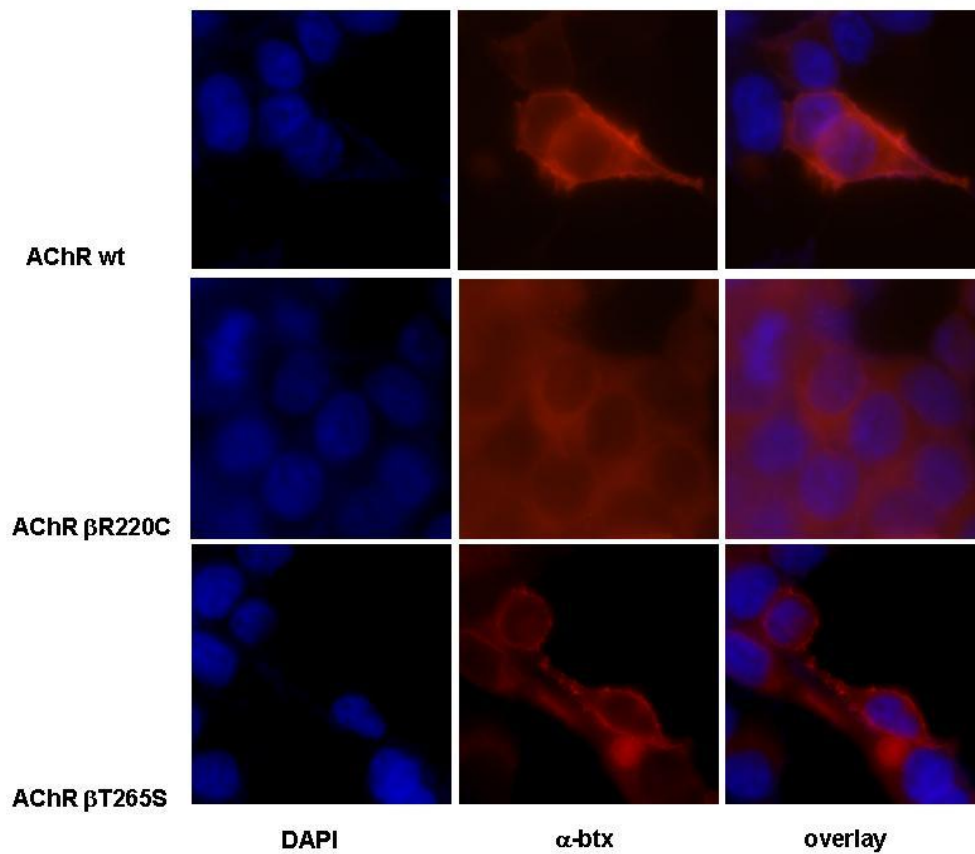


Abb. 7

Mikroskopische Darstellung des AChR-Expressionsmusters bei β T265S und β R220C mittels Färbung mit α -Bungarotoxin an nicht-permeabilisierten Zellen.

Oben: Wildtyp (wt); Mitte: Mutation β R220C; Unten: Mutation β T265S.

Linke Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI (Bisbenzimid); mittlere Spalte: AChR-Färbung mit α -Bungarotoxin; rechte Spalte: Färbung von Zellkernen und AChR.

AChR-wt sowie β T265S zeigen ein perlschnurartiges AChR-Expressionsmuster an der Zellmembran in Aggregaten. β R220C weist eine blasse Färbung auf, wobei die Färbungsintensität im Gegensatz zum wt deutlich schwächer ist.

4.1.2 Patientin B: Die Mutationen β Y149X und β R220C

4.1.2.1 Klinik

Bei der 4-jährigen Patientin B handelt es sich um das einzige Kind nicht-konsanguiner Eltern. Die Mutter ist Chinesin, der Vater ist Deutscher. Die Familienanamnese hinsichtlich neuromuskulärer Erkrankungen war leer. Das Kind wurde nach einer komplikationslosen Schwangerschaft termingerecht per Sectio Caesarea geboren. Klinisch imponierte unmittelbar postnatal ein Floppy-Infant-Syndrom mit extrem hypotnem Muskeltonus und generalisierter Schwäche. Die Patientin weist charakteristische Dysmorphien des Gesichts auf, mit zeltförmiger Oberlippe und hohem Gaumen, der Mund ist häufig geöffnet. Kongenitale Kontrakturen wurden nicht berichtet. Der schlechte Allgemeinzustand mit respiratorischer Insuffizienz bei erhöhter bronchoalveolärer Schleimsekretion, sowie Trinkschwäche und Schluckstörungen erforderten eine 5-wöchige intensivmedizinische Therapie. Die Patientin musste enteral über eine Sonde ernährt werden, im ersten Lebensjahr erfolgte eine Überwachung der Vitalparameter. Es traten zwei Episoden von Apnoen auf, erstmals spontan im Alter von 2 Monaten. Im Alter von 2 Jahren kam es im Rahmen eines febrilen Infekts zu einer Exazerbation mit respiratorischer Insuffizienz und stridoröser Atmung. Im Verlauf gingen moderate rezidivierende Infektionen häufig mit Exazerbationen und Tachypnoe einher. Im Alter von 4 Monaten zeigten sich erstmals eine Ptosis und Einschränkungen der Augenmotilität mit kompensatorischer Kopfhaltung (Abb.8). Die motorische Entwicklung war altersentsprechend, die Patientin konnte im Alter von 12 Monaten frei laufen. Allerdings ist die physische Belastbarkeit eingeschränkt mit aktuell einer maximalen Gehstrecke von 200m. Desweiteren wurde ein gastroösophagealer Reflux diagnostiziert. Die Symptomatik manifestiert sich hauptsächlich in der tageszeitlich abhängigen schweren Ptosis mit Infekt-induzierter Exazerbation, und der Störung der Augenmotilität. Die Symptome waren bisher generell nicht progredient. Ein Elektromyogramm bei repetitiver Stimulation des rechten N.ulnaris sowie des rechten N.medianus erbrachte kein pathologisches Ergebnis.

Aufgrund eines deutlich positiven intravenösen Edrophoniumchlorid-Test wurde im Alter von 19 Monaten eine medikamentöse Therapie mit steigenden Dosen von Pyridostigmin (Mestinon®) angesetzt. Initial konnte eine Besserung der Symptomatik erzielt werden, trotz steigender Dosierung war die Therapie jedoch unzureichend. Es zeigte sich eine Verzögerung des Wirkungseintritts von 45-60 Minuten und schnellem Wirkungsabfall, was zuletzt eine Verabreichung in 3-stündigem Intervall bei einer Dosierung von 150mg/d erforderte.

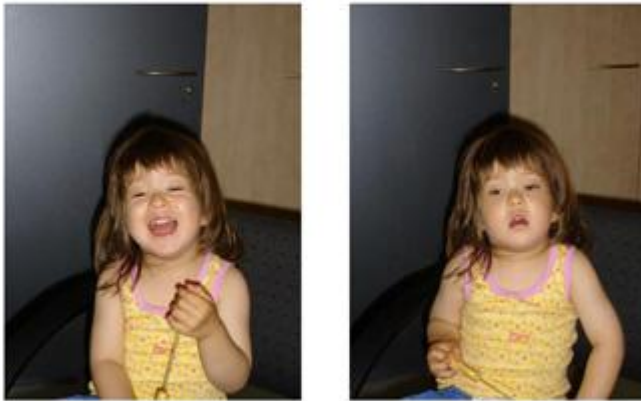


Abb.8

4.1.2.2 Mutationsanalyse

Mutationen im *CHRNE*-, *RAPSN*-, *CHAT*- und *COLQ*-Gen wurden zunächst durch direkte Sequenzanalyse ausgeschlossen. Defekte in diesen Genen können mit dem Phänotyp einer schweren neonatalen Form von CMS mit episodischen Apnoen einhergehen. Bei der Analyse des *CHRNA1* Gens konnten zwei compound heterozygote Defekte der β -Untereinheit des AChRs identifiziert werden. Bei der Mutation β Y149X handelt es sich um einen C>G Basenaustausch des Nukleotids 447 in Exon 6. Das Basentriplett TAC kodiert für die Aminosäure Tyrosin, während TAG ein Stop-Codon ist. Damit führt der Basenaustausch zu einem vorzeitigen Translationsabbruch. Die Mutation liegt im B-Loop der extrazellulären Domäne des AChRs. Die Mutation β R220C betrifft das Nukleotid 658 mit einem C>T-Basenaustausch in Exon 7. Das mütterliche Allel trägt die Mutation β R220C, es stand kein Material zur Analyse des Genotyps des Vaters zur Verfügung. Die Mutation β R220C kann anhand eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus mit Hilfe des Enzyms BbvI detektiert werden. Das Enzym schneidet spezifisch das Mutations-tragende Allel, Wildtyp-Allele bleiben intakt. Die Analyse von 100 unabhängigen gesunden Normalkontrollen auf die Mutation β R220C war negativ.

4.1.2.3 Funktionelle Charakterisierung der Mutation β R220C

Die heterozygote Konstellation mit einem Defekt, der einen Translationsabbruch induziert, legt die Hypothese nahe, dass das β Y149X Allel nicht exprimiert wird, während die Mutation β R220C den Phänotyp bestimmt. Daher wurden Expressionsstudien für die Mutation β R220C durchgeführt. Die betroffene

Aminosäure ist eine evolutionär hoch konservierte Aminosäure in der extrazellulären Domäne der β AChR-Untereinheit (Abb.9) und grenzt an die M1 Transmembran-Domäne (Abb.10). Mutationen der korrespondierenden Aminosäure sind bereits in anderen AChR-Untereinheiten beschrieben worden.

Die Expression der β R220C-mutierten β -Untereinheit wurde in *in vitro*-Experimenten getestet, wie oben bereits beschrieben.

HEK 293 Zellen, die AChR exprimieren, deren β -Untereinheit den Defekt β R220C tragen, weisen im Vergleich zu Wildtyp-AChR eine deutlich geringere Färbungsintensität auf. Wurde die Zellmembran vor der Färbung nicht permeabilisiert, so war kein spezifisches Färbungsmuster erkennbar, es zeigte sich lediglich eine homogene blassrote Färbung. Dieses Bild ist mit einer unspezifischen Färbung vereinbar. Im Vergleich zum Wildtyp war die α -Bungarotoxin Markierung nicht perlschnurartig an der Zellmembran konzentriert, sondern diffus. Das morphologische Bild entsprach dabei der Negativkontrolle, bei der HEK 293 Zellen nur mit den Untereinheiten α , δ und ϵ transfiziert wurden. Folglich werden β R220C tragende AChR nicht als Cluster-bildende Aggregate an der Zelloberfläche exprimiert. Durch Permeabilisierung der Zellmembran und anschließende Färbung war zu erkennen, dass α -Bungarotoxin bindende Strukturen intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum konzentriert sind (Abb.7).

β -subunit	Y15C	V91M	R220C
human	LFSG Y DSSV...LPDV V LLNN...LIIR R KPLF...		
bovine	LFSG Y DSTV...LPDV V LLNN...LIIR R KPLF...		
mouse	LFSN Y DSSV...LPDV V LLNN...LIIR R KPLF...		
rat	LFSG Y DSSV...LPDV V LLNN...LIIR R KPLF...		
xenopus laevis	LFET Y NPKV...QPDI V LMNN...LIIQ R KPLF...		
dog	LFEG Y DSSV...LPDV V LLNN...LIIR R KPLF...		
danio rerio	LFSY Y NSKV...LPDI V LINN...LIIQ R KPMF...		
torpedo	LFET Y NPKV...QPDI V LMNN...LIIQ R KPLF...		
takifugu rubripes	IFHN Y NPKV...RPDI Y LINN...LIIQ R KPLF...		

	Y15C	V91M	R220C
β -subunit	LF--S--G-- Y DSSV...LPDV V LLNN...LIIR R KPLF...		
α -subunit	LF--K--D-- Y SSVV...RPDL V LYNN...FVMQ R LPLY...		
γ -subunit	LM--Q--N-- Y DPNL...RPDI V LYNN...LIIQ R KPLF...		
δ -subunit	LF--QEKG-- Y NKEV...LPEI V LYNN...LIIR R KPLF...		
ϵ -subunit	LF--N--N-- Y DPGS...LPEI V LYNN...LIIR R KPLF...		
CHRN2	LLDFS--R-- Y NKLK...LPDV V LYNN...FIIR R KPLF...		
CHRN3	LF--Q--G-- Y QKVV...LPDI V LFEN...FVLR R LPLF...		
CHRN4	LL--N--KTR Y NNLI...LPDI V LYNN...FIIK R KPLF...		

Abb.9

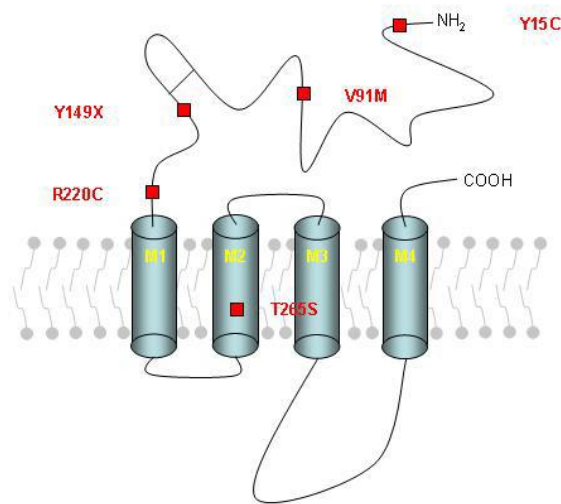


Abb. 10

4.1.3 Patientin C: Die Aminosäurevarianten β Y15C und β V91M

4.1.3.1 Klinik

Patientin C ist ein 15 Monate altes Kind gesunder nicht-konsanguiner Eltern albanischer Herkunft, auch die 4-jährige Schwester der Patientin ist gesund. In der Familie sind keine weiteren Fälle neuromuskulärer Erkrankungen bekannt. Erste Symptome traten bei Patientin C bereits neonatal auf, in Form von respiratorischer Insuffizienz, Ptosis, generalisierter Muskelschwäche und kongenitalen Gelenkkontrakturen. Im Verlauf war die motorische Entwicklung verzögert. Es traten mehrere Episoden von respiratorischer Insuffizienz mit vermehrter bronchoalveolärer Schleimsekretion bei allgemeiner Schwäche der Atemhilfsmuskulatur auf. Die schwere Myasthenie betrifft vor allem okuläre Muskeln mit extremer Ptosis, zudem

wurde eine verlangsamte Pupillenreaktion festgestellt. Eine Bulbärsymptomatik äussert sich in Schwäche der mimischen Muskulatur, Kau- und Schluckstörungen. Proximale und distale Extremitätenmuskulatur sind in gleichem Maße betroffen. Bei der neurologischen Untersuchung fielen eine leichte Muskelatrophie und pathologische Muskeldehnungsreflexe auf. Eine spinale Muskelatrophie wurde zunächst durch Muskelbiopsie und molekulargenetische Untersuchungen ausgeschlossen. Bei der repetitiven Nervenstimulation zeigte sich im niedrigfrequenten Bereich ein pathologisches Dekrement von 15% der distalen Muskelgruppen, die Nervenleitgeschwindigkeit war im physiologischen Bereich. Laborchemisch wurden Anti-AChR-Antikörper sowie eine Erhöhung der Serum-Creatinkinase ausgeschlossen. Durch die Verabreichung einer Testdosis Pyridostigmin (Mestinon®) konnte ein positiver Effekt erzielt werden, bisher wurde jedoch noch keine dauerhafte Therapie mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren versucht.

4.1.3.2 Mutationsanalyse

Nachdem Mutationen in *RAPSN* und *CHAT* ausgeschlossen worden waren, konnten bei der Analyse der β -Untereinheit des AChRs zwei Missense-Mutationen identifiziert werden. Bei der Mutation β Y15C ist das Nukleotid Adenin an Position 44 in Exon 2 durch Guanin ausgetauscht. Der Aminosäureaustausch β V91M beruht auf einem G>T Basenaustausch des Nukleotids 271 in Exon 4. Für beide Mutationen dienten 100 gesunde Probanden als Normalkontrollen, dabei waren 50 Probanden süd-ost-europäischer Herkunft. β Y15C wurde durch Restriktionsfragmentpolymorphismus mit Hilfe des Enzyms HpyCH4III detektiert, β V91M mit Hilfe des Enzyms SfaNI.

Bei der molekularen Untersuchung genetischen Materials der Mutter sowie der Schwester der Patientin mittels direkter Sequenzanalyse wurde keine der beiden Aminosäurevariationen detektiert. Der phänotypisch gesunde Vater der Patientin ist hingegen Träger sowohl von β Y15C als auch β V91M. Unter der Annahme eines autosomal-rezessiven Erbgangs musste die Hypothese, dass es sich bei β Y15C und β V91M um compound heterozygote Mutationen handelt, verworfen werden. Allerdings könnte eine der beiden Aminosäurevariationen sehr wohl pathogenetisch wirksam sein. In diesem Falle müsste jedoch eine weitere compound heterozygote Mutation identifiziert werden.

