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

Molekulargenetische Charakterisierung Kongenitaler Myasthener Syndrome

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

vorgelegt von
Carolin Schmidt
aus
Bad Kreuznach
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Hanns Lochmüller
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med E. Albert Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. U. Welsch Prof. Dr. med. P. Grafe
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Angela Abicht
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	19.01.2004

meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. Karcagi V, Tournev I, **Schmidt C**, Herczegfalvi A, Guergueltcheva V, Litvinenko I, Song IH, Abicht A, Lochmüller H (2001). Congenital myasthenic syndrome in south-eastern European Roma. Acta Myologica; 20:231-237.

2. Abicht A, Stucka R, **Schmidt C**, Briguet A, Höpfner S, Song IH, Pongratz D, Müller-Felber W, Ruegg MA, Lochmüller H (2002). A newly identified chromosomal microdeletion and an N-box mutation of the AChR epsilon gene cause a congenital myasthenic syndrome. Brain; 125:1005-1013.

3. **Schmidt C***, Barisic N*, Sidorova OP, Herczegfalvi A, Gekht BM, Song IH, Stucka R, Karcagi V, Abicht A, Lochmüller H. Congenital myasthenic syndromes (CMS) in three European kinships due to novel splice site mutation (IVS7-2A/G) in the epsilon acetylcholine receptor (AChR) subunit gene (2002). Neuropediatrics, 33:249-254.
   * equal contribution

4. **Schmidt C***, Abicht A*, Krampfl K, Voss W, Stucka R, Mildner G, Petrova S, Schara U, Mortier W, Bufler J, Huebner A, Lochmüller H. Congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation in the gene encoding choline acetyltransferase (2003). Neuromuscular Disorders, 13:245-251.
   * equal contribution

5. Walter MC, Braun C, Vorgerd M, Poppe M, Thirion C, **Schmidt C**, Schreiber H, Knirsch UI, Brummer D, Müller-Felber W, Pongratz D, Müller-Höcker J, Huebner A, Lochmüller H. Secondary reduction of caveolin-3 in some, but not all patients with dysferlin deficient LGMD2B / MM (2003). Neuromuscular Disorders, 250:1431-1438.

Inhaltsverzeichnis Seite

A	**Einleitung**	1
1.	Kongenitale Myasthene Syndrome	1
1.1.	Kongenitale Myasthene Syndrome: Einführung	1
1.2.	Krankheitsbild	1
2.	Grundlagen der neuromuskulären Signalübertragung	2
2.1.	Die neuromuskuläre Endplatte	2
2.2.	Reizweiterleitung an der neuromuskulären Endplatte	3
3.	Unterscheidung verschiedener CMS-Formen	4
3.1.	Pathogenetische und klinische Einteilung der CMS	4
3.2.	Identifizierte molekulargenetische Defekte bei CMS	6
3.2.1.	Mutationen am Acetylcholinrezeptor als Ursache postsynaptischer CMS	6
3.2.2.	Mutationen des *RAPSN*-Gens als Ursache eines postsynaptischen CMS	7
3.2.3.	Mutationen des *COLQ*-Gens als Ursache des Fehlens von Acetylcholinesterase an der Endplatte bei synaptischen CMS	8
3.2.4.	Mutationen des *CHAT*-Gens als Ursache eines präsynaptischen CMS (CMS mit episodischen Apnoen)	8
3.3.	Neue Kandidatengene bei kongenitalen myasthenen Syndromen	8
B	**Zielsetzung**	10
1.	Klinische Bedeutung der molekularen Charakterisierung von CMS	10
2.	Beitrag der molekularen Charakterisierung von CMS zum Verständnis pathophysiologischer Vorgänge an der neuromuskulären Endplatte	11
3.	Populationsgenetische Aspekte einzelner Mutationen	11
C	**Material und Methoden**	13
1.	Patienten	13
2.	Chemikalien	13
3.	DNA-Extraktion	13
4.	RNA-Extraktion aus Muskelgewebe	13

