

Aus dem Friedrich-Baur-Institut der Medizinischen Fakultät
(Leitender Arzt: Prof. Dr. med. Dieter Pongratz)
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Brandt)
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Molekulare Charakterisierung der gestörten neuromuskulären
Erregungsübertragung bei kongenitalen myasthenen Syndromen**

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

vorgelegt von
Juliane Simona Müller
aus
Kronstadt/Rumänien
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hanns Lochmüller
2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Sutor

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Götz
Priv.-Doz. Dr. E. M. Grasbon-Frodl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. Angela Abicht

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 05. 2006

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Colomer J, **Müller JS**, Vernet A, Nascimeinto A, Pons M, Gonzalez V, Abicht A, Lochmüller H. Dramatic, long-term improvement of a slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine. *Neuromuscul Disord* 2006, 16: 329–333.

von der Hagen M, Schallner J, Kaindl AM, Köhler K, Mitzscherling P, Abicht A, Grieben U, Korinthenberg R, Kress W, von Moers A, **Müller JS**, Schara U, Vorgerd M, Walter MC, Müller-Reible C, Hübner C, Lochmüller H, Huebner A. Facing the genetic heterogeneity in neuromuscular disorders: Linkage analysis as an economic diagnostic approach towards the molecular diagnosis. *Neuromuscul Disord* 2006, 16: 4–13.

Müller JS, Stucka R, Neudecker S, Zierz S, Schmidt C, Huebner A, Lochmüller H, Abicht A. Characterization of a novel splicing mutation leading to a congenital myasthenic syndrome. *Neurology* 2005, 65: 463-466.

Soltanzadeh P, **Müller JS**, Ghorbani A, Abicht A, Lochmüller H, Soltanzadeh A. An Iranian family with congenital myasthenic syndrome caused by a novel acetylcholine receptor mutation (*CHRNE* K171X). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005, 76: 1039-1040.

Barisic N, **Müller JS**, Paucic-Kirincic E, Gazdik M, Lah-Tomulic K, Pertl A, Sertic J, Zurak N, Lochmüller H, Abicht A. Clinical variability of CMS-EA (congenital myasthenic syndrome with episodic apnea) due to identical *CHAT* mutations in two infants. *Eur J Paediatr Neurol* 2005, 9: 7-12.

Müller JS, Abicht A, Christen HJ, Stucka R, Schara U, Mortier W, Huebner A, Lochmüller H. A newly identified chromosomal microdeletion of *RAPSN* causes a congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord* 2004, 14: 744-749.

Müller JS, Abicht A, Burke G, Cossins J, Richard P, Baumeister SK, Stucka R, Eymard B, Hantai D, Beeson D, Lochmüller H. The Congenital Myasthenic Syndrome mutation *RAPSN* N88K derives from an ancient Indo-European founder. *J Med Genet* 2004, 41: e104.

Müller JS, Petrova S, Kiefer R, Stucka R, König C, Baumeister SK, Huebner A, Lochmüller H, Abicht A. Synaptic congenital myasthenic syndrome in three patients due to a novel missense mutation (T441A) of the *COLQ* gene. *Neuropediatrics* 2004, 35: 183-189.

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

Inhaltsverzeichnis

A	Zusammenfassung	3
B	Einleitung	5
1	Die neuromuskuläre Endplatte	5
1.1	Aufbau	5
1.2	Der nikotinische Acetylcholinrezeptor des Skelettmuskels	6
1.3	Das exzitatorische postsynaptische Potenzial	8
2	Die kongenitalen myasthenen Syndrome (CMS)	10
2.1	Klinische Symptomatik der CMS	10
2.2	Pathogenetische und klinische Einteilung der CMS	11
2.3	Molekulargenetische Klassifizierung von CMS	12
2.3.1	Postsynaptische CMS-Formen	12
2.3.1.1	Mutationen der AChR-Untereinheiten	12
2.3.1.2	Mutationen des <i>RAPSN</i> -Gens	13
2.3.1.3	Mutationen des <i>MUSK</i> -Gens	14
2.3.1.4	Mutationen des <i>SCN4A</i> -Gens	14
2.3.2	Synaptische CMS-Formen: Mutationen des <i>COLQ</i> -Gens	15
2.3.3	Präsynaptische CMS-Formen: Mutationen des <i>CHAT</i> -Gens	15
2.4	Weitere Kandidatengene bei CMS	16
C	Zielsetzung	17
D	Material und Methoden	19
1	Patienten	19
2	Chemikalien	19
3	Molekulargenetische Methoden	19
3.1	DNA-Extraktion	19
3.2	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	19
3.3	RNA-Extraktion aus Muskelgewebe	20
3.4	RNA-Extraktion aus Zellen	20
3.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	20
3.5.1	Prinzip der PCR	20

3.5.2	PCR-Primer	21
3.5.3	PCR-Reaktionsbedingungen	21
3.6	Aufreinigung der PCR-Produkte	22
3.7	Sequenzanalyse	22
3.8	Genotypenanalyse	23
3.9	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus- (RFLP) Analyse	23
3.10	Reverse-Transkriptase-PCR	23
3.11	Klonierungen, verwendete Plasmide	24
3.11.1	Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pDrive	24
3.11.2	Klonierung von DNA-Fragmenten in den Vektor ExonTrap	24
3.11.3	Einführung der Mutation E381K in den Vektor δ AChR-pRC/CMV2	25
3.12	Ligation	26
3.13	Transformation von Bakterien	26
3.14	Bakterienkultur	26
3.15	Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien	26
4	Zellkultur	27
4.1	Transfektion von HEK 293-Zellen zur RNA-Analyse	27
4.2	Transfektion von HEK 293-Zellen nach der Calciumphosphat-Methode	27
5	α -Bungarotoxin-Färbungen, Mikroskopie	28
6	Analyse von AChE/ColQ-Komplexen aus Muskelgewebe	28
6.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Muskelgewebe	28
6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
6.3	Auftrennung von Muskelextrakten über Sucrosegradienten	29
6.4	Bestimmung der AChE-Aktivität	30
6.5	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	31
E	Ergebnisse	32
1	Analyse der AChR-Untereinheiten	33
1.1	Analyse des <i>CHRNA1</i> -Gens	33
1.2	Analyse des <i>CHRND</i> -Gens	33
1.3	Mutationen des <i>CHRNE</i> -Gens	41
1.3.1	<i>CHRNE</i> -Mutationen mit Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften des Rezeptors	42
1.3.1.1	Die Mutation <i>CHRNE</i> L269F	42

1.3.1.2	Die Mutation <i>CHRNE</i> A411P	43
1.3.2	<i>CHRNE</i> -Mutationen, die zur Rezeptordefizienz führen.....	43
1.3.3	Die Spleißmutation <i>IVS5-16G>A</i>	46
2	Analyse des <i>RAPSN</i> -Gens	50
2.1	Die Mutation <i>RAPSN</i> N88K.....	52
2.2	Genauere Kartierung des Founder-Fragmentes	53
2.3	Nachweis einer heterozygoten Mikrodeletion im <i>RAPSN</i> -Gen	56
2.4	Die Spleißmutation <i>RAPSN</i> <i>IVS1-15C>A</i>	60
3	Analyse des <i>CHAT</i> -Gens.....	63
4	Analyse des <i>COLQ</i> -Gens	66
4.1	Im <i>COLQ</i> -Gen identifizierte Mutationen	66
4.2	Die Mutation <i>COLQ</i> T441A.....	68
F	Diskussion.....	72
1	Mutationen in den Untereinheiten des AChR	72
1.1	Mutationen mit veränderter AChR-Kinetik	72
1.1.1	Die Slow-Channel-Mutationen α G153S und ϵ L269F.....	72
1.1.2	Die Fast-Channel-Mutation ϵ A411P	73
1.2	<i>CHRNE</i> -Mutationen, die zur Rezeptordefizienz führen.....	73
1.2.1	Trunkierende <i>CHRNE</i> -Mutationen.....	74
1.2.2	Missense-Mutationen	75
1.2.3	Die Spleißmutation <i>CHRNE</i> <i>IVS5-16G>A</i>	75
1.2.4	Klinische Merkmale der Patienten mit <i>CHRNE</i> -Mutationen	78
1.3	Die Mutationen <i>CHRND</i> E381K und <i>del2,2kb</i>	79
2	Mutationen des <i>RAPSN</i> -Gens.....	81
2.1	Die Mutation <i>RAPSN</i> N88K – eine indoeuropäische Founder-Mutation.....	83
3	Mutationen im <i>CHAT</i> -Gen	84
4	Mutationen im <i>COLQ</i> -Gen.....	86
5	Vorgehensweise bei der molekulargenetischen Diagnostik eines CMS	87
6	Einordnung der Ergebnisse aus der molekulargenetischen Diagnostik der CMS	89
7	Ausblick.....	92
8	Klinische Konsequenzen der molekularen Charakterisierung von CMS	93

G	Literaturverzeichnis	95
H	Anhang	105
1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	105
2	Mikrosatellitenmarker	108
3	Primersequenzen	111
4	Genbank-Zugangsnummern	118
5	Polymorphismen.....	119
6	Liste aller in unserer Arbeitsgruppe identifizierten CMS-Mutationen	121
7	Fragebogen zur klinischen Erfassung von CMS-Patienten.....	123
8	Danksagung	125
9	Lebenslauf	126
	Ehrenwörtliche Erklärung	130

A Zusammenfassung

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (CMS) bilden pathogenetisch und klinisch eine heterogene Gruppe von relativ seltenen hereditären Erkrankungen des Kindesalters, denen eine gestörte Erregungsübertragung im Bereich der neuromuskulären Endplatte zu Grunde liegt. Daher stellen diese Erkrankungen ein hervorragendes Modell zur Untersuchung synaptischer Prozesse dar. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von genetischen Veränderungen, die zu einer gestörten Erregungsübertragung an der menschlichen neuromuskulären Endplatte und damit zu CMS führen. Die Analyse ursächlicher Mutationen und deren pathophysiologischer Bedeutung soll die Grundlage für eine sichere Einordnung von CMS bilden. Aus der Korrelation von Geno- und Phänotypen von CMS-Patienten sollen Daten gewonnen werden, die für den einzelnen CMS-Patienten hinsichtlich Diagnostik, Beratung und Therapie hilfreich sind.

Es konnten über 250 nicht verwandte CMS-Patienten aus Deutschland und anderen europäischen Ländern molekulargenetisch analysiert werden. Dies führte zur Identifizierung und funktionellen Charakterisierung zahlreicher ursächlicher Mutationen in sechs verschiedenen CMS-Genen (Gene kodierend für Acetylcholinrezeptor (AChR)-Untereinheiten: *CHRNE*, *CHRND*, *CHRNA1*, sowie *COLQ*, *CHAT* und *RAPSN*). Ausgewählte Mutationen wurden in funktionellen Studien auf ihren pathogenetischen Effekt an der Endplatte hin untersucht. Auf diese Weise konnte bereits bei über 50% der Patienten des CMS-Kollektivs die molekulare Grundlage des CMS identifiziert werden.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wurden die meisten Mutationen (19 verschiedene Mutationen in 40 unabhängigen Familien) im *CHRNE*-Gen kodierend für die epsilon-Untereinheit des adulten AChR identifiziert, die zu einem postsynaptischen CMS führen. Im Bereich der übrigen AChR-Untereinheiten ist eine Missense-Mutation im *CHRND*-Gen kodierend für die delta-Untereinheit hervorzuheben. Für diese konnte ein für AChR-Mutationen neuartiger Pathomechanismus gezeigt werden: die Mutation reduziert die Fähigkeit der AChR, mit dem postsynaptischen Protein Rapsyn zu clustern.

Als zweithäufigste Ursache eines CMS im Kollektiv stellten sich Mutationen des *RAPSN*-Gens heraus (10 verschiedene Mutationen in 22 unabhängigen Familien). Bei Patienten deutschen Ursprungs erwiesen sich diese sogar als häufigste ursächliche Mutationen. Neben verschiedenen anderen Mutationen trugen die meisten der Patienten dabei auf mindestens einem Allel die Mutation N88K. Die besondere Häufigkeit von N88K konnte auf einen

Founder in der indoeuropäischen Bevölkerung zurückgeführt werden. Klinisch auffällig waren bei *RAPSN*- Patienten – ähnlich wie bei Patienten mit *CHAT*-Mutationen - im Rahmen von Infekten plötzlich auftretende, lebensbedrohliche Störungen der Atmung. Durch einen Schnelltest auf die Mutation N88K bei neuen Patienten können insgesamt etwa 10% aller CMS-Fälle genetisch diagnostiziert werden. Damit können weitere aufwendige und für die Patienten belastende Untersuchungen vermieden werden.

Darüber hinaus gelang es, bei einer Reihe von Patienten des CMS-Kollektivs Mutationen im *COLQ*- sowie im *CHAT*-Gen nachzuweisen und zu charakterisieren:

Mutationen im synaptisch exprimierten *COLQ*-Gen konnten bislang in insgesamt 11 CMS-Familien nachgewiesen werden. Die meisten genetischen Veränderungen waren als „private“ Mutationen jeweils nur in einzelnen Patienten bzw. Familien nachweisbar. Eine Missense-Mutation des *COLQ*-Gens (T441A) fand sich dagegen interessanterweise homozygot in drei unabhängigen deutschen CMS-Familien mit insgesamt vier betroffenen Personen. Krankheitsalter bei Erstmanifestation, Fortschreiten und Schweregrad der Erkrankung zeigten trotz der identischen Mutation eine bemerkenswerte Variabilität zwischen den einzelnen Patienten. Eine biochemische Charakterisierung der Mutation T441A mittels Dichtegradienten-Zentrifugation der aus Patientenmuskel extrahierten AChE zeigte ein Fehlen der ColQ-assoziierten, im synaptischen Spalt verankerten Esterase-Form.

Im *CHAT*-Gen wurden bei sechs Index-Patienten des Kollektivs sieben unterschiedliche Mutationen identifiziert. Bei allen Patienten traten – ähnlich wie bei Patienten mit *RAPSN*-Mutationen - wiederholt plötzliche Apnoen auf. Im Schweregrad der myasthenen Symptomatik zeigten auch *CHAT*-Patienten deutliche Unterschiede, sogar bei Vorliegen einer identischen genetischen Ursache. Die klinische Beobachtung von zwei kroatischen Patienten mit identischen Mutationen des *CHAT*-Gens betont die Bedeutung plötzlicher Apnoen als Risikofaktor für die Entwicklung sekundärer hypoxischer Hirnschäden und einer psychomotorischen Retardierung.

Die Größe des Patientenkollektivs ermöglichte es erstmals, Daten zu Vorkommen und Häufigkeit einzelner CMS-Mutationen in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen zu gewinnen. Darüber hinaus erbrachte die Analyse von Phänotyp und Genotyp wichtige Informationen zu klinischen Besonderheiten, Therapiemöglichkeiten und Prognose. Neben der Analyse bekannter CMS-Gene bilden die in dieser Arbeit charakterisierten Patienten und Familien die Grundlage, weitere CMS-Gene zu identifizieren.

B Einleitung

Erkrankungen, die durch Störungen der neuromuskulären Übertragung verursacht werden, sind relativ selten. Sie schließen jedoch ein großes Spektrum erworbener, autoimmunologischer und erblicher Erkrankungen ein und zeigen charakteristische klinische Symptome, wie zum Beispiel belastungsabhängige Muskelschwäche. Durch die gute Zugänglichkeit der neuromuskulären Endplatte ist diese Struktur histopathologisch, molekularbiologisch und elektrophysiologisch sehr gut untersucht.

1 Die neuromuskuläre Endplatte

1.1 Aufbau

Die neuromuskuläre Endplatte ist die Struktur, bei der die präsynaptisch über die Nervenfasern einlaufende elektrische Erregung über chemische Transmission postsynaptisch an der Muskelfaser zur Depolarisation und damit zur Muskelkontraktion führt. Eine Übersicht der Struktur und Funktionsweise der Endplatte findet sich in (Wood and Slater, 2001). Im Menschen wird, so wie bei allen Säugetieren und den meisten höheren Vertebraten, jede Muskelfaser von einem einzigen myelinisierten Motoraxon innerviert. An der Endplatte verliert die Nervenfasern ihre Myelinscheide und bildet Verzweigungen, die den synaptischen Kontakt mit der Muskelfaser herstellen.

In der unmyelinisierten Nervenendigung sind dicht mit dem Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) gepackte Membranvesikel gespeichert. Einige dieser Vesikel lagern dicht aneinander und bilden mikroskopisch sichtbare aktive Zonen. ACh wird im Cytoplasma der präsynaptischen Nervenendigung aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert, katalysiert durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT), und dann mit Hilfe eines spezifischen Transporters, des vesikulären Acetylcholintransporters (vAChT), in die synaptischen Vesikel aufgenommen. Jedes Vesikel enthält 5000-10000 Moleküle ACh.

Die Depolarisation der präsynaptischen Membran bewirkt die Öffnung von spannungsaktivierten Calciumkanälen; der Calciumeinstrom in die präsynaptische Nervenendigung führt zur Exozytose von ACh aus den präsynaptischen Vesikeln. Zusätzlich zu den spannungsabhängigen Calciumkanälen sind auf präsynaptischer Seite spannungsabhängige, Calcium-aktivierte Kaliumkanäle vorhanden. Diese begrenzen die Dauer der Depolarisation der Nervenendigung und damit die Transmitterfreisetzung.

Das bei der Vesikelexocytose freigesetzte ACh diffundiert durch den synaptischen Spalt zu den Acetylcholinrezeptoren (AChR) an der postsynaptischen Membran. In dem synaptischen Spalt befindet sich in hoher Konzentration das Enzym Acetylcholinesterase (AChE), das über die Spaltung von ACh in einen Acetylrest und Cholin entscheidend für die zeitliche Begrenzung des exzitatorischen postsynaptischen Potenzials ist. Die AChE ist in der Basalmembran des synaptischen Spaltes über ein Protein mit einer kollagenartigen Struktur (engl. collagen tail = ColQ) verankert.

Die postsynaptische Membran ist durch starke Membraneinfaltungen charakterisiert. Diese Einfaltungen entwickeln sich während der Ausbildung der Synapse und sind an der Muskelmembran nur im Bereich der Endplatte nachweisbar. Die postsynaptische Membran enthält vorwiegend nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (AChR) und spannungsaktivierte Natriumkanäle. Die AChR sind überwiegend an den oberen Spitzen der postsynaptischen Einfaltungen lokalisiert, genau gegenüber der aktiven Zonen auf präsynaptischer Seite, während die spannungsaktivierten Natriumkanäle, die das muskuläre Aktionspotenzial generieren, überwiegend in der Tiefe der Einfaltungen lokalisiert sind.

1.2 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor des Skelettmuskels

Der nikotinische AChR ist ein membranständiges großes Glykoprotein (Abbildung 1), das aus fünf Untereinheiten besteht. Die Transmembranregionen dieser Untereinheiten bilden eine wässrige Pore, durch die positiv geladene Ionen (hauptsächlich Natrium und Kalium, in geringerem Ausmaß Calcium) fließen können. Die Bindungsstellen für ACh liegen auf der α -Untereinheit des Rezeptors; zur Öffnung des Kanals müssen jeweils zwei Moleküle ACh binden. Bei Vertebraten existieren zwei verschiedene AChR-Formen: Bei Embryonen liegt der Rezeptor überwiegend in der embryonalen Form des Rezeptors vor und ist aus den Untereinheiten 2α , β , δ und γ aufgebaut. Mit zunehmender Innervation des fetalen Muskels kommt es zu einer Konzentration der Rezeptoren unter der präsynaptischen Endigung und zu einem Ersatz der γ -Untereinheit durch die ϵ -Untereinheit. Im adulten Zustand tritt der nikotinische AChR überwiegend in der adulten Form (2α , β , δ , ϵ) auf. Kommt es jedoch zu einer Denervierung des Muskels, wird dieser wieder durch den embryonalen Typ des Rezeptors ersetzt und breitet sich auf der gesamten Muskelmembran aus.

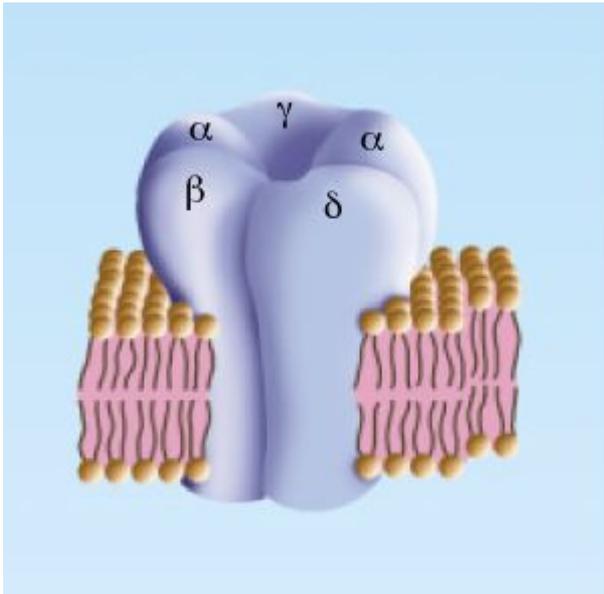


Abbildung 1: Die embryonale Form des AChR mit den Untereinheiten α_2 , β , δ und γ . Beim adulten Rezeptor wird die γ -Untereinheit durch die ε -Untereinheit ersetzt.

Die Anordnung der AChR in der postsynaptischen Membran wird durch einen Signaltransduktionsweg gesteuert. Sobald Myoblasten zu Myotuben fusionieren, beginnen sie, die Gene kodierend für die AChR-Untereinheiten zu exprimieren. AChR werden gebildet und in die Membran inseriert. Anfangs sind AChR über die gesamte Muskelmembran verteilt. Bei der Bildung von Synapsen erfolgt eine Umverteilung der AChR: die Dichte der AChR gegenüber der Nervenendigung steigt extrem an, während gleichzeitig die extrasynaptischen AChR verschwinden. Die AChR clustern auf der postsynaptischen Seite; dieses Clustern führt auch zu einer erhöhten metabolischen Stabilität der Rezeptoren verglichen mit freien AChR (Gervasio and Phillips, 2005).

Der Prozess des Clusters wird über den Agrin-MuSK-Rapsyn-Signalweg eingeleitet. Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglykan und wird von der Nervenendigung in den synaptischen Spalt freigesetzt (Hoch, 1999). Agrin wird auch von Schwann-Zellen und von Myotuben selbst synthetisiert, jedoch ist nur die von der präsynaptischen Nervenendigung synthetisierte Spleissform z^+ in der Lage, das Zusammenfügen postsynaptischer Komponenten zu induzieren (Hoch, 1999). Verschiedene Arbeiten zeigten, dass der Rezeptor für das Agrin-Signal die postsynaptische Rezeptor-Tyrosinkinase MuSK (muscle-specific kinase) ist (Glass et al., 1996). So sind zum Beispiel MuSK-defiziente Mäuse nicht in der Lage, postsynaptische Strukturen auszubilden, trotz normaler AChR-Expression in den Muskelzellen (DeChiara et al., 1996). Dennoch konnte eine direkte Bindung von Agrin durch MuSK nicht gezeigt werden. Agrin ist in der Lage, MuSK in Muskelzellen zu aktivieren, jedoch nicht in

heterologen Nicht-Muskelzellen. Daraus ergibt sich, dass ein weiterer, essentieller muskelspezifischer Faktor für die Agrin-MuSK-Bindung benötigt wird; dieser hypothetische Faktor, genannt MASC (muscle accessory specificity component) kann ein anderes Protein, ein aktivitätsverstärkender Kofaktor oder auch eine posttranslationale Modifikation von MuSK sein. Es gibt experimentelle Hinweise darauf, dass es sich bei MASC um Glykosylreste handeln könnte (Parkhomovskiy et al., 2000; Watty and Burden, 2002; Xia and Martin, 2002).

Ein entscheidender Effektor stromabwärts von MuSK ist Rapsyn, ein 43kDa membranassoziiertes cytoplasmatisches Protein. Rapsyn assoziiert mit AChR an der postsynaptischen Membran und clustert die Rezeptormoleküle. Rapsyn-Knockout-Mäuse sind nicht in der Lage, postsynaptische AChR-Cluster auszubilden (Gautam et al., 1995); dies zeigt, dass Rapsyn ein essentieller Faktor der postsynaptischen Spezialisierung ist.

1.3 Das exzitatorische postsynaptische Potenzial

Die meisten Vesikel in der präsynaptischen Nervenendigung gehören zur ruhenden Vesikelreserve und sind über Synapsin-1 in das Aktinskelett der Nervenendigung eingebunden. Um für die Transmitterausschüttung verwendet werden zu können, müssen die Vesikel über einen speziellen Reifungsprozess vorbereitet werden. Sobald ein Vesikel an der aktiven Zone ankommt, lagert es sich an der Plasmamembran an („docking“). Angedockte Vesikel werden einer ATP-abhängigen Präfusion unterzogen, dem sogenannten „priming“. Dies bringt die Vesikel in einen fusionskompetenten Zustand. In diesem Reifungsprozess spielt der SNARE-Komplex („soluble NSF-attachment protein receptor“) eine entscheidende Rolle. Dieser Komplex besteht aus den Molekülen Syntaxin und SNAP-25 auf der Seite der Plasmamembran, sowie Synaptobrevin, einem Protein aus der Vesikelmembran (Übersicht z.B. in (Sudhof, 2004)).

Wenn ein über die motorische Nervenfasern laufendes Aktionspotenzial, das über die Aktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle generiert wird, in die präsynaptische Endigung einläuft, kommt es zur Depolarisation der präsynaptischen Endigung. Die Spannungsänderung ist der spezifische Reiz zur Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Die Öffnung der Calciumkanäle führt gemäß dem elektrochemischen Gradienten für Calcium zum Einstrom von Calcium in die präsynaptische Endigung. Eine Besonderheit des SNARE-Komplexes liegt darin, dass er an die intrazelluläre Calciumkonzentration gekoppelt ist. Diese Kopplung wird durch das calciumbindende Protein

Synaptotagmin vermittelt, das ebenfalls in der Vesikelmembran verankert ist und in Abwesenheit von Calcium mit dem SNARE-Komplex interagiert. Durch die Bindung von Calcium an Synaptotagmin löst sich diese Wechselwirkung auf und die Vesikelmembran fusioniert mit der Plasmamembran, was zur Exocytose von ACh in den synaptischen Spalt führt.

ACh erreicht im synaptischen Spalt innerhalb weniger Mikrosekunden eine Konzentration von ungefähr 1 mM. Die Bindung von ACh an die Rezeptoren bewirkt die Öffnung von Kationenkanälen und dadurch eine Depolarisation der postsynaptischen Membran. Diese Depolarisation entspricht dem exzitatorischen postsynaptischen Potenzial. Die elektrophysiologische Messung der postsynaptischen Potenziale führte zur Theorie der Quantennatur der synaptischen Übertragung. Da in einem ACh-enthaltenden präsynaptischem Vesikel jeweils ähnlich große Mengen ACh enthalten sind, ist die Amplitude des postsynaptisch auftretenden Stroms nach Ausschüttung eines Vesikels in den synaptischen Spalt ungefähr konstant (Miniaturendplattenpotenzial, (Fatt and Katz, 1952)). Die Höhe von exzitatorischen postsynaptischen Potenzialen ist somit ein ganzzahliges Vielfaches der Höhe von Miniaturendplattenpotenzialen.

Wenn die postsynaptische Membran des Muskels durch die Aktivierung von AChR und das dadurch generierte exzitatorische postsynaptische Potenzial den Schwellenwert, der für die Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle notwendig ist, erreicht, kommt es durch Aktivierung der Natriumkanäle zur Fortleitung der Depolarisation über die gesamte Muskelmembran und dadurch letztendlich zur Kontraktion der aktivierten Muskelfaser. Das Verhältnis der aktuellen Amplitude des exzitatorischen Potenzials zu der Amplitude, die notwendig ist, um gerade noch ein fortgeleitetes Aktionspotential (das über spannungsaktivierte Natriumkanäle generiert wird) zu erzeugen, nennt man den Sicherheitsfaktor der neuromuskulären Übertragung (Übersicht in (Trontelj et al., 2002)).

Die Zuverlässigkeit der neuromuskulären Übertragung beruht auf der Tatsache, dass im Normalfall, selbst bei starker körperlicher Aktivität, immer mehr ACh-Quanten freigesetzt werden als zur Generierung eines Aktionspotentials nötig sind. Verschiedene Organismen haben diverse Strategien entwickelt, um den Sicherheitsfaktor der neuromuskulären Übertragung aufrechtzuerhalten. Eine Strategie besteht in der Vergrößerung der Nervenendigung – große präsynaptische Terminals setzen eine größere Menge an ACh-Quanten frei als kleine. Die andere Möglichkeit ist, die Anzahl der postsynaptischen AChR zu erhöhen, die durch ein ACh-Quantum erreicht werden. Dies wird durch die Vergrößerung der postsynaptischen Membranfläche durch starke Einfaltung und durch Clustern der AChR an

den oberen Abschnitten der Membranfalten erzielt. Dies ist die Strategie, welche von menschlichen Endplatten angewandt wird.

2 Die kongenitalen myasthenen Syndrome (CMS)

Trotz der hohen Zuverlässigkeit der Reizweiterleitung an der Endplatte sind einige Erkrankungen bekannt, bei denen der Sicherheitsfaktor der neuromuskulären Übertragung durch verschiedene pathogene Mechanismen herabgesetzt ist. Diese Erkrankungen sind durch eine belastungsabhängige Muskelschwäche charakterisiert und werden unter dem Oberbegriff „Myasthenie“ zusammengefasst.

Zur Gruppe der Myasthenien gehören sowohl erworbene, z.B. autoimmun bedingte Erkrankungen (Myasthenia gravis, Lambert-Eaton-Syndrom), als auch erbliche Myasthenieformen, die kongenitalen myasthenen Syndrome, auf die in den weiteren Teilen dieser Arbeit eingegangen werden soll.

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (engl. congenital myasthenic syndromes, CMS) stellen klinisch und pathogenetisch eine heterogene Gruppe von erblichen Erkrankungen dar, deren gemeinsamer Defekt eine Störung der neuromuskulären Übertragung im Bereich der Endplatte ist (Engel, 1994; Engel et al., 2003b; Engel and Sine, 2005).

2.1 Klinische Symptomatik der CMS

CMS-Fälle machen ca. 10% aller Myasthenien aus. Im Kindesalter dürften kongenitale Myasthenien noch häufiger sein (Anlar et al., 1996). Der Beginn der Symptomatik von CMS liegt in der Regel in der frühen Kindheit, meist in den ersten beiden Lebensjahren. Verlauf und Schweregrad der Erkrankung sind jedoch sehr unterschiedlich: Die Symptomatik reicht vom schweren 'floppy-infant'-Syndrom bei Geburt bis zu einer Minimalsymptomatik mit Ptose und leichter muskulärer Schwäche. Im Säuglingsalter fallen Trinkschwäche, kraftloses Schreien und generalisierte muskuläre Hypotonie, mit oder ohne Ptose auf. In vielen Fällen kommt es - ausgelöst durch respiratorische Infekte - zu krisenhaften Verschlechterungen, die zu einer plötzlichen Ateminsuffizienz und zum Kindstod führen können. Im Erwachsenenalter steht meist eine abnorme Ermüdbarkeit der Muskulatur bei Belastung im Vordergrund; dazu kommt häufig eine tageszeitabhängige Ptose mit oder ohne Störungen der externen Augenmuskulatur.

Anders als bei der autoimmunologisch ausgelösten Myasthenia gravis lassen sich keine

Antikörper gegen AChR (Aarli et al., 1975) oder MuSK (Hoch et al., 2001) nachweisen und die Patienten sprechen nicht auf eine immunsuppressive Therapie an.

2.2 Pathogenetische und klinische Einteilung der CMS

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

Die Differenzierung von CMS erfolgte ursprünglich durch elektrophysiologische Untersuchungen an einem Nerv-Muskelpräparat, gewonnen aus einer Biopsie des *M. intercostalis*. Durch ergänzende morphologische, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen gelang es, einzelne CMS weiter zu differenzieren (Engel, 1994), Rückschlüsse auf die vermutliche Pathogenese einzelner Defekte zu ziehen und prä- und postsynaptische Syndrome zu unterscheiden (Engel, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass dem Großteil von CMS postsynaptische Störungen zugrunde liegen. Seit 1994 brachte die molekulargenetische Analyse der CMS weiteren Einblick in die ursächlichen Krankheitsmechanismen. Für einige Formen von CMS konnten die zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen identifiziert werden (Abbildung 2). Diese molekulargenetischen Ergebnisse fanden Eingang in die Klassifikation der CMS (Engel and Sine, 2005), die nun in den folgenden Abschnitten geschildert wird.

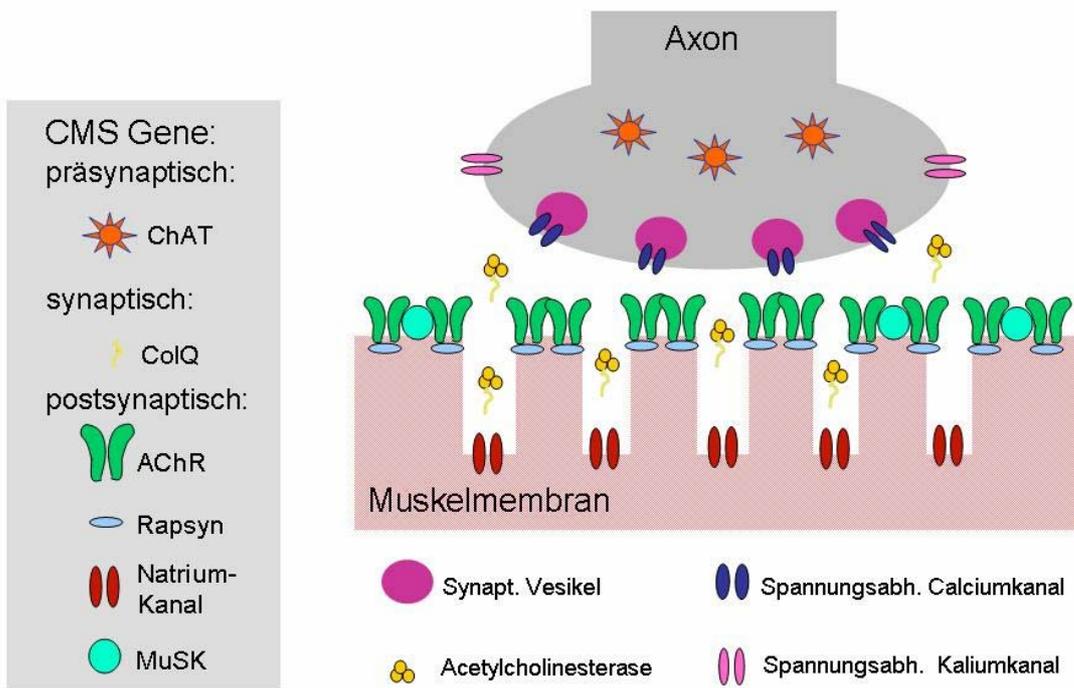


Abbildung 2: Bisher bekannte CMS-Gene und die Lokalisation ihrer Proteinprodukte an der neuromuskulären Endplatte. Abbildung modifiziert aus (McConville and Vincent, 2002)

2.3 Molekulargenetische Klassifizierung von CMS

2.3.1 Postsynaptische CMS-Formen

2.3.1.1 Mutationen der AChR-Untereinheiten

Der erste entscheidende Fortschritt, der in der molekularen Charakterisierung kongenitaler myasthener Syndrome erzielt wurde, war der Nachweis von pathogenen Mutationen der Gene, die für die verschiedenen Untereinheiten des nikotinischen AChR's kodieren (*CHRNA1* auf Chromosom 2q31.1, *CHRNB1* auf Chromosom 17p13, *CHRND* auf Chromosom 2q37.1 und *CHRNE* auf Chromosom 17p13) (Engel et al., 1996b; Gomez and Gammack, 1995; Ohno et al., 1995; Sine et al., 1995). Einige der Mutationen der AChR-Untereinheiten verändern die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptorproteins und führen zu veränderten Kanalöffnungszeiten oder zu einer veränderten Ligandenaffinität; andere Mutationen reduzieren die Rezeptorexpression.

Die erste identifizierte CMS-verursachende Mutation war die Missense-Mutation T264P im

CHRNE-Gen (Ohno et al., 1995). Diese Mutation liegt in der zweiten Transmembrandomäne (M2) der ϵ -Untereinheit, welche an der Bildung der Kanalpore teilnimmt. T264P bewirkt eine Verlängerung der Kanalöffnungszeit und wird autosomal dominant vererbt (sog. Slow-Channel-Syndrom). Das Slow-Channel-Syndrom (SCCMS) ist bislang die einzige dominante CMS-Form, es wurde jedoch auch ein Fall eines rezessiven SCCMS beschrieben (Croxen et al., 2002).

Mutationen, welche zu einer verkürzten Kanalöffnungszeit führen (sog. Fast-Channel-Syndrome), werden autosomal rezessiv vererbt; bei einigen dieser Mutationen handelt es sich ebenfalls um Missense-Mutationen in den M2-Regionen der AChR-Untereinheiten (Sine et al., 2003).

Der Großteil aller autosomal rezessiv vererbten und sporadischen CMS scheint jedoch auf Mutationen der AChR ϵ -Untereinheit zu beruhen, die über eine verminderte Expression des adulten AChRs zum morphologischen Bild eines AChR-Mangels führen (Engel et al., 2003b; Hantai et al., 2004). Die verminderte Expression der ϵ -Untereinheit kann offenbar teilweise durch die fetale γ -Untereinheit kompensiert werden, welche noch in geringen Mengen im adulten Muskel vorhanden ist (Croxen et al., 2001). Für das Gen der ϵ -Untereinheit wurden auch Mutationen im Bereich der Promotorregion beschrieben. Diese Mutationen befinden sich alle innerhalb einer sogenannten N-Box (Abicht et al., 2002; Nichols et al., 1999; Ohno et al., 1999). Dabei handelt es sich um einen konservierten, sechs Basenpaare langen Sequenzbereich, der die synapsenspezifische Expression von Genen reguliert.

Wesentlich seltener sind rezessive Mutationen der α -, β - und δ -Untereinheiten des AChRs beschrieben worden, die Einfluss auf die Expression der jeweiligen Untereinheit haben (Engel et al., 2003a; Ohno and Engel, 2004a).