4.1.3.3 Funktionelle Charakterisierung des Aminosäureaustauschs β Y15C

Es handelt sich auch bei den betroffenen Aminosäuren von β Y15C und β V91M um evolutionär hoch konservierte Residuen (Abb.9). Beide Mutationen sind in der N-terminalen extrazellulären Domäne der AChR- β -Untereinheit lokalisiert. Die Expressionsstudien wurden zunächst für den Aminosäureaustausch β Y15C

durchgeführt. Die Aminosäure Tyrosin gehört zur Familie der aromatischen Aminosäuren, während Cystein eine Thiol-Gruppe-tragende Aminosäure ist. Damit weisen die beiden Aminosäuren sowohl strukturell als auch funktionell Unterschiede auf, die die Hypothese einer pathogenen Wirkung im entsprechenden Protein nahe legen. Demhingegen sind die Aminosäuren Valin, die eine aliphatische Seitenkette trägt, und die schwefelhaltige Aminosäure Methionin strukturell verwandt. Ein Austausch könnte funktionell weniger bedeutsam sein.

In *in vitro*-Experimenten konnte für die β Y15C mutierte β -Untereinheit des AChRs ein pathologisches morphologisches AChR-Expressionsmuster in AChR-exprimierenden HEK 293 Zellen identifiziert werden. Die Klonierungsstudien wurden nach dem oben beschriebenen Procedere durchgeführt. Das AChR-Expressionsmuster von β Y15C Mutanten war dabei analog dem oben beschriebenen Expressionsmuster aus Klonierungsexperimenten mit β R220C Mutanten. Charakteristisch waren auch hier eine deutlich geringere Färbungsintensität durch den spezifischen Liganden α -Bungarotoxin bei nicht permeabilisierten Zellen, die Färbung war unspezifisch und entsprach morphologisch der Negativ-Kontrolle, der die AChR- β -Untereinheit gänzlich fehlt. Permeabilisierte Zellen zeigten eine Konzentrierung von α -Bungarotoxin bindenden Strukturen im endoplasmatischen Retikulum (Abb.11).

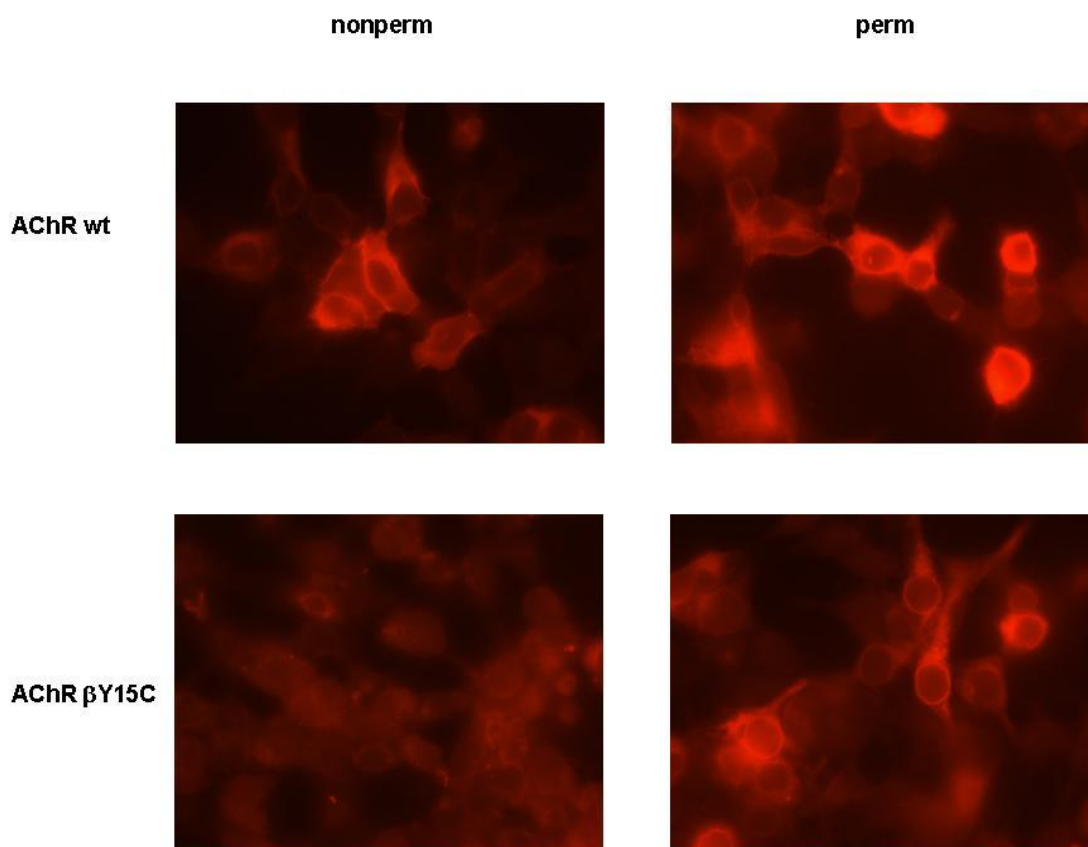


Abb.11

Mikroskopische Darstellung des AChR-Expressionsmusters bei der Mutation $\beta Y15C$ mittels Färbung mit α -Bungarotoxin an nicht-permeabilisierten sowie permeabilisierten Zellen.

Oben: Wildtyp (wt); Unten: Mutation $\beta Y15C$.

Linke Spalte: nicht-permeabilisierte Zellen; rechte Spalte: permeabilisierte Zellen.

Die Färbungsintensität ist bei $\beta Y15C$ -AChR im Gegensatz zum Wildtyp stark herabgesetzt. AChR-wt zeigen ein perlschnurartiges AChR-Expressionsmuster an der Zellmembran in Aggregaten bei nicht-permeabilisierten Zellen. $\beta Y15C$ weist hier eine unspezifische Hintergrund-Färbung auf. In permeabilisierten Zellen ist beim AChR-wt eine gleichmäßige AChR-Expression sichtbar, bei $\beta Y15C$ zeigt sich hingegen eine ringförmige Konzentrierung α -Bungarotoxin-bindender Strukturen um den Zellkern, vereinbar mit einer Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum.

4.1.4 Patientin D: Die Aminosäurevarianten $\beta I80M$ und $\beta I397T$

4.1.4.1 Klinik

Das 8-jährige erste Kind nicht-konsanguiner Eltern wurde nach einer komplikationslosen Schwangerschaft geboren. Die Mutter ist portugiesischer Herkunft, der Vater stammt von den Kapverdischen Inseln. Die 2-jährige Schwester der Patientin ist gesund, die Familienanamnese bezüglich neuromuskulärer Erkrankungen ist leer. Nach einer regelrechten motorischen Entwicklung manifestierten sich die ersten Symptome bei der Patientin im Alter von 2 Jahren. Allerdings war das Gangbild stets pathologisch, wobei eine rasche Ermüdbarkeit auffiel. Im Gegensatz zu den Patienten B und C war die Symptomatik deutlich progredient. Episodische Krisen traten dabei jedoch nicht auf. Die konstante generalisierte Schwäche nahm bei Belastung in ihrer Intensität zu. Dabei waren im Sinne einer Gliedergürtelmyasthenie vor allem proximale Muskelgruppen betroffen, mit watschelndem Gangbild, Schwierigkeiten beim Treppensteigen, Abduktionsschwäche der Arme und Scapulae alatae. Desweiteren bestanden eine Ptosis sowie eine Schwäche der Atemhilfsmuskulatur und der mimischen Muskeln. Insgesamt ist der Befund bei einer maximalen Gehstrecke von 50 Metern als schwere Form der Myasthenie zu bewerten. Klinisch imponierten eine Atrophie der Schulter- und Beckengürtelmuskulatur sowie pathologisch herabgesetzte Muskeldehnungsreflexe. Kontrakturen oder Dismorphien bestehen nicht. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten ein deutlich pathologisches Dekrement von 30% in distalen Muskelgruppen. Laborchemisch wurden eine erhöhte Serumcreatininkinase sowie das Vorhandensein von Anti-Acetylcholinrezeptor-Antikörpern ausgeschlossen. In einer Muskelbiopsie dominierten morphologisch Typ I-Muskelfasern, auffällig waren vergleichsweise kleine neuromuskuläre Endplatten. Die Verabreichung von Acetylcholinesterase-Inhibitoren zeigte einen positiven Effekt,

wobei Neostigmin gegenüber Pyridostigmin (Mestinon®) hinsichtlich der Wirkungsintensität überlegen schien. Daraufhin wurde eine Therapie mit Mestinon® angesetzt, der Therapieerfolg war jedoch nur mäßig.

4.1.4.2 Mutationsanalyse

Nachdem Mutationen in *RAPSN*, *CHRNE* und *COLQ* ausgeschlossen wurden, konnten bei der Sequenzanalyse der β -Untereinheit des AChRs zwei Missense-Mutationen in Exon 4 und Exon 10 nachgewiesen werden. Der Aminosäureaustausch β I80M beruht auf einem heterozygoten C>G Defekt des Nukleotids 240. Es handelt sich dabei um eine evolutionär relativ gut konservierte Aminosäure der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Die Mutation β I397T betrifft hingegen mit einem 1190T>C Austausch eine wenig konservierte Aminosäure im zytoplasmatischen Teil des AChRs. Der Basenaustausch in β I80M kann anhand eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus mit Hilfe des Enzyms NIAIII detektiert werden. Das Enzym schneidet spezifisch das Mutations-tragende Allel, Wildtyp-Allele bleiben intakt. β I397T wird mit dem Enzym BspDI detektiert, wobei das mutierte Allel im Gegensatz zum Wildtyp intakt bleibt. Beide Mutationen wurden bei je 100 gesunden Normalkontrollen, darunter 50 Probanden südeuropäischer Herkunft, nicht gefunden. Allerdings ergaben molekulargenetische Untersuchungen väterlicher DNA, dass auch der gesunde Vater Träger der beiden Aminosäurevarianten β I80M sowie β I397T ist. Das myasthene Syndrom bei Patientin D kann somit nicht allein aus der Kombination dieser Aminosäureaustausche resultieren. Expressionsstudien zur funktionellen Charakterisierung von β I80M sowie β I397T wurden daher bislang nicht durchgeführt.

4.1.5 Patientin E: Die Aminosäurevariante β I397T

4.1.5.1 Klinik

Patientin E fiel bereits neonatal mit tageszeitlich abhängiger einseitig betonter Ptosis auf. Die Symptomatik äußerte sich zudem in einer belastungsabhängigen Muskelschwäche der Extremitäten, die motorische Entwicklung war unterdessen altersentsprechend. Es bestand jedoch ein Strabismus. Bei der repetitiven Nervenstimulation ließ sich ein pathologisches Dekrement nachweisen. Der Tensilontest zeigte keinen positiven Effekt. In der Familie der 16-jährigen Patientin sind keine weiteren Fälle neuromuskulärer Erkrankungen bekannt.

4.1.5.2 Mutationsanalyse

Zunächst wurden Mutationen in den Genen *RAPSN*, *CHRNE* und *CHAT* sowie der ACh-Bindungsdomäne der α -Untereinheit ausgeschlossen. Bei der molekulargenetischen Analyse des *CHRNA1* Gens wurde die heterozygote Missense Mutation β 1397T (1190T>C) identifiziert, diese ist mit dem Basenaustausch bei Patientin D identisch. Ein compound heterozygoter Defekt des korrespondierenden Allels konnte jedoch auch in diesem Fall nicht nachgewiesen werden.

4.2 Analyse des *RAPSN*-Gens

Im Algorithmus der genetischen Diagnostik spielt die Sequenzanalyse des Gens *RAPSN*, aufgrund der Häufigkeit von genetischen Defekten in dem entsprechenden Protein, eine wichtige Rolle. Bei entsprechender Kompatibilität mit den klinischen Daten erfolgte zunächst stets eine genetische Analyse auf die Mutation N88K, da diese in einem Großteil der Fälle an einen genetischen Defekt von Rapsyn gekoppelt ist. Insbesondere infektinduzierte Episoden und Exazerbationen mit respiratorischer Insuffizienz sowie ein positiver Tensilontest können auf eine *RAPSN*-Mutation hinweisen [34]. 112 Patienten wurden auf Mutationen in *RAPSN* untersucht. Das Gen *RAPSN* umfasst 8 Exons, die jeweils inklusive der Promotor-Region analysiert wurden. Dabei wurden bei 5 Patienten Mutationen in *RAPSN* nachgewiesen, alle sind Träger der häufigen Mutation N88K. Zwei Patienten tragen N88K homozygot, die anderen Mutationen sind compound heterozygote Missense-Mutationen.

Mutationen in *RAPSN*

Patient/-in	A	B	C	D	E
Mutation	N88K S210R	N88K homozygot	N88K homozygot	N88K V165M	N88K E94K
Herkunft	Spanien	Mitteleuropa	Westeuropa	Westeuropa	Westeuropa
Onset	7.Lebensjahr	neonatal	neonatal	Kleinkindalter	Kleinkindalter
Betroffene Familienmitglieder	1 Bruder	-	-	-	-
Konsanguinität der Eltern	-	-	-	-	-
Symptomatik und Lokalisation der Muskelschwäche	-proximale Extremitäten - Nackenmuskeln	-Floppy-infant-Syndrom -hypotone Muskeltonus	-Fazialisparese	-proximale Extremitäten -mimische Muskeln -krisenhafte akute Muskelschwäche	- Nackenmuskeln -mimische Muskeln -krisenhafte akute Muskelschwäche
Symptome belastungsabhängig	-	+	+	+	+
Ptosis	-	+	+	+	+
Ophthalmoparese	-	-	-	-	-
Progredienz	+	-	-	-	-
Respiratorische Insuffizienz	-	+	+	+	+
Kontrakturen	-	-	+	-	-
Dysmorphien	-	-	-	-	-
Exazerbationen	-	+	+	+	+
path. Dekrement	-	k.A.	k.A.	-	-
Effekt Mestinon®	++	+	-	+	+

k.A. = keine Angaben

4.2.1 Patientin A : Die Mutationen N88K und S201R

4.2.1.1 Klinik

Die 10-jährige Patientin A ist das zweite Kind nicht-konsanguiner Eltern spanischer Herkunft. Auch der 14-jährige Bruder ist betroffen. Die Schwangerschaft verlief komplikationslos, die motorische Entwicklung des Kindes war zunächst altersentsprechend. Ab dem 7. Lebensjahr fiel die Patientin zunächst mit einer Schwäche der Nackenmuskulatur und watschelndem Gangbild auf, Rennen war nicht möglich. Der Verlauf war progredient, sodass zuletzt Treppensteigen oder Aufstehen aus dem Sitzen unmöglich waren. Es bestand eine Abduktionsschwäche der Arme, Halsmuskeln und distale Extremitätenmuskeln sowie die Rumpfmuskulatur waren hingegen nur moderat betroffen. Die Augenmotilität war hingegen nicht eingeschränkt, eine Ptosis trat nicht auf. Klinisch imponierte insgesamt eine isolierte proximale Muskelschwäche im Sinne einer Gliedergürtelmyasthenie bei einem Kraftgradwert von 4 und watschelndem Gangbild mit pathologischer Innenrotation der Beine. Der Bruder der Patientin fiel zunächst mit einer Skoliose auf, wobei er stets eine auffallende Belastungsschwäche zeigte. Da sich in einer MRT-Aufnahme des Rückenmarks eine geringgradige Syringomyelie darstellte, wurde die Pathogenese der Symptomatik zunächst darauf zurückgeführt, zumal die Extremitätenmuskulatur weniger betroffen war als bei der Schwester. Bei beiden Geschwistern zeigte sich eine hochgradige Besserung der Symptomatik durch die Verabreichung von Mestinon®, wobei der Effekt bei Patientin A deutlich stärker war. Die Elektromyographie zeigte bei beiden Patienten eine geringgradige Myopathie, in der repetitiven Stimulation des N.accessorius und des N.medianus mit Frequenzen von 3 und 50 Hz war jedoch kein Dekrement nachweisbar, die Nervenleitgeschwindigkeit zeigte physiologische Werte. Laborchemisch war die Serumcreatinkinase nicht erhöht.

4.2.1.2 Mutationsanalyse

Bei beiden Geschwistern wurde durch direkte Sequenzanalyse neben der heterozygoten, häufig auftretenden Mutation N88K (264C>A) in Exon 2, die bisher nicht publizierte monoallelische Mutation S201R (603C>A) in Exon 3 identifiziert. Die betroffene Aminosäure ist zwischen TPR 5 und TPR 6 (TPR=Tetratricopeptid-Repeats) des Rapsyn Proteins lokalisiert [34]. Bei den compound heterozygoten Mutationen ist der Vater Träger von S201R, das maternale Allel weist die N88K Mutation auf, es handelt sich um eine autosomal-rezessiv vererbliche Form des CMS (Abb.12). Auf Normalkontrollen wurde in diesem Fall verzichtet, da durch die

Sequenzierung des *RAPSN*-Gens bei weit über 100 CMS-Patienten das Vorliegen eines Polymorphismus an dieser Stelle weitgehend ausgeschlossen werden kann.