5. Polymerase-Ketten-Reaktion 14
5.1. Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion 14
5.2. PCR-Reaktionsbedingungen 14
5.2.1. Standard-PCR-Protokoll 14
5.2.2. Modifikationen des Standard-PCR-Protokolls 15
5.2.3. Reverse-Transkriptase-PCR 16
5.3. PCR-Primer 16
5.3.1. Primer für PCR des *ACHRε*-Gens 17
5.3.2. Primer für RT-PCR der AChRε-mRNA 18
5.3.3. Primer für PCR des *CHAT*-Gens 18
5.3.4. Primer für PCR des *VACHT*-Gens 20
5.3.5. Primer für PCR des *ACHE*-Gens 20
6. Aufreinigung der PCR 21
7. Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen 21
8. Sequenzanalyse 21
9. Genotypenanalyse 22

D Ergebnisse 24

1. Mutationen im *ACHRε*-Gen 24
1.1. Nachweis einer Mikrodeletion im Bereich des *ACHRε*-Gens (εΔ1290bp) 25
1.1.1. Klinisches Bild des Patienten 25
1.1.2. N-Box Mutation in der Promotorregion des *ACHRε*-Gens (ε-154G/A) 25
1.1.3. Hypothesen aus dem scheinbar homozygoten Auftreten der Mutation ε-154G/A 26
1.1.4. Haplotypenanalyse am *ACHRε*-Locus 26
1.1.5. Polymorphismenvergleich am *ACHRε*-Locus 27
1.1.6. Allelspezifische PCR zur Identifizierung des väterlichen Allels 28
1.1.7. Identifizierung der Deletionsbruchpunkte im *ACHRε*-Gen 29
1.2. Aufklärung der transkriptionellen Konsequenzen der Mutation εIVS7-2A/G 30
1.2.1. Patienten mit der Mutation εIVS7-2A/G 30
1.2.2. Klinisches Bild der Patienten mit der Mutation εIVS7-2A/G 30
1.2.3. RT-PCR-Analyse der Mutation εIVS7-2A/G 31
1.2.4. Haplotypenanalyse für die Mutation εIVS7-2A/G 32

1.3. Nachweis weiterer Mutationen im *ACHRε*-Gen bei CMS Patienten 32
1.3.1. Mutationen εG857T und ε1293insG 32
1.3.1.1. Nachweis der Mutationen 32
1.3.1.2. Klinisches Bild der Patienten 33
1.3.2. Mutationen ε1293insG und ε70insG 33
1.3.2.1. Nachweis der Mutationen 32
1.3.2.2. Klinisches Bild der Patienten 33
1.4. Phänotyp von Patienten mit der Mutation ε1267delG 34
1.5. Haplotypenanalyse von Patienten mit der Mutation ε1267delG 34
1.5.1. Herkunft der Patienten mit der Mutation ε1267delG 35
1.5.2. Haplotypen der Patienten mit der Mutation ε1267delG 37
1.5.3. Korrelation zwischen Haplotypen und Herkunft der Patienten 38
2. Nachweis einer neuen Mutationen im *CHAT*-Gen (CHAT I336T) 40
2.1. Familienanamnese und klinisches Bild bei Patienten mit der Mutation CHAT I336T 40
2.2. Kopplungsanalyse für den *CHAT*-Locus in den zwei CMS-EA Familien 41
2.3. Mutationsanalyse des *CHAT*-Gens 42
2.4. Überprüfung der Mutation CHAT I336T in DNA von Normallkontrollen 42
2.5. Sequenzanalyse des *VACHT*-Gens 43
2.6. Sequenzvergleich 43
3. Mutationssuche in Bereichen des *ACHE*-Gens 44
3.1. Mutationssuche im Bereich der N-Box des *ACHE*-Gens 44
3.2. Mutationssuche im Exon 6 des *ACHE*-Gens 44
4. Mutationssuche im *VACHT*-Gen 44