2.3.1.2 Mutationen des *RAPSN*-Gens

Als weitere Ursache für ein postsynaptisches CMS wurden Mutationen im Gen kodierend für Rapsyn auf Chromosom 11p11.2 beschrieben (Ohno et al., 2002). In vier unabhängigen CMS-Patienten wurden unterschiedliche, rezessiv vererbte Rapsyn-Mutationen nachgewiesen. Dabei trugen alle Patienten eine bestimmte Mutation, *RAPSN* N88K, homozygot oder compound heterozygot. Klinisch auffällig waren – ähnlich wie bei Patienten mit *CHAT*-Mutationen (siehe Kap. 2.3.3) – im Rahmen von Infekten plötzlich auftretende, lebensbedrohliche Störungen der Atmung. *RAPSN*-Mutationen führen zu einem reduzierten Ko-Clustern der Rapsyn-Moleküle mit AChR, was *in vivo* vermutlich eine reduzierte

postsynaptische Rezeptordichte und dadurch ein Herabsetzen des Sicherheitsfaktors an der Endplatte zur Folge hat.

2.3.1.3 Mutationen des *MUSK*-Gens

Aufgrund der Rolle von MuSK bei der Ausbildung postsynaptischer Strukturen (Valenzuela et al., 1995) galt das *MUSK*-Gen auf Chromosom 9q31.3 seit vielen Jahren schon als potentiell CMS-Kandidateng. Jedoch gelang es erst 2004, bei einer französischen Patientin zwei compound heterozygote *MUSK*-Mutationen nachzuweisen (Chevessier et al., 2004), die Frameshift-Mutation 220insC und die Missense-Mutation V790M. Die Erkrankung manifestierte sich direkt nach Geburt durch Ptose, respiratorische Probleme und Ermüdbarkeit bei körperlicher Betätigung. Im Kindes- und Jugendalter verbesserte sich die Symptomatik; dann kam es im Alter von 22 Jahren während einer Schwangerschaft zu einer akuten Verschlechterung der Muskelschwäche. Eine Behandlung mit Esteraseinhibitoren und 3,4-Diaminopyridin verlief erfolgreich.

Eine Muskelbiopsie zeigte schwerwiegende strukturelle Veränderungen an der Endplatte und eine reduzierte AChR- und MuSK-Expression. Die Mutation V790M in Exon 14 verändert nicht die Kinase-Aktivität, sondern erniedrigt das Expressionsniveau und die Stabilität des Proteins und führt dadurch zu einem verminderten Agrin-abhängigen Clustern der AChR.

2.3.1.4 Mutationen des *SCN4A*-Gens

Als Ursache eines postsynaptischen CMS wurden bei einer Patientin zwei compound heterozygote Mutationen im Gen *SCN4A*, kodierend für den spannungsabhängigen Natriumkanal (Na_v1.4), auf Chromosom 17q23.3 identifiziert (Tsuji et al., 2003). Mutationen in diesem Gen waren bislang bekannt als ursächlich für hyper- bzw. hypokaliämische periodische Lähmungen und Formen der Myotonie. Die bislang einzige beschriebene 20-jährige CMS Patientin litt seit Geburt unter einer myasthenen Symptomatik mit wiederholten plötzlich auftretenden Episoden respiratorischer und bulbärer Insuffizienz, die bei Normkaliämie über 3-30 Minuten anhielten und seit Geburt ca. 1-3 mal im Monat auftraten.

2.3.2 Synaptische CMS-Formen: Mutationen des *COLQ*-Gens

Die auch lichtmikroskopisch nachweisbare Defizienz der Acetylcholinesterase ist eine relativ häufige Ursache von CMS (Donger et al., 1998; Engel et al., 2003a; Ohno et al., 1998b). AChE ist für die rasche Hydrolyse von freigesetztem Acetylcholin im synaptischen Spalt verantwortlich und begrenzt dadurch die Dauer der Signalübertragung. Bei den identifizierten Mutationen ist jedoch nicht der ubiquitär exprimierte globuläre Anteil des Enzyms betroffen, der die eigentliche katalytische Aktivität enthält, sondern der Muskel-spezifisch exprimierte kollagenartige „Schwanz- bzw. Verankerungsteil“ (ColQ), der durch ein separates Gen (*COLQ*) auf Chromosom 3p25.1 kodiert wird. Seit der Erstbeschreibung von *COLQ*-Mutationen als Ursache synaptischer CMS (Donger et al., 1998; Ohno et al., 1998b) wurden etwa 30 unterschiedliche Mutationen (missense-, frameshifting-, und nonsense-Mutationen) identifiziert (Ohno and Engel, 2004a). Patienten mit AChE-Defizienz zeigen häufig ein relativ schweres Krankheitsbild, das nicht auf eine Therapie mit AChE-Hemmern anspricht.

2.3.3 Präsynaptische CMS-Formen: Mutationen des *CHAT*-Gens

Die Cholin-Acetyltransferase katalysiert die Biosynthese des Neurotransmitters Acetylcholin aus Cholin und Acetyl-CoA im Cytoplasma präsynaptischer Neuronen. Kürzlich konnten Mutationen im Gen kodierend für die Cholin-Acetyltransferase (*CHAT*) auf Chromosom 10q11.23 als erste molekulare Ursache für ein präsynaptisches CMS identifiziert werden (Ohno et al., 2001). Bei insgesamt fünf Patienten wurden zehn rezessive Mutationen identifiziert. In funktionellen Studien wurde gezeigt, dass diese *CHAT*-Mutanten eine reduzierte katalytische Aktivität aufweisen. Auffällig bei allen Patienten waren krisenhafte Verschlechterungen des Krankheitsbildes, die meist im Rahmen von fieberhaften Infekten auftraten und mit episodischen Apnoen einher gingen (Byring et al., 2002; Ohno et al., 2001). Von fünf betroffenen Geschwistern dieser Patienten waren vier im Rahmen derartiger Ateminsuffizienzen verstorben. Dieser klinische Phänotyp führte zum Terminus CMS-EA (CMS mit episodischen Apnoen). Zwischenzeitlich wurden bei weiteren 5 CMS Familien insgesamt 4 weitere *CHAT* Mutationen publiziert (Maselli et al., 2003; Schmidt et al., 2003).

2.4 Weitere Kandidatengene bei CMS

Nicht bei allen Patienten mit gesichertem CMS konnte die molekulare Basis der Erkrankung nachgewiesen werden. Einige dieser Patienten weisen phänotypische Besonderheiten auf, die bei den bislang molekular charakterisierten CMS nicht beobachtet wurden, z.B. CMS mit reduzierter Transmitterquantenfreisetzung (Maselli et al., 2001), CMS mit reduzierter Vesikeldichte (Walls et al., 1993) oder die sog. Gliedergürtel-Form der Myasthenie mit tubulären Aggregaten (McQuillen, 1966; Sieb et al., 1996).

Aus diesem Grund muss es noch weitere, bisher nicht identifizierte CMS-Gene geben. Insbesondere Gene, die spezifisch an der neuromuskulären Endplatte exprimiert werden, bieten sich als Kandidaten an. Ebenso könnten Mutationen von Genen, die regulatorische Funktionen auf Synapsen-spezifische Gene ausüben, oder von Genen, die für die spezifische Faltung, den Transport oder das Assemblieren von Synapsenproteinen verantwortlich sind, eine gestörte Signaltransduktion an der neuromuskulären Endplatte verursachen und damit zu CMS führen.

C Zielsetzung

Unser Labor verfügt über ein Kollektiv von über 250 unabhängigen CMS-Patienten verschiedener Herkunft. Das Ziel dieser Promotionsarbeit liegt darin, den genetischen Hintergrund für das CMS bei den einzelnen Patienten zu bestimmen und die identifizierten Mutationen – falls noch nicht anderweitig geschehen - funktionell zu charakterisieren.

Dazu sollen die bekannten CMS-Gene (AChR-Untereinheiten (*CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRND*, *CHRNE*), *RAPSN*, *CHAT*, *COLQ*, *MUSK*) bei Patienten durch PCR und direkte Sequenzierung analysiert werden.

Ausgewählte Mutationen sollen anschließend – je nach Art der vorliegenden Mutation – durch Analyse von Muskel-RNA oder –Protein, oder durch *in vitro* Zellkulturexperimente näher untersucht werden. Die funktionelle Charakterisierung soll zum einen die Pathogenität der Mutation sicherstellen, zum anderen den Wirkmechanismus der Mutation an der Endplatte aufdecken.

CMS sind eine klinisch sehr heterogene Erkrankungsgruppe, trotz einzelner spezifischer Merkmale gelingt eine sichere Abgrenzung der CMS-Unterformen anhand klinischer Kriterien in den meisten Fällen nicht. Die genaue Klassifizierung eines CMS ist jedoch für den einzelnen Patienten von großer klinischer Bedeutung. In Abhängigkeit vom genetischen Befund und vom Pathomechanismus der Mutation stehen den Patienten unterschiedliche Therapieoptionen zur Verfügung. Die Molekulargenetik ersetzt die vor wenigen Jahren noch erforderlichen invasiven Eingriffe (z.B. Biopsie des *M. intercostalis*) zur Klassifizierung des CMS beim jeweiligen Patienten.

Die funktionelle Analyse von CMS-Mutationen trägt des Weiteren dazu bei, neue grundlegende Erkenntnisse über Moleküle an der neuromuskulären Endplatte zu gewinnen betreffend Aktivität, Expression, Regulation, kinetischen Eigenschaften und Interaktionen mit anderen Proteinen. Die neuromuskuläre Endplatte dient dank ihrer Größe, ihrer relativ einfachen Struktur und ihrer guten Zugänglichkeit im Vergleich zu Synapsen des Zentralnervensystems seit vielen Jahren auch als Modell für die komplexere zentrale Signalübertragung.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Verbreitung häufigerer CMS-Mutationen bei CMS-Patienten unterschiedlicher Nationalitäten oder ethnischer

Zugehörigkeit, sowie eine genaue Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Diese Informationen sollen dazu dienen, die zukünftige genetische Diagnostik bei CMS-Patienten zu vereinfachen und zu optimieren.

C Material und Methoden

1. Patienten

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

2. Chemikalien

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

3. Molekulargenetische Methoden

3.1 DNA-Extraktion

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

3.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Mit dem Lösungsmittel der Nukleinsäure-Probe wird der Nullabgleich durchgeführt. Die DNA- bzw. RNA-Probe wird 1:50 oder 1:100 verdünnt. Bei den Wellenlängen von 260 und 280 nm (260 nm = Absorptionsmaxima von DNA und RNA; 280 nm = Absorptionsmaxima von Proteinen bzw. der enthaltenen aromatischen Aminosäuren) werden die Proben vermessen. Einer OD-Einheit entspricht eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml (doppelsträngige DNA). Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} läßt sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmen.

Zur Berechnung verwendete Faktoren:

1 OD₂₆₀ entspricht 40 µg/ml einzelsträngige DNA oder RNA

1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml doppelsträngige DNA

1 OD₂₆₀ entspricht 33 µg/ml Oligonukleotide

3.3 RNA-Extraktion aus Muskelgewebe

Die Extraktion der gesamtzellulären RNA erfolgte aus Muskelgewebe, das durch eine offene Muskelbiopsie gewonnen wurde. Die RNA-Präparation wurde entsprechend einem Standard-Protokoll durchgeführt (Chomczynski and Sacchi, 1987). Dabei sollte der Gewebeaufschluss auf Trockeneis erfolgen. Ein linsengroßes, bei -80°C tiefgefrorenes Muskelgewebe wird fein zermörsert und nach Zusatz von 500 µl kalter Guanidiniumthiocyanat-Lösung (GSCN-Lsg.) mittels Ultra Turrax (Pellet Pestle Motor, Kontes) homogenisiert. Nach Abzentrifugieren der festen Bestandteile wird der Überstand einer sauren Phenolbehandlung unterzogen und anschließend mit Ethanol gefällt. Das entstandene Pellet wird erneut in 400 µl GSCN-Lsg. gelöst, gefällt und in 400 µl RNase freiem Wasser (RNase-free water, Amersham) aufgenommen. Es schließt sich eine Behandlung mit neutralem Phenol-Chloroform (pH 7,5) an. Das entstandene Pellet wird dann in ca. 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und für 5min bei 65°C gelöst. Die RNA Konzentration wird photometrisch bestimmt und die Güte der Isolierung über ein 1,5% Agarosegel kontrolliert.

3.4 RNA-Extraktion aus Zellen

Gesamt-RNA aus HEK 293-Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert.

3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.5.1 Prinzip der PCR

Bei den zu untersuchenden Genen wurden die gesamten bzw. Teile der kodierenden Regionen, flankierende intronische Regionen und zum Teil auch Promotorregionen der entsprechenden Gene mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaktion = PCR) amplifiziert. Das von Mullis entwickelte Verfahren ermöglicht die exponentielle *in vitro* Vermehrung definierter DNA Stücke (Mullis, 1990).

3.5.2 PCR-Primer

Die verwendeten Primer wurden entworfen, basierend auf in der Genbank veröffentlichten Sequenzen der zu untersuchenden Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) und durch die Abteilung von Herrn Dr. G. Arnold, Genzentrum, LMU-München synthetisiert. Eine Liste der für die Routinesequenzierung und RFLP-Analyse verwendeten PCR-Primer befindet sich im Anhang.

3.5.3 PCR-Reaktionsbedingungen

Standard-PCR-Protokoll:

Ein typischer PCR-Ansatz enthält in 50 µl Reaktionsvolumen:

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

50 pmol sense Primer

50 pmol antisense Primer

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

100-500 ng genomische DNA

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

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

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

Ein typisches PCR Programm umfasst:

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

Modifikationen des Standard-PCR-Protokolls:

Um DNA Fragmente größer als 2 kb zu amplifizieren, wurde im Reaktionsansatz Expand long Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Um bei geringen Konzentrationen an Ausgangs-DNA ausreichende Mengen PCR-Produkt zu erhalten oder um Restriktionsschnittstellen in PCR-Produkte einzufügen, wurde eine sogenannte Nested-PCR-Analyse durchgeführt, indem einer PCR eine weitere PCR mit Primern, die sich innerhalb des ersten PCR-Produkts befinden, nachfolgt.

Um zusätzlich eine neue Restriktionsschnittstelle in ein PCR-Produkt einzufügen, wurden sogenannte Mismatch-Primer mit einer entsprechend modifizierten Base verwendet.

3.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

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

3.7 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgte teilweise durch die Abteilung von Herrn Dr. H. Blum, Genzentrum, LMU-München und teilweise durch die Firma SeqLab, Göttingen, mit DNA-Sequenziergeräten der Firma Applied Biosystems (ABI Prism 377) und fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Terminatoren. Die Sequenzen wurden anschließend auf potentielle Mutationen untersucht. Der Vergleich mit der entsprechenden Wildtypsequenz erfolgte computergestützt online über den Server des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3.8 Genotypenanalyse

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

3.9 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus- (RFLP) Analyse

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

3.10 Reverse-Transkriptase-PCR

Nachweis und Analyse von RNA-Transkripten erfolgte durch Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR). Dabei diente aus Muskelgewebe gewonnene Gesamt-RNA als Matrize für die cDNA-Erststrangsynthese. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels M-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas) entsprechend den Angaben des Herstellers. Als Ausgangsmaterial dienten 0,5–5 µg Gesamt-RNA und 0,2 µg Random Hexamer Primer

(Invitrogen). Die Reverse Transkriptase wird nach erfolgter cDNA-Synthese bei 70°C zerstört, die cDNA kann danach sofort in einer PCR weiter verwendet werden.

3.11 Klonierungen, verwendete Plasmide

3.11.1 Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pDrive

Der pDrive-Vektor aus dem Qiagen PCR Cloning Kit wird in linearisierter Form mit U-Überhängen an beiden Enden geliefert. Die Taq-Polymerase erzeugt in einer PCR-Reaktion A-Überhänge an den Enden der PCR-Produkte. Das PCR Cloning Kit System bedient sich der selektiven Hybridisierung dieser A-Überhänge mit den U-Überhängen von pDrive. PCR-Produkte können so ohne vorherigen Restriktionsverdau direkt mit dem pDrive-Vektor ligiert werden. Die Ligation wird entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Ligationsprodukte werden in *E. coli* transformiert (siehe Kap. 3.13).

3.11.2 Klonierung von DNA-Fragmenten in den Vektor ExonTrap

Minigene wurden im ExonTrap-Vektor (MoBiTec) generiert; mit Hilfe dieses Vektors können Spleißprodukte dieser Minigene in Zellkultur erzeugt werden. Der Vektor enthält ein 5'- und ein 3'- Exon, welche durch eine 600 bp lange intronische Sequenz separiert sind. In der Mitte des Introns befindet sich eine multiple cloning site; hier wird das eukaryotische genomische DNA-Fragment (enthält Exons und Introns) inseriert. Der ExonTrap-Vektor exprimiert dann in eukaryotischen Zellen eine gespleißte RNA, die sowohl die beiden ExonTrap-Exons als auch die Exons aus dem Insert enthält.

Klonierung von CHRNE-Minigenen in ExonTrap (pET01)

CHRNE Minigene wurden konstruiert, um zu überprüfen, ob der Basenaustausch *CHRNE* IVS5-16G>A eine Spleißmutation ist. Die Minigene umfassen die genomische *CHRNE*-Sequenz von Intron 3 bis Intron 7; es wurde ein Wildtyp-Minigen und eines mit der Mutation IVS5-16G>A hergestellt. 1,5 kb lange DNA-Fragmente des Patienten mit IVS5-16G>A und einer Kontrollperson wurden mit dem Primerpaar i3BamHIs: 5'-TGGGGATCCGTGTGAGGTCTTGTCAG-3' und i7BamHIas: 5'-GGGGGATCCTTCGGGGCCACTGCT-3' amplifiziert. Beide Primer führen eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bam*HI in das PCR-Produkt ein. Das PCR-Produkt und der ExonTrap-Vektor wurden mit *Bam*HI verdaut und Insert und Vektor

anschließend ligiert. Sowohl die Orientierung des Inserts als auch die Sequenz an Position -16 in Intron 5 wurden mittels direkter Sequenzierung der Plasmide überprüft.

Klonierung von RAPSN-Minigenen in ExonTrap (pET01)

Um zu testen, ob der Basenaustausch IVS1-15C>A eine Spleißmutation ist, wurde das Exon 2 des *RAPSN*-Gens mit flankierenden intronischen Sequenzen in den ExonTrap-Vektor eingefügt. Es wurden Minigene für -15C (Wildtyp), -15A (potentielle Mutation), -15T (häufiger Polymorphismus an dieser Position) und -14G>A (fraglicher Polymorphismus) hergestellt. PCR-Fragmente (Fragmentlänge 1,6 kb) mit den Primern R1s: 5'-CATGAGTGCCTAGAGGCACGGA und R2BamHIas: 5'-GAGGATCCTCCCATTATTCCT wurden aus genomischer DNA der Patienten bzw. Kontrollen mit der entsprechenden Nukleotidkonstellation amplifiziert. Der Primer R2BamHIas führt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI ein. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *Apa*I und *Bam*HI geschnitten und in den mit *Apa*I und *Bam*HI linearisierten ExonTrap-Vektor ligiert. Die Basensequenz an Position *RAPSN* IVS1-15/-14 wurde per Sequenzierung der Plasmide überprüft.

3.11.3 Einführung der Mutation E381K in den Vektor δ AChR-pRC/CMV2

Die cDNAs der Untereinheiten des AChR liegen jeweils einzeln im Expressionsvektor pRC/CMV2 (Invitrogen) vor; es handelt sich dabei um die Maus-cDNAs der Untereinheiten α , β , δ , und ϵ . Die Aminosäuresequenzen der δ -Untereinheit von Maus und Mensch sind zu 80% identisch, Aminosäure E381 entspricht E384 in der Maus-Sequenz.

Die Mutation E381K wurde durch PCR-Mutagenese eingeführt. Mit den Primern 5'-tctcacttaagtcccgcagtgacctcatgtttAag und 5'-gacaactggaaccaggtggccccg wurde ein Teil der δ -Untereinheit amplifiziert; der forward-Primer fügt über einen Mismatch die Mutation ein (G>A) und deckt gleichzeitig eine in der Wildtyp-Sequenz vorhandene *Afl*III-Schnittstelle ab. Das PCR-Fragment enthält außerdem eine *Nde*I-Schnittstelle, welche im gesamten Konstrukt nur einmal vorhanden ist. So kann das *Afl*III/*Nde*I-Fragment aus dem Vektor gegen das mutierte *Afl*III/*Nde*I-Fragment aus der PCR ausgetauscht werden. Bei den erhaltenen Klonen wird das eingefügte Teilstück sequenziert, um das Vorhandensein der Mutation E381K zu bestätigen und um unerwünschte Sequenzveränderungen aus der PCR auszuschließen.

Das Rapsyn-pEGFP-N1-Plasmid für die Ko-Lokalisationsstudien wurde von Dr. David Beeson (Oxford, UK) zur Verfügung gestellt.

3.12 Ligation

Die Ligation von Insert und Vektor bei einer Klonierung wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) anhand des Protokolls des Herstellers durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden bei 16°C über Nacht inkubiert. Vor der Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* wurde die Ligase 20 min bei 65°C inaktiviert.

3.13 Transformation von Bakterien

Unter Transformation versteht man das Verfahren zur Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Die Transformation der kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen (Invitrogen) wurde nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt (Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C).

3.14 Bakterienkultur

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α verwendet (Invitrogen). Die Bakterien wurden bei 37°C in LB (Luria-Bertani)-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin, Endkonzentration 100 μ g/ml oder Kanamycin, Endkonzentration 50 μ g/ml) zur Selektion oder auf LB-Platten kultiviert.

3.15 Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die erwünschte Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen, 3 ml Bakterienkultur) bzw. für größere Plasmidmengen mit Hilfe des QIAprep Maxiprep Kits (Qiagen) oder des Genopure Plasmid Maxi Kits (Roche, 250 ml Bakterienkultur) anhand des Protokolls der Hersteller gereinigt.

4 Zellkultur

Zur Analyse von Spleißprodukten der *CHRNE*- und *RAPSN*-Minigene wird die humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie HEK 293 verwendet. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM-Medium (supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, Glutamin sowie den Antibiotika Penicillin und Streptomycin) kultiviert. Die Medien und Reagenzien für die Zellkultur wurden von den Firmen Gibco/Invitrogen sowie PAA Laboratories GmbH erworben.

4.1 Transfektion von HEK 293-Zellen zur RNA-Analyse

HEK 293-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 6-well-Platten oder 10 cm-Schalen ausgesät, so dass sie bei der Transfektion eine etwa 50%ige Konfluenz aufwiesen. Die Transfektion wurde mit dem Reagens FuGENE (Roche, Mannheim) anhand des Protokolls des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion durch Trypsinieren geerntet, bei -80°C aufbewahrt oder sofort weiter verarbeitet (RNA-Analyse).

4.2 Transfektion von HEK 293-Zellen nach der Calciumphosphat-Methode

HEK 293-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 6-well-Platten ausgesät (10^5 bis 3×10^5 Zellen pro well). Vor Aussähen der Zellen wurden Glasdeckgläschen in die wells gelegt. 1 Stunde vor der Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt (2 ml Medium pro well).

Die DNA-Calciumphosphat-Kopräzipitate wurden folgendermaßen vorbereitet: Für 2 ml Kulturmedium wurden 200 µl Transfektionsmix angesetzt. Die Plasmid-DNA wurde mit 10 µl Calciumchloridlösung versetzt und mit 0,1x TE auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Dann wurden 100 µl 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 und Rapsyn wurden folgende Plasmidmengen eingesetzt: α : β : δ : ϵ : Rapsyn = 5 µg : 2,5 µg : 2,5 µg : 2,5 µg : 2,5 µg.

<i>0,1x TE:</i>	<i>1 mM Tris-Cl pH 7,6</i> <i>0,1 mM EDTA</i> <i>sterilfiltriert</i>
<i>CaCl₂:</i>	<i>2,5 M CaCl₂</i> <i>sterilfiltriert</i>
<i>2x HEPES/Saline:</i>	<i>140 mM NaCl</i> <i>1,5 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O</i> <i>50 mM HEPES</i> <i>pH 7,05 mit NaOH einstellen</i> <i>sterilfiltriert</i>

5 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 µg/ml AlexaFluor®594-Bungarotoxin in PBS inkubiert. Da die Zellen vor der Inkubation mit Bungarotoxin nicht permeabilisiert wurden, wurden nur AChR an der Zelloberfläche fluoreszenzmarkiert. Nach der Färbung wurden die Deckgläschen 5-mal mit PBS gewaschen, mit Dako® Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingedeckt, getrocknet und mit Nagellack versiegelt.

Die Zellen wurden mit einem Leica DM RBD Mikroskop und einer Zeiss AxioCam HR Kamera analysiert und fotografiert. Für die konfokale Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskopie wurden die Färbungen mit einem Krypton-Argon Laser (Leica TCS NT System, Leica Microsystems) und einem Leica DM IRB/E Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

6 Analyse von AChE/ColQ-Komplexen aus Muskelgewebe

6.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Muskelgewebe

Für die Extrakte verwendet man ca. erbsengroße Stücke von Muskel-Biopsien eines Patienten bzw. einer gesunden Person (Kontrollmuskel). Die gefrorenen Muskelstücke werden in

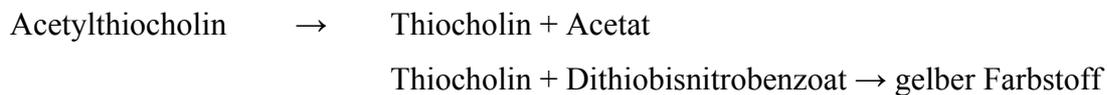
vergleichen zu können, und um die Sedimentationskoeffizienten der AChE/ColQ-Komplexe zu berechnen.

Die Gradienten werden in einer Beckman-Ultrazentrifuge im Swing-out-Rotor Ti41SW für 21 h bei 4°C und 38000 rpm zentrifugiert.

Die Gradienten werden nach der Zentrifugation in 250 µl-Fractionen aufgeteilt (Abnahme der Fractionen erfolgte von oben mit einer Pipette). In allen Fractionen werden die AChE- und β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

6.4 Bestimmung der AChE-Aktivität

Die Aktivität der AChE wird mit der kolorimetrischen Methode nach Ellman bestimmt (Ellman et al., 1961). Sie beruht auf folgender Reaktion:



Acetylthiocholin ist ein Analogon des natürlichen Substrats Acetylcholin. Seine Hydrolyserate wird mit Hilfe des Reagenz Dithiobisnitrobenzoat (DTNB) gemessen, das mit Thiocholin zum gelben Anion der 5-Thio-2-Nitro-Benzoessäure reagiert. Die Absorption wird bei 412 nm gemessen. Die Messung wird in Mikrotiterplatten durchgeführt. Für einen Ansatz werden folgende Mengen pipettiert:

7 µl	DTNB-Lösung
x µl	Lysat
(200-x) µl	Phosphatpuffer pH 7,0
1,5 µl	Acetylthiocholiniodidlösung

Die Reaktion wird durch Zugabe des Substrates gestartet. Die Enzymreaktion wird über 10 min verfolgt, wobei alle 10s ein Messwert aufgenommen wird.

Aus der Steigung ($\Delta\text{OD}/\Delta t$) kann auf die Reaktionsgeschwindigkeit geschlossen werden und diese wird dann als Messgröße auf der y-Achse gegen die Zahl der Fractionen auf der x-Achse in einem Diagramm aufgetragen.

<i>Puffer</i>	0,1M Phosphatpuffer pH7,0 bzw. 8,0
<i>Substrat</i>	0,075M (21,67 mg/ml) Acetylthiocholin-Iodid (Sigma)
<i>Reagenz</i>	0,01M Dithiobisnitrobenzoessäure (DTNB) (Sigma): 39,6 mg in 10 ml Phosphatpuffer pH 7 + 15 mg NaHCO ₃

6.5 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Die Aktivität der β -Galaktosidase wird mit einem kommerziellen Chemilumineszenz Reporter Gene Assay System (Tropix) bestimmt. Der Assay beruht auf einer zweistufigen Reaktion. Im ersten Schritt wird das Substrat Galacton PlusTM durch die β -Galaktosidase deglykosyliert. Diese Reaktion findet in einem Reaktionspuffer neutralen pH-Wertes (7,8) statt. Bei diesem pH-Wert wird das abgespaltene Dioxetan protoniert. Dieses protonierte, stabile Zwischenprodukt akkumuliert während der Inkubationszeit. Es wird deprotoniert und zerfällt unter Lichtemission (475 nm) sobald der pH-Wert durch Zugabe des Light Emission Accelerator auf 12 erhöht wird. Die Lumineszenz wird einige Sekunden nach Zugabe des Accelerators in einem Luminometer gemessen und in relativen Light Units angegeben.

Durchführung: Das Substrat Galacton-Plus wird in Reaction Buffer Diluent 1:100 verdünnt und je 100 μ l in jedes Messröhrchen gegeben. Von jeder Fraktion werden je 20 μ l zugegeben und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird durch Zugabe von 150 μ l Light Emission Accelerator die Lichtreaktion gestartet und die Emission gemessen.

E Ergebnisse

In Zusammenarbeit mit deutschen und ausländischen neuropädiatrischen Zentren gelang es unserer Arbeitsgruppe, über 250 nicht verwandte CMS-Patienten zu erfassen und klinisch zu charakterisieren. Die CMS-Patienten stammen aus 25 verschiedenen Ländern, vorwiegend aus Europa, jedoch auch z.B. aus Kanada, dem Nahen Osten, Indien, Pakistan, Nordafrika oder Australien. Deutschen Ursprungs sind etwa ein Drittel der Patienten (78).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mutationssuche in allen bekannten CMS-Genen durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Frau Prof. Angela Hübner (Abteilung für Kinderheilkunde, Technische Universität Dresden) wurden vor einer Untersuchung einzelner Gene durch direkte Sequenzierung in informativen Familien Haplotypenanalysen durchgeführt. In sechs der neun bekannten CMS-Gene konnten in unserem Patientenkollektiv Mutationen nachgewiesen werden.

Die der Erkrankung zu Grunde liegende genetische Veränderung konnte in unserem Labor bei 54% der Patienten ermittelt werden. Am häufigsten sind postsynaptische CMS (85% der Mutationen), präsynaptische Fälle sind am seltensten (6%). 67% der identifizierten Mutationen liegen im *CHRNE*-Gen, die zweithäufigste genetische Ursache für CMS sind *RAPSN*-Mutationen (16,5%). *CHRNA1* und *CHRND*-Mutationen wurden nur bei jeweils einem Patienten gefunden (Abbildung 3).

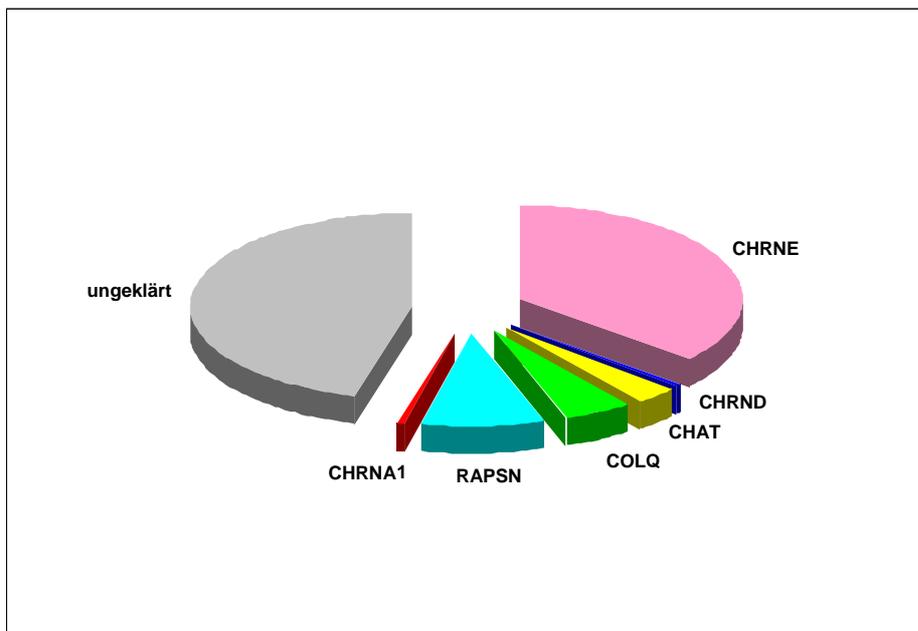


Abbildung 3: Verteilung der in unserem Patientenkollektiv nachgewiesenen Mutationen in 6 der 9 bislang bekannten CMS-Gene. In 46% der Patienten konnte die genetische Ursache des CMS bislang noch nicht ermittelt werden.

1 Analyse der AChR-Untereinheiten

1.1 Analyse des *CHRNA1*-Gens

Im *CHRNA1*-Gen wurde bei einer Patientin aus Äquatorial-Guinea die Mutation G153S (457G>A) heterozygot nachgewiesen. Diese Mutation wurde bereits publiziert und ist als dominante Slow-Channel-Mutation ausführlich charakterisiert worden (Croxen et al., 1997; Sine et al., 1995).

Die Patientin ist 39 Jahre alt, bei keinem Familienangehörigen (Eltern, 14 Geschwister) war eine neuromuskuläre Erkrankung bekannt. Die ersten Myasthenie-Symptome machten sich im Alter von 25 Jahren bemerkbar. Die Erkrankung verlief progressiv, mit einer schwerwiegenden, belastungsabhängigen generalisierten Schwäche. Betroffen war vor allem die Muskulatur der Extremitäten. Da die Creatinkinase leicht erhöht war, wurde die Erkrankung als myopathische Myasthenie eingestuft. Das deutliche Dekrement in der repetitiven Stimulation sowie die Doppelantwort auf einen nervalen Einzelreiz wiesen jedoch entweder auf eine *COLQ*-Mutation oder auf ein Slow-Channel-Syndrom hin.

1.2 Analyse des *CHRND*-Gens

Bei einem deutschen CMS-Patienten wurden zwei compound heterozygote Mutationen im Gen kodierend für die δ -Untereinheit des AChR (*CHRND*) gefunden. *CHRND*-Mutationen sind sehr seltene genetische Ursachen für CMS, bislang sind weltweit nur 7 *CHRND*-Mutationen beschrieben (Engel and Sine, 2005).

Der Patient ist das dritte Kind einer nicht-konsanguinen deutschen Familie, die Familienanamnese bezüglich neuromuskulärer Erkrankungen war leer. In der neonatalen Periode fiel der Säugling durch eine generalisierte muskuläre Schwäche und Hypotonie auf. Hinzu kamen eine Trinkschwäche, häufiges Verschlucken, eine bilaterale Ptose sowie eine Schwäche der mimischen Muskulatur. Im Alter von 7 Monaten kam es während eines Infektes zu Apnoen, die eine maschinelle Beatmung erforderlich machten. Im Verlauf von respiratorischen Infekten kam es danach immer wieder zu krisenhaften Verschlechterungen der Symptomatik. Im Alter von 18 Monaten wurde die Diagnose eines CMS gestellt und eine Therapie mit Mestinon begonnen, welche eine generelle Verbesserung der Symptomatik zur Folge hatte.

Eine Haplotypenanalyse in der Familie führte zum Ausschluss einer Kopplung der Erkrankung zu den Genen *CHAT*, *CHRNE* und *CHRNBI*, per direkte Sequenzierung wurden

Mutationen in den Genen *RAPSN*, *CHRNA1* und *MUSK* ausgeschlossen. Eine synaptische CMS-Form mit Esterasedefizienz (*COLQ*-Mutationen) kam wegen der eindeutigen symptomatischen Besserung des Patienten auf eine Therapie mit Esteraseinhibitoren nicht in Frage.

Die Daten aus der Haplotypenanalyse bezüglich des *CHRND*-Gens ließen keine Aussage zu einer möglichen Kopplung der Erkrankung zu diesem Locus zu. Es wurde nur ein einziger intragenischer Marker zu diesem Gen analysiert, welcher allerdings in der Familie nicht informativ war. Beide Eltern hatten jeweils Fragmentlängen von 279 und 283 bp, mit der Folge, dass die Allele bei den Kindern nicht zugeordnet werden konnten. Aus diesem Grund wurde das *CHRND*-Gen beim Patienten direkt sequenziert.

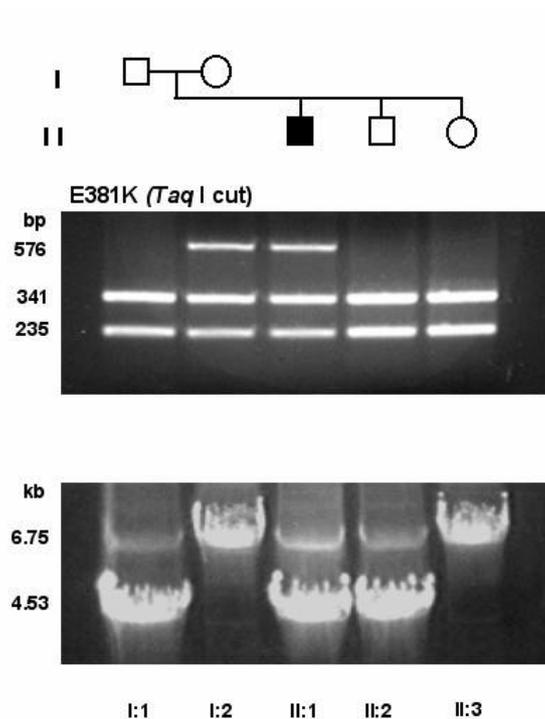


Abbildung 4: Oberes Gelbild: RFLP-Analyse auf die Mutation E381K in Exon 10 des *CHRND*-Gens. Die Mutation beseitigt eine *TaqI*-Schnittstelle. Der Patient (II:1) und seine Mutter sind heterozygote Träger der Mutation, der Vater und die zwei Geschwister tragen die Mutation nicht. Unteres Gelbild: Long-range-PCR im *CHRND*-Gen mit dem Primerpaar D4s und D8a. Beim Patienten, seinem Vater und seinem Bruder wurde zusätzlich zu der berechneten Bande von 6,75 kb eine kürzere Bande von 4,5 kb erhalten.

In Exon 10 des *CHRND*-Gens konnte eine heterozygote Sequenzvariation (1141G>A) identifiziert werden, welche zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz (E381K) an dieser Stelle führt. In 100 untersuchten Kontrollpersonen ließ sich diese Sequenzvariation nicht

nachweisen. Die Mutter des Patienten ist ebenfalls heterozygote Trägerin dieser Mutation, der Vater und die beiden gesunden Geschwister tragen die Mutation nicht (Abbildung 4).