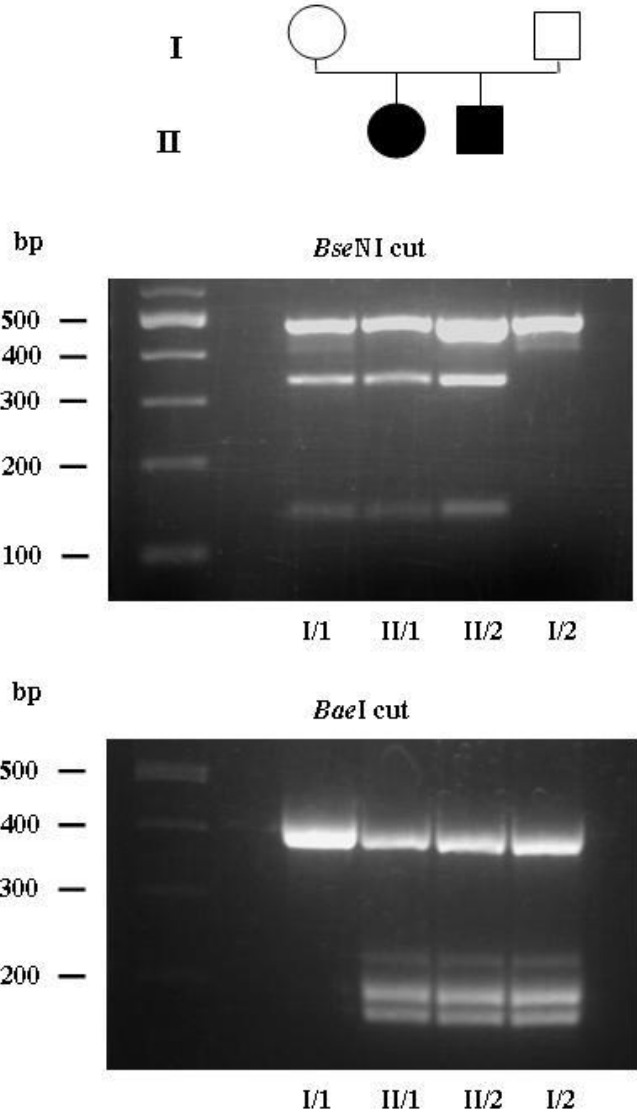


Abb. 12

4.2.2 Patientinnen B und C: homozygote Träger der Mutation N88K

4.2.2.1 Klinik

Beide Patientinnen sind mittel- bzw. westeuropäischer Herkunft. In beiden Fällen traten erste Symptome bereits neonatal auf, wobei Patientin B durch ein Floppy-Infant-Syndrom bei hypotonem Muskeltonus auffiel, während das klinische Bild von Patientin C von einer Arthrogryposis multiplex congenita sowie einer Fazialisparese dominiert wurde. Episoden respiratorischer Insuffizienz bei Infektexazerbationen im Kleinkindesalter traten in beiden Fällen auf, bei Patientin B erforderte diese Komplikation im Alter von 10 Monaten eine intensivmedizinische Behandlung. Weitere gemeinsame klinische Charakteristika waren eine starke belastungsabhängige Muskelschwäche, sowie Ptose. Ophthalmoparesen traten nicht auf. Während bei Patientin B ein deutlich positiver Effekt durch AChE-Inhibitoren erzielt werden konnte, wurde bei Patientin C keine relevante Besserung im Tensilontest beobachtet.

4.2.2.2 Mutationsanalyse

Durch direkte Sequenzanalyse konnte in beiden Fällen homozygot die *RAPSN* Mutation N88K (264C>A) in Exon 2 nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um eine autosomal-rezessive Mutation.

4.2.3 Patientinnen D und E: Heterozygote Träger der Mutation N88K

4.2.3.1 Klinik

Bei beiden Patientinnen westeuropäischer Herkunft traten im Kleinkindesalter Exazerbationen mit respiratorischer Insuffizienz und krisenhafter akuter Muskelschwäche auf. Die generalisierte belastungsabhängige Myasthenie betraf bei Patientin D in erster Linie die proximale Extremitätenmuskulatur, bei Patientin E dominierte eine Schwäche der Nackenmuskeln. Desweiteren waren Ptosis und Schwäche der mimischen Muskeln gemeinsame klinische Charakteristika, Ophthalmoparesen traten hingegen nicht auf. Die Elektromyographie zeigte keine pathologischen Merkmale. In beiden Fällen konnte durch die Verabreichung von AChE-Inhibitoren ein deutlich positiver Effekt erzielt werden.

4.2.3.2 Mutationsanalyse

In beiden Fällen fanden sich neben der Mutation N88K (264C>A) in Exon 2 compound heterozygote Missense-Mutationen. Bei Patientin D wurde die bereits beschriebene Aminosäurevariation V165M [35] identifiziert, der Basenaustausch G>A des Nukleotids 493 in Exon 2 ist hier die Ursache.

Im Fall von Patientin E liegt neben N88K die Mutation E94K (280G>A) in Exon 2 vor. E94K liegt in der gleichen TPR Domäne wie N88K und wurde bisher bei noch keinem der weit über 100 gescreenten CMS-Patienten nachgewiesen. Bei allen identifizierten Mutationen handelt es sich um Defekte mit autosomal-rezessiver Vererbungsform.

4.3 Analyse des *CHRNE*-Gens

Neben dem *RAPSN*-Gen spielt auch das *CHRNE*-Gen im Rahmen der molekulargenetischen Diagnostik von CMS aufgrund seiner Häufigkeit eine entscheidende Rolle. Der molekulardiagnostische Algorithmus sieht bei entsprechenden phänotypischen Charakteristika zunächst eine Untersuchung des *RAPSN*-Gens, anschließend die Analyse des *CHRNE*-Gens vor. Eine routinemäßige Sequenzierung erfolgt vor allem bei milder Ausprägung der CMS-Symptomatik, Ptosis und Ophthalmoparese und positivem Tensilontest. 12 Exons kodieren für die ϵ -Untereinheit des AChRs, es erfolgte jeweils eine vollständige Sequenzierung inklusive der Promotorsequenz. Mutationen des *CHRNE*-Gens auf Chromosom 17p13-12 können sowohl kinetische Defekte des AChRs als auch AChR-Defizienz hervorrufen. Letztere stellen unter allen Formen von AChR-Defizienz die häufigste Gruppe dar. Dabei sind bereits weit über 70 verschiedene *CHRNE*-Mutationen charakterisiert worden, sowohl Missense-Mutationen, als auch Deletionen, Insertionen und intronische Mutationen [8]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei 66 CMS-Patienten das *CHRNE*-Gen untersucht, in 5 Fällen konnten Mutationen der AChR- ϵ -Untereinheit nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich in drei Fällen um die häufige Mutation 1267delG, die vorwiegend in der Volksgruppe der Roma auftritt und sowohl in homozygoter als auch in compound heterozygoter Form identifiziert wurde, sowie um die bereits beschriebene Mutation 723delC in homozygoter Form und die bisher unveröffentlichte homozygote Mutation C142Y.

Mutationen in *CHRNE*

Patient/-in	A	B	C	D	E, F, G, H
Mutation	1267delG homozygot	1267delG 734delC	1267delG IVS7-2A>G	C142Y homozygot	723delC homozygot
Herkunft	Volksguppe der Roma	Osteuropa	Osteuropa	Jordanien	Jordanien
Onset	Kleinkindalter	Kleinkindalter	Kleinkindalter	neonatal	neonatal
Betroffene Familienmitglieder	-	1 Schwester	-	1 Bruder	4 Geschwister
Konsanguinität der Eltern	-	-	-	+	+
Symptomatik und Lokalisation der Muskelschwäche	k.A.	-prox. und distale Extremitäten - tageszeitliche Schwankung	-prox. und distale Extremitäten -tageszeitliche Schwankung	-hypotone Muskeltonus -abnorme Ermüdbarkeit	-prox. Extremitäten -abnorme Ermüdbarkeit
Symptome belastungsabhängig	k.A.	+	+	+	+
Ptosis	+	+	+	+	+
Ophthalmoparese	+	+	+	+	+
Bulbärsymptome	-	-	nasale Sprache	Kau-, Schluckstörung mimische Muskeln	-
Progredienz	-	-	-	-	-
Respiratorische Insuffizienz	-	-	-	+	+
Kontrakturen	-	-	-	-	-
Stigmata	-	-	Skoliose, Scapulae alatae, Muskelatrophie chron.	-	-
Exazerbationen	k.A.	+	generalisiert distal (14.3%) prox. (30%)	+	+
path. Dekrement	k.A.	k.A.		-	k.A.
Effekt Mestinon®	++	++	++	++	++

k.A. = keine Angaben

4.3.1 Patienten A, B und C: Die Mutation 1267delG

4.3.1.1 Klinik

Die Patientin A gehört der Volksgruppe der Roma an, Patienten B und C sind osteuropäischer Herkunft. Konsanguinität wurde nicht angegeben. In allen Fällen imponieren klinisch eine Ptosis sowie eine Ophthalmoparese. Der Effekt von Mestinon® war bei allen Patienten deutlich positiv. Die Patienten B und C wiesen gleichermaßen eine belastungsabhängige bzw. generalisierte Muskelschwäche mit tageszeitlicher Schwankung auf, die sowohl proximale als auch distale Muskelgruppen betraf und sich in einem herabgesetzten Kraftgrad manifestierte. In beiden Fällen traten erste Symptome im Kleinkindesalter auf, bei Patient B im Alter von 4 Jahren, bei Patient C bereits nach dem ersten Lebensjahr. Kontrakturen oder Dysmorphien wurden nicht beobachtet. Im Verlauf zeigte sich kein Anhalt für eine Progredienz der Symptomatik. Während das Syndrom bei Patient B durch Exazerbationen bestimmt wurde, war die Symptomatik bei Patient C chronisch generalisiert. Die Schwester von Patient B ist bei identischer Symptomatik gleichermaßen betroffen. Insgesamt scheint die Symptomatik bei Patient C am schwersten ausgeprägt zu sein, mit schwerer Skoliose, Scapulae alatae, Muskelatrophie sowie Bulbärsymptomatik in Form von nasaler Sprache. Die Myasthenie ließ sich in der Elektromyographie durch ein pathologisches Dekrement, sowohl distaler (14.3%) als auch proximaler (30%) Muskelgruppen, objektivieren.

4.3.1.2 Mutationsanalyse

Bei Patientin A konnte die Mutation 1267delG in homozygoter Form identifiziert werden. Die Deletion des Nukleotids Guanin in Exon 12 resultiert in einem sogenannten Frameshift (engl.: Rasterverschiebung), der das Leseraster der Aminosäuren-Kodierung durch Basen-Triplets kompromittiert.

Bei Patient B als auch bei seiner ebenfalls betroffenen Schwester wurde neben 1267delG in monoallelischer Form die compound heterozygote Mutation 734delC gefunden. Bei dieser Deletion einer einzelnen Base in Exon 7 handelt es sich ebenfalls um eine Frameshift-Mutation.

Patient C ist neben dem 1267delG Defekt von dem intronischen Basenaustausch IVS7-2A>G betroffen. Diese intronische Mutation modifiziert die Konsensussequenz

für die Induktion des Spleißprozess von Exon 8, die entsprechende mRNA unterliegt damit einem defekten Spleißvorgang [36].

4.3.2 Patient D: Die Mutation ϵ C142Y

4.3.2.1 Klinik

Der 5-jährige Patient fiel bereits neonatal durch hypotonen Muskeltonus, generalisierte Schwäche und rasche Ermüdbarkeit auf. Die Eltern sind jordanischer Herkunft und konsanguin. Ein 8-jähriger Bruder des Patienten ist ebenfalls betroffen, allerdings ist die Symptomatik milder ausgeprägt und auf leichte bilaterale Ptosis und Ophthalmoparese beschränkt. Zwei Schwestern des Patienten sind gesund. Neben der okulären Symptomatik mit Ptosis und Augenmotilitätsstörungen, manifestierte sich eine belastungsinduzierte Muskelschwäche bei Patient D vor allem in der proximalen Extremitätenmuskulatur, infolge dessen ermüdet der Patient bereits nach einer Gehstrecke von 5-6 Metern. Kau- und Schluckstörungen sowie eine Schwäche der mimischen Muskeln deuteten auf eine Bulbärsymptomatik hin. Kontrakturen oder Dysmorphien traten hingegen nicht auf. Bis zum 5. Lebensjahr ereigneten sich vier Episoden respiratorischer Insuffizienz, die durch eine Aspirationspneumonie kompliziert wurden. Elektrophysiologische Untersuchungen erbrachten keine pathologischen Ergebnisse. Klinisch wurde durch die Verabreichung von Mestinon® ein deutlich positiver Effekt erzielt, insbesondere die stark ausgeprägte Muskelschwäche und die Schluckstörungen konnten durch AChE-Inhibitoren erfolgreich therapiert werden.

4.3.2.2 Mutationsanalyse

Bei beiden Brüdern wurde homozygot die Mutation ϵ C142Y (485G>A) nachgewiesen. Diese Missense Mutation in Exon 5 betrifft eine evolutionär hoch konservierte Aminosäure. Die Mutation ϵ C142Y wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Tatsache, dass es sich bei den vorliegenden Fällen um Kinder konsanguiner Eltern handelt, könnte darauf hin deuten, dass es sich um eine seltene Mutation („private mutation“) handelt.

4.3.3 Patienten E-H: Die homozygote Mutation 723delC

4.3.3.1 Klinik

Vier Geschwister einer jordanischen Familie im Alter von 10-17 Jahren sind gleichermaßen betroffen und weisen in Symptomenkomplex und Schweregrad der Erkrankung ein identisches klinisches Bild auf. Die Eltern sind konsanguin, die Mutter ist eine Cousine ersten Grades des Vaters. Die Eltern sowie vier weitere Geschwister sind gesund. Es handelt sich um eine CMS-Form mit neonataler Erstmanifestation, die durch belastungsinduzierte muskuläre Schwäche und abnorme Ermüdbarkeit sowie Ptosis und Ophthalmoparese charakterisiert ist. Tendenziell waren eher proximale Muskelgruppen betroffen. Bei einem der Patienten trat bis zum 10. Lebensjahr als einmaliges Ereignis eine krisenhafte Exazerbation mit extremer Muskelschwäche und respiratorischer Insuffizienz auf. In einem Fall zeigten sich zusätzlich Schluck- und Kaustörungen. Auf der Basis eines positiven Tests mit AChE-Inhibitoren wurde eine Therapie mit Mestinon® angesetzt, durch die eine zufriedenstellende Besserung der Symptomatik erzielt werden konnte.

4.3.3.2 Mutationsanalyse

Bei allen Geschwistern wurde die Mutation 723delC in Exon 7 in homozygoter Form identifiziert. Die autosomal-rezessiv vererbliche Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters der mRNA. Die Mutation 723delC wurde in einem ähnlichen Fall, ebenfalls bei einer Familie jordanischer Herkunft, bereits publiziert [37].

4.4 Analyse des APC-Gens

Die Hypothese einer möglichen Beteiligung von potentiellen genetischen Defekten im *APC*-Gen im Prozess der Pathogenese von CMS, beruht auf der Entdeckung einer Agrin-abhängigen direkten Interaktion zwischen APC und dem cytoplasmatischen Teil der β -Untereinheit des AChRs. Die relevanten interagierenden Aminosäuren befinden sich in Position 1998-2170 von APC sowie in den Aminosäuren 406-469 der β -Untereinheit, entsprechend der APC-Bindungsdomäne der AChR- β -Untereinheit [29]. Wird diese Interaktion durch einen funktionellen oder strukturellen Defekt des *APC*-Gens unterbunden, so könnte eine verminderte Cluster- und Aggregatbildung der AChR und eine geringere Interaktion mit dem Ankerprotein Rapsyn resultieren.

Um die Hypothese einer eventuellen Beteiligung des Gens *APC* an der Entstehung von CMS näher zu beleuchten, wurde bei 82 Patienten aus unserem CMS-Kollektiv

das relevante Nukleotidfragment von *APC* anhand von PCR und direkter Sequenzierung auf Mutationen untersucht. Mutationen in anderen relevanten CMS-Genen, in erster Linie Mutationen in *RAPSN* und *CHRNE* sowie weitere mit dem jeweiligen klinischen Erscheinungsbild kompatible Mutationen, wurden zunächst ausgeschlossen. Zur Identifizierung häufiger Polymorphismen erfolgte zu Beginn eine Analyse der entsprechenden *APC*-Teilsequenz bei 2 gesunden Normalkontrollen. Das relevante *APC*-Fragment ist in Exon 15 des *APC*-Gens lokalisiert. Zur direkten Sequenzanalyse wurde die entsprechende Nukleotidsequenz in zwei PCR-Fragmenten amplifiziert. Die durch entsprechend entworfene Primer begrenzten Sequenzfragmente überschneiden sich und umfassen je etwa 600 Basenpaare.

In dem untersuchten Patientenkollektiv konnten keine Mutationen identifiziert werden.

5 Diskussion

5.1 Mutationen in der β -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors

Bisher wurden lediglich fünf verschiedene Mutationen in der AChR- β -Untereinheit beschrieben, von denen drei mit einem Slow-Channel-Syndrom einhergehen, aus den anderen beiden Mutationen resultiert eine AChR-Defizienz [8]. Es handelt sich um drei Missense-Mutationen, β V229F [38], β L262M [39] und β V266M [40], die autosomal-dominant vererbt werden und ein Slow-Channel-CMS hervorrufen, sowie um die compound heterozygoten Deletionen β 1276del9 und β 752del224 [41], die zu einer Abnahme der AChR Expression an der postsynaptischen Membran führen. Bislang wurden noch keine Defekte im *CHRNA1*-Gen nachgewiesen, die mit einem Fast-Channel-Syndrom einhergehen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei weitere, bisher noch nicht bekannte Defekte in der AChR- β -Untereinheit identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Ursache eines CMS sind. Die autosomal-dominant vererbliche Punkt-Mutation β T265S liegt einem Slow-Channel-Syndrom zugrunde. Zwei weitere Mutationen, β Y149X und β R220C sind autosomal-rezessiv vererbt und treten in compound heterozygoter Form auf. β Y149X und β R220C verursachen eine verminderte Expression der AChR an der neuromuskulären Endplatte.