E Diskussion 45

1. Mutationen im *ACHRε*-Gen 45
1.1. Mikrodeletion εΔ1290bp 45
1.2. Spleißmutation εIVS7-2A/G 46
1.3. Mutation εG857T 47
1.4. Mutation ε1267delG 48
1.4.1. Phänotyp bei Patienten mit der Mutation ε1267delG 48
1.4.2. Haplotypen bei Patienten mit der Mutation ε1267delG 49

2. Mutation I336T im *CHAT*-Gen 50
3. Mutationssuche in weiteren CMS-Kanidatengenen 52
4. Weiterführende Überlegungen 53

F Zusammenfassung 55

G Literatur 57

H Anhang

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen
Erfassungsbogen CMS
Tabellen A1-A3
Danksagung
Lebenslauf
Ehrenwörtliche Erklärung

A Einleitung

1. Kongenitale Myasthene Syndrome

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (congenital myasthenic syndrome = CMS) stellen klinisch und pathogenetisch eine heterogene Gruppe von hereditären Erkrankungen dar, deren gemeinsamer Defekt eine Störung der Signalübertragung im Bereich der neuromuskulären Endplatte ist (Übersicht in Engel, 1994; Engel und Ohno 2002; Engel *et al.*, 2002).

1.1. Kongenitale Myasthene Syndrome: Einführung

Bereits 1937 wurden von Rothbart vier Brüder beschrieben, die im Alter von unter zwei Jahren ein myasthenes Syndrom zeigten (Rothbart, 1937). 1972 sammelte Sarah Bundey 97 familiär auftretende Fälle von Myasthenie mit einem Krankeitsbeginn innerhalb der ersten zwei Lebensjahre (Bundey, 1972). Aber erst in den 70er Jahren, als feststand, daß es sich bei der Myasthenia gravis um eine Autoimmunkrankheit handelt, wurden myasthene Krankheitsbilder, die familiär gehäuft oder bereits sehr frühzeitig auftreten, als sogenannte Kongenitale Myasthene Syndrome abgegrenzt.
Die Beobachtung phänotypischer Unterschiede der Patienten, sowie die Untersuchung von Muskelbiopsiematerial, auf ultrastruktureller Ebene und mit Hilfe von *in vitro* Mikroelektroden-Untersuchungen führte zur Unterscheidung mehrerer CMS-Formen. Es konnte gezeigt werden, daß Defekte die zu CMS führen, sowohl auf der präsynaptischen (Mora *et al.*, 1987; Wallis *et al.*, 1993), als auch auf der postsynaptischen Seite (Engel *et al.*, 1982; Engel *et al.*, 1993; Vincent *et al.*, 1993) der neuromuskulären Endplatte liegen, oder Proteine im synaptischen Spalt (Engel *et al.*, 1977; Hutchinson *et al.*, 1993) betreffen. Aber erst Kenntnisse der Sequenz der beteiligten Proteine im Bereich der neuromuskulären Endplatte erlaubten die weitere molekulargenetische Analyse der verschiedenen CMS-Formen.

1.2. Krankheitsbild

Der Beginn der Symptomatik von CMS liegt in der Regel in früher Kindheit, meist in den ersten zwei Lebensjahren. Verlauf und Schweregrad der Erkrankung sind jedoch sehr unterschiedlich (Übersicht in Abicht und Lochmüller, 2002): Die Symptomatik