Da die Mutter des Patienten, die diese Mutation auch trägt, gesund ist, konnte es sich nicht um eine dominante Mutation handeln. Es konnte jedoch weder in den kodierenden Regionen und den angrenzenden intronischen Bereichen, noch im Promotor des *CHRND*-Gens eine weitere Mutation identifiziert werden.

Aufgrund der Ergebnisse bei einem Patienten mit einer Mikrodeletion im *RAPSN*-Gen (siehe Kapitel E 2.3) wurde auch bei diesem Patienten eine Mikrodeletion von Teilen des *CHRND*-Gens auf dem paternalen Allel vermutet. Um eine derartige Mutation nachzuweisen, wurden Long-range-PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen über mehrerer Exons hinweg durchgeführt.

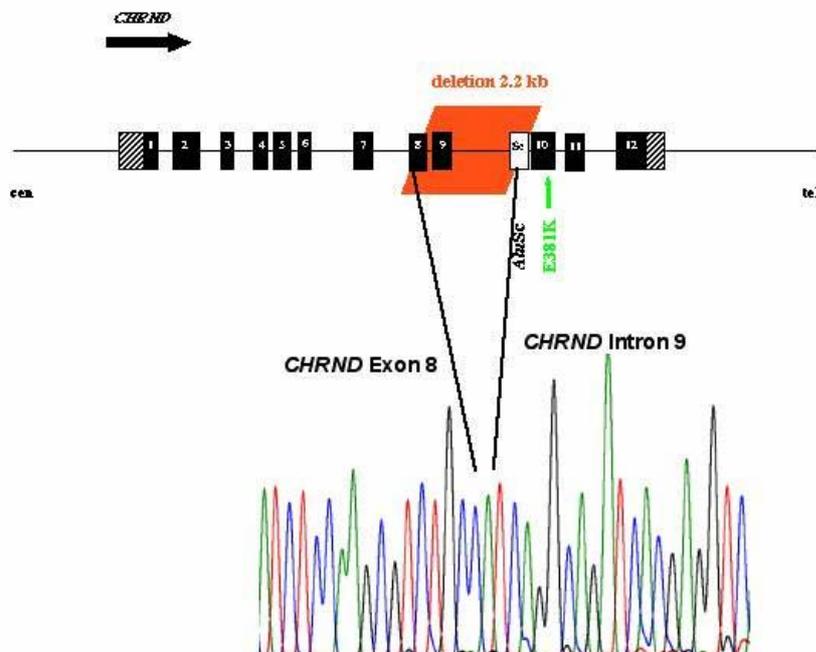


Abbildung 5: Schema des *CHRND*-Gens und Lokalisation der Mikrodeletion von 2,2 kb (orange markiert). Die Exons sind durch schwarze Rechtecke dargestellt, repetitive Elemente in den Introns durch weiße Blöcke. Die Deletion beginnt in Exon 8 und erstreckt sich bis in ein AluSc-Element in Intron 9. B. Flankierende Sequenzen an den Bruchpunkten der Deletion.

Bei einer PCR mit dem Primerpaar D4s (Intron 5) und D8a (3'-UTR Exon 12) ergab sich beim Patienten, seinem Vater und dem gesunden Bruder zusätzlich zur erwarteten Bande von 6746bp eine zusätzliche kürzere Bande von etwa 4,5 kb (Abbildung 4). Bei der Sequenzierung dieser Bande mit dem Primer D6s (in Intron 7) wurden die genauen

Deletionsbruchstellen erfasst. Die Mikrodeletion beginnt in Exon 8 und erstreckt sich bis in ein *AluSc*-Element in Intron 9, d.h. Teile von Exon 8 und das gesamte Exon 9 sind nicht vorhanden (siehe Abbildung 5). Bei der zweiten, compound heterozygoten Mutation im *CHRND*-Gen bei diesem Patienten handelte es sich damit um eine paternal vererbte Mikrodeletion von 2,2 kb.

Funktionelle Charakterisierung der Mutation *CHRND* E381K:

Die Missense-Mutation betrifft eine Aminosäure im Bereich der cytoplasmatischen Schleife der δ -Untereinheit, die über Speziesgrenzen hinweg hoch konserviert ist (Abbildungen 6 und 7). Bislang ist noch keine Missense-Mutation in der cytoplasmatischen Schleife der δ -Untereinheit bekannt.

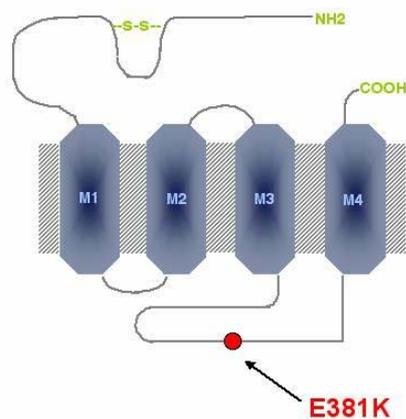


Abbildung 6: Die Mutation *E381K* liegt in der cytoplasmatischen Schleife zwischen den Transmembranregionen 3 und 4 der delta-Untereinheit des AChR.

δ-subunit

		E381K		
human	AEEYFLLKSRSDLMF	▼	E	KQSERHGLARRLTTA
bovine	AEEYFSLKSRSDLMF		E	KQSERHGLARRLTTA
mouse	AEEYFSLKSRSDLMF		E	KQSERHGLARRLTTA
rat	AEEYFSLKSRSDLMF		E	KQSERHGLARRLTTA
frog	AEEYYSVKSRSELMF		E	KQSERHGLTSRATPA
chicken	AEEYYSVKSRSELMF		E	KQSERHGLASRVTPA
danio rerio	AEEYYSVKSRSELMF		E	KQSERHGLAARPTPK
electric ray	AQEYFNIKSRSELMF		E	KQSERHGLVPRVTPR
takifugu rubripes	AEEYDSVKSRSELMF		E	KQSGRHG-----

ε-subunit

human AEEILKKPRSELV F E GQRHRQGTWTA AFCQ

γ-subunit

human GEEVALCLPRSELL F Q QQWRQGLVAALEKL

Abbildung 7: Die Aminosäure E381 ist über Speziesgrenzen hinweg in allen AChR-delta-Untereinheiten konserviert, sowie auch in der menschlichen epsilon-Untereinheit. Die Proteinsequenzen wurden der NCBI-Datenbank entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>).

Die Pathogenität der Missense-Mutation E381K sollte anschließend in funktionellen Studien belegt werden. Dazu wurde die Mutation in den entsprechenden cDNA-Vektor (δAChR-pRC/CMV2) mittels PCR-Mutagenese eingeführt.

Die Expression der mutierten delta-Untereinheit wurde in *in vitro*-Experimenten getestet. Dabei wurde δE381K-pRC/CMV2 zusammen mit den anderen Untereinheiten (αAChR-pRC/CMV2, βAChR-pRC/CMV2 und εAChR-pRC/CMV2) in HEK-293-Zellen transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die AChR an der Zelloberfläche 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 delta-Untereinheit enthalten, exprimiert werden. Als Negativkontrolle wurden HEK 293-Zellen nur mit den Untereinheiten α, β und ε transfiziert. Hier wurde nur eine gleichmäßige, blassrote Färbung der Zellen erhalten (Abbildung 8A, rechts). Sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante wurde ein ähnliches, punktiertes Färbungsmuster erhalten (Abbildung 8), die Färbungsintensitäten waren identisch. Die Mutation δE381K führte nicht zu einer vom Wildtyp abweichenden Lokalisation des Rezeptors in der Zelle.

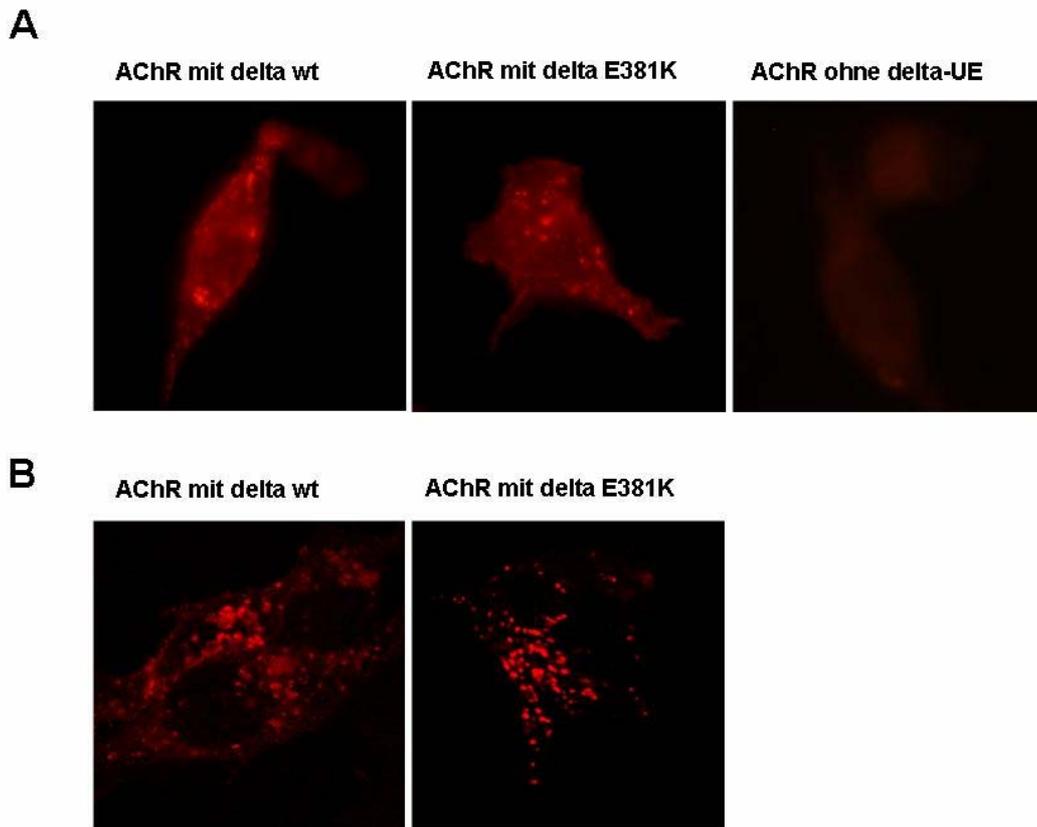


Abbildung 8: Transfizierte HEK 293-Zellen; die AChR an der Zelloberfläche wurden AlexaFluor®594-Bungarotoxin markiert und im konventionellen Fluoreszenzmikroskop (A) und mittels konfokaler Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskopie (B) analysiert. Links Wildtyp-AChR, in der Mitte AChR mit mutierter delta-Untereinheit (E381K), in A rechts Zellen nur transfiziert mit den AChR-Untereinheiten α , β und ϵ .

Es wurde bereits gezeigt, dass die cytoplasmatischen Schleifen aller AChR-Untereinheiten für Interaktion des AChR mit Rapsyn und das Clustern dieser beiden Moleküle eine entscheidende Rolle spielen (Huebsch and Maimone, 2003). Deshalb sollte nun untersucht werden, ob die Mutation δ E381K einen Einfluss auf die Wechselwirkung von AChR und Rapsyn haben könnte. Dafür wurden Ko-Transfektionen der AChR-Untereinheiten mit der Rapsyn-EGFP im Vektor pEGFP-N1 durchgeführt und die Ko-Lokalisation bzw. das Ko-Clustering des AChR mit Rapsyn untersucht.

Wie bereits von anderen Labors festgestellt, kommt es in heterologen, transfizierten Zellen auch beim Wildtyp-AChR nicht zu einem vollständigen Ko-Clustering des Rezeptors mit Rapsyn, so wie es unter physiologischen Bedingungen an der Endplatte der Fall ist (Ohno et al., 2002). Aus diesem Grund wurden jeweils 100 ko-transfizierte Zellen aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten im konventionellen Fluoreszenzmikroskop

fotografiert und das Cluster-Verhalten ausgewertet. Wurden HEK 293-Zellen mit den Wildtyp-AChR – Untereinheiten und Rapsyn transfiziert, finden sich in 67% der Zellen gemeinsame Cluster der beiden Moleküle (Abbildung 9; Abbildung 10 zeigt ein Beispiel einer Zelle mit AChR-Rapsyn-Clustern an der Zellmembran). Im Fall der Mutation E381K konnten nur in 33% der Zellen gemeinsame Cluster detektiert werden; es handelte sich dabei meistens auch nur um 2-3 gemeinsame Cluster pro Zelle.

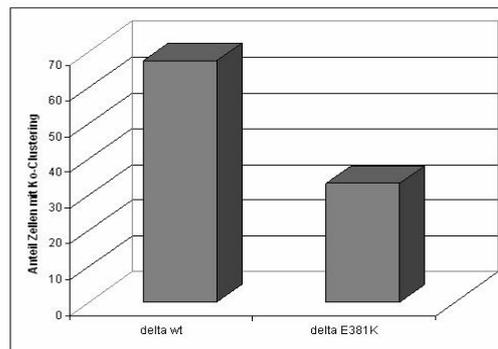


Abbildung 9: 100 ko-transfizierte HEK 293-Zellen (Wildtyp-AChR + Rapsyn-EGFP bzw. deltaE381K-AChR + Rapsyn-EGFP) wurden auf gemeinsame Cluster von AChR und Rapsyn untersucht. Im Fall der Mutation deltaE381K ist die Anzahl der Zellen mit gemeinsamen Clustern um die Hälfte reduziert (67% zu 33%).

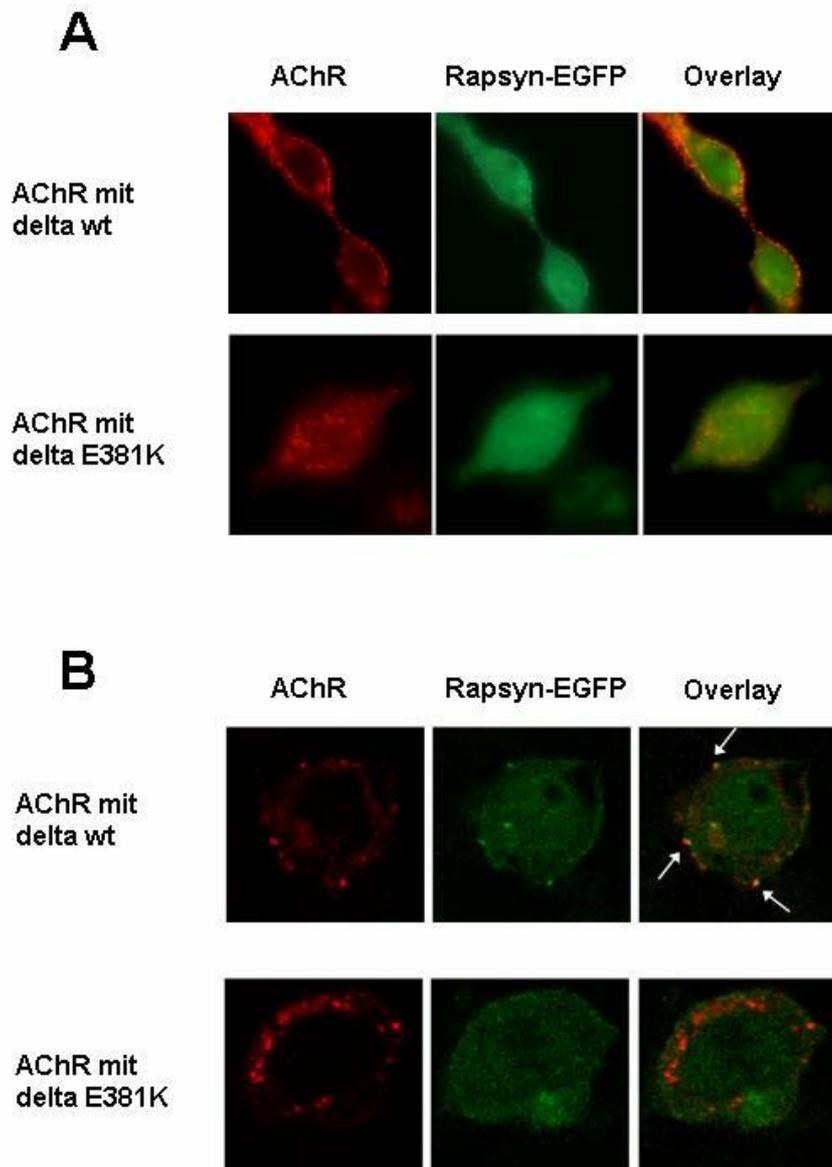


Abbildung 10: Mit AChR-Untereinheiten und Rapsyn-EGFP ko-transfizierte HEK 293-Zellen. Rapsyn-EGFP ist grün dargestellt (Mitte). Die AChR an der Zelloberfläche wurden AlexaFluor®594-Bungarotoxin markiert (rote Färbung, links) und im konventionellen Fluoreszenzmikroskop (A) und mittels konfokaler Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskopie (B) analysiert. Rechts jeweils die Überlagerung der Färbungen; gemeinsame Strukturen erscheinen gelb. AChR-Rapsyn-Cluster sind in B mit weißen Pfeilen markiert.

1.3 Mutationen des *CHRNE*-Gens

Mutationen im Gen kodierend für die epsilon-Untereinheit des Acetylcholinrezeptors sind die häufigste Ursache eines CMS (neueste Übersicht dazu in (Beeson et al., 2005)). Aufgrund dieser Tatsache wurde das *CHRNE*-Gen bei fast allen Patienten routinemäßig sequenziert, vor allem wenn eine generell milde Ausprägung der Erkrankung, ein gutes Ansprechen auf Esteraseinhibitoren, sowie eine Ptose in Kombination mit Ophthalmoparese beim Patienten vorlagen. Bei CMS Patienten aus 40 unabhängigen Familien wurden *CHRNE*-Mutationen nachgewiesen. Besonders häufig wurde die Mutation $\epsilon 1267\text{delG}$ nachgewiesen (22 Familien, vorwiegend Angehörige der Volksgruppe der Roma); diese Verteilung ist bedingt durch den hohen Anteil von Patienten aus Südosteuropa in unserem Patientenkollektiv.

Die klinischen Symptome der Patienten mit *CHRNE*-Mutationen sind in Tabelle 1 zusammengefasst, die Mutationen sind in Abbildung 11 aufgeführt:

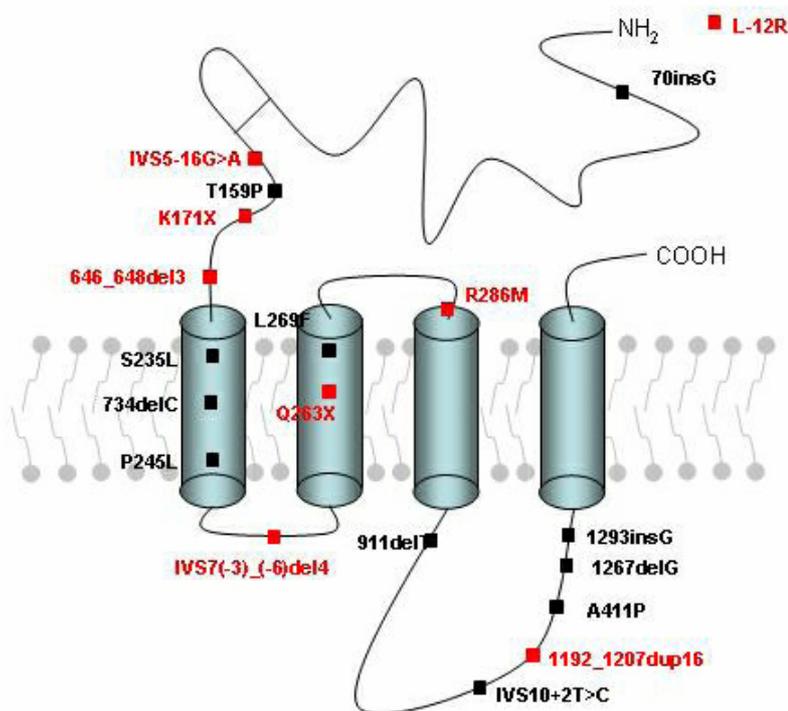


Abbildung 11: *CHRNE*-Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit in unserem Patientenkollektiv nachgewiesen wurden. Mutationen, die in dieser Arbeit erstmals beschrieben werden, sind rot markiert.

	Anzahl der Patienten/ untersuchte Patienten
Beginn der Erkrankung	neonatal - 6.Lj
Konsanguinität in der Familie	4/33
Herkunft der Patienten	<i>Roma 14, Portugal 4, Italien 3, Spanien 3, Deutschland 2, Ungarn 3 (1), Türkei 1, Cap Verde 1, Österreich 1, Iran 1, Indien 1, Serbien/Montenegro 4, Griechenland 1, ohne Angaben 1</i>
Ptose	38/38 (21/21)
Ophthalmoparese	37/37 (20/20)
Strabismus	0/37 (0/20)
bulbäre/faziale Schwäche	24/36 (16/20)
episodische Krisen - mit respiratorischer Insuffizienz	15/38 (11/21) - 8/38 (4/21)
Schwäche der Extremitäten/ des Gliedergürtels	20/36 (13/20)
generalisierte Schwäche	23/37 (13/20)
Kongenitale Kontrakturen	0/38 (0/21)
Dekrement nachweisbar	24/29 (13/16)
repetitive Antwort auf Einzelreiz	0/4 (0/3)
verzögerte motorische Entwicklung	15/36 (9/20)
Reaktion auf Esteraseinhibitoren	33/37 (20/20) positiv

Tabelle 1: Zusammenfassung der klinischen Symptome bei 40 Familien mit *CHRNE*-Mutationen (22 davon mit der Mutation 1267delG). Daten, die die Mutation 1267delG betreffen, sind mit kursiver Schrift gekennzeichnet.

1.3.1 *CHRNE*-Mutationen mit Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften des Rezeptors

1.3.1.1 Die Mutation *CHRNE* L269F

Der jetzt 14jährige spanische Patient fiel schon im Säuglingsalter durch eine allgemeine Muskelhypotonie und schwaches Schreien auf, er hatte außerdem Schwierigkeiten, den Kopf

anzuheben. Im Alter von 7 Monaten wurden eine Ptose sowie eine Ophthalmoparese bemerkt. Aufgrund eines Dekrements in der repetitiven Nervenstimulation wurde ein CMS vermutet und eine Behandlung mit Esteraseinhibitoren eingeleitet, die aber zu keiner deutlichen Besserung führte. Eine Muskelbiopsie erbrachte keine weiterführenden Hinweise, da sie nur eine unspezifische Fasertyp-II-Atrophie aufwies. Der Verlauf der Erkrankung war progredient, der Patient profitierte nicht von der Behandlung mit Esteraseinhibitoren. Im Alter von 12 Jahren entwickelte er respiratorische Insuffizienzen und musste nachts beatmet werden. Die Aktivitäten des täglichen Lebens und der Schulbesuch waren nur sehr eingeschränkt möglich.

Die zu diesem Zeitpunkt eingeleitete genetische Untersuchung führte zur Identifizierung der heterozygoten Mutation L269F (805C>T) in Exon 8 des *CHRNE*-Gens. Diese Mutation liegt in der zweiten Transmembrandomäne der epsilon-Untereinheit, ist als Slow-Channel-Mutation bereits bekannt und wird autosomal dominant vererbt (Engel et al., 1996b; Gomez and Gammack, 1995). Die gesunden Eltern des Patienten tragen die Mutation nicht, so dass es sich in dieser Familie vermutlich um eine Neumutation handelt.

Nach der Diagnose eines Slow-Channel-Syndroms wurde der Patient mit Fluoxetin behandelt, was zu einer dramatischen Verbesserung seines Zustandes führte.

1.3.1.2 Die Mutation *CHRNE* A411P

Die Mutation A411P (1231G>C) in Exon 11 wurde homozygot bei drei betroffenen Schwestern aus einer konsanguinen italienischen Familie nachgewiesen, die jetzt 37, 41 und 46 Jahre alt sind. Die Mutation ist bereits als Fast-Channel-Mutation bekannt (Wang et al., 2000), bewirkt gleichzeitig aber auch eine reduzierte Rezeptorexpression an der Zelloberfläche. Ungewöhnlich für *CHRNE*-Mutationen ist, dass eine der Schwestern zahlreiche krisenhafte Episoden mit respiratorischen Insuffizienzen in der Kindheit hatte, eine andere Schwester hatte eine ähnliche Episode nach einer Anästhesie.

1.3.2 *CHRNE*-Mutationen, die zur Rezeptordefizienz führen

Folgende *CHRNE*-Mutationen, die schon zuvor in der Literatur beschrieben waren, konnten im Rahmen dieser Arbeit bei CMS-Patienten aus unserem Kollektiv nachgewiesen werden:

- Die Frameshift-Mutationen 70insG in Exon 2 (Ohno et al., 1998a) und 1293insG in Exon 12 (Engel et al., 1996a) wurden bei mehreren Patienten aus Spanien und

Portugal nachgewiesen. Diese Mutationen kamen sowohl homozygot (70insG homozygot bei zwei portugiesischen Patienten), als auch compound heterozygot miteinander oder mit anderen Mutationen vor. Phänotypisch bemerkenswert sind zwei spanische Patientinnen mit identischem Genotyp (beide compound heterozygot für 70insG und 1293insG). Während das eine Mädchen bis auf eine leichte Ptose und Ophthalmoparese fast keine Symptome hat und keiner medikamentösen Behandlung bedarf, ist die andere Patientin in ihrem alltäglichen Leben durch die Erkrankung schwer eingeschränkt.

- Die Frameshift-Mutation 1267delG in Exon 12 (Abicht et al., 1999; Croxen et al., 1999) wurde homozygot bei 22 CMS-Familien aus der Volksgruppe der Roma oder südosteuropäischer Abstammung, sowie einem indischen Patienten nachgewiesen. Die typischen klinischen Merkmale der Patienten mit der Mutation 1267delG unterscheiden sich nicht von denen anderer Patienten mit AChR-Defizienz (siehe Tabelle 1).
- Die Frameshift-Mutation 911delT in Exon 9 (Bregman et al., 2000; Sieb et al., 2000) wurde heterozygot bei zwei nicht verwandten deutschen Patienten identifiziert (siehe unten).
- Die Frameshift-Mutation 734delC in Exon 8 (Bregman et al., 2000) wurde bei einer ungarischen Patientin in Kombination mit einer putativen Spleißmutation nachgewiesen.
- Die Missense-Mutation T159P (475A>C) in Exon 6 (Wang et al., 2000) wurde homozygot bei zwei italienischen Patienten nachgewiesen, die aus dem gleichen Dorf stammen.
- Die Missense-Mutation P245L (734C>T) in Exon 7 (Ohno et al., 1997) wurde bei einem portugiesischen Patienten heterozygot zusammen mit der Frameshift-Mutation 70insG nachgewiesen. Der Vater des Patienten trägt die Mutation 70insG ebenfalls heterozygot, bei der Mutter des Patienten ließ sich die Mutation P245L nicht nachweisen, es handelt sich somit um eine Neumutation beim Patienten.
- Die Mutation der Donor-Spleißstelle von Exon 10, IVS10+2T>C wurde homozygot bei einem Jungen türkischer Herkunft nachgewiesen. Diese Mutation könnte auf mRNA-Ebene entweder zum Verlust von Exon 10 oder zur Retention von Intron 10 in der mRNA führen. Weder von unserem Patienten, noch vom Patienten in der Erstbeschreibung dieser Mutation (Middleton et al., 1999) stand Muskelgewebe für eine RNA-Analyse zur Verfügung.

Die in dieser Arbeit identifizierten *CHRNE*-Mutationen, die bislang in der Literatur nicht beschrieben waren, sind in Abbildung 11 rot markiert. Alle unten aufgeführten Nukleotidvarianten wurden bei über 100 Kontrollpersonen nicht nachgewiesen. Sie kosegregieren in den jeweiligen Familien mit der Erkrankung und/oder liegen compound heterozygot zu einer bereits bekannten Mutation vor. Für diese Mutationen ist daher eine Pathogenität anzunehmen, die allerdings für einige davon nicht direkt durch funktionelle Studien bestätigt wurde.

- Die Missense-Mutation L-12R (-35T>G) in Exon 1 der epsilon-Untereinheit wurde homozygot bei einem afrikanischen Patienten (Cap Verde) identifiziert. Die Aminosäure R-12 liegt im Signalpeptid zum Eintransport ins Endoplasmatische Retikulum.
- Die Nonsense-Mutation K171X (511A>T) in Exon 6 wurde homozygot bei drei iranischen Geschwistern aus einer konsanguinen Familie identifiziert (Soltanzadeh et al., 2005). Alle drei Geschwister zeigen eine relativ schwere CMS-Form, mit Einsetzen der Symptome bei Geburt, generalisierter Schwäche, bilateraler Ptose, eingeschränkter Augenbeweglichkeit, und betroffener bulbärer Muskulatur (Kau- und Schluckprobleme). Bei allen drei Patienten konnte ein deutliches Dekrement in der repetitiven Stimulation festgestellt werden.
- Bei einem 15jährigen Patienten aus Österreich wurde die Mutation S235L (704C>T) homozygot in Exon 7 identifiziert. Diese Aminosäure liegt in der ersten Transmembrandomäne der epsilon-Untereinheit. Bei diesem Patienten sind nur die okulären Muskeln betroffen; in früher Kindheit erlitt er, ähnlich wie die Schwestern mit der Mutation A411P, krisenhafte Verschlechterungen mit respiratorischen Insuffizienzen.
- Die Missense-Mutation R286M in Exon 8 (entspricht 857G>T) wurde in Kombination mit 70insG bei zwei portugiesischen Brüdern identifiziert. Die gleiche Mutation wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits in einer anderen portugiesischen Familie identifiziert, hier compound heterozygot zu 1293insG.
- Eine heterozygote Deletion von vier Nukleotiden in Intron 7, IVS7(-3)₁(-6)del4, wurde bei einer ungarischen Patientin compound heterozygot zu 734delC identifiziert. Die Mutation führt zum Verlust von vier Pyrimidinen aus dem Polypyrimidintrakt vor Exon 8.

- Die heterozygote Deletion von drei Nukleotiden aus Exon 7, 646_648del3, wurde compound heterozygot zu 911delT bei einem deutschen Patienten nachgewiesen. Die Mutation führt zum Verlust eines Isoleucins an Position 216.
- Die Nonsense-Mutation Q263X in Exon 8 wurde bei einer ungarischen Patientin zusammen mit der Frameshift-Mutation 1192_1207dup16 in Exon 11 gefunden. Die Mutter der Patientin ist heterozygote Trägerin der Duplikation, der Vater trägt die Nonsense-Mutation heterozygot. Die gesunde Schwester trägt keine der beiden Mutationen.

1.3.3 Die Spleißmutation IVS5-16G>A (Müller et al., 2005)

Eine besonders interessante Mutation, die zur Rezeptordefizienz führt, identifizierten wir bei einem 18-jährigen deutschen Patienten. Der Patient hat eine nicht betroffene ältere Schwester, auch die weitere Familienanamnese bezüglich neuromuskulärer Erkrankungen ist leer. Im Säuglingsalter traten eine bilaterale tageszeitabhängige Ptose und eine eingeschränkte Augenbeweglichkeit auf. Die motorische Entwicklung verlief verzögert. Im Alter von 6 Jahren wurde der Verdacht auf das Vorliegen einer Myasthenie geäußert, eine daraufhin begonnene Mestinon-Therapie erwies sich jedoch zunächst nicht als wirksam. In einer ausführlichen neurologischen Untersuchung im Alter von 15 Jahren wurde eine Myasthenie durch den Nachweis eines pathologischen Dekrements in der repetitiven Stimulation bestätigt. Die daraufhin erneut aufgenommene Mestinon-Therapie verläuft jetzt erfolgreich.

Aufgrund der typischen klinischen Symptomatik wurde das *CHRNE*-Gen sequenziert und eine heterozygote Frameshift-Mutation in Exon 9 nachgewiesen. Diese Mutation, 911delT, wurde schon in der Literatur beschrieben (Bregman et al., 2000; Bregman JM, 2000; Sieb et al., 2000). Der Vater des Patienten trägt diese Mutation ebenfalls heterozygot, die Mutter und die Schwester tragen die Mutation nicht. Jedoch konnte beim Patienten keine zweite heterozygote Mutation in den kodierenden Bereichen oder in der Promotorsequenz nachgewiesen werden. Der einzige weitere heterozygote Basenaustausch war ein G>A an Position -16 in Intron 5. IVS5-16G>A war bisher weder als Mutation noch als Polymorphismus beschrieben. Die Mutter und die gesunde Schwester des Patienten tragen dieses Allel ebenfalls (Abbildung 12).

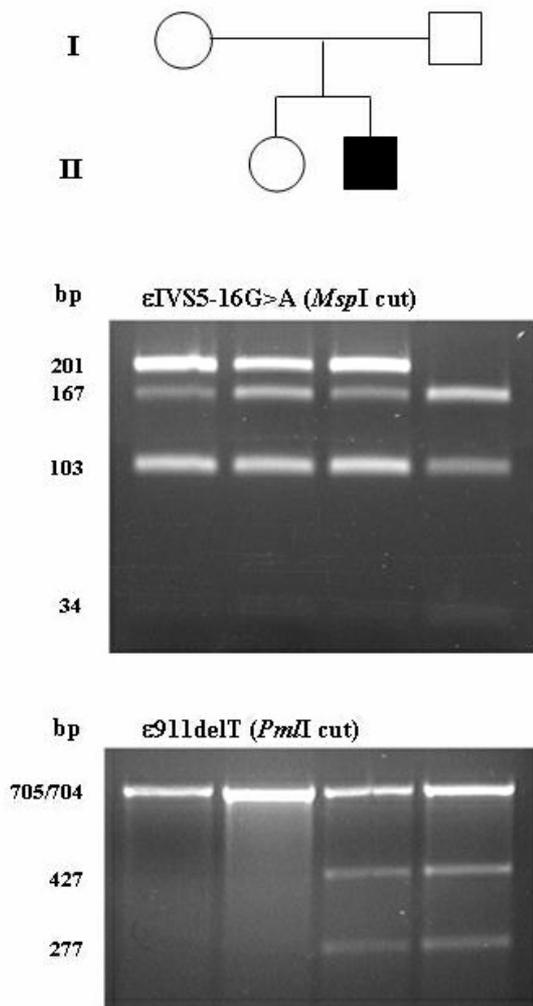


Abbildung 12: RFLP-Analysen der Familie zu den Mutationen IVS5-16G>A (oberes Gelbild) und 911delT. Die Mutation IVS5-16G>A führt zum Wegfall einer MspI-Schnittstelle; die Mutter, der Patient sowie die Schwester tragen die Mutation heterozygot, der Vater trägt die Wildtyp-Sequenz. Die Mutation 911delT führt eine neue PmlI-Schnittstelle ein; der Patient und sein Vater sind heterozygote Träger der Mutation. Der Patient trägt damit beide Mutationen heterozygot.

Die Mutation ϵ IVS5-16G>A, die in 200 untersuchten Normalchromosomen nicht nachweisbar war, liegt 16 bp vor Beginn von Exon 6 im Polypyrimidin-Trakt der Akzeptor-Spleißstelle von Exon 6. Sie verändert die Spleißstelle selbst nicht, könnte jedoch zur Entstehung einer neuen Akzeptor-Spleißstelle führen, da sie die Wildtyp-Sequenz von cgg nach cag (= Spleißakzeptor-Konsensussequenz) verändert.

Die Pathogenität des Basenaustausches -16G>A wurde durch RNA-Analyse aus Muskelgewebe des Patienten überprüft. In einer RT-PCR mit den Primern e5s (in Exon 5) und

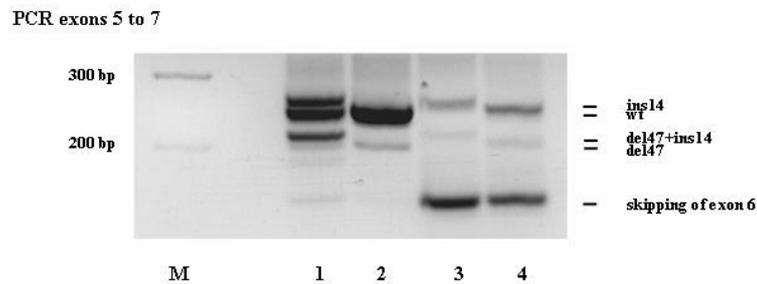
9/10R (am Übergang von Exon 9 zu Exon 10) wurden mehrere PCR-Produkte mit Längen zwischen 550 und 650 bp erhalten. Neben dem Wildtyp-Fragment mit einer Länge von 617 bp wurden sowohl kürzere als auch längere Fragmente erhalten. Die PCR-Produkte wurden in den U-Überhang-Vektor pDrive kloniert und anschließend sequenziert. Als Kontrolle wurde RNA aus einem Normalmuskel analysiert.

Das längere Produkt kam durch eine Insertion der 14 letzten Basen aus Intron 5 zustande (ins14), eines der kürzeren durch das Fehlen der letzten 47 Nukleotide aus Exon 5 bei gleichzeitiger Insertion von 14 bp aus Intron 5 (del47+ins14). Bei dem kürzesten Fragment waren nur die letzten 47 Nukleotide aus Exon 5 deletiert (del47). Aus dem Kontrollmuskel konnten auch del47-Transkripte – wenn auch in sehr geringem Ausmaß – amplifiziert werden, jedoch keine ins14- oder del47+ins14-Transkripte.

Um sicher zu beweisen, dass der intronische Basenaustausch ϵ IVS5-16G>A zum fehlerhaften Spleißmechanismus führt, wurde ein *CHRNE*-Minigen konstruiert, welches die genomische *CHRNE*-Sequenz von Intron 3 bis Intron 7 im pET01-Vektor enthält. Konstruiert wurde eine Wildtyp-Variante und eine Variante mit der Mutation ϵ IVS5-16G>A. Beide Konstrukte wurden jeweils in 293-Zellen transfiziert und sich ergebende Spleißprodukte mittels RT-PCR analysiert.

Es zeigte sich, dass bei der Transfektion mit dem ϵ IVS5-16G>A-Minigen keine Wildtyp-Transkripte gebildet werden, sondern nur die beiden Transkripte ins14 und del47+ins14. Eine PCR der Exons 5-7 verdeutlicht diese Ergebnisse (Abbildung 13).