Desweiteren wurden je zwei Aminosäurevariationen bei zwei CMS-Patientinnen identifiziert, β I80M und β I397T sowie β Y15C und β V91M. Für diese Mutationen konnte eine Pathogenität bisher noch nicht zweifelsfrei belegt werden (Abb.10).

5.1.1 Die Mutation β T265S: Eine Slow-Channel-Mutation

Die heterozygote Mutation β T265S wurde bei Patientin A auf einem Allel identifiziert. Die entscheidenden klinischen Charakteristika waren eine eher milde ausgeprägte Symptomatik eines CMS mit Spätmanifestation, es wurde kein positiver Effekt von Acetylcholinesterase-Inhibitoren beobachtet. Die Mutter der Patientin ist gleichermaßen betroffen und weist genotypisch den gleichen Defekt auf. Anhand dieser Merkmale liegt die Hypothese einer autosomal-dominanten Form eines Slow-Channel-CMS nahe. Ein autosomal-dominanter Erbgang ist charakteristisch für das Slow-Channel-Syndrom [8]. Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung von Expressionsstudien der Mutation β T265S stützen diese Hypothese.

5.1.1.1 Klinische Indizien für ein Slow-Channel-Syndrom

Charakteristische klinische Merkmale von Slow-Channel-CMS sind im Vergleich zu einem AChR-Mangel eine eher blande Ausprägung der Symptomatik und eine im Verlauf über Jahre progrediente klinische Manifestation der Erkrankung, die sich durch die Pathogenese erklärt. Allerdings treten auch schwere Fälle von Slow-Channel-CMS auf, die im Verlauf bereits bis zum zehnten Lebensjahr zu einer gravierenden körperlichen Behinderung führen können. Die Erstmanifestation der Symptome kann bereits im frühen Kindesalter auftreten, oder aber erst im späten Erwachsenenalter, wobei eine Late-onset Form des CMS ein Hinweis auf ein Slow-Channel-Syndrom sein kann. Allerdings treten Late-Onset-Formen von CMS auch bei Mutationen in *RAPSN* oder in *DOK-7* auf. Insgesamt reicht der Ausprägungsgrad beschriebener klinischer Phänotypen bei Slow-Channel-CMS somit von blanden Late-Onset CMS bis hin zu schweren Early-Onset CMS [2]. Patientin A zeigte im Alter von 38 Jahren erste Symptome, diese Late-Onset Form kann im klinischen Kontext als Hinweis auf ein Slow-Channel-CMS gewertet werden. Eine selektive Schwäche der Fingerextensoren sowie der Nackenmuskeln mit Zeichen einer muskulären Atrophie können charakteristische Merkmale eines Slow-Channel-Syndroms sein. Bei leichten Formen sind faziale Muskeln hingegen meist nicht betroffen. Bei Patientin A war die myasthene Symptomatik an Fingerextensoren und Nackenmuskeln am schwersten ausgeprägt, eine Schwäche der Gesichtsmuskeln und eine Ptosis wurden hingegen nur in leichter Form beobachtet. Diese Befunde korrelieren mit der Beschreibung der typischen Klinik bei bisher identifizierten Slow-Channel-Syndromen. Als Komplikationen können Wirbelsäulendeformitäten und respiratorische Insuffizienz auftreten. Im Falle von Patientin A ereigneten sich einige Episoden respiratorischer Probleme. Wird bei der neuronalen Stimulierung ein Einzelreiz gesetzt, können typischerweise repetitive CMAPs gemessen werden

(Summenaktionspotential; CMAP=engl.: compound muscle action potential). Dieses Phänomen beruht auf der verlängerten Öffnungszeit der Kanalpore. Bei Patientin A wurde ein entsprechendes biphasisches CMAP bei Einzelreizstimulierung des N. ulnaris registriert. Die Verabreichung von AChE-Inhibitoren hat entsprechend dem Pathomechanismus der Erkrankung keinen positiven Effekt. Ein korrespondierendes Ergebnis erbrachte der Test mit AChE-Inhibitoren bei Patientin A. Dieser Befund kann allerdings auch bei Syndromen mit verminderter AchR-Expression beobachtet werden. Bei Slow-Channel-CMS drohen bisweilen durch die medikamentös-induzierte Überflutung des synaptischen Spalts mit Acetylcholin gar lebensbedrohliche Exazerbationen [2], [4].

5.1.1.2 Vererbungsmodus des Slow-Channel-Syndroms

In der Literatur sind 21 dieser sogenannten gain-of-function Mutationen beschrieben, dabei wurde bei 20 ein autosomal-dominanter Vererbungsmodus festgestellt [8], [42], [43]. Einzige Ausnahme bildet die Slow-Channel-Mutation ϵ L78P, die in einer konsanguinen Familie in autosomal-rezessiver homozygoter Form auftrat [44]. Diese Beobachtungen korrelieren mit der Hypothese eines autosomal-dominanten Vererbungsmodus des Basenaustauschs bei Patientin A aufgrund der Konstellation familiären Auftretens der Mutation.

5.1.1.3 Kinetische und morphologische Merkmale des Slow-Channel-Syndroms

Dem Slow-Channel-CMS liegt ein kinetischer Defekt des Ionenkanals zugrunde. Der kinetische Defekt des Slow-Channel Syndroms ist durch eine erhöhte Acetylcholin-Affinität des AchRs, eine erhöhte Öffnungsrate sowie eine herabgesetzte Schließrate der Kanalpore bei Bindung des Liganden gekennzeichnet. Die Kanalöffnungszeit ist verlängert, während der Aktivierung treten vermehrt spontane Öffnungseignisse ein. Die Dissoziation von Acetylcholin von seinem Rezeptor ist dabei herabgesetzt. Diese Faktoren resultieren in einem Depolarisationsblock, der sich klinisch in belastungsabhängiger Muskelschwäche äußert. Charakteristische morphologische Veränderungen sind zunächst nicht zu identifizieren. In mikroskopischen Analysen sind häufig sowohl Quantität als auch Verteilungsmuster der mutierten AChR an der postsynaptischen Membran identisch mit der Expression von Wildtyp-AChR. Dieses für Slow-Channel-Mutationen charakteristische Merkmal wurde auch bei Expressionsstudien an β T265S-AChR-transfizierten HEK293 Zellen beobachtet. Im Vergleich mit AChR-Wildtyp-transfizierten Zellen konnte in der Fluoreszenzmikroskopie kein morphologischer Unterschied festgestellt werden. Da die Pathogenität der Mutation β T265S nicht anhand der Morphologie der AChR-Expression belegt werden kann, handelt es sich offenbar nicht um eine Mutation, aus

der eine AChR-Defizienz an der Zelloberfläche resultiert. Vielmehr ergibt sich aus den Ergebnissen der Expressionsstudie die Hypothese eines kinetischen Defekts des AChRs. Dieser Defekt muss anhand von elektrophysiologischen Untersuchungen mit der Patch-Clamp Methode noch analysiert und bestätigt werden.

5.1.1.4 Verwandte Mutationen im klinischen Vergleich

Bisher sind drei Slow-Channel-Mutationen bekannt, die in der β -Untereinheit des AChRs lokalisiert sind, β V229F [38], β V266M [40] und β L262M [39]. Des Weiteren wurden in der ϵ -Untereinheit sowie in der δ -Untereinheit Slow-Channel-Mutationen beschrieben, die die korrespondierende Aminosäure betreffen, ϵ T264P [45] und δ S268F [46]. Die hohe evolutionäre Konservierung der betroffenen Aminosäure in den verschiedenen AChR-Untereinheiten könnte ähnliche mutationsbedingte kinetische Eigenschaften des Rezeptors bedingen und rechtfertigt einen Vergleich.

Slow-Channel-Mutationen in der β -Untereinheit im Vergleich

Die Mutation β V229F wurde bei acht Mitgliedern einer Familie über drei Generationen beobachtet. Es handelt sich um eine Late-Onset Form, der Zeitpunkt der Erstmanifestation der Symptome reichte vom jungen Erwachsenenalter bis in die 5. Lebensdekade. Im Verlauf war die Erkrankung über Jahre progredient. Charakteristischerweise zeigte sich die myasthene Symptomatik selektiv an den Fingermuskeln und distalen Armmuskeln, in einem Fall wurde eine muskuläre Atrophie der Handmuskeln sowie eine Schwäche der Nackenmuskeln beobachtet. In elektrophysiologischen Untersuchungen folgte auf Setzen eines neuronalen Einzelreizes ein repetitives CMAP. Der Symptomenkomplex der β V229F Patienten weist somit charakteristische Merkmale eines Slow-Channel-Syndroms und offensichtliche Parallelen mit der Symptomatik der Patientin A auf. In beiden Fällen scheint ein autosomal-dominanter Erbgang vorzuliegen. Allerdings unterscheidet sich die relativ schleichende Progredienz vom Erkrankungsverlauf bei Patientin A, die post partum ein akutes Auftreten schwerer Symptome zeigte [38].

Die Mutation β V266M geht hingegen mit einer schweren Form von CMS mit neonatalem Onset einher. Dabei waren okuläre und faciale Muskelgruppen sowie die Extremitätenmuskulatur betroffen. Bei der neuronalen Stimulierung durch Einzelreize wurde ein repetitives CMAP beobachtet. Die Familienanamnese bezüglich neuromuskulärer Erkrankungen war leer. Interessanterweise liegt hier eine deutliche Diskrepanz der klinischen Charakteristika in Verlauf und Symptomatik vor, obwohl molekulargenetisch benachbarte Aminosäuren der gleichen AChR-Untereinheit betroffen sind [40].

Auch die Mutation β L262M resultiert in einem neonatalen Onset mit schwerster progredienter Symptomatik. Im Säuglingsalter fielen bei dem betroffenen Patienten eine Kopfhalt- sowie Trinkschwäche auf, die motorische Entwicklung war verzögert. Des Weiteren traten eine Ophthalmoparese und Ptosis auf. Bedingt durch Kontrakturen der unteren Extremität war der Patient seit dem 13. Lebensjahr rollstuhlpflichtig bei schwerer Muskelatrophie und extensiver Muskelschwäche. Kraniofaziale Dysmorphien wurden beschrieben. Familienanamnestisch ist die Erkrankung ein Einzelfall. Ein Edrophoniumchlorid (Tensilon®) Test erbrachte zunächst ein positives Ergebnis, die anschließende Therapie mit Pyridostigmin hatte jedoch keinen positiven Effekt. Im vorliegenden Fall handelt es sich um eine schwere Form des Slow-Channel-CMS. Zwar lässt sich unter molekulargenetischen Gesichtspunkten feststellen, dass die Mutation in der gleichen Domäne des AChRs lokalisiert ist, wie die Mutation β T265S. Das phänotypische Korrelat ist in beiden Fällen jedoch ganz unterschiedlich [39].

Im Vergleich klinischer Daten von Slow-Channel-CMS-Patienten mit Missense-Mutationen in der AChR- β -Untereinheit zeigt sich somit eine deutliche Heterogenität des Phänotyps der verschiedenen Mutationen bezüglich Erstmanifestation, Symptomatik und Schweregrad. Eine Verwandtschaft klinischer Merkmale besteht in elektrophysiologischen Befunden, Augen- und Extremitätenmuskeln sind betroffen, die Erkrankung ist progredient. Diese Merkmale sind jedoch wenig spezifisch und können auch bei Mutationen in anderen Rezeptor-Untereinheiten auftreten. Somit kann die entsprechende Slow-Channel-Symptomatik kaum in eine Kausalbeziehung zu einem generalisierten funktionellen Defekt der AChR- β -Untereinheit durch die Mutation gestellt werden. Vielmehr muss die Pathogenität der einzelnen Mutationen auf dem Niveau der Primärstruktur betrachtet werden. Interessanterweise handelt es sich bei den analysierten Mutationen mit völlig unterschiedlichen phänotypischen Pendanten um Defekte benachbarter Aminosäuren in der Proteinsequenz der identischen AChR-Untereinheit. Die gravierenden phänotypischen Unterschiede in Symptomatik und Schweregrad bei ähnlichem Genotyp sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass insbesondere bei kinetischen Defekten das Ausmaß der funktionellen Rezeptordefekte sehr variabel ist. Beim Slow-Channel-Syndrom bestimmen sowohl der kinetische Defekt als auch die sukzessive Zerstörung der Morphologie der Synapse das klinische Bild. Zudem könnten weitere genetische Kofaktoren, die bisher noch nicht identifiziert wurden, für die hohe Variabilität des Phänotyps im Falle identischer oder verwandter pathogener Mutationen verantwortlich sein.

Im Falle von Patientin A trat bei der ebenfalls betroffenen Mutter ein nahezu identisches klinisches Bild auf. Auch der Vergleich klinischer Daten von acht β V229F-Patienten untereinander zeigte nur geringe phänotypische Unterschiede.

Slow-Channel-Mutationen korrespondierender Aminosäuren im Vergleich

Im Gegensatz zu Patientin A fiel die Patientin mit einem korrespondierenden Aminosäureaustausch in der ϵ -Untereinheit, ϵ T264P, bereits neonatal durch myasthene Symptome auf. In der Elektromyographie zeigte sich ein pathologisches Dekrement. Untersuchungen einer im Alter von 17 Jahren durchgeführten interkostalen Muskelbiopsie zeigten morphologisch eine Myopathie der Endplatte sowie ein verlängerter biphasischer Abfall von MEPCs (engl.: MEPC=miniature endplate current), charakteristische Merkmale eines Slow-Channel-Syndroms [45].

Auch der Träger der Mutation δ S268F fiel bereits neonatal mit generalisiertem hypotonem Muskeltonus im Sinne eines Floppy-Infant-Syndrom, sowie schwerer belastungsinduzierter Muskelschwäche auf. Eine Ptosis wurde beobachtet. Im Alter von 9 Jahren war der Patient rollstuhlpflichtig, Episoden respiratorischer Insuffizienz traten auf. Befunde einer Muskelbiopsie und einer Elektromyographie zeigten ähnliche Ergebnisse wie bei ϵ T264P. Allerdings wurden für die Mutation δ S268F kinetische Eigenschaften beschrieben, die einen Sonderfall unter allen bisher analysierten Slow-Channel-Syndromen darstellen: Sie weist funktionell neben einer charakteristisch verzögerten Schließung der Kanalpore auch eine verzögerte Öffnung auf [46].

Einerseits unterscheiden sich die Missense-Mutationen ϵ T264P und δ S268F in korrespondierenden Aminosäuren bezüglich der entsprechenden Klinik von der Mutation β T265S. Diese Beobachtung verdeutlicht den funktionellen Unterschied der verschiedenen Untereinheiten. Andererseits konnte jedoch auch für diese Mutationen gezeigt werden, dass es sich um Slow-Channel-Mutationen handelt. Diese Beobachtung stützt die Hypothese der Pathogenität der Mutation β T265S im Sinne eines Slow-Channel-CMS.

Mutation	β T265S	β V229F	β V266M	β L262M	ϵ T264P	δ S268F
Onset	38./26. Lebensjahr	15.-50. Lebensjahr	neonatal	neonatal	neonatal	neonatal
Progredienz	gering (Symptome akut post partum)	+	k.A.	+	+	+
Repetitives CMAP	+	+	+	k.A.	+	+
Ptosis	moderat	-	k.A.	+	k.A.	+
Externe Augenmuskeln	-	moderat	+	++	k.A.	k.A.
Faziale Muskeln	moderat	-	+	+	k.A.	k.A.
Nackenmuskeln	+	+	k.A.	+	k.A.	+
Finger-und Handmuskeln	+	+	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Extremitätenmuskeln	-	+	+	++	k.A.	k.A.
Muskuläre Atrophie	+(SCM)	+(Hand)	k.A.	++ (Extremitäten)	k.A.	k.A.
Episoden respiratorischer Insuffizienz	+	-	k.A.	k.A.	k.A.	+
Effekt von AchE- Inhibitoren	-	k.A.	k.A.	(+)	k.A.	-
Skoliose	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Dysmorphien	-	-	-	+	k.A.	k.A.
Kontrakturen	-	-	-	+	k.A.	k.A.
Rollstuhlpflicht	-	-	-	+	k.A.	+

k.A. = keine Angaben

5.1.1.5 Molekularbiologische Charakterisierung der Mutation β T265S

Bisher wurden insgesamt 21 Slow-Channel-Mutationen identifiziert, ein Großteil betrifft die α - sowie die ϵ -Untereinheit des AChRs und ist in der extrazellulären Domäne oder in den Transmembran Domänen M1 und M2 der Kanalpore lokalisiert [20]. Es handelt sich um sogenannte Gain-of-Function-Mutationen. Der relevante Aminosäure-Austausch in β T265S ist in der M2 Transmembran-Domäne der AChR-

β -Untereinheit lokalisiert, die die Kanalpore begrenzt [40] (Abb.10). Betrachtet man die Sekundärstruktur des Rezeptors, ist das evolutionär hoch konservierte Aminosäure-Residuum β T265 (entsprechend ϵ T264, δ S268, α T279, γ T262) in allen Untereinheiten in der Mitte der Transmembranregion M2 lokalisiert. Diese Domäne besteht aus zwei α -Helices, die den inneren Ring des AChRs aufbauen. Die beiden α -Helices werden zentral durch ein gestrecktes Peptid verbunden. Teil dieses gestreckten Peptids ist ein hoch konserviertes zentrales Leucin (human α L251, β L262, δ L265, ϵ L261), das wahrscheinlich eine hydrophobe Barriere für Ionen darstellt [40]. Als hydrophober Ring bildet die M2-transmembran-Domäne in geschlossenem Zustand der Kanalpore somit eine Barriere für Ionen. Die M2 Domäne hat folglich eine wichtige Funktion für die Kontrolle des synaptischen Kationenstroms. Unterschiede hinsichtlich der Pathogenität von Aminosäure-Variationen von β T265, ϵ T264, δ S268, α T279 und γ T262 könnten durch die unterschiedliche Funktion der verschiedenen Untereinheiten im Rezeptor bedingt sein. Acetylcholin bindet an die extrazellulären Domänen zwischen α - und ϵ -Untereinheit oder α - und δ -Untereinheit. Die β -Untereinheit ist nicht am Prozess der Ligandenbindung beteiligt. Die M2 Domäne der α -Untereinheit vollzieht nach Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne eine Konfigurationsänderung [47]. Die Mutation β T265S betrifft eine Aminosäure, die in der AChR- β -Untereinheit in der Nähe der Aminosäure liegt, die bei der Slow-Channel-Mutation β L262M [39] betroffen ist, und direkt neben β V266M [40]. Letztere ist in der M2 Domäne der Kanalpore zugewandt. β T265S ist drei Positionen neben dem funktionell relevanten zentralen Leucin β L262 lokalisiert, das bei der Mutation β L262M [39] direkt betroffen ist.