reicht vom schweren "Floppy-infant"-Syndrom bei Geburt bis zu einer Minimalsymptomatik mit Ptose der Augenlider und leichter muskulärer Schwäche im Erwachsenenalter. Im Säuglingsalter fallen Trinkschwäche, kraftloses Schreien und generalisierte muskuläre Hypotonie, mit oder ohne Ptose auf. In manchen Fällen kommt es - ausgelöst durch respiratorische Infekte - zu krisenhaften Verschlechterungen, die zu einer plötzlichen Ateminsuffizienz und zum Kindstod führen können. Die motorische Entwicklung kann verzögert sein. Bei älteren Kindern und 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. In manchen Fällen ist der Erkrankungsverlauf progredient und kann in den ersten Lebensjahrzehnten zu schwerer Behinderung und sogar Tod führen.
Anders als bei der autoimmunologisch ausgelösten Myasthenia gravis lassen sich keine Antikörper gegen Acetylcholinrezeptoren (AChR) oder muskelspezifische Kinasen (MuSK) nachweisen und die Patienten sprechen nicht auf eine immunsuppressive Therapie an. Ein Teil der Patienten läßt sich mit Acetylcholinesterase-Hemmern, z.B. Pyridostigmin (Mestinon®) befriedigend behandeln. Oft ist diese Therapie jedoch nicht oder nicht dauerhaft erfolgreich. Alternativ kann eine Behandlung mit 3,4-Diaminopyridin versucht werden. In Einzelfällen kann, nach genauer Charakterisierung des zugrundeliegenden Defektes, das Antiarrhythmikum Chinidin eine therapeutische Alternative darstellen (Harper und Engel, 1998).
Zur Prävalenz von CMS gibt es keine genauen Daten. CMS-Fälle machen ca. 10% aller Myasthenien aus. Im Kindesalter dürfte das Vorkommen von kongenitalen Myasthenien noch häufiger sein (Anlar *et al.*, 1996).

2. Grundlagen der neuromuskulären Signalübertragung

Zum Verständnis der Pathogenese und zur Differenzierung verschiedener CMS Formen sind Kenntnisse der neuromuskulären Signalübertragung essentiell.

2.1. Die neuromuskuläre Endplatte

Die neuromuskuläre Endplatte ist die Verbindungsstelle zwischen motorischer Nervenfaser und Muskelfaser. An dieser Stelle verliert die Nervenfaser ihre Myelinscheide und bildet Verzweigungen, die in Vertiefungen an der Oberfläche der Muskelfaser enden. Schwann-Zellen grenzen das jeweilige Axon an seiner von der

Muskelfaser abgewandten Seite ab, dadurch wird eine spezielle Art von Synapse gebildet. An der neuromuskuläre Endplatte erfolgte die Übertragung präsynaptisch einlaufender elektrischer Erregung auf die Muskelfaser durch chemische Transmission.

2.2. Reizweiterleitung an der neuromuskulären Endplatte

Die neuromuskuläre Erregungsübertragung beginnt mit der Calciumkationen-abhängigen Freisetzung von Acetylcholin aus Vesikeln der präsynaptischen Nervenendigung und dessen Interaktion mit den nikotinergen AChR an der postsynaptischen Membran (Übersicht in McConville und Vincent, 2002). Zuerst wird Acetylcholin im Cytoplasma präsynaptischer Neuronen aus Acetyl-CoA und Cholin, katalysiert durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT), synthetisiert und dann mit Hilfe eines spezifischen Transporters, der vesikulären Acetylcholintransferase (VAChT), in die synaptischen Vesikel aufgenommen. Bei Depolarisation durch ein Aktionspotential öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle, Calcium strömt in die Nervenendigung ein und bewirkt die Ausschüttung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt. Das bei der Vesikelexocytose freigesetzte Acetylcholin diffundiert durch den synaptischen Spalt zu den AChR an der postsynaptischen Membran. Bei dem nikotinergen AChR handelt es sich um ein pentameres Protein der Zusammensetzung $\alpha_2\beta\delta\varepsilon$. Die Untereinheiten bilden einen kationenselektiven Ionenkanal, der sich bei Bindung von zwei Molekülen Acetylcholin öffnet und zu einer Depolarisation im Bereich der Endplatte führt. Dadurch öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle, die ein muskuläres Aktionspotential einleiten und damit zur Kontraktion des Muskels führen. Acetylcholin wird durch die Acetylcholinesterase (AChE), die in der Basalmembran des synaptischen Spaltes über eine kollagenartige Struktur (collagen tail = ColQ) verankert ist, hydrolysiert, und bewirkt dadurch die Begrenzung der Reizweiterleitung. Durch Öffnung spannungsabhängiger Kaliumkanäle wird schließlich das Membranpotential an der präsynaptischen Endigung wiederhergestellt.
Postsynaptisch ist die Basalmembran der neuromuskulären Endplatte stark gefaltet. Die AChR befinden sich, Cluster bildend, an den oberen Spitzen der Einfaltungen, die spannungsabhängigen Natriumkanäle sitzen am Grund der Einfaltungen. Die unterschiedliche Verteilung wird durch einen Signaltransduktionsweg gesteuert. Dabei spielt neben einer muskelspezifischen Kinase (MuSK) das Protein Rapsyn eine entscheidende Rolle.