A



B

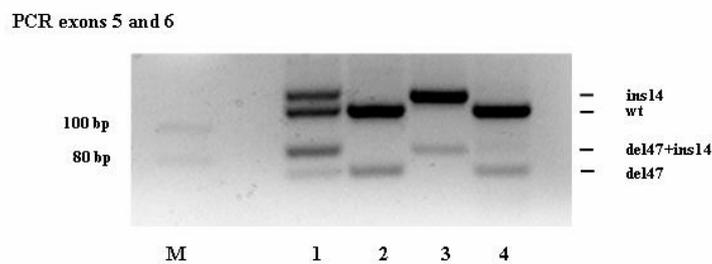


Abbildung 13: Ergebnisse einer RT-PCR der *CHRNE*-Exons 5-7 (A) bzw. Exons 5 und 6 (B). Spur 1 entspricht dem Muskelgewebe des Patienten, Spur 2 dem Kontrollmuskel. Die Spuren 3 und 4 stellen die Ergebnisse der Minigenexperimente dar, in Spur 3 wurden die Zellen mit dem IVS5-16G>A-Minigen transfiziert, in Spur 4 mit dem Wildtyp-Minigen. Aus transfizierten Zellen erhält man einen großen Anteil an Transkripten ohne Exon 6 (A), während dieses Transkript im Muskel nur in geringen Spuren vorkommt. Gel B verdeutlicht, dass aus dem IVS5-16G>A-Minigen nur *ins14* (126 bp) und *del47+ins14*-Transkripte (79 bp) gebildet werden. Aus Kontrollmuskel und Wildtyp-Minigen erhält man Wildtyp- (112 bp) und *del47*-Transkripte (65 bp). Im Muskel des Patienten finden sich alle 4 Transkripte.

Sowohl bei dem Wildtyp-Konstrukt als auch bei dem mutierten Minigen erhielt man einen großen Anteil an Transkripten ohne Exon 6; dies entspricht den Ergebnissen aus der Literatur (Ohno et al., 2003). Die Mutation -16G>A bewirkt jedoch kein erhöhtes Niveau an Transkripten ohne Exon 6 im Vergleich zum Wildtyp.

Durch diese Ergebnisse konnte die Pathogenität der Mutation ϵ IVS5-16G>A untermauert werden, da in der Tat allein dieser Basenaustausch für das falsche Spleißen der *CHRNE*-Transkripte an der Exon 5/6-Grenze verantwortlich ist. Die noch vorhandene ursprüngliche Akzeptor-Spleißstelle wird von der Spleißmaschinerie nicht verwendet; alle korrekten Transkripte am Exon 5/6-Übergang im Patientenmuskel stammen demnach vom 911delT-Allel.

Interessanterweise wurde in den mit dem Wildtyp-Minigen transfizierten Zellen zu einem sehr geringen Anteil das del47-Transkript - wie auch im Kontrollmuskel- nachgewiesen.

2 Analyse des *RAPSN*-Gens

Das Gen *RAPSN* kodiert für das postsynaptisch exprimierte Protein Rapsyn. Mutationen von *RAPSN* wurden vor kurzem als CMS-Ursache beschrieben (Ohno, et al. 2002). *RAPSN*-Mutationen führen zu einem postsynaptischen CMS mit sekundärer AChR-Defizienz. Rapsyn wurde – in Anlehnung an die beschriebene klinische Symptomatik der Patienten bei Ohno et al - insbesondere bei Patienten mit positiver Reaktion auf Esteraseinhibitoren, ohne Ophthalmoparese, mit vereinzelt respiratorischen Krisen v.a. im Rahmen von Infekten untersucht. Bei 28 CMS Patienten aus 22 unabhängigen Familien wurden *RAPSN*-Mutationen nachgewiesen. Die identifizierten *RAPSN*-Mutationen sind in Abbildung 14 zusammengefasst:

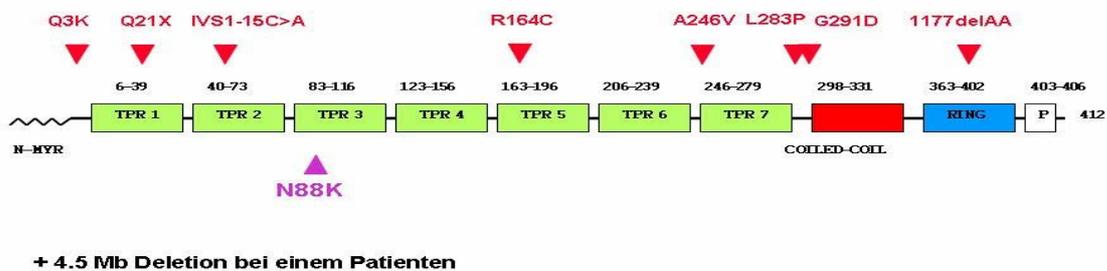


Abbildung 14: Lokalisation der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten *RAPSN*-Mutationen. TPR = Tetratricopeptide repeat, N-Myr = Myristinsäureanker am N-Terminus, P = Phosphorylierungsstelle. Die häufige Mutation N88K im dritten TPR ist pink gekennzeichnet.

Tabelle 2 fasst die klinischen Symptome der 28 Patienten aus 22 Familien mit *RAPSN*-Mutationen zusammen. In fünf von sechs Familien mit jeweils mehr als einem betroffenen Familienmitglied fand sich eine starke intrafamiliäre Variabilität der Ausprägung der Erkrankung.

	Anzahl der Patienten/ untersuchte Patienten
Beginn der Erkrankung	neonatal - 5.Lj: 25; >10 Lj: 2; 1 unklar
Konsanguinität in der Familie	0/28
Herkunft der Patienten	Deutschland 14, Kanada 4, Serbien 3, Luxemburg 2, Österreich 1, Italien 1, Norwegen 1, England 1, Schweiz 1
Ptose	27/28
Ophthalmoparese	3/28
Strabismus	7/28
bulbäre/faziale Schwäche	21/28
episodische Krisen (mit respiratorischer Insuffizienz)	22/28 (19/28)
Schwäche der Extremitäten/ des Gliedergürtels	17/28
generalisierte Schwäche	24/28, meist mild/episodisch
Kongenitale Kontrakturen	9/28
Dekrement nachweisbar	12/23
repetitive Antwort auf Einzelreiz	0/5
verzögerte motorische Entwicklung	10/28
Reaktion auf Esteraseinhibitoren	20/24 positiv

Tabelle 2: Zusammenfassung der klinischen Symptomatik bei 28 Patienten aus 22 Familien mit RAPSN-Mutationen

- In mittlerweile 20 unabhängigen Familien identifizierten wir eine einzelne Missense-Mutation der RAPSN-Gens (RAPSN N88K). Während diese Mutation bei den meisten Patienten homozygot vorlag, identifizierten wir sie in vier Familien compound heterozygot zusammen mit jeweils einer unterschiedlichen zweiten Missense-Mutation (G291D, Q3K und in zwei Fällen A246V). Bei drei weiteren Familien identifizierten wir eine heteroallelische Stop-, bzw. Frameshift-Mutation (Q21X und in zwei Fällen 1177delAA).
- Bei einem weiteren deutschen Patienten, bei dem auf dem einen Allel die Mutation N88K vorliegt, identifizierten wir auf dem anderen Allel erstmals eine chromosomale Mikrodeletion dieses Gens (siehe Kap. E 2.3). Diese betrifft die letzten zwei Exons (Exon 7 und 8) von RAPSN, umfasst insgesamt 4,5 kb und entstand möglicherweise über eine Alu-vermittelte homologe Rekombination (Müller et al., 2004b).

Nur zwei der 28 Patienten mit Mutationen im RAPSN-Gen tragen N88K nicht:

- Bei einer 9-jährigen deutschen Patientin identifizierten wir eine neue heterozygote Missense-Mutation (L283P), zusammen mit einer putativen Spleiß-Mutation in Intron 1 (IVS1-15C>A). Beide Mutationen ließen sich bei 100 Chromosomen von Normalkontrollen nicht nachweisen. Die Mutation IVS1-15C>A wurde – mangels Muskelgewebe von der Patientin – in einem *in vitro* Minigen-Experiment auf ihre Pathogenität hin untersucht (siehe E 2.4).
- Bei einem serbischen Patienten wurde der Aminosäureaustausch R164C (490C>T) homozygot nachgewiesen. Die gesunden Eltern des Patienten tragen den Basenaustausch jeweils heterozygot. In unserem Patientenkollektiv wurde der gleiche Aminosäureaustausch bei einer kroatischen Patientin heterozygot identifiziert, allerdings blieb hier die Suche nach einer zweiten Mutation in kodierenden Regionen, angrenzenden intronischen Bereichen und im Promotor bislang erfolglos. Ebenso konnte keine Deletion eines Fragmentes des *RAPSN*-Gens mittels Long-range-PCRs festgestellt werden. Mittels funktioneller Untersuchungen soll geklärt werden, ob R164C eine pathogene Mutation oder ein Polymorphismus ist.

2.1 Die Mutation *RAPSN* N88K

Bei der Erstbeschreibung von *RAPSN*-Mutationen als Ursache von CMS (Ohno et al., 2002) fiel auf, dass alle vier vorgestellten Patienten eine bestimmte Mutation, N88K (264C>A), auf mindestens einem Allel trugen. Auch bei unserem Patientenkollektiv stellte sich die Mutation N88K als besonders häufig heraus (nur 2 der 28 Patienten mit *RAPSN*-Mutationen trugen nicht N88K). Ähnliches wurde von Arbeitsgruppen aus Frankreich, Großbritannien und einem weiteren Labor aus den USA berichtet (Burke et al., 2003; Dunne and Maselli, 2003; Richard et al., 2003). Aus diesem auffallend häufigen Vorkommen von *RAPSN* N88K ergab sich die Fragestellung, ob diese Mutation auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen ist (Founder-Effekt) oder ob *RAPSN* N88K in unabhängigen Ereignissen mehrfach entstanden ist und die Region in Exon 2 des *RAPSN*-Gens einen Mutations-Hotspot darstellt.

Bei der Analyse der *RAPSN*-Patienten aus unserem Kollektiv fiel auf, dass alle Patienten auf den K88-Allelen identische intragenische Polymorphismen trugen: 456C in Exon 2, IVS3-11delC in Intron 3, und 1143C in Exon 7. Diese 3 Sequenzvariationen lassen sich allerdings auch bei etwa 75% der Normalbevölkerung feststellen, sind somit alleine nicht aussagekräftig. Deshalb wurden bei 17 K88-Allelen sowie als Vergleich bei 40 Normalchromosomen zwei dieser intragenischen Polymorphismen (456C/T und IVS3-11C/delC) und zwei

Mikrosatelliten-Marker (D11S411/ und D11S986) analysiert (Müller et al., 2003). D11S4117 liegt 0,4 Mb centromer des *RAPSN*-Gens, während D11S986 4,2 Mb telomer von *RAPSN* liegt.

Bei allen Patienten war die Mutation N88K mit den Varianten 456C und IVS3-11delC gekoppelt. Bei den meisten Patienten erhielt man bei dem Mikrosatelliten-Marker D11S4117 eine Fragmentlänge von 256bp. Drei Allele trugen entweder 254 oder 258, beide Werte könnten durch Mutation der Anzahl der „CA“-Wiederholungen aus einem potentiellen 256 bp-Ursprungsfragment entstanden sein. Bei den Normalkontrollen trugen nur 9 von 40 Chromosomen die Kombination 456C + IVS3-11delC + D11S4117 256 bp. Ein Chi-Quadrat –Test bestätigte ein starkes Linkage-Ungleichgewicht ($p < 0,01$). Dieses Ergebnis sprach eindeutig für einen gemeinsamen Ursprung der von uns untersuchten K88-Allele (Müller et al., 2003). Beim weiter entfernten Marker D11S986 war keine bestimmte Fragmentlänge eindeutig mit der Mutation N88K assoziiert.

2.2 Genaue Kartierung des Founder-Fragmentes (Müller et al., 2004a)

Aus den Ergebnissen der anderen Labors ergaben sich jedoch widersprüchliche Angaben bezüglich eines Founder-Effektes bei der Mutation *RAPSN* N88K (Ohno and Engel, 2004b; Richard et al., 2003). Zum Teil wurden auch verschiedene Marker analysiert, was eine gemeinsame Auswertung aller Patienten unmöglich machte. Es ergaben sich folgende Arbeitshypothesen:

1. Nur die von uns in Deutschland analysierten K88-Allele lassen sich auf ein und dasselbe Ursprungsallel zurückführen. Das Mutationsereignis fand weltweit jedoch mehrfach statt.
2. Bei der Mutation *RAPSN* N88K könnte es sich eventuell um eine sehr alte Mutation handeln. Das gemeinsame Fragment auf den Patientenchromosomen ist sehr kurz und wird bei der Analyse von weiter entfernten Mikrosatelliten-Markern nicht erfasst. Ein Hinweis auf diese Möglichkeit stellen die intragenischen Polymorphismen dar, die mit K88 gekoppelt sind.

Um diese beiden Hypothesen zu testen, wurde ein Set an SNPs (single nucleotide polymorphisms) in und um das *RAPSN*-Gen zusammengestellt. Um die Aussagekraft dieser SNPs sicherzustellen, wurden sie so gewählt, dass die Häufigkeit des selteneren Allels in der NCBI-SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) mindestens 20% beträgt. Es wurden insgesamt 21 SNPs analysiert, davon 4 intragenische, 8 telomer, sowie 8

centromer von *RAPSN* gelegen. Die ausgewählten SNPs und ihre Entfernung zum *RAPSN*-Gen werden in Tabelle 3 dargestellt, die zur Analyse benötigten Primer und Restriktionsenzyme finden sich im Anhang:

	SNP	Position auf Chr. 11 [Mb]	Häufigkeit in Kontrollgruppe
1	rs1446331 A/G	44.745543	40.0% A
2	rs728516 C/T	45.565115	70.0% T
3	rs7476 A/C	46.307143	62.5% A
4	rs3136516 A/G	46.725065	52.5% A
5	rs2279438 T/A	47.168484	82.5% A
6	rs2278890 C/T	47.363911	37.5% T
7	rs2293577 T/C	47.401511	65.0% T
8	rs4282946 C/T	47.420511	72.5% T
9	1143C/T	<i>RAPSN</i> Exon 7	72.5 % C
10	IVS3-11C/delC	<i>RAPSN</i> Intron 3	72.5 % delC
11	456 C/T	<i>RAPSN</i> Exon 2	72.5 % C
12	-365 G/A	<i>RAPSN</i> Promotor	92.5% G
13	rs2242081 T/C	47.464576	37.5% C
14	rs2280231 C/T	47.564747	25.0% T
15	rs3817334 C/T	47.615302	45.0% T
16	rs9909 C/G	47.764084	57.5% C
17	rs2270994 A/G	48.122178	52.5% G
18	rs2299650 G/T	49.138316	60.0% G
19	rs1880438 C/T	49.335007	77.5% C
20	rs1916207 C/T	50.500285	32.5% C
21	rs507015 G/A	51.454648	62.5% A

Tabelle 3: SNPs, die zur Kartierung des *RAPSN*-Founderallels ausgewählt wurden. Die rechte Spalte gibt die Häufigkeit des SNPs bei der von uns untersuchten Kontrollgruppe bestehend aus 20 gesunden Personen europäischer Herkunft.

Es wurden insgesamt 20 homozygote Patienten aus unserem Patientenkollektiv, aus Frankreich (zur Verfügung gestellt von Dr. Daniel Hantai und Dr. Pascale Richard) sowie aus Großbritannien (zur Verfügung gestellt von Dr. David Beeson) analysiert. Im Detail waren dies zehn Patienten britischer Herkunft, zwei französischer Herkunft, fünf deutsche Patienten,

eine Patientin aus Italien, eine aus Österreich, sowie zwei Patienten vom indischen Subkontinent. Einer der indischen Patienten trug die Mutation N88K nur heterozygot, wurde aber wegen seiner außergewöhnlichen Herkunft trotzdem analysiert. Um die Phase der Haplotypen zu bestimmen, wurden die Eltern dieses Patienten mit analysiert.

Das Ergebnis der Analyse der 21 SNPs bei den insgesamt 41 K88-Chromosomen ist in Abbildung 15 dargestellt.

SNP	distance to N88K [Mb]	G4	Fr1	UK8	UK9	UK10	Fr2	UK4	UK5	UK7	UK1	UK3	UK6	G3	G2	Au1	UK2	G5	G1	It1	Ind1	Ind2*	
1	2.688	A	A	A	A	A	A/G	A/G	A/G	A/G	G	G	G	A	G	A/G	A/G	A/G	A/G	G	G	G	
2	1.869	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C/T	C	C/T	T	C/T	C/T	T	C	
3	1.127	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
4	0.709	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
5	0.266	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
6	0.070	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	
7	0.032	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
8	0.013	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
9	0.009	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
10	0.006	delC																					
11	0.000	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
12	0.001	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	
13	0.030	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
14	0.131	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
15	0.181	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
16	0.330	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
17	0.688	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G/A	G/A	A	G
18	1.704	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G/T	G/T	G/T	G
19	1.901	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C/T	C/T	C
20	3.066	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C/T	C	C	C/T	C/T	C/T	C/T	T	T
21	4.021	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A/G	A	A	A/G	A	G	G	A	A	

Abbildung 15: SNP-Konstellation bei den untersuchten RAPS-N88K-Patienten. Die Bezeichnung der Patienten leitet sich von den Anfangsbuchstaben ihrer Herkunftsländer ab (Germany, France, United Kingdom, Austria, Italy, Indian Subcontinent). Die Mutation N88K befindet sich in der Mitte der Tabelle, die SNPs sind der Entfernung nach von K88 aus angeordnet. Markierung in orange steht für eine SNP-Konstellation entsprechend dem Founder auf beiden Allelen, gelbe Markierung bedeutet Founder-Konstellation auf einem Allel. Alle untersuchten K88-Chromosomen haben identischen SNP-Sequenzen für die SNPs 7-16. *Der Patient Ind2 trägt nur ein K88-Allel.

Alle untersuchten K88-Chromosomen haben die gleiche Sequenz-Konstellation bei den SNPs 7-16. Dieses Fragment der Länge von 360 kb wird stellt den gemeinsamen Kern-Founder-Haplotyp dar. Alle Allele mit Ausnahme von Ind2 teilen sich auch einen größeren Chromosomen-Abschnitt von SNP 3 bis SNP 16, den erweiterten Founder-Haplotyp mit einer Länge von 1,4 Mb.

Bei den Kontroll-Chromosomen standen die elterlichen Chromosomen nicht zur SNP-Analyse zur Verfügung. Deshalb wurden hier die Haplotypen so konstruiert, dass eine größtmögliche Anzahl an Kern- oder erweiterten Founder-Haplotypen erzielt wurden. Dies ergab bei den 40 Kontrollallelen eine maximal mögliche Anzahl von 10 Kern-Haplotypen und 5 erweiterten Haplotypen; es ist allerdings möglich, dass diese Zahlen überschätzt sind. Ein Chi-Quadrat-Test beweist eine signifikante Kopplung des erweiterten Founder-Haplotyps ($p < 0.0000174$) mit der Mutation N88K.

2.3 Nachweis einer heterozygoten Mikrodeletion im *RAPSN*-Gen (Müller et al., 2004b)

Der Patient ist das zweite Kind einer nicht konsanguinen, deutschen Familie. Die Eltern sowie der ältere Bruder sind gesund. Die Mutter bemerkte beim zweiten Kind reduzierte Bewegungen im Mutterleib. Es wurde mit einer schweren neonatalen Arthrogryposis mit multiplen Kontrakturen der oberen und unteren Extremitäten geboren. Am 3. Tag nach der Geburt war eine künstliche Beatmung für einige Tage notwendig. In der Säuglingszeit wurden eine Saug- und Trinkschwäche, ein offener Mund und Schielen bemerkt. Im Rahmen von Infektionskrankheiten kam es zu einer starken Ermüdbarkeit und Schwäche sowie zu respiratorischen Insuffizienzen. Im Alter von 15 Monaten trat eine beidseitige Ptose auf. Die motorische Entwicklung des Jungen verlief verzögert. Im Alter von 20 Monaten wurde die Diagnose eines CMS gestellt und eine Therapie mit Esterasehemmern (Mestinon) eingeleitet, auf die der Patient gut anspricht. Während Infektionen wird die Mestinon-Dosis erhöht, um Apnoen zu verhindern.

Molekulare Diagnostik:

Bei dem Patienten wurde heterozygot die Mutation N88K nachgewiesen. Der Vater und der gesunde Bruder des Patienten sind ebenfalls heterozygote Träger von N88K. Die Mutter des Patienten trägt die Mutation N88K nicht (Abb. 16). Bei dem Patienten konnte allerdings in der gesamten kodierenden Region, den angrenzenden intronischen Bereichen sowie im Promotor des *RAPSN*-Gens keine zweite Mutation identifiziert werden.

Daraus ergaben sich folgende Arbeitshypothesen:

1. Die zweite compound heterozygote Mutation liegt tief in einem der Introns, welche beim routinemäßigen Sequenzieren des *RAPSN*-Gens nicht erfasst werden.

2. Die Ursache des CMS liegt in Mutationen in einem anderen Gen, der Patient ist nur zufällig heterozygoter Träger von N88K, da es sich hierbei um eine häufige Mutation handelt. Das *CHRNE*-Gen sowie das *CHAT*-Gen wurden daraufhin sequenziert, es konnte keine Mutation identifiziert werden.
3. Die zweite compound heterozygote Mutation ist eine chromosomale Deletion oder eine Umordnung auf dem mütterlichen Allel, die mit den PCRs der einzelnen Exons des Gens nicht erfasst werden können. Eine größere Umordnung oder Deletion wurde jedoch durch eine Mikrosatelliten-Analyse in der gesamten Familie am *RAPSN*-Genort ausgeschlossen.

Um zu testen, ob es sich bei der zweiten Mutation um eine Mikrodeletion von Teilen des *RAPSN*-Gens handelt, wurden Long-range-PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen (Primersequenzen siehe Anhang) ausgehend von Exon 2 durchgeführt. Eine PCR mit den Primern RPs (centromer von *RAPSN* vor der Promotorregion liegend) und R2as (hinter Exon 2) ergab eine Bande mit der erwarteten Länge entsprechend der Wildtyp-Sequenz. Beide Allele wurden amplifiziert, da die Mutation N88K im PCR-Fragment heterozygot vorhanden war. Im Gegensatz dazu amplifizierte eine PCR mit den Primern R2s (vor Exon 2) und *RAPSN* 3'-UTR reverse nur das väterliche Allel, da hier die Mutation N88K homozygot im PCR-Fragment erschien. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass eine Deletion im hinteren Teil des Gens vorliegt, welche auf jeden Fall das letzte Exon des *RAPSN*-Gens betrifft. Um die Bruchstellen zu erfassen, wurden weitere Long-range-PCRs durchgeführt:

Eine PCR mit den Primern R2s und rs4282946 reverse (liegt 3 kb telomer von *RAPSN* in der Nähe des SNP rs4282946) ergab ein etwa 9 kb langes PCR-Fragment anstatt des erwarteten Fragmentes von etwa 13 kb. An Aminosäureposition 88 lag die Wildtypsequenz N in diesem PCR-Produkt homozygot vor. Dies deutete auf eine relativ kurze Deletion eines Teils des *RAPSN*-Gens hin, da in dieser PCR nur das kürzere, deletierte Allel amplifiziert wurde.

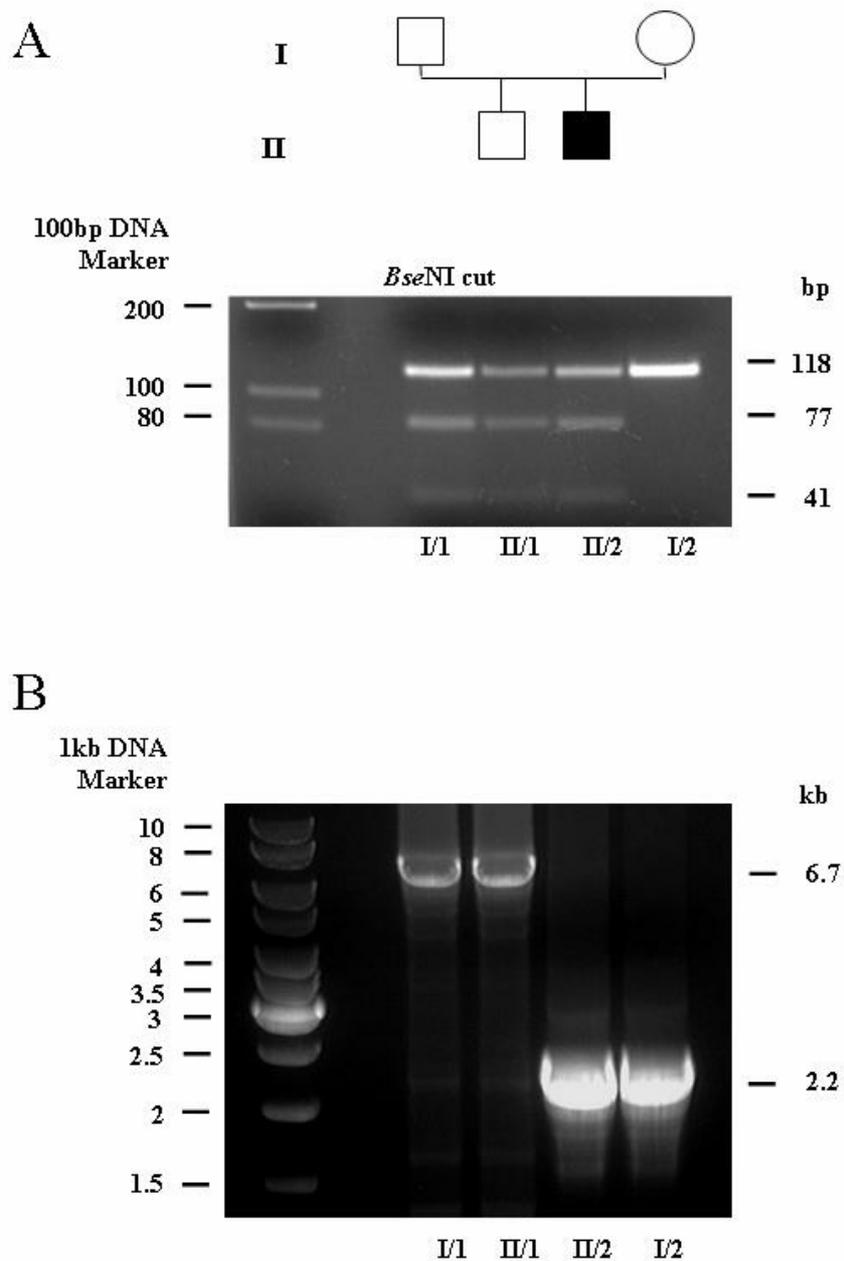


Abbildung 16: A: RFLP-Analyse auf die Mutation RAPSN N88K in der gesamten Familie. Die Mutation führt eine *Bse*NI-Restriktionsschnittstelle in Exon 2 ein. Der Vater, der Patient sowie sein gesunder Bruder tragen die Mutation heterozygot. B: Long-range-PCR in der Familie mit dem Primerpaar R5s und rs4282946reverse. Beim Patienten und seiner Mutter wurde statt des erwarteten Fragmentes von 6,7 kb ein kürzeres Fragment von etwa 2,2 kb erhalten.

Die genaue Lage der Deletion wurde nun mit anderen Primerkombinationen eingegrenzt. Eine PCR mit den Primern R5s und rs4282946 reverse ergab ein Fragment der Länge 2,2 kb statt der berechneten 6,7 kb bei dem Patienten und seiner Mutter (Abb. 16). Patient und Mutter sind also beide heterozygote Träger der Mikrodeletion, es handelt sich also nicht um eine Neudeletion beim Patienten. Hier wurde, wie auch in der vorherigen PCR, das heterozygot vorliegende Allel mit normaler Länge nicht gebildet.

Sequenzierung der PCR-Fragmente ergab, dass die telomer gelegene Bruchstelle im Poly(A)-Bereich eines *AluSx*-Elementes in der Region zwischen *RAPSN* und dem *PSMC3*-Gen liegt. Das *PSMC3*-Gen ist von der Deletion nicht betroffen. Die centromere Bruchstelle liegt in Intron 6 des *RAPSN*-Gens. Sie wird von einem L1MC4-Element und einem *AluSq*-Element flankiert und liegt im Poly(A)-Bereich des *AluSq*-Elementes. Das *AluSq*- und das *AluSx*-Element an beiden Seiten der Deletion haben die gleiche Orientierung. Die genaue Länge des deletierten Fragmentes beträgt 4464 bp (Abb. 17).

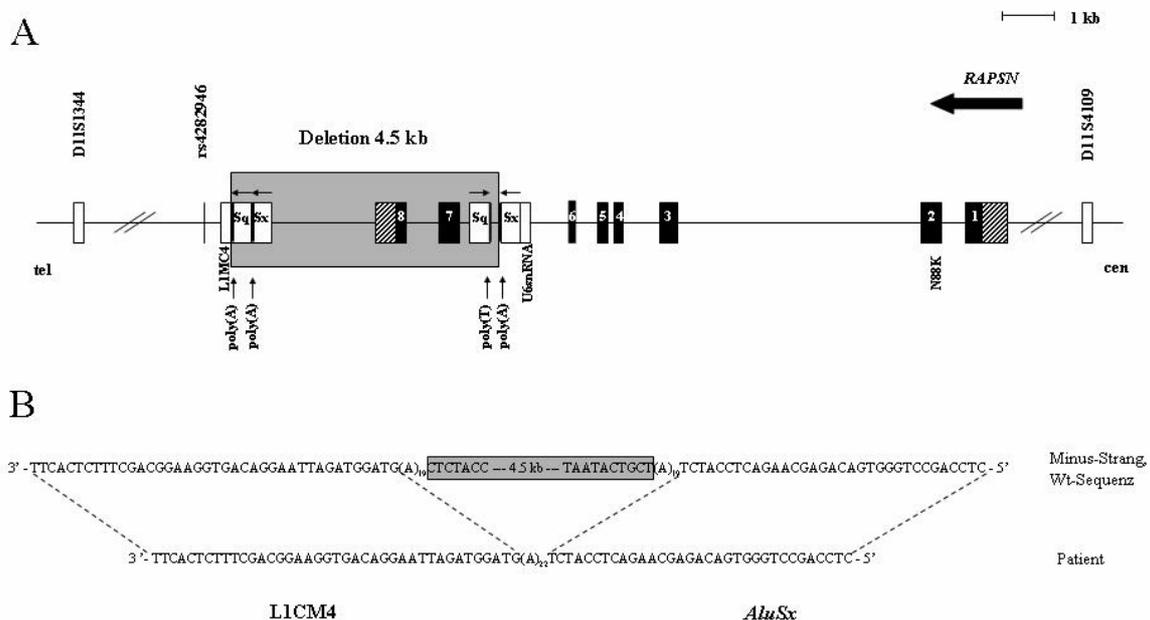


Abbildung 17: A: Schema des *RAPSN*-Gens und Lokalisation der Mikrodeletion von 4,5 kb (grauer Kasten). Die Exons sind durch schwarze Rechtecke dargestellt, repetitive Elemente in den Introns durch weiße Blöcke. B. Flankierende Sequenzen an den Bruchpunkten. Beide Bruchpunkte liegen in Poly-(A)-Sequenzen.

2.4 Die Spleißmutation *RAPSN* IVS1-15C>A

Untersucht wurde eine 9-jährige Patientin, bislang einziges Kind eines deutschen Vaters und einer tschechischen Mutter. Die Mutter bemerkte während der Schwangerschaft reduzierte Kindsbewegungen. Postpartal kam es erstmalig zu Apnoen. Auffällig waren bei der Patientin auch Gelenkkontraktionen (Kniebeugekontraktionen), Klumpfüße, ein schmaler Gesichtsschädel, tief sitzende Ohren und ein hoher Gaumen. Im Säuglingsalter folgten weitere Episoden mit respiratorischen Insuffizienzen. Die Eltern berichteten über Probleme beim Trinken, außerdem sei ihre Tochter häufig erschöpft. Im Alter von drei Monaten wurde die Diagnose eines CMS gestellt. Die motorische Entwicklung des Mädchens verlief verzögert. Im Alter von fünf Jahren wurde auch eine leichte Ptose beidseits bei einer neurologischen Untersuchung festgestellt. Eine Therapie mit Mestinon führte zur deutlichen Verbesserung der Symptomatik.

Molekulare Diagnostik:

Bei der Sequenzierung des *RAPSN*-Gens wurde ein heterozygoter Basenaustausch 848 T>C (L283P) in Exon 5 identifiziert. Dieser Aminosäureaustausch wurde bisher weder als Mutation noch als Polymorphismus in der Literatur oder in online-Sequenzdatenbanken beschrieben. Die Mutter der Patientin trägt den Basenaustausch ebenfalls heterozygot und er konnte bei 100 Normalkontrollen nicht nachgewiesen werden.

In den restlichen Exons, den Exon/Intron-Grenzen sowie in der Promotorregion konnte anfangs keine zweite heterozygote Mutation nachgewiesen werden. Die einzige Basenvariation, die als compound heterozygote Mutation in Frage kam, war ein heterozygoter Nukleotidaustausch C>A an Position -15 vor Exon 2. Interessanterweise liegt genau an dieser Position der schon bekannte Polymorphismus IVS1-15C/T (Ohno and Engel, 2004b). Bei der Patientin erzeugt der Basenaustausch C>A jedoch ein „CAG“, welches möglicherweise als Akzeptor-Spleißstelle erkannt wird. IVS1-15C>A war bei 100 durchgeführten Normalkontrollen nicht nachweisbar.

Funktionelle Untersuchungen:

Die Pathogenität des Nukleotidaustausches IVS1-15C>A sollte durch Analyse von *RAPSN*-Spleißprodukten überprüft werden. Da von der Patientin kein Muskelgewebe erhältlich war, um eine RNA-Analyse durchzuführen, wurden *RAPSN*-Minigene konstruiert. Diese Minigene enthielten einen Teil von Intron 1, Exon 2 und einen Teil von Intron 2 der genomischen

Sequenz des *RAPSN*-Gens. Es wurden vier verschiedene Konstrukte erstellt: eine Wildtyp-Kontrolle (IVS1-15C), ein Minigen mit der Mutation IVS1-15A, ein Minigen mit dem Polymorphismus IVS1-15T, und ein Minigen mit einem Polymorphismus an der Nachbarposition (IVS1-14G/A). Die Minigene wurden im Vektor ExonTrap hergestellt, ähnlich dem Verfahren bei der Mutation *CHRNE* IVS5-16G>A.

Die Minigene wurden in HEK 293-Zellen transfiziert und anschließend *RAPSN*-Spleißprodukte mittels RT-PCR und Sequenzierung analysiert (Abb. 18).

Die Minigene mit den Polymorphismen IVS1-15T und IVS1-14A erzeugen wie das Wildtyp-Minigen nur korrekt gespleißte Transkripte. Das Minigen mit der Mutation IVS1-15C>A erzeugt hingegen ein etwas längeres Produkt, welches durch die Insertion der letzten 13 bp aus Intron 1 zustande kommt. Hier werden gar keine korrekten Spleißprodukte gebildet, es wird ausschließlich die neue Akzeptorspleißstelle verwendet, die durch die Mutation gebildet wird. Die Insertion von 13 bp aus dem Intron führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu einem vorzeitigen Stop-Codon.

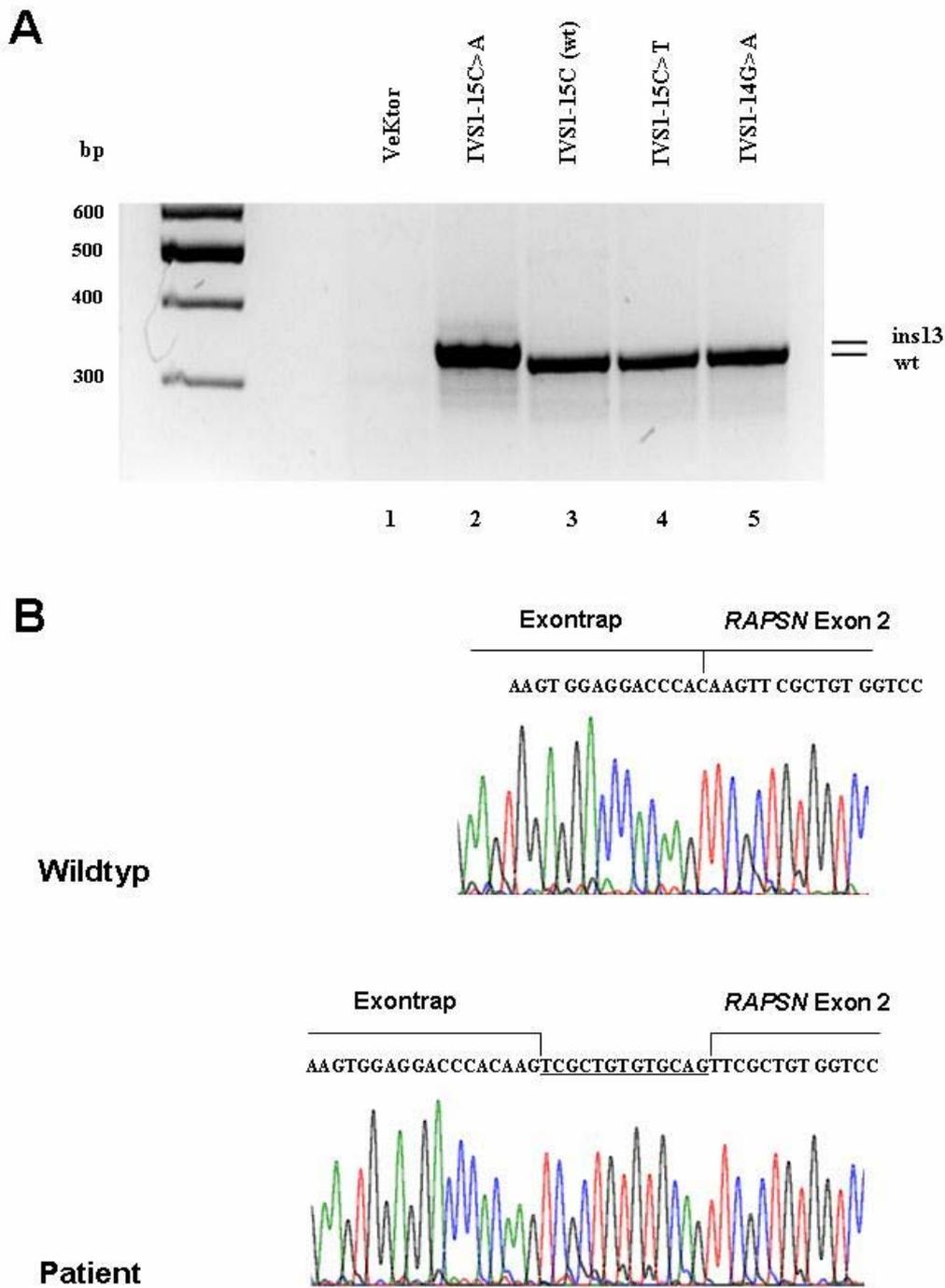


Abbildung 18: A. RT-PCR-Analyse der RAPSIN-Minigen-Spleißprodukte bezügl. Exon 2. Die Wildtyp-Kontrolle (IVS1-15C), das Minigen mit dem Polymorphismus IVS1-15T und das Minigen mit dem Polymorphismus IVS1-14G/A erzeugen RT-PCR-Produkte der erwarteten Länge von 334 bp. Aus dem Minigen mit der Mutation IVS1-15A bildet sich ausschließlich ein etwas längeres Produkt. B. Die Sequenzierung der RT-PCR-Produkte zeigt die Insertion von 13 bp aus Intron 1 in die Spleißprodukte des Minigens IVS1-15A.