Für drei von vier Untereinheiten wurden Mutationen in der korrespondierenden Aminosäure von β T265 beschrieben: ϵ T264P [45] in der ϵ -Untereinheit, δ S268F in der δ -Untereinheit [46] und im vorliegenden Fall β T265S. Alle genannten Mutationen sind autosomal-dominante Slow-Channel-Mutationen. Ihre Pathogenität könnte mit der Bedeutung der hoch konservierten Aminosäuren für die Stabilisierung des Kanals, sowohl im offenen als auch im geschlossenen Zustand, durch die Kontrolle des synaptischen Ionenstroms zusammenhängen. Vermutlich verlängert die Mutation β T265S die Kanalöffnungszeiten durch Stabilisierung des Offen-Zustandes [40].

Diese vergleichenden Analysen der Mutation β T265S zeigen, dass es sich offenbar um einen Defekt in einer für Slow-Channel-Mutationen prädisponierten Region in der Nukleotidsequenz handelt. Die genetische Untersuchung eines Patienten mit Verdacht auf Slow-Channel-CMS sollte daher diese Region in Exon 8 in allen AChR-Untereinheiten einschließen. Eine rasche Diagnosestellung ist insbesondere bei Slow-Channel-CMS von großer Bedeutung, da eine ausbleibende oder falsche Therapie die Prognose verschlechtert. Die Verabreichung von

Cholinesteraseinhibitoren, beispielsweise Mestinon, kann eine akute Exazerbation der Symptomatik hervorrufen. Mögliche Therapieoptionen sind der Natrium-Kanal-Blocker Chinidin [48] und der selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitor Fluoxetin [49].

5.1.2 Die Mutation β R220C

5.1.2.1 Molekularbiologische Charakterisierung der Mutation β R220C

Bei β R220 handelt es sich um eine evolutionär hoch konservierte Aminosäure. Die Aminosäure ist in der β -Untereinheit in N-terminaler Richtung zwei Basen vor der Transmembran Domäne M1 lokalisiert (Abb. 10). Der Austausch von Arginin durch Cystein könnte eine strukturelle Störung der Cystein-Loops im AChR hervorrufen [13].

5.1.2.2 Klinik und Morphologie im Vergleich mit korrespondierenden Mutationen

Bei Patientin B konnten die compound heterozygoten Mutationen β Y149X und β R220C identifiziert werden.

Bei der Mutation β Y149X kodiert das veränderte Basentriplett für ein Stop-Kodon, es kommt zum Translationsabbruch und fehlender Expression. Daher kann angenommen werden, dass das klinische Erscheinungsbild auf der Mutation β R220C basiert. Da bei der Patientin beide Allele betroffen sind, bei der gesunden Mutter jedoch nur ein Allel die Mutation β R220C aufweist und in der Familie keine weiteren Fälle von neuromuskulären Erkrankungen bekannt sind, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine autosomal-rezessive Form von CMS.

Bei Patientin B lag ein neonataler Onset von CMS vor, mit schwerer myasthener Symptomatik, die assistierte Beatmung und Ernährung über eine nasogastrische Sonde erforderte. Der eindeutig positive Effekt von Mestinon® erwies sich in der Langzeittherapie als unzureichend.

Morphologisch wurde in Expressionsstudien an β R220C transfizierten HEK293 Zellen eine massive Abnahme der Gesamtexpression von AChR beobachtet. Die α -Bungarotoxin-Bindung schien sehr unspezifisch, die Färbungsintensität war sehr schwach. An der Zelloberfläche konnten durch die α -Bungarotoxin-Färbung keine charakteristischen AChR-Aggregate nachgewiesen werden, intrazellulär wurde eine vermehrte Bindung von α -Bungarotoxin im endoplasmatischen Retikulum registriert (Abb. 7). Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis auf die Pathogenität der Mutation β R220C. Das charakteristische AChR-Expressionsmuster mit Cluster-bildenden Aggregaten an der Zelloberfläche ist für die funktionelle Integrität der Synapse von

essentieller Bedeutung. Der Morphologie zufolge ist der genetische Defekt entweder mit einer Abnahme der AChR-Expression auf Translations-Ebene, mit einem Defekt der Formierung des Rezeptor-Pentamers im endoplasmatischen Retikulum oder mit einem Defekt des Transports an die Zelloberfläche zu vereinbaren. Allerdings lassen die vorliegenden morphologischen Aspekte keine eindeutigen Aussagen darüber zu, um welche identifizierten α -Bungarotoxin bindenden Strukturen es sich handelt. Da nur der vollständige pentamere Rezeptor vom endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat und schließlich an die Zelloberfläche transportiert werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass die strukturelle Integrität des Rezeptors durch β R220C gestört ist. Um zu untersuchen, ob die defekte β -Untereinheit exprimiert wird, oder ob es sich um eine Null-Mutation handelt, wären Analysen mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch die β -Untereinheit markieren, erforderlich. Unter der Annahme einer Herunterregulierung des korrespondierenden Allels wären die Ergebnisse des morphologischen Befunds jedoch möglicherweise nicht mit dem Leben vereinbar. Allerdings können die Ergebnisse dieser in vitro Studien nicht ohne weiteres auf die Expression in vivo übertragen werden. Die reelle Morphologie an der neuromuskulären Synapse könnte allein anhand einer Muskelbiopsie belegt werden. In der Literatur sind zwei Mutationen beschrieben, die korrespondierende Aminosäuren in anderen Untereinheiten betreffen: ϵ R218W (Abicht, unveröffentlichte Daten) und γ R217C im embryonalen AChR [13].

Bei ϵ R218W handelt es sich um eine autosomal-rezessive Mutation, die in einer AChR-Defizienz resultiert. Im Vergleich zu β R220C lag eine milde Symptomatik vor mit Ptosis und Ophthalmoparese seit dem ersten Lebensjahr. Kraniofaziale Dysmorphien, ein pathologisches Dekrement und ein fraglich positiver Effekt von Edrophonium (Camsilon® bzw. Tensilon®) weisen klinisch Parallelen mit Patientin B auf, respiratorische Insuffizienz wurde hingegen nicht beobachtet. Funktionelle in vitro Studien zeigten, dass die AChR-Expression bei ϵ R218W transfizierten Zellen extrem herabgesetzt ist.

γ R217C in der fetalen γ -Untereinheit wurde in homozygoter Form bei zwei Geschwistern und bei einem nicht-verwandten Patienten beschrieben [13]. Der embryonale pentamere AChR wird aus zwei α , sowie je einer β -, δ - und γ -Untereinheit gebildet ($\alpha_2\beta\delta\gamma$). Ab der 33. Schwangerschaftswoche wird die embryonale γ -Untereinheit allmählich durch die adulte ϵ -Untereinheit ersetzt. Die Mutation γ R217C resultiert in einem schweren neonatalen Escobar-Syndrom, das mit Arthrogryposis multiplex congenita, Pterygoideum, Skoliose, kraniofazialen Dysmorphien bis hin zu intrauterinem Exitus in einem Fall einhergeht. Ein Patient verstarb am 13. Lebensstag, eine 7-jährige Schwester zeigte eine schwere Symptomatik, jedoch keine Myasthenie. In der betroffenen Familie traten vermehrt Fälle von Aborten auf, die mit der homozygoten Mutation γ R217C zusammenhängen

könnten. Auch Expressionsstudien γ R217C-transfizierter Zellen zeigten eine massive Abnahme von AChR an der Zelloberfläche.

5.1.3 Die Aminosäurevariationen β Y15C und β V91M

5.1.3.1 Molekularbiologische Charakterisierung der Aminosäurevariationen β Y15C und β V91M

Die Aminosäureaustausche β Y15C und β V91M betreffen Aminosäuren, die evolutionär sowohl in den verschiedenen Untereinheiten, als auch in den verschiedenen Subtypen des humanen AChRs und in verschiedenen Spezies hoch konserviert sind (Abb.9). β Y15C ist in der N-terminalen extrazellulären Domäne des AChRs lokalisiert.

Die extrazelluläre Domäne des AChRs wird durch eine komplexe Struktur mehrerer β -Faltblätter gebildet. Die Aminosäure Valin an Position 91 in der β -Untereinheit ist Teil eines äußeren β -Faltblatts. In den Untereinheiten, die an der Ligandenbindung beteiligt sind, trägt diese Aminosäure zur Bildung hydrophober Strukturen bei, die den synaptischen Kationenstrom kontrollieren [47]. Die unterschiedlichen funktionellen Auswirkungen der Slow-Channel-Mutation δ V93L und der Mutation β V91M könnten damit zusammenhängen, dass die extrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit an der Ligandenbindung beteiligt ist, die β -Untereinheit jedoch nicht.

Die Hypothese der Pathogenität der beiden Aminosäureaustausche basiert auf zwei Beobachtungen: Bei beiden betroffenen Aminosäuren handelt es sich um hoch konservierte Residuen. Zudem zeigen sich im Vergleich Parallelen mit in der Literatur beschriebenen pathogenen Mutationen korrespondierender Aminosäuren in anderen Untereinheiten des AChRs.

Expressionsstudien an β Y15C transfizierten HEK293 Zellen zeigten ein pathologisches AChR-Expressionsmuster, das morphologisch mit dem AChR-Expressions-Defekt durch die Mutation β R220C identisch ist. Eine physiologische AChR-Cluster-Bildung an der Zellmembran war nicht nachweisbar, α -Bungarotoxin-bindende Strukturen waren lediglich im endoplasmatischen Retikulum nachweisbar (Abb.11). Diese pathologische Morphologie bei β Y15C-mutierten AChR legt ein funktionelles Defizit des AChRs nahe.

Eine korrespondierende zweite heterozygote Mutation neben β Y15C, die das phänotypische Bild des CMS erklären würde, konnte allerdings bislang weder in *CHRNA1* noch in anderen CMS-Genen detektiert werden. Ob es sich bei β Y15C und β V91M um pathogene Mutationen oder lediglich um seltene Polymorphismen handelt, konnte somit noch nicht sicher belegt werden.

5.1.3.2 Klinik und Morphologie im Vergleich

Bei Patient C wurde ein schweres neonatales CMS mit Episoden respiratorischer Insuffizienz und Beteiligung der Augenmuskeln beobachtet.

Im Vergleich klinischer Daten der Patienten B und C zeigen sich eindeutige Parallelen. Allerdings wurde im Gegensatz zu Patientin B bei Patient C durch repetitive Nervenstimulation kein pathologisches Dekrement registriert.

In der Literatur wird eine Mutation der korrespondierenden Aminosäure von $\beta Y15$ in der ϵ -Untereinheit beschrieben. Allerdings resultiert $\epsilon Y15X$ in einem vorzeitigen Translationsabbruch mit obligatem Defekt der Proteinstruktur des Kanals [50].

Eine Mutation in der δ -Untereinheit, $\delta V93L$ betrifft die gleiche Aminosäure in der Primärstruktursequenz wie $\beta V91M$ [8]. Interessanterweise handelt es sich bei $\delta V93L$ um eine autosomal-dominante Slow-Channel-Mutation, während für $\beta V91M$ ein dominanter Erbgang unwahrscheinlich ist, da auch der gesunde Vater der Patientin Träger von $\beta Y15C$ und $\beta V91M$ ist.

5.1.4 Die Aminosäurevarianten $\beta I80M$ und $\beta I397T$

Die klinischen Charakteristika der Patientin D unterscheiden sich deutlich von Patientin B und C. Patientin D zeigte eine progrediente Gliedergürtelmyasthenie ohne episodische Krisen.

Die Hypothese einer möglichen Pathogenität von Mutationen basiert auf verschiedenen Voraussetzungen bezüglich der genetischen Analyse der Familienmitglieder. Tritt CMS in einer Generation einer Familie erstmalig auf, liegt die Vermutung eines autosomal-rezessiven Erbgangs nahe. Bei der molekulargenetischen Analyse erwartet man entsprechend entweder eine homozygote Mutation, die beide Elternteile in heterozygoter Form tragen, oder aber zwei compound heterozygote Mutationen. Sind beide Elternteile gesund, kann ein autosomal-dominanter Erbgang nahezu ausgeschlossen werden. Sporadische Mutationen sind selten. Im Falle von Patientin D konnte die Pathogenität der beiden heterozygoten Mutationen $\beta I80M$ und $\beta I397T$ nicht belegt werden, da auch der gesunde Vater der Patientin D beide Mutationen trägt. Interessanterweise gibt es in unserem Patientenkollektiv eine weitere Patientin, Patientin E, die ebenfalls den Aminosäureaustausch $\beta I397T$ trägt. Allerdings trat $\beta I397T$ bei Patientin E ebenfalls nur in heterozygoter Form auf, eine zweite Mutation wurde nicht gefunden. Die isolierte Mutation bietet damit keine eindeutige Klärung der Pathogenese des CMS. Da kein Probematerial Familienangehöriger zur Verfügung stand, lassen sich keine Aussagen bezüglich des Vererbungsmodus treffen, eine autosomal-dominante Mutationsform ist jedoch unwahrscheinlich, da beide Elternteile gesund sind.

Trotz fehlenden Nachweises von β 1397T in 100 gesunden Normalkontrollen stellt sich die Frage, ob es sich bei diesem Aminosäureaustausch um einen sehr seltenen Polymorphismus handelt. Ein weiterer Erklärungsversuch besteht darin, dass β 1397T tatsächlich eine pathogene Mutation darstellt, wobei die zweite pathogene compound heterozygote Mutation weder bei Patientin D, noch bei Patientin E, identifiziert werden konnte. β 180M betrifft eine evolutionär relativ gut konservierte Aminosäure, was für Pathogenität spricht. Weitere genetische Analysen von Patientin D ergaben eine heterozygote Frameshift-Mutation im *DOK-7* Gen, 1124_1127dup4. Dabei handelt es sich um eine bereits beschriebene rezessive Mutation [16]. Allerdings konnte auch hier keine Mutation des 2. Allels nachgewiesen werden. Weitere Mutationsanalysen zur abschließenden Klärung der Pathogenese des CMS stehen damit noch aus. So könnten beispielsweise intronische Sequenzen Mutationen aufweisen, die zu Deletionen führen. Auch Mutationen im Promotor können einen Defekt im Rahmen der Translation herbeiführen.

5.1.5 Bedeutung der identifizierten *CHRNA1*-Mutationen

Bisher wurden lediglich bei einem Patient compound heterozygote Mutationen der β -Untereinheit beschrieben, die mit einem AChR-Mangel einhergehen, β 1276del9 und β 752del224 [41]. Der Patient war bereits neonatal von einem schweren CMS betroffen, das eine assistierte Beatmung sowie Ernährung über eine PEG (perkutane endoskopische Gastrostomie) erforderte. Die klinischen Daten weisen identische Charakteristika mit den Patienten B und C auf, insbesondere die frühe neonatale Erstmanifestation sowie respiratorische Insuffizienz und Schwäche der pharyngealen Muskulatur sind bemerkenswert. Diese Beobachtungen könnten einen Hinweis auf die funktionelle Bedeutung der AChR- β -Untereinheit geben.

Alle hier identifizierten Mutationen im *CHRNA1*-Gen betreffen Aminosäuren, die evolutionär sowohl in den verschiedenen Untereinheiten, als auch in den verschiedenen Subtypen des humanen AChRs und in verschiedenen Spezies hoch konserviert sind (Abb. 6 und 9). Diese strukturelle Kontinuität deutet darauf hin, dass Defekte der entsprechenden Aminosäuren mit relevanten funktionellen Defekten des AChRs einhergehen.