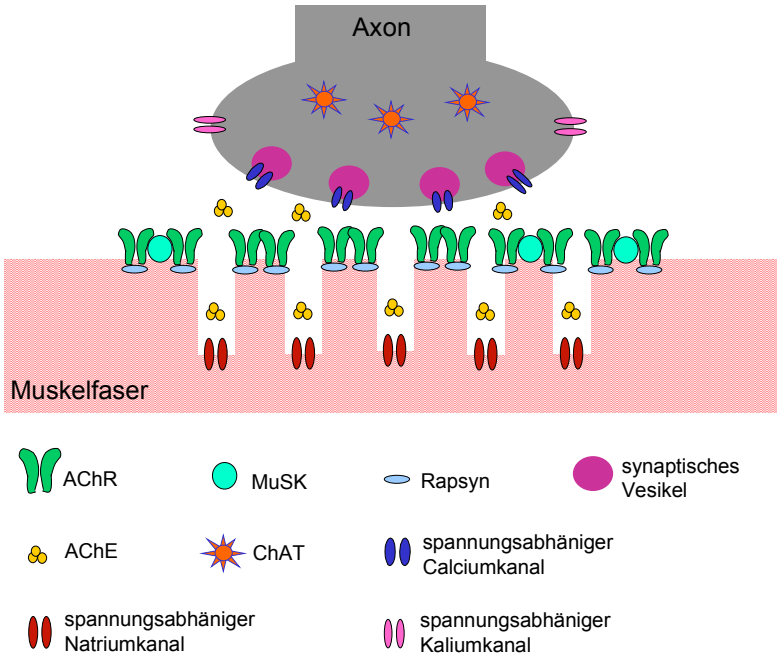

Abb. 1: Schematische Darstellung der neuromuskulären Endplatte und einiger Proteine, die bei Krankheiten mit Defekten in der Signalübertragung beteiligt sind (modifiziert nach McConville und Vincent, 2002).

3. Unterscheidung verschiedener CMS-Formen

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.

3.1. Pathogenetische und klinische Einteilung der CMS

Bislang erfolgte die Differenzierung von CMS 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, Rückschlüsse auf die vermutliche Pathogenese einzelner Defekte zu ziehen und prä- und postsynaptische Syndrome zu unterscheiden (Engel, 1994; Engel und Ohno 2002; Engel *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, daß dem Großteil von CMS postsynaptische Störungen

zugrunde liegen. Die für eine derartige Klassifizierung erforderlichen differenzierenden Untersuchungen sind weltweit nur an wenigen spezialisierten Instituten in den USA und in Großbritannien möglich. In der klinischen Praxis hat sich daher die Einteilung gemäß der ENMC-Konsensus-Konferenzen (European Neuromuscular Centers) von 1995 (Middleton, 1996) und 1999 (Engel, 2001) durchgesetzt, die klinisch einfach erfassbare Merkmale wie Vererbung und klinische Symptomatik berücksichtigt.
Seit 1994 brachte die molekulargenetische Analyse der CMS weiteren Einblick in die ursächlichen Krankheitsmechanismen. Für einige Formen von CMS konnten die zugrunde liegenden genetischen Veränderung identifiziert werden.