3 Analyse des *CHAT*-Gens

Das *CHAT*-Gen kodierend für die präsynaptisch lokalisierte Cholin-Acetyltransferase wurde insbesondere bei Patienten untersucht, die im Krankheitsverlauf krisenhafte Verschlechterungen mit plötzlich auftretender respiratorischer Insuffizienz aufwiesen. Bei insgesamt sechs CMS-Familien konnten sieben unterschiedliche *CHAT*-Mutationen identifiziert werden:

	Anzahl der Patienten/ untersuchte Patienten
Beginn der Erkrankung	neonatal - 2.Lebensjahr
Konsanguinität in der Familie	1/6
Herkunft der Patienten	Türkei 2, Kroatien 2, Finnland 1, Deutschland 1
Ptose	6/6
Ophthalmoparese	0/6
Strabismus	0/6
bulbäre/faziale Schwäche	2/6
episodische Krisen (mit respiratorischer Insuffizienz)	5/6 (5/6)
Schwäche der Extremitäten/ des Gliedergürtels	3/4, 2 unklar
generalisierte Schwäche	4/4, 2 unklar
Kongenitale Kontrakturen	0/6
Dekrement nachweisbar	4/5, 2 davon nur nach Belastung
verzögerte motorische Entwicklung	4/6
Reaktion auf Esteraseinhibitoren	6/6 positiv

Table 4: Zusammenfassung der klinischen Symptomatik bei 6 Familien mit CHAT-Mutationen

- Bei einer 8-jährigen finnischen Patientin fanden sich zwei compound-heterozygote Missense Mutationen des *CHAT* Gens (*CHAT* S498L und L210P). Beide Mutationen sind bereits als pathogene CMS Mutationen beschrieben, ebenfalls bei einem Patienten finnischer Abstammung (Byring et al., 2002; Ohno et al., 2001). Die Patientin zeigte seit Ende des 1. Lebensjahres eine myasthene Symptomatik, die bei mäßiger Progression zu einer deutlich eingeschränkten Gehfähigkeit (>100m) trotz Ansprechens auf Mestinon führte. Krisenhafte Verschlechterungen oder respiratorische Apnoen wurden bislang nicht beobachtet, im Gegensatz zu dem Patienten aus (Byring et al., 2002; Ohno et al., 2001), wo zwei betroffene Geschwisterkinder an plötzlichem Kindstod verstorben sind, eines davon war vor seinem Tod asymptomatisch.

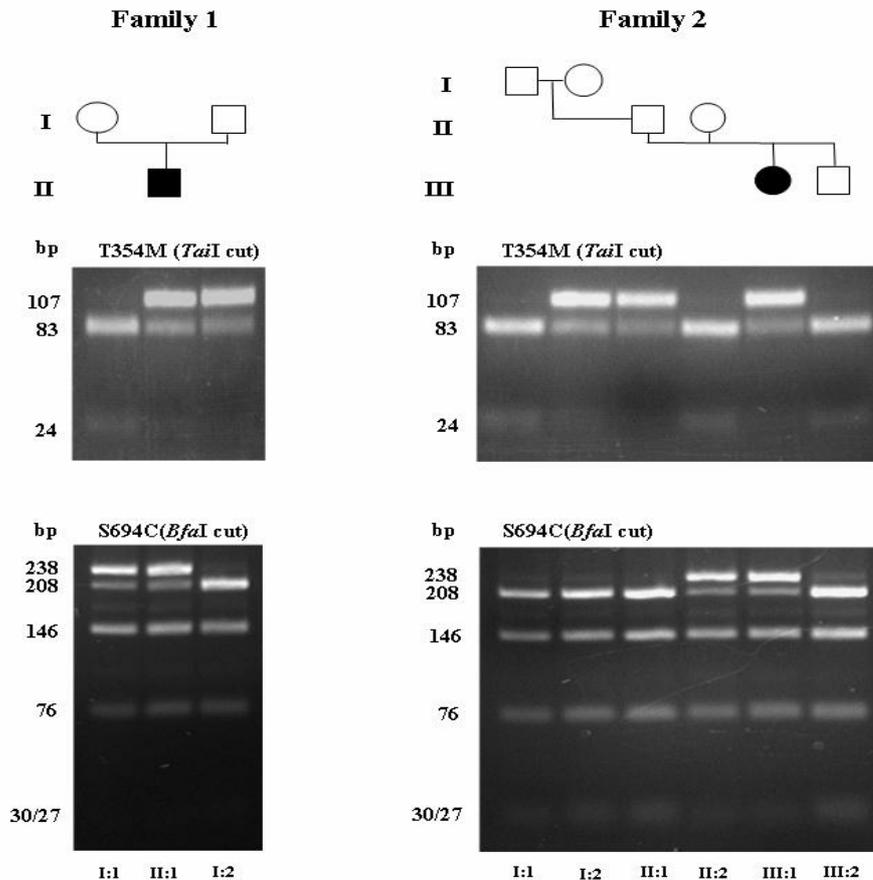


Abbildung 19: RFLP-Analyse in zwei kroatischen Familien mit *CHAT*-Mutationen. Die Mutation *T354M* entfernt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Tai*I, die Mutation *S694C* eine *Bfa*I-Schnittstelle. *T354M* wird in beiden Familien von väterlicher Seite vererbt, *S694C* von der Mutter. Die Oma väterlicherseits in Familie 2 ist heterozygot für die Mutation *T354M*. Nur die beiden Patienten (II:1 in Familie 1, III:1 in Familie 2) tragen beide Mutationen heterozygot.

- Bei zwei nicht verwandten kroatischen Kleinkindern, einem Jungen und einem Mädchen, mit wiederholt aufgetretener respiratorischer Insuffizienz konnten zwei compound heterozygote Mutationen des *CHAT* Gens identifiziert werden (Barisic et al., 2005): Die Missense-Mutation (*S694C*) war bereits als pathogen beschrieben (Maselli et al., 2003), die zweite Missense-Mutation (*T354M*) war bislang noch nicht in der Literatur beschrieben und konnte in 50 Normalkontrollen nicht nachgewiesen werden. Die Aminosäure *T354* ist in verschiedenen Spezies an dieser Stelle hoch konserviert. *S694C* liegt bei beiden Patienten auf dem mütterlichen Allel, *T354M* auf

dem väterlichen (Abb. 19). Während der Krankheitsverlauf bei dem Mädchen sehr gutartig ist, leidet der Junge unter fast täglich auftretenden respiratorischen Insuffizienzen und unter einer verzögerten psychomotorischen Entwicklung. Die Therapie mit Esteraseinhibitoren war bei diesem Patienten nur phasenweise erfolgreich, während bei dem Mädchen die episodischen Apnoen unter Therapie nicht mehr auftraten.

- Bei zwei Patienten aus einer türkisch-kurdischen Familie konnte die homozygote Mutation I336T in Exon 10 der kodierenden Sequenz identifiziert werden. Die Mutation I336T wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits bei zwei anderen türkisch-kurdischen Familien nachgewiesen (Schmidt et al., 2003). In allen Familien kosegregiert diese Mutation mit der Erkrankung. Eine durchgeführte Haplotypisierung des *CHAT*-Genortes in allen drei Familien spricht für ein Founder-Allel in der türkisch-kurdischen Bevölkerung.
- Bei einem deutschen Patienten wurde die Mutation R482G (1444A>G) (Ohno et al., 2001) homozygot diagnostiziert. Im Alter von acht Monaten traten erstmals respiratorische Insuffizienzen auf; zuerst wurde ein cerebrales Krampfleiden ohne EEG-Korrelat als Ursache vermutet. Danach manifestierten sich diese episodischen Apnoen fast täglich, die motorische Entwicklung des Jungen verlief verzögert, bei körperlicher Aktivität ermüdete er sehr schnell. Im Alter von 1 ½ Jahren wurde erstmal die Diagnose eines CMS gestellt und eine genetische Untersuchung eingeleitet. Unter einer Therapie mit Esteraseinhibitoren verbesserten sich die klinischen Symptome sofort.
- Bei einem weiteren türkischen Patienten mit einer ähnlichen klinischen Symptomatik wie bei dem oben beschriebenen deutschen Patienten wurde die Mutation G417R homozygot identifiziert. Der türkische Junge stammt aus einer konsanguinen Familie, ein älterer Bruder und seine Eltern sind gesund. Postnatal wurde bei dem Jungen eine unzureichende Atmung festgestellt, es kam zu mehreren Zyanose-Attacken, welche eine maschinelle Beatmung notwendig machten. Auch hier bestand zuerst der Verdacht auf ein cerebrales Anfallsleiden. Die ersten 16 Lebensmonate verbrachte der Junge im Krankenhaus, seine motorische Entwicklung war retardiert. Im Verlauf von Infekten kam es immer wieder zu respiratorische Insuffizienzen, bis im Alter von 1 ¾ Jahren die Diagnose eines CMS gestellt wurde und eine Therapie mit Mestinon begonnen wurde. G417R ist bislang weder als pathogene Mutation noch als Polymorphismus beschrieben.

4 Analyse des COLQ-Gens

Bei sporadischen oder autosomal rezessiven CMS-Patienten, bei denen keine Mutation des AChR's identifiziert werden konnte und die nicht auf eine Mestinon-Therapie ansprachen, wurde das COLQ-Gen untersucht. Dieses Gen kodiert für das muskelspezifisch exprimierte kollagenartige „Verankerungsprotein“ ColQ (collagenic-like tail) der AChE. Unsere Analyse führte bislang zum Nachweis von 10 verschiedenen Mutationen, davon sieben neuen Mutationen bei 12 CMS Patienten aus 11 unabhängigen Familien.

	Anzahl der Patienten/ untersuchte Patienten
Beginn der Erkrankung	neonatal - 8.Lebensjahr
Konsanguinität in der Familie	4/12
Herkunft der Patienten	Deutschland 5, Spanien 3, Serbien 1, Türkei 1, Pakistan 1, Libanon 1
Ptose	6/12
Ophthalmoparese	3/12
Strabismus	1/12
bulbäre/faziale Schwäche	2/12
episodische Krisen (mit respiratorischer Insuffizienz)	4/12 (4/12)
Schwäche der Extremitäten/ des Gliedergürtels	11/12
generalisierte Schwäche	12/12
Kongenitale Kontrakturen	0/12
Dekrement nachweisbar	8/9
repetitive Antwort auf Einzelreiz	3/4
verzögerte motorische Entwicklung	8/12
Reaktion auf Esteraseinhibitoren	11/11 negativ*

Tabelle 5: Zusammenfassung der klinischen Symptomatik bei 12 Patienten mit COLQ-Mutationen.

** bei 4 Patienten anfangs fragliche Besserung bei geringer Mestinondosis*

4.1 Im COLQ-Gen identifizierte Mutationen

- Bei einer Patientin pakistanischer Herkunft wurde ein homozygoter Basenaustausch von C nach T an Nukleotidposition 706 in Exon 11 identifiziert. Diese Punktmutation führt zu einem Translationsstop nach Codon 226 (COLQ R227X) und wurde bislang noch nicht als Ursache einer AChE-Defizienz beschrieben.

- Eine weitere Nonsense-Mutation in Exon 11, R236X, wurde homozygot bei einer schwer betroffenen türkischen Patientin diagnostiziert. Diese Mutation wurde bereits bei einer CMS-Patientin aus Frankreich beschrieben (Ishigaki et al., 2003).
- Bei einem ebenfalls sehr schwer betroffenen deutschen Patienten konnten wir die Diagnose eines CMS durch den Nachweis von zwei heterozygoten *COLQ*-Mutation (W148X und C386S) molekulargenetisch sichern. Die Mutation W148X wurde bereits als pathogene Mutation beschrieben (Ohno et al., 2000). Die bislang noch nicht beschriebene Mutation C386S betrifft ein hoch konserviertes Cystein der C-terminalen Region, das als essentiell für Proteininsertion und -assemblierung angesehen wird (Ohno et al., 1998b).
- Bei zwei unabhängigen Patienten aus Spanien mit moderater myasthener Symptomatik wurde die homozygote Mutation Y430S in Exon 16 als Ursache ihres CMS ermittelt. Diese Missense-Mutation wurde in der Erstbeschreibung eines synaptischen CMS ebenfalls bei einer spanischen Familie publiziert (Donger et al., 1998).
- Die Frameshift-Mutation *COLQ* 158insC in Exon 2 wurde homozygot bei einem zweijährigen spanischen Patienten gefunden. Diese Mutation wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben.
- Eine weitere neue Frameshift-Mutation in Exon 2, 109delC, wurde bei einem serbischen Patienten compound heterozygot zu einer In-Frame Deletion von 3 Nukleotiden in Exon 17 identifiziert. Die Deletion der 3 Nukleotide in Exon 17 führt zum Verlust einer Aminosäure, Q442, im C-terminalen Bereich des Proteins.
- Die Missense-Mutation R341G in Exon 14 wurde homozygot bei einer 9-jährigen Patientin detektiert. Das Mädchen stammt aus einer konsanguinen Familie libanesischen Ursprungs und hat zwei gesunde Brüder. Sie zeigte eine milde Symptomatik, die Hauptbeschwerden waren ein leichter Kraftverlust in den Extremitäten und im Schultergürtel und eine leicht eingeschränkte Gehstrecke. Durch eine Haplotypenanalyse in dieser Familie wurden alle bisher bekannten CMS-Loci außer *COLQ* und *CHRNA1* ausgeschlossen, wobei nur der *COLQ*-Locus langstreckig homozygot war. Die Sequenzanalyse des Gens ergab einen homozygoten Basenaustausch A>G an Position 1021 in Exon 14, welcher ein Arginin durch ein Glycin ersetzt. Diese Mutation wurde noch nicht in der Literatur beschrieben und konnte bei 75 Normalkontrollen (davon 30 arabischen Ursprungs) nicht nachgewiesen werden.

- Bei einer 4-jährigen deutschen Patientin, welche unter einer generalisierten Schwäche mit krisenhaften Verschlechterungen, einer Ptose und Ophthalmoparese leidet, wurden die bereits bekannte Spleißmutation IVS1-1G>A (Ishigaki et al., 2003) sowie die neue Frameshift-Mutation 950delC in Exon 13 nachgewiesen.

4.2 Die Mutation *COLQ* T441A (Müller et al., 2004c)

Bei 4 Patienten aus drei nicht verwandten deutschen Familien identifizierten wir jeweils homozygot die *COLQ*-Mutation T441A (1321A>G) in Exon 17. Diese Mutation führt zum Austausch einer über Speziesgrenzen konservierten Aminosäure innerhalb der C-terminalen Region des ColQ-Proteins. In über 100 untersuchten Normalkontrollen war diese Mutation nicht nachweisbar. In Familie 1 (mit Patienten 1 und 2) wurde die gesamte Familie auf die Mutation hin untersucht; die Mutation ko-segregiert mit dem CMS Phänotyp und zeigt ein rezessives Vererbungsmuster: die nicht betroffenen Eltern sowie ein gesunder Bruder tragen die Mutation heterozygot, zwei gesunde Brüder tragen die Mutation nicht (Abbildung 20).

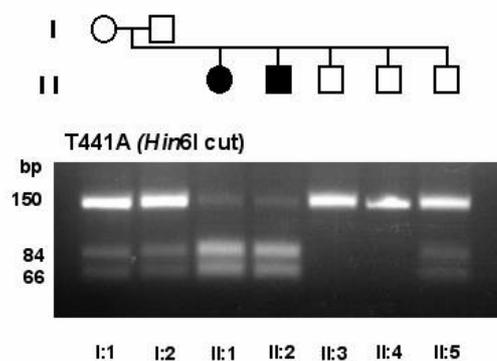


Abbildung 20: RFLP-Analyse in Familie 1 mit der Mutation *COLQ* T441A. Die Mutation führt eine neue Hin6I-Schnittstelle in Exon 17 ein. Die beiden Patienten (II:1 und II:2) sind homozygot für die Mutation, die Eltern sowie ein gesunder Bruder (II:5) heterozygot. Die beiden anderen Geschwister tragen die Mutation nicht.

Bei Patientinnen 3 und 4 war keine DNA der Familienangehörigen verfügbar.

Die klinischen Symptome waren, trotz der identischen Mutation, sehr variabel: Während die beiden Patienten aus Familie 1 nur eine sehr milde myasthene Symptomatik mit Beginn im Grundschulalter aufwiesen, zeigte sich bei Patientinnen 3 und 4 ein schwerer, progressiver Krankheitsverlauf.

Eine Haplotypenanalyse in Familie 1 (zwei betroffene und drei nicht betroffene Geschwister) zeigte eine mögliche Kopplung zum Genort von *COLQ* bei Ausschluss einer Kopplung zu anderen bekannten CMS-Genorten. Patientin 3 zeigt bei zwei intragenischen Polymorphismen (IVS5-27G/C und IVS7-23G/A) und drei dem *COLQ*-Gen benachbarten Mikrosatelliten-Marker (D3S3613 telomer, D3S1286 und D3S3726 centromer von *COLQ*) denselben Haplotyp wie die beiden Patienten aus Familie 1 (Abbildung 21), so dass sich diese Mutation wahrscheinlich auf ein Founder-Ereignis zurückführen lässt. Wenn man annimmt, dass der Marker D3S1286 auf dem väterlichen Allel bei den Patienten 1 und 2 von 296 nach 298 mutiert ist (d.h. keine Rekombination stattfand), ergibt sich ein gemeinsames Fragment von mindestens 4 Mb.

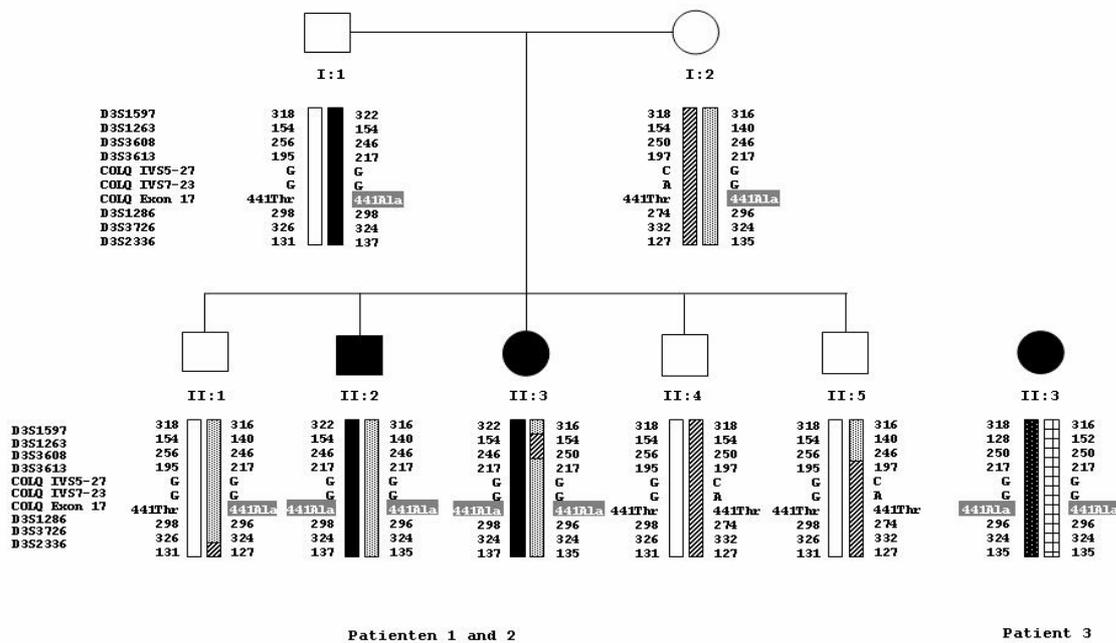


Abbildung 21: Haplotypenanalyse in Familie 1 und Patientin 3 mit der Mutation *COLQ* T441A. Alle drei Patienten tragen identische intragenische Polymorphismen und identische Werte bei den Markern D3S3613, D3S1286 und D3S3726.

Die Mutation *COLQ* T441A wurde durch biochemische Untersuchungen funktionell weiter charakterisiert: Eine Analyse der RNA aus dem Muskel von Patientin 2 (RT-PCR Exons 15-17) zeigte ein cDNA-Produkt gleicher Länge wie die Wildtyp-Kontrolle. Die Mutation T441A hat keine Auswirkungen auf das Spleissen der *COLQ*-RNA, sondern übt ihre Wirkung wahrscheinlich auf Proteinebene aus. Eine quantitative Untersuchung der Transkriptmenge wurde nicht durchgeführt.

Aus Muskelmaterial der Patientin 1 und einem Kontrollmuskel wurde die Aktivität der AChE bestimmt. Muskelextrakte wurden auf einen 5-20%igen Sucrosegradienten aufgetragen; dabei werden die einzelnen AChE-Formen (globuläre Monomere, asymmetrische, ColQ-assoziierte Heteromultimere) nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde in den einzelnen Fraktionen die Esterase-Enzymaktivität kolorimetrisch bestimmt. Dabei zeigte sich im Falle des Patienten ein völliges Fehlen der asymmetrischen, ColQ-assoziierten Formen der AChE; in den entsprechenden Fraktionen konnte keine Esteraseaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 22).

Im Kontrollmuskel waren zwei Hauptpeaks sichtbar: Zum einen ein breiter Peak bei Fraktionen 10-15 (entspricht S-Werten von 3-8), welcher den AChE-Monomeren entspricht, zum anderen ein scharfer Peak in den Fraktionen 37-43 (S-Werte 15-19), welcher die asymmetrischen A12-Heteromultimere darstellt. Der A12-Komplex aus 12 Enzymmolekülen, verknüpft über eine ColQ-Tripelhelix, ist aufgrund seines größeren S-Wertes in den unteren Fraktionen des Gradienten zu finden. Dieser A12-Peak fehlt komplett im Patientenmuskel, es entsteht auch kein neuer Peak bei einem anderen S-Wert.

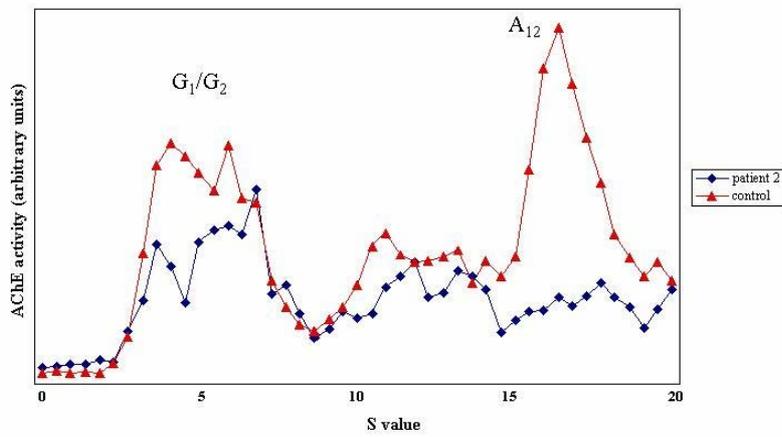


Abbildung 22: Messung der Esterase-Aktivität in Fraktionen einer Sucrosegradienten-Zentrifugation. Die roten Dreiecke symbolisieren die Werte aus Kontrollmuskel, die blauen Quadrate die des Patienten. Die Einheiten für die Esteraseaktivität wurden willkürlich gewählt.

F Diskussion

Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse des Mutationsscreenings in den einzelnen CMS-Genen diskutiert werden, anschließend soll die Bedeutung der vorgenommenen Untersuchungen für die Diagnostik, Beratung und Behandlung der CMS-Patienten dargelegt werden.

1 Mutationen in den Untereinheiten des AChR

1.1 Mutationen mit veränderter AChR-Kinetik

1.1.1 Die Slow-Channel-Mutationen α G153S und ϵ L269F

Das Slow-Channel-Syndrom wird durch dominante Punktmutationen in den AChR-Untereinheiten verursacht. Die Mehrheit dieser Mutationen liegt in den M2-Regionen der Untereinheiten und verändert den Öffnungsmechanismus des Rezeptorkanals: die Aktivitätsepisoden der Kanäle sind verlängert, der Abfall der Miniatur-Endplattenpotentiale an den Endplatten der Patienten wird verlängert.

Die Mutation ϵ L269F, die bei einem sporadischen spanischen Patienten identifiziert wurde, liegt in der M2-Region der epsilon-Untereinheit. Sie verlängert die Kanalöffnungszeiten vermutlich durch Stabilisierung des Offen-Zustandes (Engel et al., 1996b). Die Mutation α G153S hingegen liegt in der extrazellulären Domäne der α -Untereinheit. Sie erhöht die Bindungsaffinität des Rezeptors für ACh, der Transmitter dissoziiert dadurch langsamer vom Rezeptor ab und der Kanal öffnet sich mehrfach während Bindung von zwei Molekülen ACh (Sine et al., 1995).

Aus der Literatur ist bekannt, dass das klinische Erscheinungsbild auch bei Patienten mit identischen Slow-Channel-Mutationen sehr heterogen sein kann und von schweren, progressiven Krankheitsverläufen bis zu milden Verläufen, die sich erst in der 2.-3. Lebensdekade manifestieren, („Late-Onset“) reichen kann (Engel et al., 2003a). Die von uns diagnostizierte sporadische Patientin mit der Mutation α G153S gehört zu der Gruppe der Late-Onset-CMS, welche für diese spezielle Mutation im *CHRNA1*-Gen schon beschrieben wurde (Sine et al., 1995). Bei dem spanischen Patienten mit der Mutation ϵ L269F hingegen manifestierte sich die myasthene Symptomatik bereits im Säuglingsalter.

Der Late-Onset-Phänotyp tritt beim SCCMS häufiger auf als bei anderen CMS-Unterformen, wahrscheinlich aufgrund des pathogenen Mechanismus dieser Mutationen. Durch die verlängerte Öffnungszeit der mutierten AChR kommt es zur Überladung der postsynaptischen

Seite mit Kationen, vor allem mit Calcium, und zur langsam voranschreitenden Zerstörung der Endplattenmorphologie.

Als Behandlungsmöglichkeit für das SCCMS hat sich neben Chinidin auch das als Antidepressivum bekannte Fluoxetin etabliert (Harper et al., 2003). Beide Mittel hemmen den Offen-Zustand der AChR-Kanäle. Bei anderen Myasthenieformen führen sie jedoch zu einer weiteren Abnahme der Muskelkraft.

Der spanische Patient mit der Mutation ϵ L269F wurde vor der Kenntnis der Mutation über Jahre hinweg mit Esteraseinhibitoren behandelt, obwohl nie ein therapeutischer Effekt erzielt wurde. Vielleicht kam es durch diese Behandlung sogar zu einer schnelleren Degeneration der Endplatten. Dieses Beispiel zeigt, dass es außerordentlich wichtig ist, eine molekulargenetische Untersuchung bei CMS-Patienten durchzuführen, und die Mutationen genau zu charakterisieren.

1.1.2 Die Fast-Channel-Mutation ϵ A411P

Das Fast-Channel-Syndrom beruht auf verkürzten Öffnungszeiten oder niedrigeren Öffnungswahrscheinlichkeiten des AChR-Kanals und kann, wie auch das Slow-Channel-Syndrom, durch Punktmutationen in den AChR-Untereinheiten verursacht werden. Diese Mutationen liegen jedoch nur selten in den zweiten Transmembrandomänen der Untereinheiten. Fast-Channel-Mutationen werden vorwiegend rezessiv vererbt, wie auch im vorliegenden Fall der italienischen Familie, in der drei Schwestern homozygot für die Mutation ϵ A411P waren. Diese Mutation liegt in der cytoplasmatischen Schleife der ϵ -Untereinheit und bewirkt zusätzlich zum Fast-Channel-Effekt auch eine leichte Reduktion der Rezeptorexpression (Wang et al., 2000).

Ungewöhnlich für Patienten mit *CHRNE*-Mutationen sind die respiratorischen Insuffizienzen, welche bei zwei der drei Schwestern vorkamen. Es wurde allerdings in einem anderen Fall anekdotisch vermerkt (Brownlow et al., 2001), dass Apnoen bei CMS-Patienten mit Fast-Channel-Mutationen vorkommen können.

1.2 *CHRNE*-Mutationen, die zur Rezeptordefizienz führen

Die meisten AChR-Mutationen führen nicht zu einer modifizierten Rezeptorkinetik, sondern zu einer verminderten Rezeptorexpression an der Zelloberfläche. Bei diesen Mutationen handelt es sich meistens um Frameshift-, Nonsense-, Spleiß-, oder Promotormutationen,

jedoch auch vereinzelt um Missense-Mutationen. Auffällig ist, dass sie gehäuft in der ϵ -Untereinheit des AChR auftreten (Ohno and Engel, 2004a). Dafür gibt es zwei Gründe: 1. Die persistierende Expression der fetalen γ -Untereinheit in geringen Mengen auch im adulten Muskel kann teilweise den Ausfall der ϵ -Untereinheit kompensieren (Engel et al., 2003b). Der komplette Ausfall der anderen Untereinheiten ist zu schwerwiegend, da hier kein solches Kompensationssystem existiert; solche Kinder wären vermutlich gar nicht lebensfähig. 2. Das *CHRNE*-Gen hat einen hohen GC-Gehalt, vor allem im Bereich der Exons, die für den cytoplasmatischen Loop kodieren; dies begünstigt DNA-Umlagerungen und somit Nukleotid-Deletionen und Insertionen (Beeson et al., 2005).

1.2.1 Trunkierende *CHRNE*-Mutationen

Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei unserem Patientenkollektiv gemacht. Die meisten *CHRNE*-Mutationen sind entweder Nonsense- oder Frameshift-Mutationen, die ebenfalls einen vorzeitigen Translationstop zur Folge haben. In diesen Fällen entsteht voraussichtlich keine funktionsfähige ϵ -Untereinheit.

Besonders häufig wurden drei Frameshift-Mutationen diagnostiziert: 1267delG, 1293insG und 70insG. 1293insG wurde in unserem Labor bei spanischen, portugiesischen und nordafrikanischen Patienten nachgewiesen. Es handelt sich bei dieser Mutation aller Wahrscheinlichkeit nach um eine Founder-Mutation in der nordafrikanischen Bevölkerung (Beeson et al., 2005), sie kommt bei etwa 1/3 der nordafrikanischen CMS-Patienten vor. Die Mutation wurde möglicherweise von Mauren nach Spanien und Portugal gebracht und verbreitet.

Ob sich die 70insG-Allele auch alle auf einen gemeinsamen Founder zurückführen lassen, wurde noch nicht untersucht. In unserem Patientenkollektiv fanden wir diese Mutation nicht nur bei Spaniern und Portugiesen, sondern auch bei einem südosteuropäischen Patienten.

Bei der Mutation 1267delG handelt es sich um eine Founder-Mutation in der Population der Roma (Morar et al., 2004). Interessanterweise konnte sie auch bei Patienten aus Indien auf dem gleichen chromosomalen Hintergrund wie in der Roma-Population festgestellt werden, ein genetischer Beweis für die Herkunft der Roma aus Indien. Fast 2/3 der Patienten mit *CHRNE*-Mutationen aus unserem gesamten Patientenkollektiv tragen 1267delG, vorwiegend in homozygoter Form. Diese Verteilung spiegelt den überproportionalen Anteil an Patienten aus Südosteuropa und/oder aus der Volksgruppe der Roma in unserem Patientenkollektiv wieder.

1.2.2 Missense-Mutationen

Die neu identifizierten Missense-Mutationen wurden nicht weitergehend in *in vitro*-Assays charakterisiert, deshalb ist es nicht auszuschließen, dass sie auch kinetische Effekte haben. Zahlreiche Punktmutationen in der ϵ -Untereinheit, die nicht in der zweiten Transmembranregion liegen, sind sogenannte „Low-Expressor“-Mutationen, d.h. die Expression dieser mutierten Untereinheiten liegt weit unter dem Wildtyp-Niveau (Engel and Sine, 2005).

Die Missense-Mutation L-12R liegt im Signalpeptid zum Eintransport ins Endoplasmatische Retikulum, die Mutation könnte eine falsche Lokalisation der epsilon-Untereinheit verursachen und auf diesem Wege zu einer Rezeptordefizienz führen. Es wurden bereits zwei andere Mutationen im Signalpeptid publiziert, diese führen zu Rezeptordefizienz (V-13D (Middleton et al., 1999) und G-8R (Ohno et al., 1996)), der genaue Wirkmechanismus wurde allerdings nicht genau charakterisiert. R286M ist letzte Aminosäure im Exon 8, das veränderte Nukleotid, 857G>T, ist sogar die letzte Base in Exon 8 und Teil der Spleißdonorstelle. Die pathogenen Auswirkungen dieser Mutation liegen wahrscheinlich eher auf der Spleißebene, als auf Proteinebene. Die Mutation 646_648del3 hat den Verlust eines Isoleucin an Position 216 zur Folge, welches die drittletzte Aminosäure in der extrazellulären Domäne ist. Die funktionellen Auswirkungen dieser Mutation sind unbekannt. Bei der Mutation S235L in der ersten Transmembranregion könnte es sich auch um eine Fast-Channel-Mutation oder eine kombinierte Low-Expressor/Fast-Channel-Mutation handeln. Eine Slow-Channel-Mutation ist wegen des guten Ansprechens des Patienten auf Esteraseinhibitoren und das rezessive Vererbungsmuster der Mutation eher unwahrscheinlich.

1.2.3 Die Spleißmutation *CHRNE* IVS5-16G>A (Müller et al., 2005)

Der deutsche Patient mit den compound heterozygoten Mutationen *CHRNE* IVS5-16G>A und 911delT zeigte eine typische klinische Symptomatik für *CHRNE*-Mutationen, die zur Rezeptordefizienz führen. Während es sich bei 911delT um eine bereits beschriebene Frameshift-Mutation handelt (Sieb et al., 2000), war es bei *CHRNE* IVS5-16G>A anfangs unklar, ob es sich überhaupt um eine pathogene Mutation handelt. Es ist eine unübliche Spleißmutation, da sie keine der natürlichen Spleißstellen im Gen direkt betrifft. Die RNA-Analyse bewies, dass von diesem Allel vorwiegend Transkripte mit vorzeitigen Stop-Codons gebildet werden (Abbildung 23).

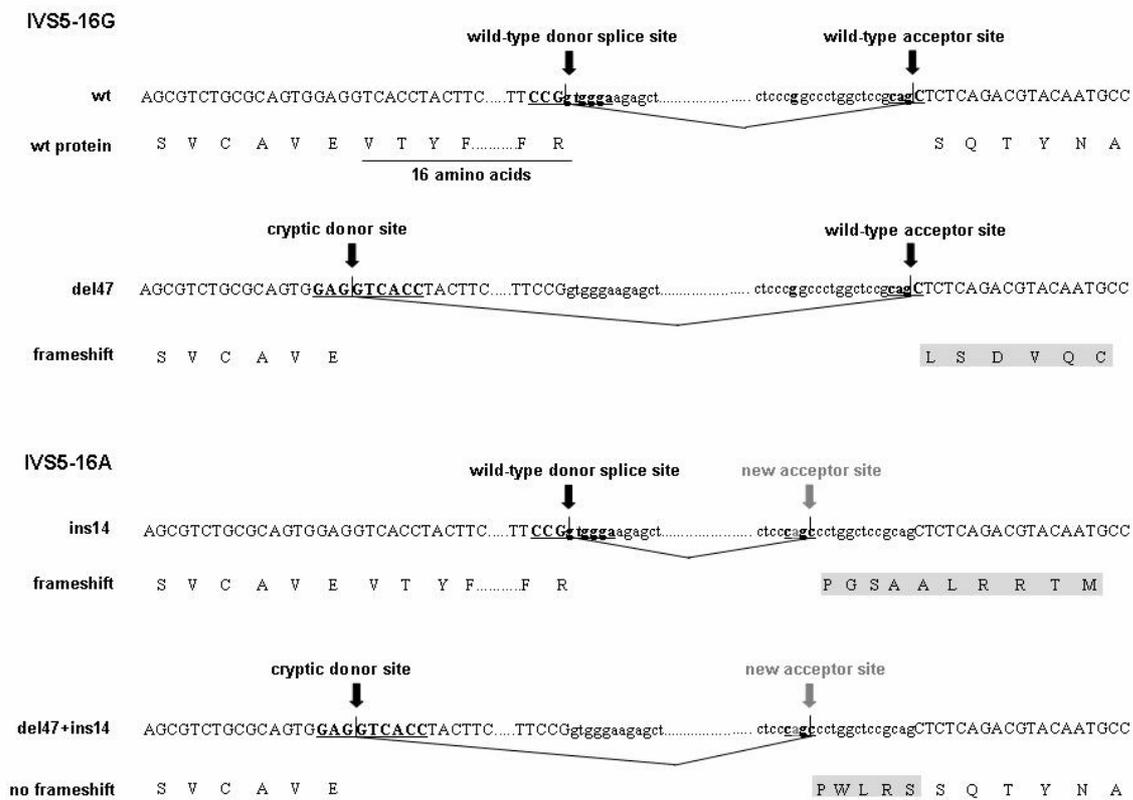


Abbildung 23: Folgen der Mutation IVS5-16G>A auf Proteinebene. Die in den jeweiligen Transkripten verwendeten Spleißstellen sind unterstrichen und mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Transkripte del47 und del47+ins14 entstehen durch den Einsatz einer kryptischen Donor-Spleißstelle in Exon 5.

Die Insertion von 14 Nukleotiden aus Intron 5 hat eine Verschiebung des Leserasters und die Einführung eines Stop-Codon nach 19 Missense-Aminosäuren zur Folge. Die Deletion von 47 Nukleotiden verschiebt ebenfalls das Leseraster und führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon nach 33 Aminosäuren.