Bisher wurden im Vergleich zu anderen AChR-Untereinheiten nur wenige Mutationen in *CHRNA1* beschrieben. Die β -Untereinheit scheint daher bei der Pathogenese von CMS eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5.2 Mutationen in der ϵ -Untereinheit des AChRs

Mutationen in der ϵ -Untereinheit des AChRs stellen unter den mannigfaltigen identifizierten CMS-Mutationen, die zu Rezeptordefizienz führen, die größte Entität dar. Insgesamt kann ein großer Teil aller CMS auf Mutationen im *CHRNE* Gen zurückgeführt werden. Dabei handelt es sich um Frameshift-, Missense-, Spleiß-, Promotor-, oder Nonsense-Mutationen [4]. Zum vermehrten Auftreten von Mutationen in der ϵ -Untereinheit existieren zwei synergistische Hypothesen: Zunächst können Mutationen in der ϵ -Untereinheit durch Reexpression der fetalen γ -Untereinheit im adulten AChR teilkompensiert werden. Identische Defekte in anderen Untereinheiten sind hingegen nicht mit dem Leben vereinbar, daher ist die Prävalenz von Mutationen in *CHRNE* erhöht. Desweiteren weist *CHRNE* in den für den cytoplasmatischen Loop kodierenden Exons eine G-C-reiche Region auf. Diese Nukleotidsequenz ist besonders anfällig für Deletionen und Insertionen. Dementsprechend finden sich die meisten Mutationen zwischen den Transmembrandomänen M3 und M4, zwischen denen der lange cytoplasmatische Loop lokalisiert ist [4], [2], [9]. Klinisch zeigen *CHRNE*-Mutationen tendenziell eine vergleichsweise milde myasthene Symptomatik, aufgrund der funktionellen Teilkompensation durch die fetale γ -Untereinheit. Demhingegen konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass transgene Mäuse mit einer isolierten Defizienz der ϵ -Untereinheit nach 2-3 Lebensmonaten versterben [51]. In der humanen adulten Synapse wird physiologischerweise die γ -Untereinheit in geringen Anteilen koexprimiert. Diese geringe Quantität kann funktionelle Defekte der Rezeptoren aufgrund von Mutationen der ϵ -Untereinheit kompensieren. Croxen et al. konnten in in vitro Studien zeigen, dass dabei die quantitative mRNA Expression der γ -Untereinheit in perisynaptischen Zellkernen im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht ist, wie lange vermutet wurde. Zudem wird möglicherweise ein Teil der synaptischen Erregungsübertragung bei Defizienz der ϵ -Untereinheit durch $\alpha_2\beta\delta_2$ -Rezeptoren bewerkstelligt [52]. Das klinische Bild von *CHRNE*-Mutationen ist sehr variabel, in erster Linie sind faziale sowie okuläre Muskeln betroffen. Krisenhafte Exazerbationen treten selten auf, auch eine generalisierte Muskelschwäche ist untypisch. Die Prädisposition bestimmter Muskelgruppen und die große Variabilität des Phänotyps könnte auf interindividuell unterschiedlicher Expressionstärke der γ -Untereinheit beruhen. AChE-Inhibitoren zeigen einen positiven Effekt, eine vollständige Remission kann jedoch nicht immer erzielt werden [9]. Ein charakteristisches Merkmal von *CHRNE* Mutationen ist eine Ophthalmoparese der externen Augenmuskeln. Die Anfälligkeit der äußeren Augenmuskeln bei *CHRNE*-CMS erklärt sich möglicherweise durch den geringeren Safety-Faktor, durch eine geringere Zahl

synaptischer Falten und eine geringere Rezeptordichte. Damit sind die äußeren Augenmuskeln besonders anfällig für eine Herabsetzung der Depolarisation. Allerdings steht dieses Phänomen pathophysiologisch im Widerspruch zu den physiologischen Gegebenheiten: Der adulte AChR der externen Augenmuskeln exprimiert sowohl die adulte als auch die fetale Isoform. Folglich müsste die Kompensation der defekten ϵ -Untereinheit durch die γ -Untereinheit hier in besonders hohem Maße erfolgen können. Eine Ptosis lässt sich hingegen dadurch erklären, dass der M.levator palpebrae die fetale Isoform des AChRs nicht exprimiert [18].

Für die trunkierende Mutation 1267delG in Exon 12 konnte gezeigt werden, dass es sich um eine Founder-Mutation der Volksgruppe der Roma handelt. Auch bei indischen Patienten mit gleichen chromosomalen Charakteristika des betroffenen Allels wurde diese Mutation nachgewiesen, was sich durch die ethnische Herkunft der Roma erklärt. Bis zu 5% aller Roma sind Träger der Mutation 1267delG, somit können Fälle pseudodominanter Vererbung beobachtet werden [53], [54]. Bei Patientin A aus der Population der Roma tritt die Mutation homozygot auf, zwei weitere osteuropäische Patienten sind heterozygote Träger der Mutation. Die ethnischen Daten unserer 1267delG Patienten sind somit kompatibel mit der beschriebenen Populationsgenetik. Die Deletion geht mit einem herabgesetzten AChR-Expressions-Level einher. Sie betrifft das erste Nukleotid des Exon 12 und ist im langen cytoplasmatischen Loop zwischen M3 und M4 lokalisiert. Die Deletion resultiert entweder in einem Verlust der M4-Domäne, sodass der unvollständige Rezeptor nicht an der Zelloberfläche exprimiert wird, oder aber Intron 11 wird im Rahmen der Transkription konserviert und ist Bestandteil der mRNA. Bei diesem Spleißdefekt treten AChR an der Zelloberfläche auf, deren Quantität zwar herabgesetzt ist, die aber die synaptische Erregungsübertragung aufrechterhalten können [55]. Phänotypisch gleicht die Mutation anderen Frameshift-, oder Low-Expressor-Missense-Mutationen in der ϵ -Untereinheit. Bei unseren Patienten entsprechen charakteristische klinische Merkmale, wie bilaterale Ptosis und Ophthalmoparese bei fazialer Muskelschwäche mit Erstmanifestation im Kleinkindesalter, den klinischen Daten aus der Literatur.

Bei den von der Mutation 723delC betroffenen Patienten handelt es sich um vier Kinder konsanguiner Eltern jordanischer Herkunft. Alle sind homozygote Träger der Mutation 723delC. Klinisch imponierten ein charakteristischer neonataler Onset mit Ophthalmoparese und Ptosis. Die gleiche Mutation mit ähnlicher klinischer Symptomatik wurde bereits bei einer weiteren jordanischen Familie beschrieben [37]. Molekulargenetisch handelt es sich um eine trunkierende Frameshift-Mutation in Exon 7, die die Transmembrandomäne M1 betrifft. Dem Frameshift nach Codon 241

folgen 37 Missense-Codons und ein vorzeitiger Translationsabbruch. Es resultiert eine verminderte Expression der postsynaptischen AChR.

Die identifizierte Spleiß-Mutation IVS7-2A>G wurde erstmals von Barisic et al. in homozygoter Form bei einem Geschwisterpaar kroatischer Herkunft beschrieben. Der Basenaustausch ist am 3'-Ende von Intron 7 lokalisiert, einer Konsensstelle für den Spleißvorgang zwischen den Transmembrandomänen M1 und M2. Durch den Spleiß-Defekt folgt auf mRNA-Ebene Exon 9 direkt nach Exon 7, Exon 8 wird entfernt. Es resultieren 14 Missense-Codons nach Codon 247 gefolgt von einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch [36]. Bei Patient C trat die Spleiß-Mutation IVS7-2A>G als compound heterozygote Mutation mit 1267delG auf. Barisic et al. beobachteten bei den homozygot betroffenen IVS7-2A>G-Patienten zusätzliche klinische Merkmale, die bei AChR-Defizienz nicht regelhaft gefunden werden, wie Entwicklungsverzögerung, Schwäche der Halsmuskeln und Fingerextensoren. Auch Patient C ist im Vergleich zu den anderen *CHRNE*-Patienten aus unserem Patientenkollektiv relativ schwer betroffen. Klinisch imponierten eine Skoliose, Scapulae alatae, Muskelatrophie und Bulbärsymptomatik.

Bei Patient D wurde die Missense-Mutation ϵ C142Y in homozygoter Form gefunden. Das Kind konsanguiner Eltern jordanischer Herkunft fiel bereits neonatal durch ein Floppy-Infant-Syndrom, charakteristische Ophthalmoparese und Ptosis auf. Zahlreiche Missense-Mutationen in der ϵ -Untereinheit wurden bereits beschrieben. Abgesehen von Mutationen in der M2 Transmembran-Domäne des AChRs, die einen kinetischen Defekt des Rezeptors zur Folge haben, resultiert meist eine verminderte AChR-Expression (sog. „Low-Expressor-Mutations“) [4]. ϵ C142Y in Exon 5 betrifft das äußere Blatt der Doppelstruktur aus β -Faltblättern, die die extrazelluläre Domäne des AChRs bilden. Das relevante Cystein ist an der Bildung der Disulfid-Brücke C128-C142 im Cys-Loop der extrazellulären Domäne des AChRs beteiligt [47]. Für ϵ C128S wurde bereits eine Missense-Mutation beschrieben [56]. Bei gestörter Bildung des Disulfid-Loops ist die Faltung der Untereinheit und letztendlich die Formierung des gesamten pentameren Rezeptormoleküls gestört. Die Oligomerisierung zum Pentamer sistiert auf dem Niveau des Komplex aus α - und ϵ -Untereinheit. Es handelt sich somit um eine Null-Mutation, der Defekt resultiert in einer AChR-Defizienz mit gestörter neuromuskulärer Erregungsübertragung [56]. Die hier neu detektierte Mutation ϵ C142Y wurde funktionell nicht weiter in Expressionsstudien untersucht, da davon ausgegangen werden kann, dass der funktionelle Defekt mit dem Effekt der untersuchten Null-Mutation ϵ C128S vergleichbar ist.

5.3 Mutationen in RAPSN

Mutationen in *RAPSN* wurden erstmals 2002 von der Arbeitsgruppe um Ohno als genetische Ursache für CMS beschrieben [34]. Defekte in *RAPSN* auf Chromosom 11p11 werden autosomal-rezessiv vererbt, bisher wurden bereits über 20 verschiedene CMS-Mutationen in *RAPSN* identifiziert [4]. Dabei sind Mutationen des *RAPSN*-Gens bei CMS-Patienten sehr häufig, bei Patienten deutscher Herkunft stellen sie mit 48% gar die größte Entität der CMS-Mutationen dar. Abgesehen von Einzelfällen weisen alle Träger von *RAPSN*-Mutationen die Missense-Mutation N88K zumindest auf einem Allel auf. Erst vor kurzem identifizierte unsere Arbeitsgruppe bei zwei Patienten *RAPSN*-Mutationen, die nicht mit der N88K Mutation assoziiert sind [25]. Homozygote Träger von N88K weisen eine hohe Heterogenität des Phänotyps auf. Das klinische Bild reicht vom Late-Onset CMS mit milder Symptomatik bis hin zu neonataler Erstmanifestation mit schwerer Beeinträchtigung der Vitalfunktionen. Dabei ist die Ausprägung der Symptomatik bei homozygoten N88K Trägern im Vergleich zu compound heterozygoten N88K Formen eher moderat. Folglich werden bei N88K heterozygoten CMS-Formen, Phänotyp und Schweregrad der Erkrankung offenbar maßgeblich vom Defekt auf dem zweiten Allel bestimmt [30]. Für N88K konnte durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass es sich um eine indoeuropäische Founder Mutation handelt, alle betroffenen Patienten waren Kaukasier europäischer Herkunft [57]. Unter diesen Gesichtspunkten ergibt sich eine besondere Bedeutung für die Mutation N88K im Rahmen des Algorithmus der genetischen Diagnostik europäischer CMS-Patienten. Weitere Mutationen sind auf dem gesamten *RAPSN*-Gen ohne Prädisposition bestimmter Regionen lokalisiert. Defekte des Proteins Rapsyn resultieren in einer verminderten Aggregat- und Cluster-Bildung von AChR, die physiologisch über Agrin und MuSK vermittelt wird. In vitro Studien zeigten, dass pathophysiologisch vier Mechanismen bei strukturellen Defekten von Rapsyn eine Rolle spielen: Über das N-terminale myristylierte Ende wird Rapsyn an die postsynaptische Membran gebunden. 7 Tetratricopeptid Repeat (TPR) Domänen dienen der Bindung der Rapsyn-Proteine untereinander, N88K und E94K sind beispielsweise in TPR2 lokalisiert, V165M in TPR4. Eine Zink-Finger und Coiled-Coil Domäne vermitteln die Interaktion mit dem AChR, eine RING-H2 Domäne die Bindung an Dystroglykan. Pathophysiologisch kann damit die Kolokalisierung mit den AChR oder die Bindung der Rapsyn-Proteine untereinander gestört sein. Die Verankerung des Rezeptors in Membran und Cytoskelett über den Dystroglykan Komplex kann vermindert sein. Die Agrin-induzierte Cluster-Bildung über MuSK bleibt aus oder die Aggregate sind weniger stabil [30]. Die verminderte

Rezeptordichte an der postsynaptischen Membran führt letztendlich zu einer Störung der neuromuskulären Erregungsübertragung [34]. In der Muskelbiopsie lassen sich morphologisch eine AChR-Defizienz und eine Verminderung des Endplatten-Potentials bei elektrischer Stimulierung nachweisen [9].

Klinisch lassen sich zwei Manifestationsformen von *RAPSN*-CMS unterscheiden: Die Early-Onset Form, mit schweren myasthenen Symptomen, die oft bereits neonatal einsetzen, und die seltene Late-Onset Form, bei der die Symptomatik nur mild ausgeprägt ist. Die Late-Onset Form wurde bisher nur bei Patienten beschrieben, die die Mutation N88K homozygot tragen, sowie bei der homozygoten E-Box Promotor Mutation -38A>G. Letztere trat bei Juden aus dem Nahen Osten auf und ging mit milder myasthener Symptomatik und charakteristischen kraniofazialen Dysmorphien einher [9]. Bei Late-Onset CMS kommt der differenzialdiagnostischen Abgrenzung von der seronegativen Myasthenia gravis eine entscheidende Bedeutung zu. Letztere geht ebenso mit im Erwachsenenalter einsetzender Muskelschwäche der proximalen Extremitäten einher, bei beiden Formen kann eine Ptosis auftreten [2]. Bei Mutationen sind die äußeren Augenmuskeln im Gegensatz zu *CHRNE*-Mutationen meist nicht beteiligt. Dieses Phänomen könnte damit zusammen hängen, dass die äußeren Augenmuskeln, im Vergleich mit quergestreifter Muskulatur anderer Lokalisation, andere morphologische, physiologische und strukturelle Eigenschaften aufweisen [18]. In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv mit *RAPSN*-Mutationen trat in einem Fall eine Late-Onset Form auf: Bei Patientin A wurden erste Symptome erst seit dem 7. Lebensjahr beobachtet.

Die Early-Onset Form der *RAPSN*-CMS ist mit einigen charakteristischen klinischen Merkmalen assoziiert. Bereits neonatal können Gelenkkontrakturen auftreten, die durch unzureichende intrauterine Fetusbewegungen bedingt sind. Diese wurden besonders häufig im Zusammenhang mit trunkierenden Mutationen beobachtet [31]. Zu den charakteristischen kraniofazialen Dysmorphien zählen ein langer Gesichtsschädel, ein zeltförmiger Mund, ein hoher Gaumen und tiefsitzende Ohren. Oftmals tritt die generalisierte Muskelschwäche im Verlauf in Form von krisenhaften Exazerbationen bei febrilen Infekten auf. Typisches Charakteristikum von Rapsyn-Defekten sind Episoden respiratorischer Insuffizienz. Diese können eine assistierte Beatmung erforderlich machen und zum Tode führen. Neonatale Todesfälle durch respiratorische Insuffizienz bei CMS wurden häufig als plötzlicher Kindstod beobachtet [9]. Unter diesem Gesichtspunkt ist eine frühzeitige Diagnose im Hinblick auf eine adäquate Therapie und Prävention besonders wichtig. Rapsyn-Defekte sprechen gut auf die Verabreichung von AChE-Inhibitoren an. Bei einigen Patienten wurde ein positiver Effekt mit 3,4-Diaminopyridin erzielt, das die Acetylcholin-Freisetzung aus präsynaptischen Vesikeln steigert [58]. In unserem Patientenkollektiv konnte bei einer homozygoten Trägerin von N88K eine

Arthrogryposis multiplex congenita beobachtet werden. In 4 Fällen wurden Krisen mit respiratorischer Insuffizienz beschrieben, betroffen waren zwei Patienten mit der homozygoten Mutation N88K, sowie die Patienten mit N88K/E94K und N88K/V165M. Dysmorphie Stigmata wurden hingegen in keinem der Fälle beobachtet.

Bei 5 Patienten aus einem Kollektiv von 112 gescreenten Patienten konnte ein Rapsyn-Defekt gefunden werden. Die Mutation N88K wurde dabei bei allen *RAPSN*-Patienten nachgewiesen, zwei Patienten tragen N88K homozygot. Drei Patienten weisen compound heterozygote Missense-Mutationen in *RAPSN* auf, V165M, E94K und S201R. Die Mutation V165M wurde bereits publiziert [35]. Die Aminosäureaustausche E94K und S201R wurden bisher noch nicht beschrieben, wobei letzterer mit einem ungewöhnlichen Phänotyp einhergeht. Weiterführende funktionelle Untersuchungen der neu detektierten *RAPSN*-Mutationen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Der aus verschiedenen *RAPSN*-Mutationen resultierende funktionelle Defekt der verminderten AChR-Cluster-Bildung wurde in Expressionsstudien bereits mehrfach untersucht und ist in der Literatur ausführlich beschrieben worden [34].