Tab. 1: CMS-Klassifikation (nach ENMC 1995 und 1999: Middleton, 1996; Engel, 2001)
*molekulargenetischer Defekt identifiziert

Präsynaptische CMS • CMS mit Vesikelmangel und reduzierter Quantenfreisetzung • CMS mit einem Defekt der Acetylcholin-Resynthese (CMS mit episodischen Apnoen) **identifizierter molekulargenetischer Defekt: CHAT-Mutationen* • Kongenitales Lambert-Eaton-Syndrom
Synaptische CMS • AChE-Defizienz **identifizierter molekulargenetischer Defekt: COLQ-Mutationen*
Postsynaptische CMS • CMS mit primären kinetischen Veränderungen des Rezeptors mit/ohne AChR-Defizienz ** identifizierter molekulargenetischer Defekt: ACHR-Mutationen* • CMS mit primärer AChR-Defizienz **identifizierter molekulargenetischer Defekt: ACHR-Mutationen oder RAPSN-Mutationen* • CMS mit Plectin-Defizienz

Diese Einteilung ist nicht als endgültig anzusehen. Einige in der Tabelle nicht aufgeführte CMS sind bislang nicht vollständig charakterisiert, weitere Ergebnisse molekulargenetischer Untersuchungen werden möglicherweise Eingang in zukünftige Revisionen dieser Klassifikation finden.

3.2 Identifizierte molekulargenetische Defekte bei CMS

Wie oben bereits beschrieben, sind bei CMS schon verschiedene pathogene Mutationen in mehreren Genen, kodierend für Proteine der neuromuskulären Endplatte, nachgewiesen worden (Übersicht in Ohno und Engel, 2002b).

3.2.1. Mutationen am Acetylcholinrezeptor als Ursache postsynaptischer CMS

Der nikotinerge AChR ist ein membranständiges Glykoprotein, bei dem fünf Untereinheiten, einen ligandenaktivierten Ionenkanal bilden. An der neuromuskulären Endplatte hat er in der adulten Form die Zusammensetzung $\alpha_2\beta\delta\varepsilon$ bei der fetalen Form ist die ε-Untereinheit durch eine γ-Untereinheit ersetzt. Die Gene, die für die jeweiligen Untereinheiten kodieren, befinden sich auf verschiedenen Loci auf den Chromosomen 2 und 17 (Gene für AChR β- und ε-Untereinheit auf Chromosom 17p12-13; α- und δ-Untereinheit auf Chromosom 2q24-32). Jede Untereinheit besteht aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne, vier Transmembrandomänen (M1-M4) und einer kurzen extrazellulären C-terminalen Domäne. Die M2-Regionen der jeweiligen Untereinheiten begrenzen dabei die Kanalpore.
Jeder AChR besitzt im Bereich der α-Untereinheiten an den Grenzbereichen von α /ε (oder α /γ) und α /δ Bindungsstellen für Acetylcholin. Die Bindung von zwei Molekülen Acetylcholin pro Rezeptor bewirkt die Öffnung des Kanals und damit den selektiven Einstrom von Kationen (Abbildung 2).