Im Transkript del47+ins14 kommt es zu einem Netto-Verlust von 33 Basen aber nicht zu einer Verschiebung des Leserasters. Verglichen mit der Wildtyp-Sequenz, fehlen die Aminosäuren 132-147 aus der extrazellulären Domäne der ϵ -Untereinheit, fünf andere Aminosäuren werden an ihrer Stelle eingefügt. Der fehlende Abschnitt des Proteins enthält jedoch für die Funktion des Rezeptors entscheidende Aminosäuren: eine Glykosylierungsstelle an Position N141 (Gehle and Sumikawa, 1991), sowie ein Cystein (C142) aus der Disulfidbrücke (Betz, 1990; Karlin and Akabas, 1995; Mishina et al., 1985). Der Verlust der Disulfidbrücke verhindert die korrekte Oligomerisierung der AChR-Untereinheiten. Trotz des erhaltenen Leserasters in diesem *CHRNE*-Transkript wird höchstwahrscheinlich kein

funktioneller Rezeptor an der Zelloberfläche exprimiert.

Verwendung der Spleißstellen in Exons 5 und 6:

Die Mutation IVS5-16G>A liegt im Polypyrimidin-Trakt vor Exon 6, durch den Basenaustausch G>A reduziert sich die Effizienz des Traktes jedoch nicht. Die pathogene Wirkung beruht darauf, dass ein neues „CAG“ als Akzeptorspleißstelle vor der natürlichen Spleißstelle gebildet wird. Die Wildtyp-Akzeptor-Spleißstelle von Exon 6 hat einen relativ hohen Konsensuswert (KW 0,838 nach (Shapiro and Senapathy, 1987)). Die neue Akzeptor-Spleißstelle, welche durch die Mutation entsteht, hat einen niedrigeren KW (0,712), wird aber interessanterweise sowohl im Muskel als auch in transfizierten Zellen von der Spleißmaschinerie bevorzugt. Diese Beobachtung stützt die „Scanning“-Theorie von Mount (Mount, 1982), die besagt, dass Akzeptor-Spleißstellen anhand der Verzweigungsstelle („Branchpoint“) erkannt werden. Von hier aus scannt der Spleißapparat die RNA stromabwärts nach dem ersten geeigneten „AG“ ab.

Die Charakterisierung der Mutation IVS5-16G>A führte auch zur Identifizierung einer bisher noch nicht erkannten latenten Donor-Spleißstelle in Exon 5. Die normale Donor-Spleißstelle von Exon 5 ist keine perfekte Spleißstelle, nur 4 der 9 Nukleotide entsprechen der Konsensussequenz. Dies führt vermutlich dazu, dass auch im gesunden Muskel manchmal die stromaufwärts liegende potentielle Donorstelle verwendet wird; dies erklärt die vorhandenen Spuren des del47-Transkriptes im Kontrollmuskel. Im Patienten mit der ϵ IVS5-16G>A – Mutation ist der Anteil an del47+ins14-Transkript höher. Entweder wird hier diese latente Donor-Spleißstelle verstärkt aktiviert, da das Transkript del47+ins14 nicht zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt, oder die geringe Menge an gebildetem Transkript wird im Patientemuskel nicht durch den sogenannten Nonsense-mediated decay abgebaut, da es keine vorzeitigen Stop-codons enthält.

Das Beispiel dieser untypischen Mutation macht deutlich, dass die alleinige Sequenzierung der Exons, des Promotors und der direkten Exon/Intron-Grenzen – wie sie häufig bei der Routinediagnostik durchgeführt wird - nicht ausreichend sein könnte, um alle pathogenen Mutationen zu entdecken. Dies wird in dieser Arbeit auch durch die Identifizierung einer ähnlichen Spleißmutation im *RAPSN*-Gen (*RAPSN* IVS1-15C>A), sowie zweier heterozygoter Mikrodeletionen bestätigt. Manche Mutationen können z.B. auch tief im Intron liegen (Varon et al., 2003). Auch scheinbar bedeutungslose Basenaustausche im Exon, die keine Veränderung der Aminosäuresequenz hervorrufen, können als Spleißmutation agieren,

indem sie Spleiß-Enhancer oder –Silencer modifizieren (Pagani and Baralle, 2004). Wenn möglich, sollten alle unklaren Nukleotidveränderungen funktionell überprüft werden, vor allem wenn sie bei einem Patienten compound heterozygot zu einer schon bekannten pathogenen Mutation vorkommen und eine zweite eindeutige Mutation fehlt.

1.2.4 Klinische Merkmale der Patienten mit *CHRNE*-Mutationen

Der Beginn der Erkrankung lag bei den meisten Patienten mit *CHRNE*-Mutationen im ersten Lebensjahr, die ersten Symptome waren eine bilateraler Ptose und eine fixierte Ophthalmoparese, oft begleitet von einer fazialen Schwäche. Schwer betroffene „floppy-infants“ mit genereller Muskelhypotonie, Ateminsuffizienzen und Gelenkkontrakturen bei Geburt kamen nicht vor. Die motorische Entwicklung im Kleinkindalter war nur bei etwa der Hälfte der Patienten verzögert. Die Ophthalmoparese der externen Augenmuskulatur scheint ein typisches Merkmal für *CHRNE*-Mutationen zu sein und wird bei Patienten mit Mutationen in anderen Genen sehr selten berichtet. Generell sprechen alle Patienten mit *CHRNE*-Mutationen gut auf Esteraseinhibitoren an; bei einigen Patienten mit einer sehr mild ausgeprägten Symptomatik wird keine Behandlung durchgeführt.

Die tendenziell gutartige Ausprägung der Symptomatik im Vergleich zu Patienten mit Mutationen in anderen CMS-Genen lässt sich sicherlich auf die Kompensation durch die fetale γ -Untereinheit zurückführen. Die Variabilität der klinischen Symptome bei Patienten mit identischen Mutationen beruht möglicherweise auf unterschiedlichen Expressionslevels der γ -Untereinheit in verschiedenen Muskelgruppen oder bei einzelnen Patienten.

Bei Frameshift- oder Nonsense-Mutationen könnte durch Retention von Introns oder Entfernung ganzer Exons während des Spleißprozesses in der Zelle der Leserahmen wieder korrigiert werden und eine mildere Erkrankungsform hervorrufen. Dies wurde z.B. für die Mutation 1267delG gezeigt (Croxen et al., 1999), wo durch diesen Mechanismus ein Rest des Proteins funktionsfähig blieb.

Der hohe Anteil an Patienten mit der Mutation ϵ 1267delG in unserem Patientenkollektiv ließ eine getrennte Genotyp-Phänotyp-Korrelation für diese Mutation zu; das Spektrum der klinischen Symptomatik entspricht allerdings im Wesentlichen den generellen Merkmalen für *CHRNE*-Mutationen, die zur AChR-Defizienz führen. Im Unterschied zu früheren Berichten (Abicht et al., 1999) hat sich gezeigt, dass auch bei dieser Mutation schwere Krankheitsverläufe z.T. mit krisenhaften Verschlechterungen vorkommen (siehe Tabelle 1, Kap. E1.3).

1.3 Die Mutationen *CHRND* E381K und del2,2kb

CHRND-Mutationen sind eine sehr seltene Ursache für CMS, bisher sind nur sieben *CHRND*-Mutationen publiziert. Bei zwei dieser Mutationen (S268F in der M2-Region (Gomez et al., 2002) und V93L in der extrazellulären Domäne (Shen et al., 2003)) handelt es sich um Slow-Channel-Mutationen, drei Mutationen sind Fast-Channel-Mutationen (P250Q (Shen et al., 2002), E59K (Brownlow et al., 2001) und L42P (Shen et al., 2003)) und zwei Mutationen erniedrigen bzw. verhindern die Expression der δ -Untereinheit (I58K (Shen et al., 2003), bzw. 756del2 (Brownlow et al., 2001)). Zwei der drei Fast-Channel-Mutationen erniedrigen gleichzeitig moderat die Rezeptorexpression. Da in der Literatur nur zu drei dieser *CHRND*-Mutationen klinische Informationen über die Patienten vorliegen, ist eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation sehr schwierig.

In unserem Fall zeigte der Patient klinisch ausgeprägte, mehrfach intubationspflichtige Apnoen, generalisierte muskuläre Schwäche, Hypotonie, bilaterale Ptose ohne Ophthalmoparese und gutes Ansprechen auf eine Mestinon-Therapie, was zunächst an Mutationen des *RAPSN*- oder *CHAT*-Gens denken ließ. Bei dem Jungen wurde bei Geburt weder eine Arthrogryposis noch Dysmorphien im Gesicht festgestellt, wie bei den Patienten mit δ E59K /756del2 (Brownlow et al., 2001) und δ P250Q homozygot (Shen et al., 2002).

Bei unserem Patienten konnten die Mutationen *CHRND* E381K und eine Mikrodeletion von 2,2 kb compound heterozygot identifiziert werden. Die Mikrodeletion betrifft die Exons 8 und 9 des *CHRND*-Gens und wurde vermutlich durch ein nicht-homologes Rekombinationsereignis zwischen Teilen von Exon 8 und Intron 9 ausgelöst. Für das Intron 9 sind – verglichen mit allen anderen *CHRND*-Introns - in Sequenzdatenbanken (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/>) überproportional viele repetitive DNA-Elemente, wie z.B. *Alu*-Elemente, vermerkt. Dies erhöht möglicherweise die Wahrscheinlichkeit solcher Rekombinationen an dieser Stelle. Die Folgen der Mikrodeletion wurden nicht auf RNA-Ebene überprüft, da kein Muskelgewebe des Patienten vorlag; man kann jedoch mit großer Sicherheit davon ausgehen, dass kein funktionsfähiges δ -AChR-Protein von diesem Allel exprimiert wird.

Die Folgen der Punktmutation E381K für die Rezeptorfunktion sollten in *in vitro*-Untersuchungen nachvollzogen werden. Dass es sich bei E381K um eine Slow-Channel-Mutation handeln könnte, war aufgrund des guten Ansprechens des Patienten auf Esteraseinhibitoren ausgeschlossen. Ebenso wäre eine zweite Mutation, welche die

Expression des Rezeptors stark oder ganz beeinträchtigt, bei diesem Patienten unwahrscheinlich, da ein vollständiges Fehlen des AChR vermutlich nicht mit dem Leben vereinbar ist. Bei E381K könnte es sich daher um eine Fast-Channel-Mutation (mit oder ohne moderate Expressionserniedrigung) oder um eine Mutation mit einem neuartigen Pathomechanismus handeln.

Diese Mutation ist die erste *CHRND*-Mutation in der cytoplasmatischen Schleife dieser Untereinheit. In der ϵ -Untereinheit sind mehrere Mutationen im cytoplasmatischen Loop beschrieben (Ohno and Engel, 2004a), welche nicht zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führen. Zwei der Mutationen (R311W und P331L) erniedrigen das Expressionniveau der ϵ -Untereinheit, die restlichen Mutationen (N436del, A441P, 1254ins18) sind kombinierte Fast-Channel/Low-Expressor-Mutationen. In den anderen beiden Untereinheiten sind die Mutationen α V402F und β 426EQEdel beschrieben (Ohno and Engel, 2004a). Bei der Mutation β 426EQEdel stellte sich heraus, dass diese Aminosäuren für die Interaktion der β - mit der δ -Untereinheit notwendig sind (Quiram et al., 1999).

Die cytoplasmatische Schleife der AChR-Untereinheiten, in der die Mutation δ E381K liegt, ist für die Interaktion des AChR mit Rapsyn essentiell (Huebsch and Maimone, 2003). Es wäre denkbar, dass eine verminderte Interaktion von Rapsyn mit der cytoplasmatischen Schleife der δ -AChR Untereinheit – ausgelöst durch die Mutation E381K - ein reduziertes Clustern der AChR im Bereich der Endplatte zur Folge haben könnte, wie es eigentlich von Rapsyn-Mutationen bekannt ist.

In der Tat zeigten Ko-Transfektionen der AChR-Untereinheiten mit Rapsyn-EGFP in HEK 293-Zellen im Fall der Mutation δ E381K eine reduzierte Ko-Lokalisation von mutiertem Rezeptor und Rapsyn in Clustern in der Zellmembran. Während fast 70% der mit Wildtyp-AChR transfizierten Zellen AChR-Rapsyn-Cluster aufwiesen, war dies bei der Mutation δ E381K nur in 33% der Zellen der Fall. Die pathogene Wirkung dieser Mutation beruht anscheinend auf einer verminderten Interaktion zwischen AChR und Rapsyn.

Bisher ist nicht bekannt, welche Bereiche oder Aminosäuren der cytoplasmatischen Schleifen welcher Untereinheiten mit Rapsyn interagieren. In der Studie von Huebsch und Maimone (Huebsch and Maimone, 2003) verlor jede Untereinheit ihre Fähigkeit, alleine mit Rapsyn-Molekülen zu clustern, durch die Deletion der gesamten cytoplasmatischen Schleife. Im vollständigen AChR war allerdings nur die cytoplasmatische Schleife einer der Untereinheiten ausreichend, um das Clustern mit Rapsyn zu ermöglichen. Aus diesem Grund

ist die deutliche Abnahme der AChR-Rapsyn-Cluster durch die Mutation E381K überraschend.

Ausblick: Dieser Bereich der cytoplasmatischen Schleife ist auch in der ε -Untereinheit konserviert (δ E381 entspräche ε E376). Um die Rolle der Aminosäure δ E381 bzw. der gesamten δ - Untereinheit beim Vorgang der Clusterbildung näher zu beleuchten, soll die Mutation in die ε -Untereinheit eingeführt werden. In analogen Ko-Lokalisationsstudien soll die Clusterbildung des AChR mit der Mutation ε E376K und Rapsyn untersucht werden.

2 Mutationen des *RAPSN*-Gens

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden in unserem Patientenkollektiv 10 verschiedene *RAPSN*-Mutationen in 22 Familien identifiziert; dies entspricht einem Anteil von 9% aller Patienten. Damit stellen *RAPSN*-Mutationen die zweithäufigste Ursache für CMS in unserem Patientenkollektiv dar, was sich mit den Erfahrungen anderer Labors deckt (Beeson et al., 2005). Bei Patienten deutschen Ursprungs sind *RAPSN*-Mutationen sogar die häufigste CMS-Ursache. 48% aller bei deutschstämmigen CMS-Patienten diagnostizierten Mutationen liegen im *RAPSN*-Gen.

Sechs der von uns nachgewiesenen Mutationen sind Missense-Mutationen, darunter die sehr häufige Mutation N88K in Exon 2. Die Missense-Mutationen sind über das gesamte *RAPSN*-Gen verteilt, es fällt keine bevorzugt mutierte Domäne auf.

Durch Missense-Mutationen wird die Fähigkeit von Rapsyn, Cluster mit dem AChR zu bilden, in heterologen transfizierten Zellen vermindert (Ohno et al., 2002). An der postsynaptischen Membran der Endplatte sind die AChR-Cluster genau gegenüber der präsynaptischen Nervenendigung positioniert. Durch eine diffusere Verteilung der AChR über die gesamte postsynaptische Membran bei Patienten mit *RAPSN*-Mutationen kann die Signalübertragung vermutlich weit weniger effizient ablaufen.

Bei vier Mutationen handelt es sich um trunkierende Mutationen, welche einen vorzeitigen Translationsstop verursachen. Darunter befinden sich auch eine ungewöhnliche Spleißmutation (IVS1-15C>A), die nicht direkt eine der natürlichen Spleißstellen betrifft, sowie eine Mikrodeletion von 4,5 kb (Müller et al., 2004b). Diese Mikrodeletion ist die bislang einzige, die für das *RAPSN*-Gen berichtet wurde, und entstand wahrscheinlich durch eine homologe Rekombination. Die beiden Deletionsbruchstellen in Intron 6 bzw. hinter dem

RAPSN-Gen befinden sich in zwei *Alu*-Elementen gleicher Orientierung, die eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Diese Tatsache könnte die nicht-legitime Rekombination begünstigt haben. Die Introns 2 und 6 des *RAPSN*-Gens sind relativ lang und beherbergen viele repetitive Sequenzelemente, was die Gefahr von nicht-legitimen Rekombinationen z.B. im Vergleich zum *CHRNE*-Gen, erhöht.

Bei Patienten mit *RAPSN*-Mutationen können in der Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwei unterschiedliche Phänotypen unterschieden werden: ein milder „Late-Onset“-Phänotyp mit Beginn im jugendlichen oder frühen Erwachsenenalter, sowie ein „Early-Onset“-Phänotyp mit Beginn vor dem 5. Lebensjahr (meistens schon neonatal), und einer schweren myasthenen Symptomatik (Burke et al., 2003). Zwei der 28 von uns untersuchten Patienten können dem „Late-Onset“-Phänotyp zugeordnet werden; beide Patienten waren homozygot für die Mutation N88K. Bisher wird der „Late-onset“-Phänotyp nur im Zusammenhang mit der Mutation N88K in homozygoter Konstellation erwähnt.

Patienten mit dem „Early-Onset“-Phänotyp werden häufig mit Gelenkkontrakturen und/oder Dysmorphien des Gesichtsschädels (langer Gesichtsschädel, tiefliegende Ohren, hoher Gaumen, zeltförmiger Mund) geboren (Burke et al., 2004)); die Kontrakturen kommen durch unzureichende Fetusbewegungen im Mutterleib zustande. Auch wird bei den meisten „Early-Onset“-Patienten von Krisen mit respiratorischen Insuffizienzen in der Kindheit berichtet (Burke et al., 2004). Eine ausführlichere Untersuchung von Burke und Kollegen ergab auch, dass Gelenkkontrakturen vorwiegend bei Patienten vorkommen, bei denen eine der Mutationen eine trunkierende ist (Beeson et al., 2005).

In unserem Patientenkollektiv haben fünf Patienten eine trunkierende *RAPSN*-Mutation: Q21X, IVS1-15C>A, 1177delAA bei zwei Patienten sowie die 4,5 kb Mikrodeletion. Bei drei dieser Patienten sind Gelenkkontrakturen bekannt (60%, gegenüber 71% bei Burke und Kollegen (Burke et al., 2004)). Alle fünf Patienten zeigen den „Early-Onset“-Phänotyp. Von den anderen 22 Patienten mit Missense-Mutationen hatten sechs Kontrakturen oder Dysmorphien des Gesichtsschädels (27,3%), nur einer dieser Patienten war homozygot für die Mutation N88K.

Interessanterweise scheint die Mutation 1177delAA bei zwei Patienten aus unserem Kollektiv keine Kontrakturen zu verursachen, jedoch bei zwei britischen Patienten (Burke et al., 2004). Diese Abweichung von anderen Nullmutationen könnte damit zusammenhängen, dass 1177delAA im letzten Exon des *RAPSN*-Gens liegt. Es wäre möglich, dass ein Transkript von

diesem Allel bei manchen Patienten teilweise dem Abbau durch Nonsense mediated decay entgeht und die pathogene Wirkung der Mutation in diesen Fällen eher mit der Auswirkung einer Missense-Mutation vergleichbar wäre. Das neue Terminationscodon folgt 14 Missense-Aminosäuren nach der Mutation; man erhielte ein Protein, welches nur sechs Aminosäuren kürzer wäre als das Wildtyp-Protein. Allerdings wären die C-terminale Phosphorylierungsstelle sowie ein Teil der RING-Domäne nicht mehr vorhanden.

2.1 Die Mutation *RAPSN* N88K – eine indoeuropäische Founder-Mutation (Müller et al., 2004a; Müller et al., 2003)

Im Laufe der molekulargenetischen Analyse des *RAPSN*-Gens in unserem Patientengut war aufgefallen, dass die Missense-Mutation N88K auffallend häufig bei Patienten kaukasisch-europäischer Herkunft, jedoch unterschiedlicher Nationalitäten, nachgewiesen wurde. In der Regel kommen CMS-Mutationen nur bei einzelnen Familien (sog. „private mutations“) oder in bestimmten Bevölkerungsgruppen (z.B. Roma) vor. Aus der Analyse von Mikrosatellitenmarkern ergaben sich allerdings widersprüchlich Ergebnisse dazu, ob es sich bei der Mutation N88K um eine Founder-Mutation handelt (Burke et al., 2003; Dunne and Maselli, 2004; Müller et al., 2003; Ohno and Engel, 2004b; Richard et al., 2003).

Mit Hilfe der Analyse von 21 SNPs in und um das *RAPSN*-Gen (verteilt über einen Abschnitt von insgesamt 6 Mb auf Chromosom 11) konnte gezeigt werden, dass die 41 Chromosomen von 21 CMS-Patienten mit der Mutation N88K alle die gleiche Abstammung haben. Alle von uns untersuchten K88-Chromosomen lassen sich auf ein einziges ursprüngliches Mutationsereignis zurückführen (Founder-Effekt). Die genaue Kartierung des Fragmentes auf Chromosom 11 um die Mutation N88K ergab auf allen 41 Chromosomen einen gemeinsamen Founder-Haplotyp, der sich über 360 kb erstreckt.

Die genaue Berechnung des Zeitpunktes, zu dem die Mutation entstanden ist, wird erschwert durch die Lage des *RAPSN*-Gens in der Nähe des Centromers von Chromosom 11. Für diese Centromer-Region wurde eine stark erniedrigte Rekombinationsrate von nur 0 - 0,1Mb/cM beobachtet (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/>). Dennoch kann man schätzen, dass das Mutationsereignis mehrere tausend Jahre zurückliegt. Aufgrund der Verbreitung der Mutation kann man von einer indoeuropäischen Mutation ausgehen. In Übereinstimmung mit dieser Theorie wurde N88K nicht bei Ost-Asiaten oder Schwarzafrikanern nachgewiesen.

Die widersprüchlichen Ergebnisse aus den anderen Labors erklären sich im Nachhinein durch die Lage der dort verwendeten Mikrosatellitenmarker relativ zum Founder-Fragment:

Der Mikrosatellitenmarker D11S986, der in keiner der Untersuchungen mit der Mutation N88K gekoppelt war, liegt weit außerhalb des erweiterten Founder-Fragmentes. Der Marker D11S1252 – in Frankreich und USA bei den meisten Patienten identisch - liegt zwischen SNP 3 und 4, d.h. innerhalb des erweiterten Founderhaplotyps. Der Marker D11S4117, der in allen Untersuchungen mit N88K gekoppelt war, liegt neben SNP 16, könnte also noch Teil des Kern-Founderhaplotyps sein. Dies trifft auch auf den Marker D11S4109 zu, der zwischen SNP 14 und 15 liegt. Bei diesem Marker ließ sich bei nordamerikanischen Patienten kein bestimmter Wert der Mutation N88K zuordnen. Dies könnte entweder auf weitere Founder-Ereignisse in Nordamerika deuten, oder daraufhin, dass der Marker D11S4109 nach der Entstehung der Mutation N88K auf einigen Allelen mutiert ist. Da Mikrosatellitenmarker bei der DNA-Replikation durch „Stottern“ der Polymerase schneller mutieren als SNPs und da N88K eine sehr alte Mutation ist, ist dies durchaus denkbar. Eine endgültige Beantwortung der Frage ist nur durch Analyse der 41 SNPs bei den nordamerikanischen Patienten möglich.

Die Tatsache, dass N88K eine in Europa weit verbreitete Mutation ist, hat wichtige Konsequenzen für das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf ein CMS. Ein Vorab-Test auf N88K aus Lymphozyten-DNA erspart weitere aufwendige und teilweise invasive Diagnostik, wie z.B. ausführliche elektrophysiologische Messungen oder eine Muskelbiopsie. Diese Untersuchungen sind vor allem bei Kleinkindern und Säuglingen schwierig durchzuführen und oft nur eingeschränkt aussagekräftig.

3 Mutationen im *CHAT*-Gen

Präsynaptische Defekte sind in unserem Patientenkollektiv die seltenste Ursache für CMS; dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Labors, die eine molekulargenetische Diagnostik bei CMS durchführen (Beeson et al., 2005). *CHAT*-Missense-Mutationen können entweder die katalytische Aktivität des Enzyms stark absenken oder die Expression des Proteins erniedrigen (Ohno et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten sieben verschiedene Missense-Mutationen im *CHAT*-Gen identifiziert werden, vier dieser Mutationen wurden zuvor schon von anderen Arbeitsgruppen charakterisiert. Die Analyse der Kristallstruktur von ChAT verdeutlichte die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des Enzyms (Cai et al., 2004): Die Mutation S694C, die bei

den zwei kroatischen CMS-Patienten heterozygot vorlag (Barisic et al., 2005), verändert die Bindungsstelle für Cholin. L210P verändert sowohl das aktive Zentrum des Enzyms als auch die Bindungsstelle für Cholin. Die Mutationen R482G und S498L sind weit entfernt vom aktiven Zentrum und üben nur strukturelle Effekte aus, indem sie die Faltung des Enzyms destabilisieren. Durch eine Fehlfaltung des Enzyms kann sowohl dessen Abbau beschleunigt werden, als auch die katalytische Aktivität herabgesetzt werden, was in Enzymtests gezeigt wurde (Ohno et al., 2001). Die noch nicht näher untersuchten Mutationen G417R, T354M (Barisic et al., 2005) und I336T haben vermutlich nur strukturelle Effekte wie andere Mutationen im Bereich der Aminosäuren 300-500.

Anfangs schien es, als kämen alle *CHAT*-Mutationen nur in jeweils einer Familie vor („private mutations“, (Maselli et al., 2003; Ohno et al., 2001)). Einige Mutationen wurden in der Zwischenzeit dennoch mehrmals identifiziert, wie z.B. I336T in drei kurdisch-türkischen Familien, L210P und S498L bei finnischen CMS-Patienten, sowie auch S694C und T354M (Barisic et al., 2005).

Auffällig bei allen Patienten mit *CHAT*-Mutationen waren sehr häufige krisenhafte Verschlechterungen des Krankheitsbildes, die meist im Rahmen von fieberhaften Infekten auftraten, und mit gefährlichen episodischen Apnoen einhergingen. Die Apnoen traten vorwiegend im Säuglings- und frühen Kindesalter auf. Manchmal kam es im Rahmen dieser respiratorischen Attacken zu Zyanose und zerebralen Krampfanfällen, was teilweise zunächst als eine Epilepsie gedeutet wurde. Zwischen den krisenhaften Verschlechterungen war die myasthene Symptomatik bei einigen Patienten fast nicht vorhanden (Schmidt et al., 2003), was oftmals die Diagnose eines CMS verzögerte.

In einigen Familien waren Säuglinge mit *CHAT*-Mutationen an plötzlichem Kindstod verstorben (Byring et al., 2002). Der Nachweis einer *CHAT*-Mutation hat damit direkte Konsequenzen in der ärztlichen Betreuung der Patienten: Prophylaxe von Apnoen durch Behandlung mit AChE-Hemmern auch bei geringer klinischer Symptomatik, Möglichkeit eines Heimmonitorings bei Säuglingen, Aufklärung der Patienten, bzw. deren Eltern über das Apnoe-Risiko, auslösende Faktoren und deren Vermeidung (Infektprophylaxe) und Interventionsmöglichkeiten (Reanimation).

4 Mutationen im *COLQ*-Gen

Aus der Literatur ist bekannt, dass Patienten mit AChE-Defizienz häufig ein relativ schweres Krankheitsbild aufweisen, das nicht auf eine Therapie mit AChE-Hemmern anspricht (Engel and Sine, 2005). Die in unserem Patientengut bislang identifizierten Patienten mit *COLQ*-Mutationen zeigten unterschiedlich schwere Krankheitsbilder, insgesamt zeigte sich, dass *COLQ*-Mutationen die variabelste Krankheitsausprägung verursachen: von einer sehr milden Form, bei der nur okuläre und faciale Muskeln betroffen sind, bis zu einer schwer beeinträchtigenden Form, bei der die Patienten nach einigen Jahren rollstuhlpflichtig werden. Bemerkenswert ist, dass eine mäßig ausgeprägte myasthene Symptomatik im Kindesalter teilweise nicht erkannt und die Diagnose eines CMS erst im Erwachsenenalter gestellt wurde.

Bei *COLQ*-Patienten aus unserem Patientengut scheint es, dass Patienten mit mindestens einer trunkierenden *COLQ*-Mutation (Nonsense-, Frameshift- oder Spleißmutation) tendenziell schwerer betroffen sind als Patienten mit Missense-Mutationen in beiden Genkopien. Allerdings können auch Patienten mit identischen Mutationen unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung aufweisen, was auf unbekannte modifizierende Faktoren hinweisen könnte.

Bei der Hälfte der CMS-Patienten mit *COLQ*-Mutationen sind okuläre und faciale Muskeln nicht betroffen, die Muskelschwäche ist nur auf die Muskulatur des Gliedergürtels und der Extremitäten verteilt. Aus diesem Grund sollten bei CMS-Patienten mit diesem Verteilungsmuster und einer nicht eindeutig positiven Reaktion auf Tensilon/Mestinon *COLQ*-Mutationen in Betracht gezogen werden. Interessanterweise wurde bei vier unserer Patienten mit *COLQ*-Mutationen eine Besserung der Symptome mit geringen Mestinondosen am Anfang der Therapie geschildert, bevor eine deutliche Verschlechterung einsetzte.

ColQ verankert AChE-Moleküle im synaptischen Spalt der neuromuskulären Endplatte. Ein komplettes Fehlen von ColQ oder eine herabgesetzte Fähigkeit von mutiertem ColQ, zu trimerisieren oder in die Basallamina zu inserieren, hat eine schwache oder fehlende Verankerung der Esterase zur Folge. Im synaptischen Spalt sind in diesem Fall nur AChE-Monomere vorhanden, die nicht in der Basallamina verankert sind. Bei dieser AChE-Defizienz wird ACh nicht schnell genug abgebaut, die AChR bleiben zu lange aktiv und es kommt zu einer Überladung der postsynaptischen Seite mit Kationen, ähnlich der Situation beim Slow-Channel-Syndrom.

Die Folgen einer Mutation im *COLQ*-Gen kann mittels Sucrosegradienten-Zentrifugation von Muskelextrakten analysiert werden. In diesem Zentrifugationsschritt werden AChE-Monomere von AChE/ColQ-Komplexen getrennt; ihre Aktivität kann danach getrennt bestimmt werden. Im Fall der Mutation T441A im C-terminalen Bereich des Proteins zeigte eine solche Untersuchung das vollständige Fehlen von AChE/ColQ-Komplexen im Patientenmuskel (Müller et al., 2004c). Die Arbeit von Kimbell und Kollegen bestätigte, dass die C-terminale Domäne von ColQ essentiell für die Trimerisierung von ColQ sowie die Insertion der AChE/ColQ-Komplexe in die Basallamina ist (Kimbell et al., 2004). Wurden ColQ-Moleküle mit Mutationen in der C-terminalen Domäne zusammen mit AChE in Zellkultur exprimiert, wurden AChE/ColQ-Komplexe gebildet; an den Endplatten der jeweiligen Patienten konnten diese Komplexe nicht nachgewiesen werden, da sie vermutlich nicht in die Basallamina inserieren konnten (Kimbell et al., 2004).

Die Punktmutation R341G, welche bei einer libanesischen CMS-Patientin in homozygoter Form identifiziert wurde, könnte die Trimerisierung von ColQ verhindern. Die Aminosäure liegt in der Trimerisierungsdomäne von ColQ und wurde bislang noch nicht anderweitig beschrieben, dafür allerdings eine Mutation der Nachbar-Aminosäure, D342E (Ohno et al., 2000). Bei dieser Mutation wurden in transfizierten COS-Zellen nach einer Sucrosegradienten-Zentrifugation keine A12-AChE/ColQ-Komplexe nachgewiesen, dafür jedoch ein neuer Peak, welcher einem Komplex von vier Molekülen AChE und einem ColQ-Molekül entspräche. In der Arbeit von Kimbell und Kollegen wurde außerdem gezeigt, dass die D342E-Mutante nicht in die Basallamina inseriert (Kimbell et al., 2004).

5 Vorgehensweise bei der molekulargenetischen Diagnostik eines CMS

Aus den erhaltenen Daten dieser Arbeit zu Vorkommen und Häufigkeit von CMS-Mutationen sowie Genotyp-Phänotyp-Korrelationen lassen sich Diagnose, Prognose und Therapie von CMS-Patienten verbessern. Einige charakteristische Symptome haben sich als richtungsweisend für die genetische Analyse herausgestellt:

Ein repetitives CMAP als Antwort auf einen Einzelreiz, sowie ein fehlendes Ansprechen auf Esteraseinhibitoren sind Hinweise auf eine Esterasedefizienz (*COLQ*-Mutation) oder ein Slow-Channel-Syndrom. Die repetitive Antwort kann aber gerade bei Kindern – trotz entsprechender Mutationen – ausbleiben. Ein dominanter Erbgang in der Familie ist ein zusätzlicher Vermerk auf ein Slow-Channel-Syndrom.

Ein wichtiges klinisches Kriterium für einzelne CMS Formen ist die Art der okulären

Mitbeteiligung. Während Patienten mit Nullmutationen der ϵ -Untereinheit des AChR immer eine Ptose und eine fixierte Ophthalmoparese aufwiesen, war bei Patienten mit der *RAPSN*-Mutation N88K die Ptose oft wenig auffällig und eine fluktuierende Ophthalmoparese manifestierte sich mit dem Auftreten von Doppelbildern oder wechselnden Schielstellungen, war jedoch niemals fixiert. Patienten mit *CHAT*-Mutationen hatten hingegen nur eine Ptose, während bei *COLQ*-Mutationen die okuläre Muskulatur in einigen Fällen gar nicht beteiligt war.

Das häufige Auftreten episodischer Apnoen – insbesondere im Rahmen von respiratorischen Infekten - wurde als typisch für Patienten mit *CHAT*- Mutationen beschrieben. Die Beobachtungen an Patienten mit *RAPSN*-Mutationen zeigen, dass in dieser Patientengruppe ebenfalls lebensbedrohliche respiratorische Insuffizienzen vorkommen. Auch bei Patienten mit *CHRND*-Mutationen sowie bei Patienten mit Fast-Channel-Mutationen können vereinzelt respiratorische Probleme auftreten.

Gelenkkontrakturen oder Dysmorphien des Gesichtsschädels können Hinweise auf *RAPSN*- oder *CHRND*-Mutationen sein, wurden hingegen nie bei Patienten mit *CHRNE*- oder *CHAT*-Mutationen beobachtet.

Einen weiteren sehr wichtigen Aspekt für die Diagnostik liefert die ethnische Herkunft des Patienten, da zahlreiche Mutationen besonders häufig in bestimmten Bevölkerungsgruppen gefunden wurden. Abbildung 24 zeigt die Strategie bei der genetischen Diagnostik von CMS.

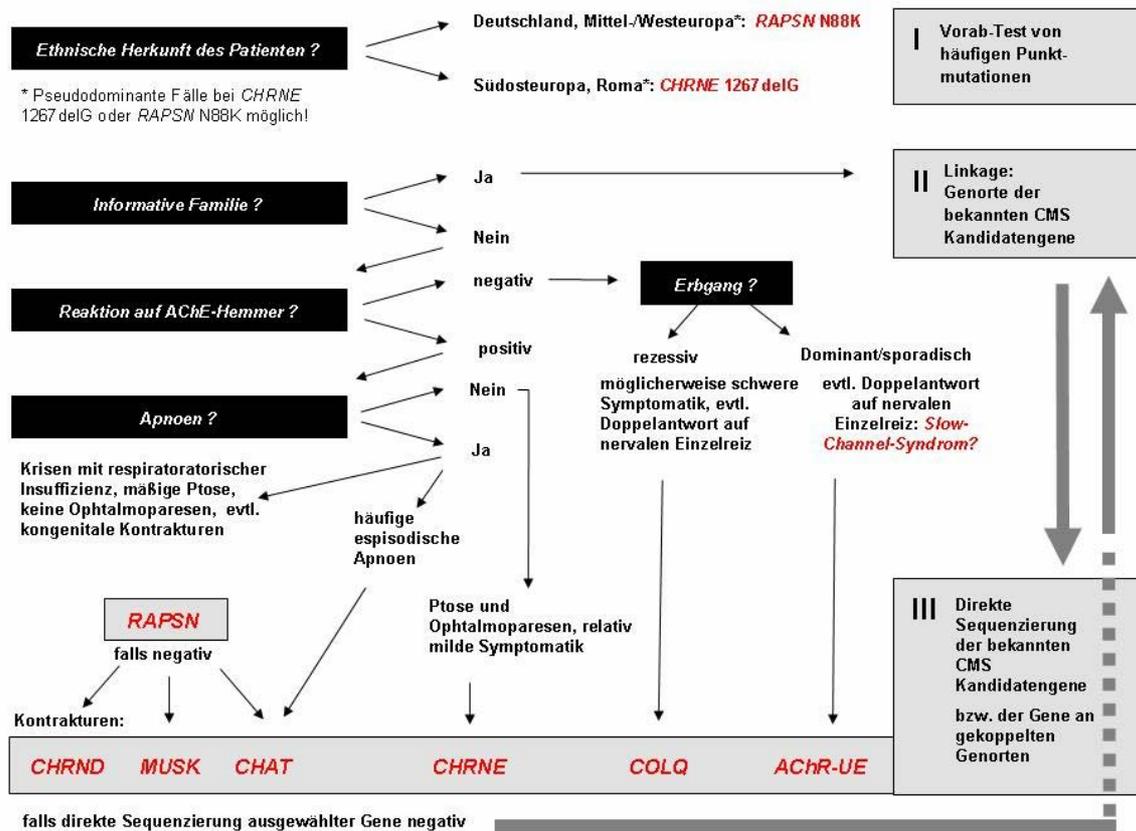


Abbildung 24: Diagnostische Strategie bei CMS. Bei informativen Familien kann die Anzahl in Frage kommender Genloci durch Haplotypenanalyse eingengt werden. UE = Untereinheiten.