Patientin A und deren Bruder sind von den compound heterozygoten Mutationen N88K und S201R betroffen. Klinisch imponierte bei Patientin A eine isolierte Gliedergürtelmyasthenie, ohne Beteiligung der Augenmuskeln, ohne respiratorische Insuffizienz oder Dysmorphien. Eine isolierte Gliedergürtelmyasthenie bei Late-Onset ist für CMS-Patienten und insbesondere für Träger von Rapsyn-Defekten ungewöhnlich. Die isolierte Gliedergürtelmyasthenie tritt in zwei Manifestationsformen auf. Die autoimmunologische Form der Gliedergürtelmyasthenie mit später Manifestation wird durch AChR-Antikörper induziert und spricht gut auf immunsuppressive Therapie an. Die familiäre Form ist selten, sie manifestiert sich mit progredienter proximaler Muskelschwäche bereits in der ersten Lebensdekade. Interessanterweise weist dieses klinische Erscheinungsbild einer Gliedergürtelmyasthenie Parallelen mit den typischen klinischen Charakteristika, die bei *DOK-7*-Patienten beobachtet wurden, auf [16]. Charakteristisch sind tubuläre Aggregate in der Muskelbiopsie. Die Augenmuskeln sind nicht betroffen, die Serumcreatininkinase kann erhöht sein. Die Verabreichung von AChE-Inhibitoren zeigt einen deutlich positiven Effekt. Bisher konnte für dieses Erkrankungsbild noch kein genetisches Korrelat identifiziert werden [59]. Die Diagnosestellung wird dadurch erschwert, dass die Symptomatik sowohl klinische Merkmale einer Myasthenie, als auch einer Myopathie aufweist [60]. Das klinische Erscheinungsbild einer Gliedergürtelmyasthenie bei Patientin A verdeutlicht, dass Mutationen im *RAPSN*-Gen mit einer hohen Variabilität des Phänotyps einhergehen. Der vorliegende Fall zeigt, dass bei den bisher molekulargenetisch nicht

klassifizierten familiären Formen der Gliedergürtelmyasthenie, Mutationen im *RAPSN*-Gen in Betracht gezogen werden müssen.

5.4 Bedeutung molekulargenetischer Analysen für Klinik und Therapie von CMS

Für den Kliniker besteht die Problematik der Diagnostik und folglich der Therapie von CMS im heterogenen klinischen Bild der Erkrankung. Vergleichende Analysen klinischer Daten sollen dazu dienen, mögliche Korrelationen zwischen Geno- und Phänotyp zu identifizieren, um die genetische Diagnostik auf der Basis des klinischen Erscheinungsbildes zu erleichtern. Die Problematik besteht weiterhin darin, dass sich einerseits genotypisch ähnliche und identische Defekte in unterschiedlichen klinischen Formen manifestieren, andererseits können gänzlich unterschiedliche genetisch bedingte Pathomechanismen in ähnlichen phänotypischen Ausprägungen resultieren. Das klinische Bild reicht von einer myasthenen Minimalsymptomatik im Erwachsenenalter mit leichter Ptosis bis hin zu neonatal auftretender schwerer Behinderung und Tod. Im Idealfall kann durch die Analyse eines möglichst großen Patientenkollektivs hinsichtlich klinischer und molekulargenetischer Daten ein Algorithmus erstellt werden, der diagnostisches und therapeutisches Vorgehen erleichtern soll.

Zur Differentialdiagnostik sollten folgende Parameter herangezogen werden: Elektrophysiologische Tests zeigen häufig ein pathologisches Dekrement bei repetitiver neuronaler Stimulation, das auf einen singulären neuronalen Reizstrom folgende CMAP (engl.: compound muscle action potential) kann mehrphasisch sein. Laborchemische Tests auf Acetylcholinrezeptor-Antikörper sowie MuSK-Antikörper sind negativ, die Serum-Creatin-Kinase ist nicht erhöht.

Grundsätzlich lassen sich differentialdiagnostisch eine frühe Manifestationsform (engl.: Early-Onset), die oft bereits neonatal auftritt, und eine späte Manifestationsform (engl.: Late-Onset), die oft eine therapieresistente Progredienz aufweist, heranziehen. Dabei kann ein Late-Onset Hinweis auf ein Slow-Channel-Syndrom sein, da hier unter pathogenetischen Gesichtspunkten das langsame Fortschreiten der Erkrankung charakteristisch ist. Zu den Symptomen gehören belastungsabhängige Muskelschwäche, die proximale sowie distale Extremitäten betrifft, sowie eine motorische Entwicklungsverzögerung im Kleinkindesalter. Okuläre Symptome sind Ptosis mit tageszeitlichen Schwankungen, die im Gegensatz zur Manifestationsform bei autoimmun-induzierter Myasthenia gravis meist nicht

asymmetrisch ist, und Doppelbilder auf Grund von Augenmuskelparesen. Respiratorische Insuffizienzen können episodisch auftreten oder progredient verlaufen, Infekt-bedingte Exazerbationen können zu krisenhaften Verschlechterungen bis hin zum Kindstod führen. Eine Schwäche der pharyngealen Muskulatur mit Schluckstörungen und Trinkschwäche kann eine Sondenernährung nötig machen. Myasthenische Hypomimie bei Bulbärparalyse mit nasaler Stimme, dysmorphe Stigmata wie hoher Gaumen, längliches Gesicht, tief sitzende Ohren, Scapulae alatae, Skoliose und isolierte Muskelhypotrophien können auftreten. Eine Arthrogyriosis multiplex congenita in Folge verminderter Foetusbewegungen ist Zeichen einer frühen intrauterinen Symptommanifestation. Auch eine generalisierte Schwäche kann als Floppy-infant-Syndrom bereits direkt nach der Geburt diagnostiziert werden. Betrifft eine Mutation die embryonale γ -Untereinheit des AChRs, resultiert eine schwere neonatale Form des CMS, das Escobar Syndrom, das durch Pterygium, Arthrogyriosis multiplex congenita und Skoliose gekennzeichnet ist. Weitere Kennzeichen sind respiratorische Insuffizienz, Dysmorphien des Gesichtsschädels und Ptose. Diese Mutationen sind häufig bereits intrauterin lethal. Im Rahmen der Entwicklung kommt es jedoch zur Remission, da die betroffene pathogene fetale γ -Untereinheit durch die adulte ϵ -Untereinheit ersetzt wird [13].

Ein entscheidender klinischer Parameter ist der Effekt von Acetylcholinesterase Inhibitoren. Ein absoluter Mangel an Acetylcholin oder seinem Rezeptor, oder ein relativer Mangel wie beispielsweise beim Fast-Channel-Syndrom, können im Tensilon Test aufgedeckt werden. Dabei resultiert ein Überangebot von Acetylcholin im synaptischen Spalt in einer akuten Besserung der Symptomatik. Beim Slow-Channel-Syndrom wird hingegen aufgrund des gegensätzlichen Pathomechanismus kein positiver Effekt erzielt. Da hier ein Depolarisationsblock der Muskelfaser zugrunde liegt, kann durch eine Testdosis von Tensilon gegebenenfalls eine schwere Exazerbation der Symptomatik induziert werden [44]. Therapeutisch kommt bei positivem Tensilon-Test Pyridostigmin (Mestinon®) zum Einsatz. Oftmals ist diese Therapie langfristig jedoch nicht dauerhaft erfolgreich. Alternativ kann eine zusätzliche Therapie mit 3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP) versucht werden, die sich in einzelnen Patienten mit *CHRNE*-, *COLQ*-, *RAPSN*- und *MUSK*-Mutationen als erfolgreich erwies [9].

Liegt ein Slow-Channel-Syndrom der Symptomatik zugrunde, stellt der Na^+ -Kanal-Blocker Chinidin eine Therapieoption dar [61]. Vor kurzem konnte auch ein positiver Effekt des Antidepressivums Fluoxetin nachgewiesen werden [49], [32].

Screening auf häufige Punktmutationen:

Patienten aus Deutschland, Mittel-, Westeuropa, Indien:

RAPSN N88K

Patienten aus Südosteuropa, Indien, Volksgruppe der Roma:

CHRNE 1267 delG

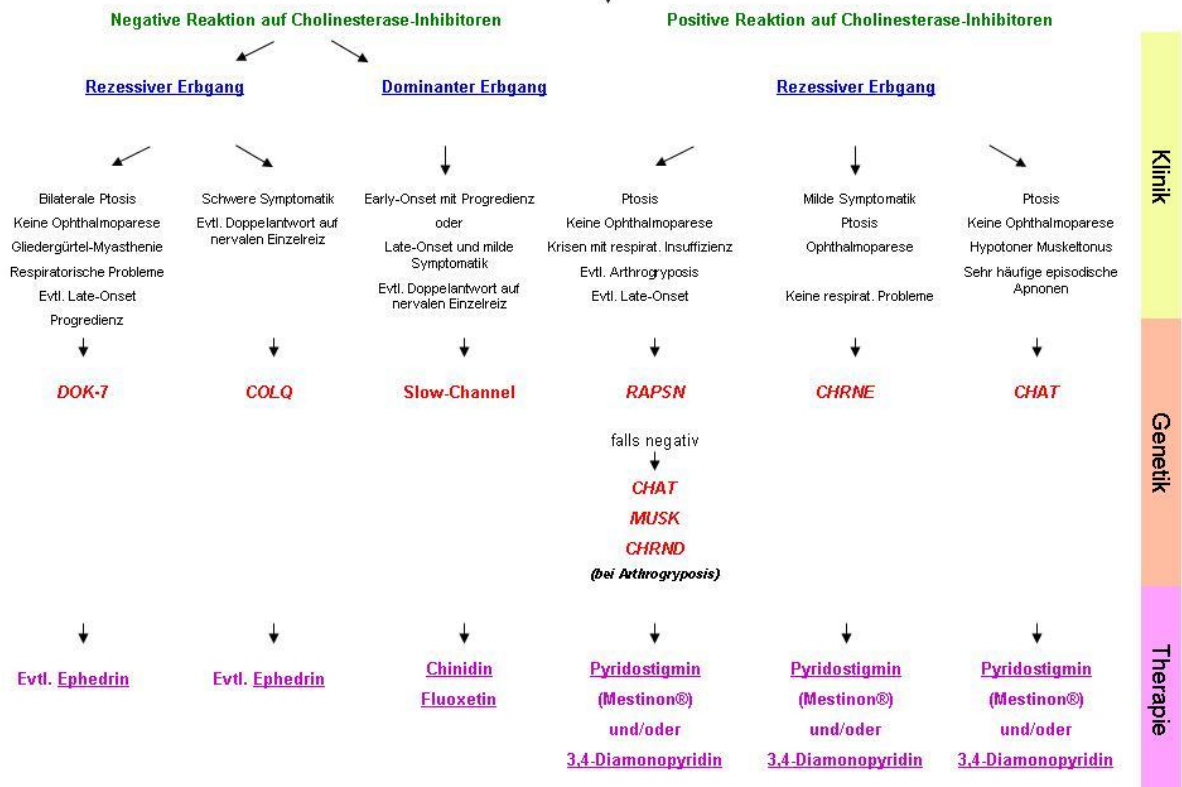


Abb. 13

Algorithmus zu Diagnostik und Therapie der CMS

6 Literatur

1. Engel, A.G., K. Ohno, and S.M. Sine, *Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade*. Muscle Nerve, 2003. **27**(1): p. 4-25.
2. Hantai, D., et al., *Congenital myasthenic syndromes*. Curr Opin Neurol, 2004. **17**(5): p. 539-51.
3. Abicht, A., Lochmueller, H., *Kongenitale myasthene Syndrome*. Muskelkrankheiten. 2004: Hrsg. Spuler, v. Moers; Verlag Schattauer
4. Engel, A.G. and S.M. Sine, *Current understanding of congenital myasthenic syndromes*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(3): p. 308-21.
5. Hughes, B.W., L.L. Kusner, and H.J. Kaminski, *Molecular architecture of the neuromuscular junction*. Muscle Nerve, 2006. **33**(4): p. 445-61.
6. Wood, S.J. and C.R. Slater, *Safety factor at the neuromuscular junction*. Prog Neurobiol, 2001. **64**(4): p. 393-429.
7. Misgeld, T., et al., *Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase*. Neuron, 2002. **36**(4): p. 635-48.
8. Ohno, K. and A.G. Engel, *Congenital myasthenic syndromes: gene mutations*. Neuromuscul Disord, 2004. **14**(1): p. 117-22.
9. Beeson, D., et al., *126th International Workshop: congenital myasthenic syndromes, 24-26 September 2004, Naarden, the Netherlands*. Neuromuscul Disord, 2005. **15**(7): p. 498-512.
10. Walls, T.J., et al., *Congenital myasthenic syndrome associated with paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **681**: p. 461-8.
11. Engel, A.G., E.H. Lambert, and M.R. Gomez, *A new myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency, small nerve terminals, and reduced acetylcholine release*. Ann Neurol, 1977. **1**(4): p. 315-30.
12. Ohno, K., et al., *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, 1998. **95**(16): p. 9654-9.
13. Hoffmann, K., et al., *Escobar syndrome is a prenatal myasthenia caused by disruption of the acetylcholine receptor fetal gamma subunit*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(2): p. 303-12.
14. Tsujino, A., et al., *Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7377-82.
15. Chevessier, F., et al., *MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(24): p. 3229-40.
16. Beeson, D., et al., *Dok-7 Mutations Underlie a Neuromuscular Junction Synaptopathy*. Science, 2006.
17. McConville, J. and A. Vincent, *Diseases of the neuromuscular junction*. Curr Opin Pharmacol, 2002. **2**(3): p. 296-301.
18. Yu Wai Man, C.Y., P.F. Chinnery, and P.G. Griffiths, *Extraocular muscles have fundamentally distinct properties that make them selectively vulnerable to certain disorders*. Neuromuscul Disord, 2005. **15**(1): p. 17-23.
19. Stroud, R.M. and J. Finer-Moore, *Acetylcholine receptor structure, function, and evolution*. Annu Rev Cell Biol, 1985. **1**: p. 317-51.
20. Sine, S.M. and A.G. Engel, *Recent advances in Cys-loop receptor structure and function*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 448-55.
21. Vohra, B.P., et al., *Focal caspase activation underlies the endplate myopathy in slow-channel syndrome*. Ann Neurol, 2004. **55**(3): p. 347-52.
22. Navedo, M.F., et al., *Constitutively active L-type Ca²⁺ channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11112-7.
23. Muller, J.S., et al., *CHRND mutation causes a congenital myasthenic syndrome by impairing co-clustering of the acetylcholine receptor with rapsyn*. Brain, 2006.

24. Hoch, W., *Formation of the neuromuscular junction. Agrin and its unusual receptors.* Eur J Biochem, 1999. **265**(1): p. 1-10.
25. Muller, J.S., et al., *Impaired receptor clustering in congenital myasthenic syndrome with novel RAPSN mutations.* Neurology, 2006.
26. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene.* Cell, 1991. **66**(3): p. 589-600.
27. Kinzler, K.W., et al., *Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21.* Science, 1991. **253**(5020): p. 661-5.
28. Nishisho, I., et al., *Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients.* Science, 1991. **253**(5020): p. 665-9.
29. Wang, J., et al., *Regulation of acetylcholine receptor clustering by the tumor suppressor APC.* Nat Neurosci, 2003. **6**(10): p. 1017-8.
30. Cossins, J., et al., *Diverse molecular mechanisms involved in AChR deficiency due to rapsyn mutations.* Brain, 2006.
31. Burke, G., et al., *Rapsyn mutations in hereditary myasthenia: distinct early- and late-onset phenotypes.* Neurology, 2003. **61**(6): p. 826-8.
32. Colomer, J., et al., *Long-term improvement of slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine.* Neuromuscul Disord, 2006. **16**(5): p. 329-33.
33. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.* J Mol Biol, 1975. **94**(3): p. 441-8.
34. Ohno, K., et al., *Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome.* Am J Hum Genet, 2002. **70**(4): p. 875-85.
35. Richard, P., et al., *Possible founder effect of rapsyn N88K mutation and identification of novel rapsyn mutations in congenital myasthenic syndromes.* J Med Genet, 2003. **40**(6): p. e81.
36. Barisic, N., et al., *Congenital myasthenic syndrome (CMS) in three European kinships due to a novel splice mutation (IVS7 - 2 A/G) in the epsilon acetylcholine receptor (AChR) subunit gene.* Neuropediatrics, 2002. **33**(5): p. 249-54.
37. Middleton, L., et al., *Chromosome 17p-linked myasthenias stem from defects in the acetylcholine receptor epsilon-subunit gene.* Neurology, 1999. **53**(5): p. 1076-82.
38. Navedo, M.F., et al., *Novel beta subunit mutation causes a slow-channel syndrome by enhancing activation and decreasing the rate of agonist dissociation.* Mol Cell Neurosci, 2006. **32**(1-2): p. 82-90.
39. Gomez, C.M., et al., *A beta-subunit mutation in the acetylcholine receptor channel gate causes severe slow-channel syndrome.* Ann Neurol, 1996. **39**(6): p. 712-23.
40. Engel, A.G., et al., *New mutations in acetylcholine receptor subunit genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome.* Hum Mol Genet, 1996. **5**(9): p. 1217-27.
41. Quiram, P.A., et al., *Mutation causing congenital myasthenia reveals acetylcholine receptor beta/delta subunit interaction essential for assembly.* J Clin Invest, 1999. **104**(10): p. 1403-10.
42. Shen, X.M., et al., *Slow-channel mutation in acetylcholine receptor alphaM4 domain and its efficient knockdown.* Ann Neurol, 2006. **60**(1): p. 128-36.
43. Fidzianska, A., et al., *IBM-type inclusions in a patient with slow-channel syndrome caused by a mutation in the AChR epsilon subunit.* Neuromuscul Disord, 2005. **15**(11): p. 753-9.
44. Croxen, R., et al., *Recessive inheritance and variable penetrance of slow-channel congenital myasthenic syndromes.* Neurology, 2002. **59**(2): p. 162-8.
45. Ohno, K., et al., *Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the epsilon subunit.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(3): p. 758-62.