6 Einordnung der Ergebnisse aus der molekulargenetischen Diagnostik der CMS

Bei annähernd 60% der CMS-Patienten aus unserem Patientenkollektiv konnte die der Erkrankung zu Grunde liegende Mutation festgestellt werden. Bei den restlichen 40% der Patienten konnte jedoch mit oben beschriebenen Strategien die genetische Ursache ihres CMS bislang noch nicht ermittelt werden. Dies liegt zum einen daran, dass die CMS sowohl genetisch als auch klinisch eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe bilden und dass auch bei CMS-Patienten mit identischen Mutationen der Phänotyp sehr stark variieren kann. Zum anderen ist eine genaue klinische Abgrenzung eines CMS gegenüber anderen Muskelerkrankungen – vor allem im Säuglings- und Kleinkindalter - oftmals schwierig. Des Weiteren gibt es Patienten mit klinisch und elektrophysiologisch gesichertem CMS, deren Erkrankung wahrscheinlich auf Mutationen in bislang nicht identifizierten Genen beruht. Insbesondere Gene, deren Proteinprodukte spezifisch an der neuromuskulären Endplatte exprimiert werden, bieten sich als neue Kandidatengene für CMS an. Dabei könnte es sich

sowohl um postsynaptisch lokalisierte Proteine (z.B. aus der Agrin-Rapsyn-MuSK Signalkaskade), als auch um Proteine aus dem synaptischen Spalt oder um präsynaptische Proteine (z.B. Proteine des Vesikelfreisetzungapparates) handeln. In der Literatur sind bereits einige CMS-Patienten mit bislang unbekannter molekularer Ursache beschrieben, bei denen die Untersuchung der Endplatte auf einen präsynaptischen Defekt deutet (Maselli et al., 2001; Walls et al., 1993). Solche Patienten bieten eine einzigartige Möglichkeit, mittels weiterer genetischer Untersuchungen neue CMS-Gene zu identifizieren und die jeweiligen Mutationen biochemisch zu charakterisieren.

Die Ausgangslage in der molekulargenetischen Diagnostik der CMS ist vergleichbar mit der bei Patienten mit Gliedergürtel-Muskeldystrophie oder mit Charcot-Marie-Tooth Neuropathien; diese Erkrankungen werden auch von Mutationen in zahlreichen unterschiedlichen Genen verursacht – mit jeweils überlappenden Phänotypen. Auch für diese Erkrankungen gibt es vermutlich weitere noch nicht identifizierte Krankheitsgene. Anders verhält es sich bei genetischen Erkrankungen, die in den allermeisten Fällen von Mutationen in nur einem einzigen Gen verursacht werden wie z.B. bei der zystischen Fibrose. Hier ist die genetische Diagnostik relativ einfach, oft beschränkt sie sich auf das Testen einer besonders häufigen Mutation (z. B. $\Delta F508$ bei 2/3 der Patienten mit zystischer Fibrose) (Daten von <http://www.geneclinics.org/>).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden Mutationen in sechs der neun bislang bekannten CMS-Gene gefunden. In den meisten Fällen handelt es sich um autosomal rezessiv vererbte Mutationen, die einen Verlust des jeweiligen Proteins oder eine Reduktion seiner physiologischen Aktivität zur Folge haben. Die Konsequenz aller Mutationen ist letztendlich immer eine reduzierte Effizienz der neuromuskulären Signalübertragung. Die Mechanismen sind im Einzelnen entweder eine zu geringe Freisetzung von Neurotransmitter, insbesondere bei längerer körperlicher Aktivität (präsynaptische CMS) oder eine ineffiziente Signalverarbeitung auf postsynaptischer Seite durch eine zu geringe Rezeptorzahl oder durch Rezeptoren mit reduzierter Aktivität. Der Pathomechanismus rezessiver synaptischer CMS (*COLQ*-Mutationen, Esterasedefizienz) hat interessanterweise ähnliche Konsequenzen wie dominant vererbte SCCMS (AChR-Mutationen): die Dauer der Signalübertragung ist verlängert, führt zu einer Überlastung der postsynaptischen Seite mit Kationen und dadurch zu einer Degeneration der Endplatten.

Ein kompletter Expressionsverlust des Proteins wurde nur bei Mutationen im *CHRNE*- und im *COLQ*-Gen beobachtet. Einzig bei diesen beiden CMS-Genen sind Nullmutationen auf beiden Allelen möglich. Etwa 2/3 aller veröffentlichten Mutationen sind hier trunkierende Mutationen, in Folge derer kein (vollständiges) Protein exprimiert wird (Ohno and Engel, 2004a). Dies ist auf vorhandene Kompensationsmechanismen zurückzuführen: durch die γ -Untereinheit bei *CHRNE*-Mutationen, bei *COLQ*-Mutationen durch die Restaktivität von freier, monomerer Esterase an der Endplatte.

Für das *CHAT*-Gen sind bislang fast ausschließlich Missense-Mutationen publiziert, nur zwei beim Menschen beschriebene *CHAT*-Mutationen sind trunkierende Mutationen (Ohno and Engel, 2004a). Ähnlich verhält es sich bei den AChR-Untereinheiten α , β , und δ . Für das *RAPSN*-Gen hingegen sind in etwa gleich viele trunkierende wie nicht-trunkierende Mutationen veröffentlicht (Ohno and Engel, 2004a), allerdings sollte man hier jedoch den großen Anteil an CMS-Patienten mit der Missense-Mutation N88K berücksichtigen. Aus den bisherigen Daten kann man schlussfolgern, dass ein vollständiges Fehlen dieser Proteine entweder (embryonal) letal ist oder zu einer weitaus schwerwiegenderen Erkrankung als CMS führt. Diese Beobachtung bei CMS-Patienten entspricht größtenteils den Ergebnissen aus Experimenten mit Knockout-Mäusen: *COLQ*-Knockout-Mäuse werden lebend geboren, entwickeln aber etwa 5 Tage nach Geburt ein Zittern bei Bewegung (Feng et al., 1999). Diese Mäuse haben außerdem eine reduzierte Lebensspanne, zwei Drittel der Tiere sterben wenige Wochen nach der Geburt. *CHRNE*-Knockout-Mäuse werden etwa einen Monat nach Geburt schwächer und weniger aktiv als Wildtyp-Wurfgeschwister (Missias et al., 1997). Rapsyn-defiziente Mäuse hingegen sterben wenige Stunden nach Geburt an respiratorischem Versagen (Gautam et al., 1995).

Bei den meisten CMS-Mutationen handelt es sich um Veränderung eines oder weniger Nukleotide. Bei über 150 verschiedenen publizierten CMS-Mutationen handelt es sich nur bei drei Mutationen um Mikrodeletionen von mehr als 1 kb (Abicht et al., 2002; Müller et al., 2004b). Im Vergleich dazu sind bei der Muskeldystrophie Duchenne mit Mutationen im Dystrophin-Gen 70% der Mutationen Deletionen oder Duplikationen mehrerer Exons (Daten von <http://www.geneclinics.org/>). Dies spiegelt die Größe und die Struktur der betroffenen Gene wider: Im Vergleich zu Dystrophin sind alle CMS-Gene, vor allem die Gene kodierend für die AChR-Untereinheiten, relativ kleine Gene mit kurzen Introns, was die Wahrscheinlichkeit einer Deletion oder Duplikation durch illegitime Rekombination herabsetzt.

7 Ausblick

Klinisch gut charakterisierte Patienten, bei denen durch vorangegangene Untersuchungen die derzeit bekannten Ursachen von CMS ausgeschlossen werden konnten, bieten eine gute Möglichkeit, mittels weiterer genetischer Untersuchungen neue Kandidatengene zu identifizieren.

In einer großen ungarischen CMS Familie mit drei betroffenen Kindern (davon eines verstorben) sowie neun weiteren nicht betroffenen Geschwistern wurden mittels Kopplungsanalyse alle derzeit bekannten CMS-Gene ausgeschlossen. Die Eltern der betroffenen Kinder sind wissentlich nicht miteinander verwandt, gehören jedoch beide derselben isolierten ungarischen Religionsgemeinschaft an.

Der 15jährige Indexpatient fiel bereits im Kleinkindalter durch eine Muskelschwäche mit verminderter Belastungstoleranz sowie durch eine beidseitige Ptose, Schluck- und Kauschwierigkeiten auf. Außerdem litt er unter zahlreichen episodischen Krisen begleitet von respiratorischer Insuffizienz. Eine Muskelbiopsie zeigte nur eine unspezifische Typ II-Faseratrophie. Nachdem bei einer repetitiven Stimulation distaler Nerven ein pathologisches Dekrement nachgewiesen wurde und der Patient eine positive Reaktion auf Esteraseinhibitoren zeigte, wurde die Diagnose eines CMS gestellt. Eine ebenfalls betroffene Schwester des Patienten verstarb im Alter von 13 Jahren im Rahmen einer respiratorischen Krise. Ein älterer Bruder des Indexpatienten weist nur eine milde klinische Symptomatik auf. Bei dieser Familie wurden bereits alle bisher bekannten CMS-Gene entweder durch direkte Sequenzierung oder durch eine Haplotypenanalyse ausgeschlossen, d.h. der zu Grunde liegende genetische Defekt muss in einem Gen liegen, welches bisher noch nicht als CMS-Kandidatengenen beschrieben wurde. Die genetische Ursache des CMS in dieser ungarischen Familie soll über ein positionelles Kandidatengenenverfahren identifiziert werden.

Vier Familien aus Süditalien sollen parallel einer ähnlichen genomweiten Kopplungsanalyse unterzogen werden. Die Indexpatienten aus diesen Familien zeigen alle einen einheitlichen „neuen“ Phänotyp einer „Gliedergürtelmyasthenie“ (Rodolico et al., 2002). Auffällig bei allen Patienten ist eine proximale Betonung der myasthenen Muskelschwäche bei Fehlen einer Ptose bzw. einer bulbären Symptomatik. Elektrophysiologisch zeigte sich bei allen Patienten ein pathologisches Dekrement bzw. Auffälligkeiten im Einzelfaser-EMG als Hinweis auf eine Störung der neuromuskulären Übertragung. Alle Patienten zeigten eine positive Reaktion auf AChE-Hemmer. In den Muskelbiopsien dieser Patienten wurden zusätzlich tubuläre

Aggregate nachgewiesen. Die genetische Veränderung, welche diese CMS-Unterform verursacht, ist bislang noch nicht bekannt.

Vorbereitend konnten in diesen Familien, die teilweise wissentlich konsanguin sind und alle aus der gleichen Region Siziliens stammen, mittels gezielter Kopplungsanalysen bzw. direkter Sequenzierung von CMS-Genen die bekannten CMS-Ursachen ausgeschlossen werden. Da dieser Phänotyp extrem selten ist, jedoch mehrfach in einer kleinen Region Süditaliens vorkam, könnte eine Founder-Mutation in einem bislang nicht bekannten CMS-Gen vorliegen. Weitere Familien unterschiedlicher ethnischer Herkunft und dem gleichen Phänotyp stehen zur Verfügung, um die Relevanz gefundener Loci zu bestätigen und diese ggf. weiter einzuengen.

8 Klinische Konsequenzen der molekularen Charakterisierung von CMS

Je nach Lokalisation des Defektes im Bereich der neuromuskulären Endplatte unterscheiden sich die einzelnen Unterformen der CMS hinsichtlich Verlauf, Prognose, Vererbbarkeit und Behandlungsmöglichkeiten. Beispielsweise haben CMS mit Mutationen im *CHAT* Gen eine geringe klinische Symptomatik, können sich jedoch insbesondere im Kleinkindesalter und im Rahmen respiratorischer Infekte krisenhaft verschlechtern, bis hin zu episodischen Apnoen und plötzlichem Kindstod. Eine Behandlung mit AChE-Hemmern ist auch bei geringer Schwäche indiziert, da dies das Risiko für akute respiratorische Verschlechterungen reduziert. Bei anderen Formen ist eine Behandlung mit AChE-Hemmern dagegen langfristig nicht erfolgreich, in bestimmten Fällen (z.B. Slow-Channel-Syndrom, AChE-Defizienz) kann sich die Symptomatik durch AChE-Hemmer sogar dramatisch verschlechtern. Damit hat der Nachweis einzelner Mutationen und deren funktionelle Charakterisierung bei CMS-Patienten häufig direkte therapeutische Konsequenzen, bisweilen auch im Hinblick auf neuartige Behandlungsmöglichkeiten. So wurden bei Patienten mit bislang therapie-refraktären, molekulargenetisch definierten Slow-Channel-Syndromen konstante Behandlungserfolge mit Chinidinsulfat bzw. Fluoxetin berichtet (Harper and Engel, 1998a; 1998b; Harper et al., 2003). Die genaue Klassifizierung eines CMS ist für den einzelnen Patienten daher von großer klinischer Bedeutung.

Trotz einzelner spezifischer Merkmale gelingt eine sichere Abgrenzung der CMS-Unterformen anhand klinischer Kriterien in den meisten Fällen nicht. In der bisherigen Diagnostik von CMS hatte daher die Biopsie des *M. intercostalis* einen hohen Stellenwert.

Neben den Risiken dieses invasiven Eingriffs (Vollnarkose, Pneumothorax) ist dabei problematisch, dass auch eine derartige Charakterisierung eine definitive Einordnung des CMS häufig nicht zulässt. Aus den oben beschriebenen Fortschritten der Molekulargenetik ergeben sich neue Perspektiven für eine nicht-invasive, auf molekulargenetischer Analyse basierende Diagnostik von CMS.

Von besonderer Bedeutung – aufgrund des Risikos für das plötzliche Auftreten einer respiratorischen Insuffizienz – erscheint auch die Testung asymptomatischer Geschwisterkinder. Bei Patienten mit einem „Late-Onset“-Phänotyp besteht die Gefahr, dass diese Erkrankung fälschlich für eine seronegative autoimmune Myasthenie gehalten wird und ineffektiv mit Immunsuppressiva therapiert wird.

Die Charakterisierung CMS verursachender Mutationen kann viel zum Verständnis synapsenspezifischer Vorgänge beitragen. Am Modell der AChE bzw. des nikotinischen AChR des Muskels lassen sich allgemeine Erkenntnisse gewinnen, die sich auf andere transmittergesteuerte Kanäle übertragen lassen und möglicherweise die Pathophysiologie anderer Erkrankungen an schwer zugänglichen Synapsen des Zentralnervensystems verstehen helfen. So konnten beispielsweise als Ursache der autosomal dominanten nächtlichen Frontallappen-Epilepsie Mutationen der α - (*CHRNA4*; 20q13.3) bzw. β -Untereinheit (*CHRNA2*, 1q21-22) des neuronalen nikotinischen AChR identifiziert werden (Übersicht in (Steinlein, 2004)). Ähnlich der Situation beim autosomal dominanten Slow-Channel-Syndrom betreffen die bislang identifizierten Mutationen die zweite Transmembrandomäne der jeweiligen Untereinheit, die die Pore des Ionen-Kanals bildet.

G Literaturverzeichnis

Aarli, J. A., Mattsson, C. and Heilbronn, E. (1975) Antibodies against nicotinic acetylcholine receptor and skeletal muscle in human and experimental myasthenia gravis. *Scand J Immunol* **4**, 849-52.

Abicht, A., Stucka, R., Karcagi, V., Herczegfalvi, A., Horvath, R., Mortier, W., Schara, U., Ramaekers, V., Jost, W., Brunner, J., Janssen, G., Seidel, U., Schlotter, B., Muller-Felber, W., Pongratz, D., Rudel, R. and Lochmuller, H. (1999) A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology* **53**, 1564-9.

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

Anlar, B., Ozdirim, E., Renda, Y., Yalaz, K., Aysun, S., Topcu, M. and Topaloglu, H. (1996) Myasthenia gravis in childhood. *Acta Paediatr* **85**, 838-42.

Barisic, N., Muller, J. S., Paucic-Kirincic, E., Gazdik, M., Lah-Tomulic, K., Pertl, A., Sertic, J., Zurak, N., Lochmuller, H. and Abicht, A. (2005) Clinical variability of CMS-EA (congenital myasthenic syndrome with episodic apnea) due to identical CHAT mutations in two infants. *Eur J Paediatr Neurol* **9**, 7-12.

Beeson, D., Hantai, D., Lochmuller, H. and Engel, A. G. (2005) 126th international workshop: congenital myasthenic syndromes, 24-26 september 2004, naarden, the Netherlands. *Neuromuscul Disord* **15**, 498-512.

Betz, H. (1990) Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* **5**, 383-92.

Brengman, J. M., Ohno, K., Milone, M., Friedman, R. L., Feldman, R. G. and Engel, A. G. (2000) Identification and functional characterization of eight novel acetylcholine receptor (AChR) mutations in six congenital myasthenic syndrome (CMS) kinships. *Neurology* **54**, A182.

Brengman JM, O. K., Milone M et al. (2000) Identification and functional characterization of eight novel acetylcholine receptor (AChR) mutations in six congenital myasthenic syndrome (CMS) kinships. *Neurology* **54**, A182.

Brownlow, S., Webster, R., Croxen, R., Brydson, M., Neville, B., Lin, J. P., Vincent, A., Newsom-Davis, J. and Beeson, D. (2001) Acetylcholine receptor delta subunit mutations underlie a fast-channel myasthenic syndrome and arthrogryposis multiplex congenita. *J Clin Invest* **108**, 125-30.

- Burke, G., Cossins, J., Maxwell, S., Owens, G., Vincent, A., Robb, S., Nicolle, M., Hilton-Jones, D., Newsom-Davis, J., Palace, J. and Beeson, D. (2003) Rapsyn mutations in hereditary myasthenia: distinct early- and late-onset phenotypes. *Neurology* **61**, 826-8.
- Burke, G., Cossins, J., Maxwell, S., Robb, S., Nicolle, M., Vincent, A., Newsom-Davis, J., Palace, J. and Beeson, D. (2004) Distinct phenotypes of congenital acetylcholine receptor deficiency. *Neuromuscul Disord* **14**, 356-64.
- Byring, R. F., Pihko, H., Tsujino, A., Shen, X. M., Gustafsson, B., Hackman, P., Ohno, K., Engel, A. G. and Udd, B. (2002) Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. *Neuromuscul Disord* **12**, 548-53.
- Cai, Y., Cronin, C. N., Engel, A. G., Ohno, K., Hersh, L. B. and Rodgers, D. W. (2004) Choline acetyltransferase structure reveals distribution of mutations that cause motor disorders. *Embo J* **23**, 2047-58.
- Chevessier, F., Faraut, B., Ravel-Chapuis, A., Richard, P., Gaudon, K., Bauche, S., Prioleau, C., Herbst, R., Goillot, E., Ios, C., Azulay, J. P., Attarian, S., Leroy, J. P., Fournier, E., Legay, C., Schaeffer, L., Koenig, J., Fardeau, M., Eymard, B., Pouget, J. and Hantai, D. (2004) MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* **13**, 3229-40.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Croxen, R., Hatton, C., Shelley, C., Brydson, M., Chauplannaz, G., Oosterhuis, H., Vincent, A., Newsom-Davis, J., Colquhoun, D. and Beeson, D. (2002) Recessive inheritance and variable penetrance of slow-channel congenital myasthenic syndromes. *Neurology* **59**, 162-8.
- Croxen, R., Newland, C., Beeson, D., Oosterhuis, H., Chauplannaz, G., Vincent, A. and Newsom-Davis, J. (1997) Mutations in different functional domains of the human muscle acetylcholine receptor alpha subunit in patients with the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* **6**, 767-74.
- Croxen, R., Newland, C., Betty, M., Vincent, A., Newsom-Davis, J. and Beeson, D. (1999) Novel functional epsilon-subunit polypeptide generated by a single nucleotide deletion in acetylcholine receptor deficiency congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol* **46**, 639-47.
- Croxen, R., Young, C., Slater, C., Haslam, S., Brydson, M., Vincent, A. and Beeson, D. (2001) End-plate gamma- and epsilon-subunit mRNA levels in AChR deficiency syndrome due to epsilon-subunit null mutations. *Brain* **124**, 1362-72.
- DeChiara, T. M., Bowen, D. C., Valenzuela, D. M., Simmons, M. V., Poueymirou, W. T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D. L., Rojas, E., Park, J. S., Smith, C., DiStefano, P. S., Glass, D. J., Burden, S. J. and

Yancopoulos, G. D. (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* **85**, 501-12.

Donger, C., Krejci, E., Serradell, A. P., Eymard, B., Bon, S., Nicole, S., Chateau, D., Gary, F., Fardeau, M., Massoulié, J. and Guicheney, P. (1998) Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet* **63**, 967-75.

Dunne, V. and Maselli, R. A. (2003) Identification of pathogenic mutations in the human rapsyn gene. *J Hum Genet* **48**, 204-7.

Dunne, V. and Maselli, R. A. (2004) Common founder effect of rapsyn N88K studied using intragenic markers. *J Hum Genet* **49**, 366-9.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. and Feather-Stone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**, 88-95.

Engel, A. (1994) *Myasthenic Syndromes.*: New-York: Mac Graw-Hill.

Engel, A. G., Ohno, K., Bouzat, C., Sine, S. M. and Griggs, R. C. (1996a) End-plate acetylcholine receptor deficiency due to nonsense mutations in the epsilon subunit. *Ann Neurol* **40**, 810-7.

Engel, A. G., Ohno, K., Milone, M., Wang, H. L., Nakano, S., Bouzat, C., Pruitt, J. N., 2nd, Hutchinson, D. O., Brengman, J. M., Bren, N., Sieb, J. P. and Sine, S. M. (1996b) New mutations in acetylcholine receptor subunit genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* **5**, 1217-27.

Engel, A. G., Ohno, K. and Sine, S. M. (2003a) Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade. *Muscle Nerve* **27**, 4-25.

Engel, A. G., Ohno, K. and Sine, S. M. (2003b) Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* **4**, 339-52.

Engel, A. G. and Sine, S. M. (2005) Current understanding of congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Pharmacol* **5**, 308-21.

Fatt, P. and Katz, B. (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* **117**, 109-28.

Feng, G., Krejci, E., Molgo, J., Cunningham, J. M., Massoulié, J. and Sanes, J. R. (1999) Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol* **144**, 1349-60.

Gautam, M., Noakes, P. G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G. C., Sanes, J. R. and Merlie, J. P. (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* **377**, 232-6.

Gehle, V. M. and Sumikawa, K. (1991) Site-directed mutagenesis of the conserved N-glycosylation site on the nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Brain Res Mol Brain Res* **11**, 17-25.

Gervasio, O. L. and Phillips, W. D. (2005) Increased ratio of rapsyn to ACh receptor stabilizes postsynaptic receptors at the mouse neuromuscular synapse. *J Physiol* **562**, 673-85.

Glass, D. J., DeChiara, T. M., Stitt, T. N., DiStefano, P. S., Valenzuela, D. M. and Yancopoulos, G. D. (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation and is a functional receptor for agrin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**, 435-44.

Gomez, C. M. and Gammack, J. T. (1995) A leucine-to-phenylalanine substitution in the acetylcholine receptor ion channel in a family with the slow-channel syndrome. *Neurology* **45**, 982-5.

Gomez, C. M., Maselli, R. A., Vohra, B. P., Navedo, M., Stiles, J. R., Charnet, P., Schott, K., Rojas, L., Keeseey, J., Verity, A., Wollmann, R. W. and Lasalde-Dominicci, J. (2002) Novel delta subunit mutation in slow-channel syndrome causes severe weakness by novel mechanisms. *Ann Neurol* **51**, 102-12.

Hantai, D., Richard, P., Koenig, J. and Eymard, B. (2004) Congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Neurol* **17**, 539-51.

Harper, C. M. and Engel, A. G. (1998a) Quinidine sulfate therapy for the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol* **43**, 480-4.

Harper, C. M. and Engel, A. G. (1998b) Safety and efficacy of quinidine sulfate in slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Ann NY Acad Sci* **841**, 203-6.

Harper, C. M., Fukudome, T. and Engel, A. G. (2003) Treatment of slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine. *Neurology* **60**, 1710-3.

Hoch, W. (1999) Formation of the neuromuscular junction. Agrin and its unusual receptors. *Eur J Biochem* **265**, 1-10.

Hoch, W., McConville, J., Helms, S., Newsom-Davis, J., Melms, A. and Vincent, A. (2001) Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* **7**, 365-8.

Huebsch, K. A. and Maimone, M. M. (2003) Rapsyn-mediated clustering of acetylcholine receptor subunits requires the major cytoplasmic loop of the receptor subunits. *J Neurobiol* **54**, 486-501.

- Ishigaki, K., Nicolle, D., Krejci, E., Leroy, J. P., Koenig, J., Fardeau, M., Eymard, B. and Hantai, D. (2003) Two novel mutations in the COLQ gene cause endplate acetylcholinesterase deficiency. *Neuromuscul Disord* **13**, 236-44.
- Karlin, A. and Akabas, M. H. (1995) Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* **15**, 1231-44.
- Kimbell, L. M., Ohno, K., Engel, A. G. and Rotundo, R. L. (2004) C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse. *J Biol Chem* **279**, 10997-1005.
- Maselli, R. A., Chen, D., Mo, D., Bowe, C., Fenton, G. and Wollmann, R. L. (2003) Choline acetyltransferase mutations in myasthenic syndrome due to deficient acetylcholine resynthesis. *Muscle Nerve* **27**, 180-7.
- Maselli, R. A., Kong, D. Z., Bowe, C. M., McDonald, C. M., Ellis, W. G., Agius, M. A., Gomez, C. M., Richman, D. P. and Wollmann, R. L. (2001) Presynaptic congenital myasthenic syndrome due to quantal release deficiency. *Neurology* **57**, 279-89.
- McConville, J. and Vincent, A. (2002) Diseases of the neuromuscular junction. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 296-301.
- McQuillen, M. P. (1966) Familial limb-girdle myasthenia. *Brain* **89**, 121-32.
- Middleton, L., Ohno, K., Christodoulou, K., Brengman, J., Milone, M., Neocleous, V., Serdaroglu, P., Deymeer, F., Ozdemir, C., Mubaidin, A., Horany, K., Al-Shehab, A., Mavromatis, I., Mylonas, I., Tsingis, M., Zamba, E., Pantzaris, M., Kyriallis, K. and Engel, A. G. (1999) Chromosome 17p-linked myasthenias stem from defects in the acetylcholine receptor epsilon-subunit gene. *Neurology* **53**, 1076-82.
- Milone, M., Wang, H. L., Ohno, K., Fukudome, T., Pruitt, J. N., Bren, N., Sine, S. M. and Engel, A. G. (1997) Slow-channel myasthenic syndrome caused by enhanced activation, desensitization, and agonist binding affinity attributable to mutation in the M2 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit. *J Neurosci* **17**, 5651-65.
- Mishina, M., Tobimatsu, T., Imoto, K., Tanaka, K., Fujita, Y., Fukuda, K., Kurasaki, M., Takahashi, H., Morimoto, Y., Hirose, T. and et al. (1985) Location of functional regions of acetylcholine receptor alpha-subunit by site-directed mutagenesis. *Nature* **313**, 364-9.
- Missias, A. C., Mudd, J., Cunningham, J. M., Steinbach, J. H., Merlie, J. P. and Sanes, J. R. (1997) Deficient development and maintenance of postsynaptic specializations in mutant mice lacking an 'adult' acetylcholine receptor subunit. *Development* **124**, 5075-86.

Morar, B., Gresham, D., Angelicheva, D., Tournev, I., Gooding, R., Guergueltcheva, V., Schmidt, C., Abicht, A., Lochmuller, H., Tordai, A., Kalmar, L., Nagy, M., Karcagi, V., Jeanpierre, M., Herczegfalvi, A., Beeson, D., Venkataraman, V., Warwick Carter, K., Reeve, J., de Pablo, R., Kucinskas, V. and Kalaydjieva, L. (2004) Mutation history of the roma/gypsies. *Am J Hum Genet* **75**, 596-609.

Mount, S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* **10**, 459-72.

Müller, J. S., Abicht, A., Burke, G., Cossins, J., Richard, P., Baumeister, S. K., Stucka, R., Eymard, B., Hantai, D., Beeson, D. and Lochmüller, H. (2004a) The congenital myasthenic syndrome mutation RAPSN N88K derives from an ancient Indo-European founder. *J Med Genet* **41**, e104.

Müller, J. S., Abicht, A., Christen, H. J., Stucka, R., Schara, U., Mortier, W., Huebner, A. and Lochmüller, H. (2004b) A newly identified chromosomal microdeletion of the rapsyn gene causes a congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord* **14**, 744-9.

Müller, J. S., Mildner, G., Muller-Felber, W., Schara, U., Krampfl, K., Petersen, B., Petrova, S., Stucka, R., Mortier, W., Bufler, J., Kurlemann, G., Huebner, A., Merlini, L., Lochmüller, H. and Abicht, A. (2003) Rapsyn N88K is a frequent cause of congenital myasthenic syndromes in European patients. *Neurology* **60**, 1805-10.

Müller, J. S., Petrova, S., Kiefer, R., Stucka, R., König, C., Baumeister, S. K., Huebner, A., Lochmüller, H. and Abicht, A. (2004c) Synaptic congenital myasthenic syndrome in three patients due to a novel missense mutation (T441A) of the COLQ gene. *Neuropediatrics* **35**, 183-9.

Müller, J. S., Stucka, R., Neudecker, S., Zierz, S., Schmidt, C., Huebner, A., Lochmüller, H. and Abicht, A. (2005) An intronic base alteration of the CHRNE gene leading to a congenital myasthenic syndrome. *Neurology* **65**, 463-5.

Mullis, K. B. (1990) Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* **48**, 579-82.

Nichols, P., Croxson, R., Vincent, A., Rutter, R., Hutchinson, M., Newsom-Davis, J. and Beeson, D. (1999) Mutation of the acetylcholine receptor epsilon-subunit promoter in congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol* **45**, 439-43.

Ohno, K., Anlar, B. and Engel, A. G. (1999) Congenital myasthenic syndrome caused by a mutation in the Ets-binding site of the promoter region of the acetylcholine receptor epsilon subunit gene. *Neuromuscul Disord* **9**, 131-5.

Ohno, K., Anlar, B., Ozdirim, E., Brengman, J. M., DeBleecker, J. L. and Engel, A. G. (1998a) Myasthenic syndromes in Turkish kinships due to mutations in the acetylcholine receptor. *Ann Neurol* **44**, 234-41.

Ohno, K., Brengman, J., Tsujino, A. and Engel, A. G. (1998b) Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9654-9.

Ohno, K. and Engel, A. G. (2004a) Congenital myasthenic syndromes: gene mutations. *Neuromuscul Disord* **14**, 117-22.

Ohno, K. and Engel, A. G. (2004b) Lack of founder haplotype for the rapsyn N88K mutation: N88K is an ancient founder mutation or arises from multiple founders. *J Med Genet* **41**, e8.

Ohno, K., Engel, A. G., Brengman, J. M., Shen, X. M., Heidenreich, F., Vincent, A., Milone, M., Tan, E., Demirci, M., Walsh, P., Nakano, S. and Akiguchi, I. (2000) The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol* **47**, 162-70.

Ohno, K., Engel, A. G., Shen, X. M., Selcen, D., Brengman, J., Harper, C. M., Tsujino, A. and Milone, M. (2002) Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. *Am J Hum Genet* **70**, 875-85.

Ohno, K., Hutchinson, D. O., Milone, M., Brengman, J. M., Bouzat, C., Sine, S. M. and Engel, A. G. (1995) 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* **92**, 758-62.

Ohno, K., Milone, M., Shen, X. M. and Engel, A. G. (2003) A frameshifting mutation in CHRNE unmasks skipping of the preceding exon. *Hum Mol Genet* **12**, 3055-66.

Ohno, K., Quiram, P. A., Milone, M., Wang, H. L., Harper, M. C., Pruitt, J. N., 2nd, Brengman, J. M., Pao, L., Fischbeck, K. H., Crawford, T. O., Sine, S. M. and Engel, A. G. (1997) Congenital myasthenic syndromes due to heteroallelic nonsense/missense mutations in the acetylcholine receptor epsilon subunit gene: identification and functional characterization of six new mutations. *Hum Mol Genet* **6**, 753-66.

Ohno, K., Tsujino, A., Brengman, J. M., Harper, C. M., Bajzer, Z., Udd, B., Beyring, R., Robb, S., Kirkham, F. J. and Engel, A. G. (2001) Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2017-22.

Ohno, K., Wang, H. L., Milone, M., Bren, N., Brengman, J. M., Nakano, S., Quiram, P., Pruitt, J. N., Sine, S. M. and Engel, A. G. (1996) Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron* **17**, 157-70.

Pagani, F. and Baralle, F. E. (2004) Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* **5**, 389-96.

Parkhomovskiy, N., Kammesheidt, A. and Martin, P. T. (2000) N-acetyllactosamine and the CT carbohydrate antigen mediate agrin-dependent activation of MuSK and acetylcholine receptor clustering in skeletal muscle. *Mol Cell Neurosci* **15**, 380-97.

Quiram, P. A., Ohno, K., Milone, M., Patterson, M. C., Pruitt, N. J., Brengman, J. M., Sine, S. M. and Engel, A. G. (1999) Mutation causing congenital myasthenia reveals acetylcholine receptor beta/delta subunit interaction essential for assembly. *J Clin Invest* **104**, 1403-10.

Richard, P., Gaudon, K., Andreux, F., Yasaki, E., Prioleau, C., Bauche, S., Barois, A., Ioos, C., Mayer, M., Routon, M. C., Mokhtari, M., Leroy, J. P., Fournier, E., Hainque, B., Koenig, J., Fardeau, M., Eymard, B. and Hantai, D. (2003) Possible founder effect of rapsyn N88K mutation and identification of novel rapsyn mutations in congenital myasthenic syndromes. *J Med Genet* **40**, e81.

Rodolico, C., Toscano, A., Autunno, M., Messina, S., Nicolosi, C., Aguenouz, M., Laura, M., Girlanda, P., Messina, C. and Vita, G. (2002) Limb-girdle myasthenia: clinical, electrophysiological and morphological features in familial and autoimmune cases. *Neuromuscul Disord* **12**, 964-9.

Schmidt, C., Abicht, A., Krampfl, K., Voss, W., Stucka, R., Mildner, G., Petrova, S., Schara, U., Mortier, W., Bufler, J., Huebner, A. and Lochmuller, H. (2003) Congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation in the gene encoding choline acetyltransferase. *Neuromuscul Disord* **13**, 245-51.

Shapiro, M. B. and Senapathy, P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* **15**, 7155-74.

Shen, X. M., Ohno, K., Brengman, J. M., Fukuda, T., Illa, I. and Engel, A. G. (2003) Congenital myasthenic syndrome associated with three missense mutations in the extracellular domain of the AChR δ subunit. *Neurology* **60** (suppl. 1), A420.

Shen, X. M., Ohno, K., Fukudome, T., Tsujino, A., Brengman, J. M., De Vivo, D. C., Packer, R. J. and Engel, A. G. (2002) Congenital myasthenic syndrome caused by low-expressor fast-channel AChR δ subunit mutation. *Neurology* **59**, 1881-8.

Sieb, J. P., Kraner, S., Rauch, M. and Steinlein, O. K. (2000) Immature end-plates and utrophin deficiency in congenital myasthenic syndrome caused by epsilon-AChR subunit truncating mutations. *Hum Genet* **107**, 160-4.

Sieb, J. P., Tolksdorf, K., Dengler, R. and Jerusalem, F. (1996) An autosomal-recessive congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates in a Libyan family. *Neuromuscul Disord* **6**, 115-9.

Sine, S. M., Ohno, K., Bouzat, C., Auerbach, A., Milone, M., Pruitt, J. N. and Engel, A. G. (1995) Mutation of the acetylcholine receptor α subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity. *Neuron* **15**, 229-39.

- Sine, S. M., Wang, H. L., Ohno, K., Shen, X. M., Lee, W. Y. and Engel, A. G. (2003) Mechanistic diversity underlying fast channel congenital myasthenic syndromes. *Ann N Y Acad Sci* **998**, 128-37.
- Soltanzadeh, P., Muller, J. S., Ghorbani, A., Abicht, A., Lochmuller, H. and Soltanzadeh, A. (2005) An Iranian family with congenital myasthenic syndrome caused by a novel acetylcholine receptor mutation (CHRNE K171X). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**, 1039-40.
- Steinlein, O. K. (2004) Nicotinic receptor mutations in human epilepsy. *Prog Brain Res* **145**, 275-85.
- Sudhof, T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**, 509-47.
- Trontelj, J. V., Mihelin, M. and Khuraibet, A. (2002) Safety margin at single neuromuscular junctions. *Muscle Nerve Suppl* **11**, S21-7.
- Tsujino, A., Maertens, C., Ohno, K., Shen, X. M., Fukuda, T., Harper, C. M., Cannon, S. C. and Engel, A. G. (2003) Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7377-82.
- Valenzuela, D. M., Stitt, T. N., DiStefano, P. S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D. L., Nunez, L., Park, J. S., Stark, J. L., Gies, D. R. and et al. (1995) Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* **15**, 573-84.
- Varon, R., Gooding, R., Steglich, C., Marns, L., Tang, H., Angelicheva, D., Yong, K. K., Ambrugger, P., Reinhold, A., Morar, B., Baas, F., Kwa, M., Tournev, I., Guerguelcheva, V., Kremensky, I., Lochmuller, H., Mullner-Eidenbock, A., Merlini, L., Neumann, L., Burger, J., Walter, M., Swoboda, K., Thomas, P. K., von Moers, A., Risch, N. and Kalaydjieva, L. (2003) Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet* **35**, 185-9.
- Walls, T. J., Engel, A. G., Nagel, A. S., Harper, C. M. and Trastek, V. F. (1993) Congenital myasthenic syndrome associated with paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release. *Ann N Y Acad Sci* **681**, 461-8.
- Wang, H. L., Ohno, K., Milone, M., Brengman, J. M., Evoli, A., Batocchi, A. P., Middleton, L. T., Christodoulou, K., Engel, A. G. and Sine, S. M. (2000) Fundamental gating mechanism of nicotinic receptor channel revealed by mutation causing a congenital myasthenic syndrome. *J Gen Physiol* **116**, 449-62.
- Watty, A. and Burden, S. J. (2002) MuSK glycosylation restrains MuSK activation and acetylcholine receptor clustering. *J Biol Chem* **277**, 50457-62.
- Wood, S. J. and Slater, C. R. (2001) Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* **64**, 393-429.

Xia, B. and Martin, P. T. (2002) Modulation of agrin binding and activity by the CT and related carbohydrate antigens. *Mol Cell Neurosci* **19**, 539-51.