46. Gomez, C.M., et al., *Novel delta subunit mutation in slow-channel syndrome causes severe weakness by novel mechanisms*. *Ann Neurol*, 2002. **51**(1): p. 102-12.
47. Unwin, N., *Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution*. *J Mol Biol*, 2005. **346**(4): p. 967-89.
48. Fukudome, T., et al., *Quinidine normalizes the open duration of slow-channel mutants of the acetylcholine receptor*. *Neuroreport*, 1998. **9**(8): p. 1907-11.
49. Harper, C.M., T. Fukudome, and A.G. Engel, *Treatment of slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine*. *Neurology*, 2003. **60**(10): p. 1710-3.
50. Croxen, R., et al., *Myasthenia gravis in a woman with congenital AChR deficiency due to epsilon-subunit mutations*. *Neurology*, 2002. **58**(10): p. 1563-5.
51. Witzemann, V., et al., *Acetylcholine receptor epsilon-subunit deletion causes muscle weakness and atrophy in juvenile and adult mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(23): p. 13286-91.
52. Croxen, R., et al., *End-plate gamma- and epsilon-subunit mRNA levels in AChR deficiency syndrome due to epsilon-subunit null mutations*. *Brain*, 2001. **124**(Pt 7): p. 1362-72.
53. Morar, B., et al., *Mutation history of the roma/gypsies*. *Am J Hum Genet*, 2004. **75**(4): p. 596-609.
54. Abicht, A., et al., *A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin*. *Neurology*, 1999. **53**(7): p. 1564-9.
55. Croxen, R., et al., *Novel functional epsilon-subunit polypeptide generated by a single nucleotide deletion in acetylcholine receptor deficiency congenital myasthenic syndrome*. *Ann Neurol*, 1999. **46**(4): p. 639-47.
56. Milone, M., et al., *Mode switching kinetics produced by a naturally occurring mutation in the cytoplasmic loop of the human acetylcholine receptor epsilon subunit*. *Neuron*, 1998. **20**(3): p. 575-88.
57. Muller, J.S., et al., *The congenital myasthenic syndrome mutation RAPSN N88K derives from an ancient Indo-European founder*. *J Med Genet*, 2004. **41**(8): p. e104.
58. Banwell, B.L., et al., *Novel truncating RAPSN mutations causing congenital myasthenic syndrome responsive to 3,4-diaminopyridine*. *Neuromuscul Disord*, 2004. **14**(3): p. 202-7.
59. Rodolico, C., et al., *Limb-girdle myasthenia: clinical, electrophysiological and morphological features in familial and autoimmune cases*. *Neuromuscul Disord*, 2002. **12**(10): p. 964-9.
60. Shankar, A., et al., *Autosomal recessive limb girdle myasthenia in two sisters*. *Neurol India*, 2002. **50**(4): p. 500-3.
61. Harper, C.M. and A.G. Engel, *Quinidine sulfate therapy for the slow-channel congenital myasthenic syndrome*. *Ann Neurol*, 1998. **43**(4): p. 480-4.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA
ACh	Acetylcholin
AChE / <i>ACHE</i>	Acetylcholinesterase / Gen
AChR	Acetylcholinrezeptor/en (nikotinerg)
α -AChR	Acetylcholinrezeptor, alpha-Untereinheit
β -AChR	Acetylcholinrezeptor, beta-Untereinheit
δ -AChR	Acetylcholinrezeptor, delta-Untereinheit
γ -AChR	Acetylcholinrezeptor, gamma-Untereinheit
ϵ -AChR	Acetylcholinrezeptor, epsilon-Untereinheit
BCA	Bicinchinoninsäure
bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
ChAT / <i>CHAT</i>	Cholin-Acetyltransferase / Gen
<i>CHRNA1</i>	Gen kodierend für die alpha-Untereinheit des AChR
<i>CHRNA1</i>	Gen kodierend für die beta-Untereinheit des AChR
<i>CHRND</i>	Gen kodierend für die delta-Untereinheit des AChR
<i>CHRNE</i>	Gen kodierend für die epsilon-Untereinheit des AChR
ColQ / <i>COLQ</i>	Collagen tail (kollagenartige Verankerung) / Gen
cM	centi Morgan
CMAP	Compound muscle action potential (Summenmuskelaktionspotential)
CMS	Congenital myasthenic syndrome (Kongenitale/s myasthene/s Syndrom/e)
CMS-EA	CMS mit episodischen Apnoen
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTNB	Dithiobisnitrobenzoat

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ENMC	European Neuromuscular Centers
FCCMS	Fast-Channel CMS
GFP	Green Fluorescent Protein
GSCN-Lsg.	Guanidiniumthiocyanat-Lösung
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HEK	Human embryonic kidney
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LOD	Logarithm of odds
M2-Region	zweite Transmembranregion der AChR-Untereinheiten
MASC	muscle accessory specificity component
Mb	Megabasen
Mg ²⁺	Magnesiumkationen
min	Minuten
mM	milli Mol
mRNA	Boten (messenger)- Ribonukleinsäure
MuSK / <i>MUSK</i>	Muskelspezifische Kinase / Gen
<i>M. intercostalis</i>	<i>Musculus intercostalis</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Pos.	Position
OD	Optische Dichte
Rapsyn / <i>RAPSN</i>	Receptor-associated protein of the synapse / Gen
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonuklein acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rotations per minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SCCMS	Slow-Channel CMS
<i>SCN4A</i>	Gen kodierend für den spannungsabhängigen Natriumkanal
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Thermus Aquaticus Polymerase
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TPR	Tetratricopeptide repeat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	Technische Universität
z.B.	zum Beispiel

7.2 Primersequenzen

CHRNE Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
proAs	5'- GAATCTCTGTACCGCAGGGCTA
e1a	5'- AGCCCCTGTCCGTACCGAGAA
i0s	5'- CCTCACACAGGCACCCTGGCA
e2a	5'- CAGTGAGATGAGATTCGTCAG
i1s	5'- TTCCCAGGCACAGCATAAT
i3a	5'- TGCCCTGGACAAGACCTCACAC
i3s	5'- TGTGAGGTCTTGTCCAGGGCAC
i5a	5'- AACATAATCGTCCGGGCCTCG
i5s	5'- AGGTACAGATGGGAACAGAG
i6a	5'- TCTGGACCCCGTCTAGAAGCG'
i6s	5'- TCTTCAGCCCGCTGTCAGCTCGGC
i8a	5'- GGCCACGCCCCACCCCTTCACACT
inn8s	5'- AGATCCACATCAGGGTGTCCA
ie10a	5'- AAGGCAGCTGGCGGGGAAAACAC
e10s	5'- CACGGAGCGAGCTCGTGTTTGA
i12a	5'- CTGGAGATGGGTGGGAAATTG

Weitere genomische *CHRNE* Primer

Name	Sequenz
e1s	5'- CAGGCAGCAGGATGGCA
i8s	5'- TCGGTAGCTGGGAGGAGGAACG
in8s	5'- GTCCACACAGGCATAGCCATGCT
in8a	5'- CCTGGAGCCACCCGAACCGAA
e11s	5'- ATGCCGTGAACTTCGTGGCCGA
epsilon3'a	5'- TGTCAGTACTGTAGACTAGGCAG

CHRNA1 Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
B1s	5'-AACTGAAGTGCTGTCTGTCATC
B1a	5'-CCAGAGCTTGTCCATTGGTC
B2s	5'-GAGGCAGGTCTTAAACTAACG
B2a	5'-GCTGGATATTCAAGGAAATTG
B3s	5'-CCCTTGACCCACAGTTTATG
B3a	5'-GGGAGTCAGGATGTCTAAGG
B4s	5'-CATGATTTCCCTTCTCTGTGCC
B4a	5'-ACAGGGCTATATTGGGCATCAC
B5s	5'-TCACAGCTAGTTTCATCAAGTC
B5a	5'-AAGCCCAATCTATGATGCTTTG
B6s	5'-TGAATGGCCTGGAAACATGGTC

B6a	5'-GTGCAACATTTCAACACTCAAC
B7s	5'-GTTTCCCTTCTGGTCTGAAAGC
B7a	5'-GCGAGTGCTGGTGCGGAATTTG
B8s	5'-CAAACCAGTGGTAGGAGGACTC
B8a	5'-GGGCTTGACAGTATCACCAAAC

CHRNA1 Primer, genomisch, für RFLPs

Name	Sequenz
B1mms*	5'-CTCCGGGGGAAACTTTTCTCTGACT
B1mmas*	5'- GGATGAGACCCAACGCTGACCCTGATACG
B3ks	5'-GGATCGATTTCGCTCCGTATCAC
B3kas	5'-TGCTGCAGAGAAGGGATCTCATCAG

* fett gedruckte Buchstaben verweisen auf den Mismatch

CHRNA1 Primer, cDNA, für Klonierung

Name	Sequenz
pRC/CMVs	5'-AAATGTCGTAACAACCTCCG
betaR220Cmmas*	5'-CCAGGTAGAAGAGAGGCTT GCACCG
betaT265Smmas	5'-CCAACAGCAGCAAGAACA CACTGAG
beta500s	5'-GTATCTTTTCGAGGGCTCTGTGCG
betaY15Cmmas	5'-CCTCCCGCGCCGGCCTCACCGAGCTATCAC AG

* fett gedruckte Buchstaben verweisen auf den Mismatch

RAPSN Primer, genomisch, für Routinensequenzierung

Name	Sequenz
RP2s	5'-TTGCCCTGGGGCAGGAAGAAGG
RP2a	5'-AGGCCTTGGGCTAGAGGTGCTC
RPs	5'-TGAGTGACCCACGGTGCTCAG
RPa	5'-CGATCTGCTGCTTGGTCTGGTC
R1s	5'-CATGAGTGCCTAGAGGCACGGA
R1a	5'-TCCGGCCCCAGCCTGACCCTCG
R2s	5'-AGGCTGGGGTCCAAGGCTCAGAGT
R2a	5'-GCCACAGGGTGTGTGCCTCA
R3s	5'-GGATGTCACAATGAATGAGCAG
R3a	5'-GGGCTTCCATGGGCTGATTTG
R4s	5'-CTCCAGTGGTGGTGGCAGAGGAGT

R4a	5'- TACTGGCCCCAAGTGGGGAGTGCT
R5s	5'- ACCCTGTGCTTCCCTGTGAGCA
R5a	5'- AGTTCCCCACTTGGGCCCTTGA
R6s	5'- AAGTGGCTGAGACCGGAGCCTA
R6a	5'- TTAAGCCAGCTGGGCCCTAGAGT
R7s	5'- GCAGGCAAGGAAGGAAGAGA
R7a	5'- AGGAGTAAATGGGCCTCTGGCGT

APC Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
APC15NF	5'- AAAGACATACCAGACAGAGGG
APC15OR	5'- GAATCAGACGAAGCTTGTCTAGAT
APC15PneuF	5'- GAACATGGTCTATCCCCTGATTC
APC15PneuR	5'- GCTTTTGGAGCTGGAGTCTTAAGG

7.3 Genbank-Zugangsnummern

Gen	genom. Sequenz	mRNA-Sequenz
<i>CHRNE</i>	AF105999	NM_000080
<i>CHRNE</i> Promotor	Z84811	--
<i>CHRNA1</i>	AC113189	NM_000747
<i>RAPSN</i>	gi18577857	AF449218
<i>APC</i>	gi68533056	gi4557318

7.4 Fragebogen zur klinischen Erfassung von CMS-Patienten

ERFASSUNGSBOGEN ZUR DIAGNOSTIK KONGENITALER MYASTHENER SYNDROME

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

Probenversand zur Molekulargenetischen Diagnostik:

10 ml EDTA-BLUT

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

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

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

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

- EDTA-Blutprobe von Patient:

Vorname:

Name:

- männlich
 weiblich

Geburtsdatum:

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

- EDTA-Blutproben von Familienangehörigen:

- Vater:
 Mutter:
 Geschwister:

Kontaktadresse des Einsenders:

Klinik:

Ansprechpartner/ überweisender Arzt:

Telefon:

e-mail:

WICHTIGE ANGABEN ZUM PATIENTEN

1. FAMILIENANAMNESE

Aus welchem Land stammt die Familie?

Ist Blutsverwandschaft in der Familie bekannt?

- ja
 nein
 keine Information

Sind andere Familienmitglieder erkrankt?:

- ja
 nein
 keine Information

Wieviele gesunde Geschwister hat der Patient?

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

bitte Rückseite beachten...

7.5 Danksagung

Ich danke herzlich allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben:

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hanns Lochmüller für die Überlassung des Themas, seine fachliche Anleitung, sowie seine Diskussionsbereitschaft in allen Fragen bedanken.

Frau Privatdozentin Dr. Angela Abicht danke ich für den Aufbau und die Etablierung des Forschungsthemas „kongenitale myasthene Syndrome“, für die gute Zusammenarbeit und für ihren Einsatz bei der Betreuung der Patienten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Juliane Simone Müller für die Einarbeitung, die hervorragenden Vorarbeiten zum Thema und die fachliche Unterstützung, mit der sie mich während der Promotion begleitete.

Allen anderen Kollegen aus der AG Lochmüller danke ich für die nette Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor!

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Patienten, ihren Familien und den betreuenden Ärzten, durch deren Mitarbeit diese Arbeit überhaupt erst möglich wurde!

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Friederike Sophie Hoellen

Geburtsdatum: 05.06.1981
Geburtsort: Marburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Vater: Dr. med. P. Ingolf Hoellen,
Chefarzt Traumatologie/Orthopädie Kreiskrankenhaus Backnang

Mutter: Gisela Hoellen, Lehrerin
Geschwister: Franz-Georg Hoellen, geb. 1990

Schulbildung:

1987-1991 Helenental Grundschule Bad Wildungen
1991 Schönenberg Grundschule Ulm-Lehr
1991-1998 Schubart Gymnasium Ulm
1998-2000 Gymnasium in der Taus Backnang

2000 Abitur

Hochschulstudium:

2000-2001 Französische Literatur
Universität d'Aix en Provence, Frankreich

seit 2002 Humanmedizin
Ludwig-Maximilians-Universität München

2004 Ärztliche Vorprüfung
2008 Staatsexamen Humanmedizin (Gesamtnote 1,0)

Wissenschaftliche Tätigkeit:

2005 Experimentelle Forschung der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
am Klinikum Großhadern der LMU
Thema: „Identifikation prognose- und therapierelevanter Proteine beim
metastasierten Kolonkarzinom“

2005-2007 Stipendiatin des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin der
medizinischen Fakultät der LMU
Arbeitsgruppe von Prof. Lochmüller Labor für Molekulare Myologie am
Friedrich-Baur-Institut
Dissertationsthema:
„Molekulargenetische Analyse von postsynaptischen kongenitalen
myasthenen Syndromen“

2007 Posterpräsentation: „Novel mutations in the CHRN1 gene in three
patients affected by a congenital myasthenic syndrome“
18. Kongress des wissenschaftlichen Beirates der Deutschen
Gesellschaft für Muskelkranke e.V. Freiburg

Praktika und Famulaturen:

2001	Krankenpflegepraktikum Kreiskrankenhaus Backnang
2004	Famulatur Traumatologie und Wiederherstellungschirurgie Kreiskrankenhaus Backnang
2004	Famulatur Innere Medizin Kreiskrankenhaus Backnang
2005	Famulatur Viszeralchirurgie Klinikum Großhadern der LMU
2006	Famulatur Gefäß- und Thoraxchirurgie Centre hospitalier universitaire Guadeloupe, Frankreich
2006	Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe Städtisches Krankenhaus München Schwabing
2007	Praktisches Jahr: Innere Medizin: Abteilung für Endokrinologie Städtisches Krankenhaus München Neuperlach Chirurgie: Plastische Chirurgie, Viszeralchirurgie, Kinderchirurgie, Chirurgische Notfallstation Universitätsspital Basel Gynäkologie: Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum Großhadern der LMU München
seit 2002	ehrenamtliche Mitarbeit beim „Teddy-Krankenhaus“ des Dr. von Haunerschen Kinderspitals München

8 Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den

.....

(Friederike Sophie Hoellen)

Dissertation eingereicht am:.....