H Anhang

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>CHRNB1</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
SNP	Single nucleotide exchange polymorphism (Einzelbasenaustausch-Polymorphismus/en)
S-Wert	Sedimentationskonstante
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Thermus Aquaticus Polymerase
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TPR	Tetratricopeptide repeat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	Technische Universität
UTR	untranslated region
VAcHT / <i>VACHT</i>	vesikuläre Acetylcholintransferase / Gen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

2 Mikrosatellitenmarker

Mikrosatellitenmarker zur Haplotypenanalyse (Position entsprechend der UCSC-Karte, <http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, Sequenzversion Mai 2004):

COLQ-Locus (Chromosom 3):

Name	Position des Markers (Mb)
<i>D3S1263</i>	11,492
<i>D3S3608</i>	13,679
<i>D3S3613</i>	15,337
<i>COLQ</i>	15,466-15,538
<i>D3S1286</i>	15,794
<i>D3S3726</i>	19,509
<i>D3S2336</i>	24,9

CHRNA1-Locus (Chromosom 2):

Name	Position des Markers (Mb)
<i>D2S2307</i>	175,282
<i>D2S2188</i>	175,282
<i>CHRNA1</i>	175,438-175,454
<i>CHRNA.PCR2</i>	intragenischer Marker
<i>D2S2314</i>	176,688
<i>D2S138</i>	177,570

CHRND-Locus (Chromosom 2):

Name	Position des Markers (Mb)
<i>D2S172</i>	230,998
<i>D2S2193</i>	232,063
<i>CHRND</i>	233,216-233,226
<i>CHRND-1</i>	intragenischer Marker
<i>D2S2344</i>	233,270

<i>D2S206</i>	233,533
<i>D2S2176</i>	233,573

CHRNBI/CHRNE-Locus (Chromosom 17):

Name	Position des Markers (Mb)
<i>D17S1583</i>	2,651
<i>D17S1828</i>	3,757
<i>D17S1584</i>	4,292
<i>CHRNE</i>	4,741-4,747
<i>D17S1810</i>	4,970
<i>D17S1832</i>	5,913
<i>D17S796</i>	6,192
<i>D17S1881</i>	6,469
<i>CHRNBI</i>	7,289-7,301
<i>IMG4125</i>	intragenischer Marker
<i>D17S1796</i>	7,728
<i>D17S1812</i>	8,203
<i>D17S1844</i>	8,558

CHAT-Locus (Chromosom 10)

Name	Position des Markers (Mb)
<i>D10S469</i>	42,768
<i>D10S1787</i>	49,504
<i>D10S1793</i>	49,806
<i>D10S1766</i>	50,416
<i>CHAT</i>	50,492-50,543
<i>D10S196</i>	51,812
<i>D10S220</i>	52,017

RAPSN-Locus (Chromosom 11)

Name	Position des Markers (Mb)
<i>DIIS986</i>	44,679
<i>DIIS4174</i>	45,215
<i>DIISI344</i>	46,123
<i>RAPSN</i>	47,415-47,427
<i>DIIS4109</i>	47,558
<i>DIIS4076</i>	61,120
<i>DIISI883</i>	63,130

SCN4A-Locus (Chromosom 17)

Name	Position des Markers (Mb)
<i>DI7S1154</i>	58,296
<i>DI7S948</i>	58,343
<i>DI7S944</i>	58,790
<i>SCN4A</i>	59,369-59,404
<i>DI7S1809</i>	60,128
<i>DI7S1874</i>	61,627
<i>DI7S1816</i>	61,851

MUSK-Locus (Chromosom 9)

Name	Position des Markers (Mb)
<i>D9S1854</i>	110,189
<i>D9S1828</i>	110,412
<i>D9S2128</i>	110,606
<i>MUSK</i>	110,510-110,642
<i>D9S1683</i>	110,942
<i>D9S1880</i>	111,125
<i>D9S105</i>	111,312

3. 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'- AACATAATCGTCCGGGCTCG
i5s	5'- AGGTACAGATGGGAACAGAG
i6a	5'- TCTGGACCCCGTCTAGAAGCG'
i6s	5'- TCTTCAGCCCGCTGTCAGCTCGGC
i8a	5'- GGCCACGCCCCACCCTTCACACT
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

CHRNE cDNA-Primer

Name	Sequenz
e4s	5'- CCCTGCGAGTCCCTTCAGAACTC
e5s	5'- ACCGCAGCGTCTGCGCAGTG
e5fwd	5'- TACGAGGGCGGCTCCGTGACGTG
e6a	5'- GCAAAAGTGAACCTCCACCTC
e7rev	5'- CTCCCCTGGGCCGTGGTGGCG
e9/10rev	5'- CAGCTCCAGGAGAACGTGGC

CHRNA1 Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
ai0s	5'- AGAGGCAGTTTGCTCACCATT
ai1a	5'- TGCCATTCTGTGGTCTCATCAA
ai1s	5'- TCATGTTCATGTGTTTGGAG
ai3a	5'- GAATGAAAACGACACACATGC
ai3s	5'- AGAAAACGTTTCACACTAGGTC

ai4a	5'- AGCCCTTCTATTAGGGCACT
ai4s	5'- GCTGTCTCCTGTTAACGTCC
S4a	5'- AGTTGGAGACCCGAATCAC
ai5s	5'- CTGGAATCTGTGGCCTTGTCAC
ai6a	5'- AAAATAGCAGCACGAGACCCAT
ai6s	5'- AGCCCAACCCAGATGGGTAGTT
ai7a	5'- AGGCCTGTAGATGTGCCTCCGT
ai7s	5'- GGACAATAATTCTCATGCATGG
ai8a	5'- CCTGTGCTCATACATTTGAC
ai8s	5'- TGCAAAGCACAAACGTTGTGAG
ai9a	5'- GAGCAAGTAGACAAATCTTC

CHRNBI 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

CHRND Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
DNs	5'- CTGGAGCTTTCTTGGGATGGGA
DNa	5'- CCTCTGACTGGGACGTGCATCT
D1s	5'- CTCATTCCACAGCCCTGTAGAC
D1a	5'-TCTAGCTTCCTCCATGGCTATC
D2s	5'- AGAGTGGGTGAATGTGTGCGGA
D2a	5'- CACCGTGTCAGCCAAGATGGT
D3s	5'- GACCTGAATCCGCACTCTGT
D3a	5'- CAGCACTAATCCAGACAGG
D4s	5'- CCTGTCTGGATTAGTGCTGCC
D4a	5'- GGATAGCTTTGCATTGAGGAAG
D5s	5'- GTAGACAGCCCATCTGCGTCTC
D5a	5'-TGGCCACCTGGCCCTCACACC
D6s	5'-TTTCATCAGGGTATGATGGT
D6a	5'-CAGGCTCAAGTGATCCACCTC
D7s	5'-TGGTGACAGAATGAGACTCCG
D7a	5'-GGAACCCTGCCCTCTTAAGAT

D8s	5'-GCCAGCATTATCCTGCAAGCC
D8a	5'-TCGGGTGGCCCCTGTCTTGATT

RAPSN Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
RP2s	5'- TTGCCCTGGGGCAGGAAGAAGG
RP2a	5'- AGGCCTTGGGCTAGAGGTGCTC
RPs	5'- TGAGTGACCCACGGTGCTCAG
RPa	5'- CGATCTGCTGCTTGGTCTGGTC
R1s	5'- CATGAGTGCCTAGAGGCACGGA
R1a	5'- TCCGGCCCCAGCCTGACCCTCG
R1seqa*	5'- CGGGTACACCCACCTTCAGCAT
R2s	5'- AGGCTGGGGTCCAAGGCTCAGAGT
R2a	5'- GCCACAGGGTGTGTGCCTCA
R3s	5'- GGATGTCACAATGAATGAGCAG
R3a	5'- GGGCTTCCATGGGCTGATTTG
R4s	5'- CTCCAGTGGTGGTGGCAGAGGAGT
R4a	5'- TACTGGCCCCAAGTGGGGAGTGCT
R5s	5'- ACCCTGTGCTTCCCTGTGAGCA
R5a	5'- AGTCCCCACTTGGGCCCTTGA
R6s	5'- AAGTGGCTGAGACCGGAGCCTA
R6a	5'- TTAAGCCAGCTGGGCCCTAGAGT
R7s	5'- GCAGGCAAGGAAGGAAGAGA
R7a	5'- AGGAGTAAATGGGCCTCTGGCGT

* nur zum Sequenzieren, nicht für PCR

Primer für Rapsyn-RFLPs

Name	Sequenz
R1ma	5'- TCGATCTGCTGCTTGGTCTGGTCGT
R2ms	5'- GAGGATGCCGACTTCCTCCGGG
R2ma	5'- TGGTACCGGGCAGCCCAAGGC
R2ps	5'- GAGAGCTTCGAGAAGGCCCTGCGGTA
R4ms	5'- CCTGGGGCAGGTGCAGGCGCTGCTCG
R4ps	5'- GCAGAGGAGTTGGCCTGAGCCACAGG
R4pa	5'- TGCATCCCGGTGACCTCACCTC

RAPSN Primer zur Deletionskartierung

Name	Sequenz
AluSx forward	5'-ACCAACATGGTGAAACTCT
3'-UTR reverse	5'-CCACCCACTGCACGTCAGCTTC
L1CM4 reverse	5'-TGAAATCCATGAGTTCACA
rs4282946 reverse	5'-GAGCCCATCCAAGCTGGCTCC

CHAT Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
C1s	5'- GAGAAGCATCTGCGTCTAATGCTGC

C1a	5'- GGGTGGGCTCTGGAGTGA CTGT
C2s	5'- CAAAGGCTGTCACCCACGGTC
C2a	5'- ACTCCTCCTAGGACAAGTTCTC
C3s	5'- GCAGCGAGCAGAGACTTCCTCAGAC
C3a	5'- CAGGACTCAGAGGACTCCACGA
C4s	5'- TGGGCACTCCTATGGCATCTACAC
C4a	5'- CCTGCCTGGAACCCAATAGATAA
C5s	5'- ACTGTGGTCAGCACGTACAGGT
C5a	5'- AGTCCCCTCAGGACTGTTCTA
C6s	5'- CTGAGCTGAGCCCTAGAAATGGA
C6a	5'- CCTACCTGCCTCTCACCGAGAT
C7s	5'- GCTCTGGTGAAGTGTCCCGATT
C7a	5'- CTGATGGCCTGGACGTCCACTGTC
C8s	5'- GGGCGGCATACAATGGGCGATCA
C8a	5'- GGAGCCAGGAATGGAATACAGA
C9s	5'- GGTTCTGTGCCCATTTTGCCTGA
C9a	5'- CCTCGGAGAAGGTAATGGACGTG
C10s	5'- TCAACAGCCTTGGCTTGGTCCCTA
C10a	5'- CTGAGCTCCCACACTATGGCTGA
C11s	5'- TGGCTCAAGACCTGGGTCTTGTT-
C11a	5'- AGTGAGTGC GCCTGCCAGACACAA
C12s	5'- TCTGGTGTCTTGGAGAAGAGGT
C12a	5'- GTTAAGACGCTTTCCAGACTG
C13s	5'- CACTGACAGCTAAGATGATTGC
C13a	5'- GCTGGGGTCTTTGGAAACTT
C14s	5'- AGGGCAGGGACTACGTCCG
C14a	5'- GTCCCTCCCTCCAGGATGCTT
C15/16s	5'- AGCTTGCTGAGGCAATTT
C15/16a	5'- GTCTTATGCCATGGTGCCCAT'
C17s	5'- ACTCATACACATTGTTGGCAGCA
C17a	5'- GCTGAAGATCACATAGTTCAG
C18s	5'- TAATTCAGTCAAACCCCCAGGTGG
C18a	5'-GGACCCTGAGGACAGGGAGCTGTGGA

VACHT Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
V1s	5'- GCATTAGCATGAGCGACGTAAG
V1a	5'- GCTGCTCTGGCCGAGCAGACTC
V2s	5'- ACGCCTCGCCGGACGGAGTCCTT
V2a	5'- ACGCCGAGGTGTTGGCCGTGTA
V3s	5'- CGCTGCCCCTCCGGCCAATG
V3a	5'- GCACCAAGAAGGGCACGCGCTT
V4s	5'- GGCATCCTCTATGAGTTCGC
V4a	5'- CGAGCGTGGGCAGCAGTGCTGT
V5s	5'- TCTGTTTTGGCATAGCCCTAGT
V5a	5'- AGCCCCCTTGACCCAAGGCGGT
V6s	5'- TACTACACCCGCAGCTAGCAT
V6a	5'- GACTTGGAGACCCAGTTCACCC

COLQ Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
Q1s	5'- TGGTTGGCATTCTTTCTTGGTA
Q1a	5'-AGACAAGCTCGGGTGACAGGAAGC
Q2s	5'- CCTATCCACATCTAACAGGCTAGA
Q2a	5'-GAATGGACACACCCCAGGAA
Q3s	5'-TACGAGGTGTCTGTAATCCAT
Q3a	5'- GAGCAGACACTAAGAGGCTCTG
Q4-5s	5'-GGAGCCCAGTGCACCAAGAGCC
Q4-5a	5'-TGGGTATCAGTGACCACTGAAGTGC
Q6s	5'- CCATGCCTAGAGAACCCACTG
Q6a	5'-GATTCCCTGACTATGTGCCA
Q7-8s	5'- CTTCTGGTTCAGTTTCTCTAA
Q7-8a	5'- TCTGCATGTCTCTGATTCCAGA
Q9-10s	5'- TTCCCTCCCAGGATATTA ACTC
Q9-10a	5'- ACCCACCATCCCTGCCTGATAG
Q11s	5'- ATGACTGGCTAGACCTGTGTAG
Q11a	5'- CCCAGAGGATGCTGGAGTCAAG
Q12s	5'- AGCTTATTAAGAGCTCGATGG
Q12a	5'- CTTGTGCCCTCTCTGGGAGGC
Q13s	5'- TGCAAAGGTCGCTCACATCTC
Q13a	5'- TACAAAGCCCCATAAGGATCAG
Q14s	5'- GAGCAGCCCAAGGATAGAGATT
Q14a	5'- TCCCATGCAGACAGACTGTAG
Q15s	5'- AACCAATGACCTCCCTGCCTGCG
Q15a	5'- CACAGCTGGTGTCCAGGGCTGGC
Q16s	5'- GGCCGCATGGTCCTTACAAGC
Q16a	5'- TGTCTAGAAGGCACCACAAAG
Q17s	5'- TTTGACCGGAAGTCACCAGCA
Q17a	5'-TGTGAGCCACCCCGAGAGAACG
Q1As	5'- GGC ACTGGGAGCACTCAGAGGCG
Q1Aa	5'- GCTGCTAAAACCTCCTAGTACAG
Q11As	5'- GGTTACTGCAGGGAATGCTTC
Q11Aa	5'-TCAGAGCAGTGATCGACACTT

COLQ cDNA Primer

Name	Sequenz
Q15mRNAs	5'- GATTACACTGCAGACCAGCACG
Q17Kas	5'- CCTTCTCCTCACGGCCCTCA

MUSK-Primer

Name	Sequenz
M1s	5'- CCCAAGCCCACCATACTATAA
M1as	5'- GAGCCTGTGGAGCTGCTGACAC
M2s	5'- GGGATGGATACCCATTCTC
M2as	5'- CTCTGGGGAAACAGAATTCTC
M3s	5'- GTGTACCAAGTCAACTTTC
M3as	5'- CAGAAGTCACTCAAGTTTCC

M4s	5'- GTAAGTGTGTAACCTGAGTGTG
M4as	5'- CTGTCTTTGCATTTGGTGA
M5s	5'- GGGCTGCCACATCTCTTCTC
M5as	5'- GTGGCCAATAAAGGTCAAAGCG
M6s	5'- GGTGTAGGTGAGACCAATGA
M6as	5'- CTGCACACAGGGGAACATGG
M7s	5'- CTAGGTCACCTCCGGAGTATCC
M7as	5'- GGCTATGTTTGCAGTGTACC
M8s	5'- GCACCCAGGCATTAACCTCC
M8as	5'- GAATGCCAAGAAATAGC
M9s	5'- GTATCTAAGGAAGGCAGAACT
M9as	5'- CACAGAATTTAGGCTCTGCCA
M10s	5'- GAGAGCGGCTGTACATTCTG
M10as	5'- GTGAGATATCTGGATGCTCA
M11s	5'- CATGATGGGGGTGCTTAAT
M11as	5'- TACTTACAGCATTCCCACC
M12s	5'- CCAAGCTAATAGTTTGGTAGC
M12as	5'- GGCTGCCTTAGTATAACTT
M13s	5'- ACTGAAACGTCTCACTGAT
M13as	5'- TCGTGAGACTTAACCAGC
M14s	5'- TCTTGTTGGGCCTCTGGTGTA
M14as	5'- TCATATGTTCTGACATGGTCG

Primer für SNP-Analyse zur Kartierung des *RAPSN*-Founderallels

	SNP	Position auf Chr. 11 [Mb]	Primersequenz	Restrictionsenzym	Häufigkeit in Kontrollen
1	rs1446331 A/G	44.745543	5'- tccatccaccagtcattttc -3' 5'- gagaaatggatggatgggtagtga -3'	<i>RsaI</i>	40.0% A
2	rs728516 C/T	45.565115	5'- ggctccagaaactccaccctg -3' 5'- ctctctgagtcgttttgctc -3'	<i>MseI</i>	70.0% T
3	rs7476 A/C	46.307143	5'- cactgtacagagaccaagaac -3' 5'- atgtgctgagctgatgaagag -3'	<i>HinfI</i>	62.5% A
4	rs3136516 A/G	46.725065	5'- cctgtgaaggtgacagtgagg -3' 5'- tcaatgaccttctgtatccac -3'	<i>EcoNI</i>	52.5% A
5	rs2279438 T/A	47.168484	5'- ctactgtctagggaggagccga -3' 5'- tctccaccgctgtaccgtg -3'	<i>Bsp143I</i>	82.5% A
6	rs2278890 C/T	47.363911	5'- ggtttctcctggaactcctg -3' 5'- ctctctaccaccgcttcac -3'	<i>AvaI</i>	37.5% T
7	rs2293577 T/C	47.401511	5'- ggcctgtccccagccatgc -3' 5'- gtcccagcagggaaggcctc -3'	<i>HpaII</i>	65.0% T
8	rs4282946 C/T	47.420511	5'- ggcgcagtgatgccaacag -3' 5'- gagccatccaagctggctcc -3'	<i>MseI</i>	72.5% T
9	1143C/T	<i>RAPSN</i> Exon 7	5'- aagtggctgagaccggagccta -3' 5'- ttaagccagctgggccttagagt -3'	Sequenz	72.5 % C
10	IVS3-11C/delC	<i>RAPSN</i> Intron 3	5'- gcagaggagttggcctgagccacagg -3' 5'- tgcateccggtagctcacctc -3'	<i>Stu I</i>	72.5 % delC
11	456 C/T	<i>RAPSN</i> Exon 2	5'- gagagcttcgagaaggcctgcgta -3' 5'- gccacaggggtgtgtcctca -3'	<i>Rsa I</i>	72.5 % C
12	-365 G/A	<i>RAPSN</i> Promotor	5'- tgagtgaccacgggtgctcag -3' 5'- aggccttgggctagaggtgctc -3'	<i>MnII</i>	92.5% G

13	rs2242081 T/C	47.464576	5'- tatcagagaacagcctcagtc -3' 5'- ccaatgggaggttaagtgttc -3'	<i>RsaI</i>	37.5% C
14	rs2280231 C/T	47.564747	5'- accgcctggttcttcagcgtc -3' 5'- aggaggggaacgcaggtgagaaag -3'	<i>Eco47I</i>	25.0% T
15	rs3817334 C/T	47.615302	5'- actattcataactgtaagcagg -3' 5'- ccattctgctttgtaattttcac -3'	<i>TaiI</i>	45.0% T
16	rs9909 C/G	47.764084	5'- cttcattggtcagatttagaagc -3' 5'- aagtataaatgtaaataatggtattg -3'	<i>Bst1107I</i>	57.5% C
17	rs2270994 A/G	48.122178	5'- gagacagtagagtggtgttc -3' 5'- ggcaccttataataacatcacc -3'	<i>MnlI</i>	52.5% G
18	rs2299650 G/T	49.138316	5'- acaaatgaaagtaatgtgatg -3' 5'- tgctatcagaaaagcatggag -3'	<i>SduI</i>	60.0% G
19	rs1880438 C/T	49.335007	5'- tcctcactaactgaaggtgag -3' 5'- tacgtatctctgattcagtac -3'	<i>SfaNI</i>	77.5% C
20	rs1916207 C/T	50.500285	5'- gtgtaactctgagagactaatg -3' 5'- ggggtttggaaacactgttgtgg -3'	<i>HinfI</i>	32.5% C
21	rs507015 G/A	51.454648	5'- acagccactggatgaaatgttc -3' 5'- tttgtatccaaggtcttc -3'	<i>HpaII</i>	62.5% A

4. Genbank-Zugangsnummern

Gen	genom. Sequenz	mRNA-Sequenz
<i>CHRNE</i>	AF105999	NM_000080
<i>CHRNE</i> Promotor	Z84811	--
<i>CHRNAI</i>	gi22044651	NM_000079
<i>CHRNBI</i>	AC113189	NM_000747
<i>CHRND</i>	AF307337	NM_000751
<i>CHAT</i>	AF305893-AF305906	AF305907-AF305909
<i>VACHT</i>	U10554	U10554
<i>RAPSN</i>	gi18577857	AF449218
<i>MUSK</i>	gi13162053	AF006464
<i>COLQ</i>	AF229117-AF229126	gi3378117

5. Polymorphismen

Gen	Polymorphismus	Lokalisation	Quelle
<i>CHRNE</i>	- 440 T/A	Promotorregion	3
	- 420 A/G	Promotorregion	3
	- 130 C/T	Promotorregion	(Ohno et al., 1996)
	-16C/T (L-6L)	Exon 1, Signalpeptid	3
	-8 G/T (G-3V)	Exon 1, Signalpeptid	(Ohno et al., 1996)
	IVS1+64G/A	Intron 1	3
	IVS4-54G/T	Intron 4	3
	IVS4-7C/T	Intron 4	(Milone et al., 1997)
	459C/T (A153A)	Exon 6	3
	IVS8+10G/A	Intron 8	3
	IVS8+15C/G	Intron 8	(Sine et al., 1995)
	906C/T (C302C)	Exon 9	3
	IVS9+46C/T	Intron 9	3
	IVS9-6C/T	Intron 9	(Ohno et al., 1996)
	IVS10+20del6	Intron 10	3
	IVS10+45C/T	Intron 10	3
	1206C/T (C402C)	Exon 11	3
	1233C/T (A411A)	Exon 11	(Abicht et al., 1999)
	1245A/G (R415R)	Exon 11	(Ohno et al., 1996)
	IVS11+20del20	Intron 11	(Croxen et al., 1999)
1342G/C (V448L)	Exon 12	(Sieb et al., 2000)	
<i>RAPSN</i>	-649G/C*	Promotorregion	(Ohno and Engel, 2004b)
	-499G/A*	Promotorregion	
	-365G/A	Promotorregion	
	171C/T (58R/C)	Exon 1	
	IVS1-14GA	Intron 1	
	IVS1-15C/T	Intron 1	
	241T/C (81F/L)*	Exon 2	
	456C/T (152Y/Y)	Exon 2	
	IVS3-11C/delC	Intron 3	
	855G/A (285Q/Q)	Exon 5	
1143C/T (381P/P)	Exon 7		
<i>CHAT</i>	AF305894 118 G/T	Exon 2, 5'-UTR	2
	AF305894 170 G/A	Exon 2, 5'-UTR	2
	AF305894 1119 C/G	Exon 3, 5'-UTR	2
	141C/G (47D/E)	Exon 4	1
	358G/A (120A/T)	Exon 5	1
	665G/C (222R/P)	Exon 7	1
	730C/T (243L/F)	Exon 8	1
	899C/T (299P/L)	Exon 9	1
	1201G/A (400D/N)	Exon 11	1
	1381G/A (461V/M)	Exon 12	1
	1438G/A (479A/T)	Exon 13	1
	1641T/C (547H/H)	Exon 15	1
	1674TC/T (558S/S)	Exon 15	1
2067C/T (689I/I)	Exon 18	1	

<i>COLQ</i>	AF229117 2131G/A	5'-UTR	2
	AF229118 20547A/G	Intron 4	2
	AF229118 20708A/C	Intron 4	2
	AF229118 20735C/G	Intron 4	2
	AF229118 20746A/C	Intron 4	2
	AF229118 20975G/C	Intron 5	2
	AF229119 499C/G	Intron 5	2
	AF229120 501T/C	Intron 6	2
	AF229120 616G/A	Intron 7	2
	AF229120 625G/T	Intron 7	2
	AF229120 706A/G	Intron 7	2
	AF229120 1045A/G	Intron 7	2
	AF229120 1831A/G	Intron 9	2
	AF229120 1843G/A	Intron 9	2
	AF229125 530C/T (D/D)	Exon 16	2
	AF229126 832T/C	Exon 17, 5'-UTR	2
	AF229126 853T/A	Exon 17, 5'-UTR	2
	AF229122 525C/G (N/K)	alternatives Exon 11	2
<i>CHRND</i>	-49G/A (-18P/P)	Exon 1	(Sine et al., 1995)
	57G/A (19K/K)	Exon 2	(Ohno et al., 1996)
	IVS3+26G/C	Intron 3	3
	IVS3+109C/G	Intron 3	3
	IVS7-37G/A	Intron 7	3
	IVS7(-18)_(-52)del35	Intron 7	Normalkontrollen
	IVS9+9T/C	Intron 9	3
	IVS11-99C/A	Intron 11	3
1543A/G	Exon 12, 5'-UTR	(Ohno et al., 1996)	
<i>CHRNB1</i>	26A/G (9E/G)	Exon 2	(Sine et al., 1995)
	IVS6-62A/G	Intron 6	(Quiram et al., 1999)
	IVS8+25C/A	Intron 8	3
	IVS9+28G/A	Intron 9	3
	IVS9+85T/C	Intron 9	3
	IVS10-145G/A	Intron 9	(Quiram et al., 1999)
	IVS10+17T/C	Intron 10	(Ohno et al., 1996)
<i>CHRNA1</i>	IVS2-5insT	Intron 2	(Ohno et al., 1996)

* unklar, ob Polymorphismen oder Mutationen. Alle 3 Nukleotidvarianten liegen auf demselben Allel.

1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> unter dem jeweiligen Genlocus

2: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar> unter der jeweiligen Zugangsnummer

3: häufiges Vorkommen bei CMS-Patienten und/oder potentiell pathogene Wirkung nicht erkennbar

6. Liste aller in unserer Arbeitsgruppe identifizierten CMS-Mutationen

Gen	Mutation
<i>CHRNE</i>	-154G>A -155G>A Deletion 1290 bp L-12R 70insG C128S 392del3 IVS5-16G>A T159P K171X R218W S235L P245L Q263X L269F (Slow-Channel) A271V 734delC R286M 646_648del3 IVS7-2A>G IVS7+2T>C IVS7(-3)_(-6)del 911delT Q378X IVS10+2T>C 1197delG 1192_1207dup16 A411P 1267delG 1293insG 1304del3 1369delG
<i>RAPSN</i>	Q3K Q21X IVS1-15C>A N88K A246V L283P G291D 1177delAA Deletion 4,5 kb
<i>CHAT</i>	L210P I336T T354M G417R

	R482G S498L S694C
<i>COLQ</i>	IVS1-1G>A 109delC 158insC 376delG W148X R227X R236X 950delC R341G C386S IVS15+1G>A Y430S T441A Q442del
<i>CHRND</i>	E381K Deletion 2,2 kb
<i>CHRNA1</i>	G153S (Slow-Channel)

Fett gedruckte Mutationen wurden im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen.

7. 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...

2. ANAMNESTISCHE ANGABEN

Erstmanifestation: neonatal
 im ersten Lebensjahr
 Kindheit: mit Jahren
 Jugend: mit Jahren
 später: mit Jahren

Motorische Entwicklung: normal
 verzögert
 Laufen erlernt mit Mon.

Erkrankungsverlauf:
 deutlich progredient
 nicht oder nur gering progredient
 Tendenz zur Besserung

Krisenhafte Verschlechterungen (z.B. im Rahmen von Infekten):
 nein
 ja
 mit respiratorischer Insuffizienz: ja nein
 in früher Kindheit

3. NEUROLOGISCHER UNTERSUCHUNGSBEFUND

Paresen:
 generalisiert
 selektive Muskelgruppen rein okuläre Paresen
 andere:
 konstant
 deutlich belastungsabhängig
 tageszeitliche Schwankung

Betroffene Muskelgruppen:
 okuläre Muskulatur fluktuierende Ptosis
 eingeschränkte Bulbusbeweglichkeit
 Bulbäre Muskulatur Schluckstörungen
 nasale Sprache
 Kauschwäche
 mimischer Schwäche
 Atemmuskulatur Vitalkapazität:
 Extremitäten proximal Kraftgrad (1-5):
 distal Kraftgrad (1-5):
 Gliedergürtel Schultergürtel (Scapulae alatae ?)
 Beckengürtel
 Axiale Muskulatur (ausgeprägte Skoliose ?)

Gehfähigkeit
 voll erhalten eingeschränkt stark / völlig eingeschränkt
 Gehstrecke ca.:

Muskeleigenreflexe:
 normal abgeschwächt

Muskuläre Trophik:
 normal Atrophien

Kongenitale Kontrakturen: nein ja
 Dysmorphie Stigmata: nein ja:

4. ELEKTROPHYSIOLOGIE

EMG nicht durchgeführt myopathisch
 unauffällig neurogen
 anderes:

Pathologisches Dekrement:
 distale Muskulatur
 nachweisbar (%)
 nicht nachweisbar
 nicht geprüft
 proximale Muskulatur
 nachweisbar: (%)
 nicht nachweisbar
 nicht geprüft

Reaktion auf Einzelreiz:
 normal
 repetitiv
 nicht geprüft

... evtl. weitere Befunde
 Einzelfaser EMG: NLG:

Anmerkung:
 Pathologisches Dekrement:
 ...bei einigen Formen des kongenitalen myasthenen Syndroms nur in zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch schwachen Muskeln nachweisbar (evtl. induzierbar durch repetitive Beübung oder 10 Hz-Stimulation über mehrere Minuten!).

Reaktion auf Einzelreiz:
 ...leicht zu übersehen, wenn Stimulationsfrequenz über 0,2 Hz oder nach kurzer Willkürkontraktion.

5. LABOR / MUSKELBIOPSIE

Muskelbiopsie durchgeführt: nein ja, Befund:
 Serum Creatinkinase (CK):

5. AZETYLCHOLIN-REZEPTOR-ANTIKÖRPER

Azetylcholin-Rezeptor-Antikörper: nachweisbar
 nicht nachweisbar
 nicht untersucht

6. ANSPRECHEN AUF AZETYLCHOLINESTERASE HEMMER:

Tensilon Test: klinisch deutlich positiv
 mit EMG fraglich positiv/negativ
 negativ
 nicht durchgeführt

langfristige Mestinontherapie: erfolgreich
 ohne Effekt
 nur anfangs erfolgreich
 nicht durchgeführt

6. WEITERE THERAPIE:

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

...ÜBER ERGÄNZENDE KRANKENBERICHTE SIND WIR SEHR DANKBAR

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

8 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.

Mein besonderer Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. Angela Abicht für den Aufbau und die Etablierung des Forschungsthemas „kongenitale myasthene Syndrome“, für die gute Zusammenarbeit und für ihren Einsatz bei der Betreuung der Patienten. Dr. Carolin Schmidt danke ich für die Einarbeitung in das Forschungsgebiet und für die hervorragenden Vorarbeiten, die mir den Einstieg sehr erleichtert haben.

Bei Gina Mildner, Sofia Petrova, Anja Pertl, Cornelia König, Ursula Klutzny und insbesondere bei Sarah Baumeister bedanke ich mich für die fleißige Mitarbeit bei Teilprojekten dieser Arbeit. Dr. Sabine Krause und Dr. Rolf Stucka danke ich für ihre Hilfe bei der Etablierung neuer Untersuchungsmethoden und bei kniffligen molekularbiologischen Fragestellungen. Allen anderen Kollegen aus der AG Lochmüller danke ich für die nette Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor!

Frau Prof. Dr. Angela Hübner (TU Dresden) danke ich für die zahlreichen Haplotypenanalysen, Dr. David Beeson (Oxford, UK), Dr. Daniel Hantai und Dr. Pascale Richard (beide Paris, Frankreich) für die Zusendung von DNA-Proben zur Untersuchung der *RAPSN* N88K Founder-Mutation.

Boehringer Ingelheim Fonds danke ich nicht nur für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, sondern auch für die persönliche Betreuung während der gesamten Promotionszeit.

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

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Juliane Simona Müller
Geburtsdatum: 01.07.1977
Geburtsort: Kronstadt/Rumänien
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Adresse: Pfingstrosenstr. 1, 81377 München

Schulbildung, Studium

1983-1987 Deutsche Grundschule, Fogarasch, Rumänien
1987-1990 Deutsches Gymnasium, Fogarasch, Rumänien
1991-1996 Otto-Hahn-Gymnasium, Landau/Pfalz
1996 Abitur
1996-2002 Biochemie-Studium, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Wissenschaftliche Ausbildung

Okt. 1999 - Okt. 2000 Arbeitsgruppenpraktika am Max-Planck-Institut für Biochemie und Neurobiologie, Martinsried, und an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Juni 2001 – Feb. 2002 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Arbeitsgruppe Dr. Michael Kiebler
seit Mai 2002 Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hanns Lochmüller, Friedrich-Baur-Institut, Neurologische Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München

Stipendien

April 2003 – Juli 2005 Promotionsstipendium des Boehringer Ingelheim Fonds
seit August 2005 Stipendium der AFM (Association Francaise contre les Myopathies)

Veröffentlichungen

Müller JS, Piko H, Schoser BGH, Schlotter-Weigel B, Reilich P, Gürster S, Born C, Pongratz D, Lochmüller H, Walter MC. Novel splice site mutation in the caveolin-3 gene leading to autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, in press.

Colomer J, **Müller JS**, Vernet A, Nascimeinto A, Pons M, Gonzalez V, Abicht A, Lochmüller H. Dramatic, long-term improvement of a slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine. *Neuromuscul Disord* 2006, 16: 329–333.

von der Hagen M, Schallner J, Kaindl AM, Köhler K, Mitzscherling P, Abicht A, Grieben U, Korinthenberg R, Kress W, von Moers A, **Müller JS**, Schara U, Vorgerd M, Walter MC, Müller-Reible C, Hübner C, Lochmüller H, Huebner A. Facing the genetic heterogeneity in neuromuscular disorders: Linkage analysis as an economic diagnostic approach towards the molecular diagnosis. *Neuromuscul Disord* 2006, 16: 4–13

Müller JS, Stucka R, Neudecker S, Zierz S, Schmidt C, Huebner A, Lochmüller H, Abicht A. Characterization of a novel splicing mutation leading to a congenital myasthenic syndrome. *Neurology* 2005, 65: 463-5

Soltanzadeh P, **Müller JS**, Ghorbani A, Abicht A, Lochmüller H, Soltanzadeh A. An Iranian family with congenital myasthenic syndrome caused by a novel acetylcholine receptor mutation (*CHRNE* K171X). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005, 76: 1039-1040.

Barisic N, **Müller JS**, Paucic-Kirincic E, Gazdik M, Lah-Tomulic K, Pertl A, Sertic J, Zurak N, Lochmüller H, Abicht A. Clinical variability of CMS-EA (congenital myasthenic syndrome with episodic apnea) due to identical *CHAT* mutations in two infants. *Eur J Paediatr Neurol* 2005, 9: 7-12

Müller JS, Abicht A, Christen HJ, Stucka R, Schara U, Mortier W, Huebner A, Lochmüller H. A newly identified chromosomal microdeletion of *RAPSN* causes a congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord* 2004, 14: 744-749.

Müller JS, Abicht A, Burke G, Cossins J, Richard P, Baumeister SK, Stucka R, Eymard B, Hantai D, Beeson D, Lochmüller H. The Congenital Myasthenic Syndrome mutation *RAPSN* N88K derives from an ancient Indo-European founder. *J Med Genet* 2004, **41**: e104.

Walter MC, Petersen JA, Stucka R, Fischer D, Schröder R, Vorgerd M, Schroers A, Schreiber H, Hanemann CO, Knirsch U, Rosenbohm A, Huebner A, Barisic N, Horvath R, Komoly S, Reilich P, Müller-Felber W, Pongratz D, **Müller JS**, Auerswald EA, Lochmüller H. FKRP (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet* 2004, **41**(4):e50.

Müller JS, Petrova S, Kiefer R, Stucka R, König C, Baumeister SK, Huebner A, Lochmüller H, Abicht A. Synaptic congenital myasthenic syndrome in three patients due to a novel missense mutation (T441A) of the *COLQ* gene. *Neuropediatrics* 2004, **35**: 183-189.

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

Mallardo M, Deitinghoff A, **Müller J**, Goetze B, Macchi P, Peters C, Kiebler MA. Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(4):2100-5.

Jaksch M, Paret C, Stucka R, Horn N, Müller-Höcker J, Horvath R, Trepesch N, Stecker G, Freisinger P, Thirion C, **Müller J**, Lunkwitz R., Rodel G, Shoubridge EA, Lochmüller H. Cytochrome c oxidase deficiency due to mutations in *SCO2*, encoding a mitochondrial copper-binding protein, is rescued by copper in human myoblasts. *Hum Mol Genet* 2001, **10**(26):3025-35.

Internationale Workshops und Kongresse

Müller JS, Stucka R, Neudecker S, Zierz S, Schmidt C, Huebner A, Lochmüller H, Abicht A. Characterization of a novel splicing mutation leading to a congenital myasthenic syndrome. *Myology* 2005, Nantes, France. Poster n° 264

Colomer J, **Müller JS**, Nascimientto A, Vernet A, Lochmüller H. Delayed appearance of hallmark symptoms in some patients affected by congenital myasthenic syndromes. Myology 2005, Nantes, France. Poster n° 188

Müller JS. Frequency of underlying mutations in European populations and founder mutations. Invited talk at the 126th European Neuromuscular Centre International Workshop on Congenital Myasthenic Syndromes. Beeson D, Hantai D, Lochmuller H, Engel AG. 126th International Workshop: Congenital Myasthenic Syndromes, 24-26 September 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2005, 15:498-512

Müller JS, Burke G, Richard P, Baumeister SK, Stucka R, Eymard B, Hantai D, Beeson D, Lochmüller H, Abicht A. The Congenital Myasthenic Syndrome mutation *RAPSN* N88K derives from an ancient Indo-European founder. 9th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Göteborg. *Neuromuscul Disord* 2004, **14**: G:P.15.07: 618.

Müller JS, Burke G, Richard P, Baumeister SK, Stucka R, Eymard B, Hantai D, Beeson D, Lochmüller H, Abicht A. The Congenital Myasthenic Syndrome mutation *RAPSN* N88K derives from an ancient Indo-European founder. European Human Genetics (ESHG) Conference, München. *Eur J Hum Genet* 2004, **12**: P0054.

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

Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den

.....

(Juliane S. Müller)

Dissertation eingereicht am:.....