Der erste entscheidende Fortschritt in der molekularen Charakterisierung kongenitaler myasthener Syndrome war der Nachweis von pathogenen Mutationen des AChR‘s (Vincent *et al.*, 1997; Engel *et al.*, 1998; Ohno und Engel, 2002a). Es konnte gezeigt werden, daß verschiedene Mutationen des AChR‘s jeweils unterschiedliche Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptorproteins haben. Heterozygote Punktmutationen innerhalb der transmembranen, die Kanalpore begrenzenden M2-Region verschiedener Untereinheiten können die Öffnungszeit des Ionenkanals verlängern und das Bild eines "Slow-Channel-Syndroms" (SCCMS) verursachen. Das SCCMS wird in der Regel autosomal dominant vererbt. Wie kürzlich gezeigt wurde, ist jedoch auch ein rezessiver Erbgang mit einer variablen Penetranz möglich (Croxen *et al.*, 2002). Bei einzelnen Patienten wurden autosomal rezessiv vererbte Punktmutationen identifiziert, die zu einer verkürzten Kanalöffnungszeit und damit zu einem "Fast-Channel-Syndrom" (FCCMS) führen.

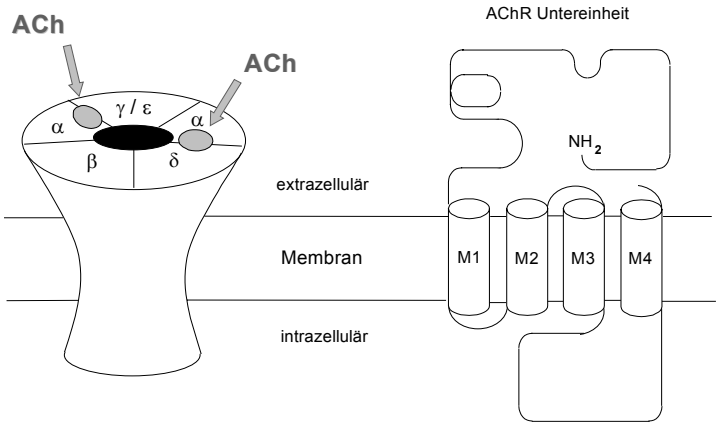

Abb. 2: (A) Schematische Darstellung eines AChR's. Fünf Untereinheiten bilden zusammen einen Ionenkanal. Die γ-Untereinheit des fetalen Rezeptors ist beim adulten Rezeptors durch die ε-Untereinheit ersetzt. (B) Schematische Darstellung einer AChR-Untereinheit. Neben einer großen N-terminalen exrtazellulären Domäne besteht jede Untereinheit aus 4 Transmembrandomänen (M1-M4) und einem kurzen C-terminalen Ende. Zwischen M3 und M4 befindet sich eine lange cytoplasmatische Schleife (modifiziert nach Vincent *et al.*, 2000).

Der Großteil aller autosomal rezessiv vererbten und sporadischen CMS scheint jedoch auf Mutationen der AChRε-Untereinheit zu beruhen, die über eine verminderte Expression des adulten AChR's zum morphologischen Bild eines AChR-Mangels führen (Milone *et al.*, 1998; Engel *et al.*, 1996; Abicht *et al.*, 1999; Abicht *et al.*, 2000; Engel, 2001). Für das Gen der AChRε-Untereinheit wurden auch Mutationen im Bereich der Promotorregion beschrieben. Diese Mutationen befinden sich alle innerhalb einer sogenannten N-Box (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 AChR's beschrieben worden, die Einfluß auf die Expression der jeweiligen Untereinheit haben (Ohno und Engel, 2002a).

3.2.2. Mutationen des *RAPSN*-Gens als Ursache eines postsynaptischen CMS

Das postsynaptischer Protein Rapsyn (receptor-associated protein of the synapse) spielt eine entscheidende Rolle im Prozeß der Aggregation von AChR an der postsynaptischen Membran (Froehner *et al.*, 1990). Rapsyn ist durch einen myristinylierten N-Terminus in der Membran verankert (Ramaro und Cohen, 1998) und enthält sieben Tetratricopeptid-Repeats, die die Selbstassoziation von Rapsyn Molekülen ermöglichen (Ramaro *et al.*, 2001); die Selbstassoziation ist Voraussetzung

für das Clustern von AChR. Die Coiled-coil-Domäne im C-terminalen Bereich von Rapsyn dient der Wechselwirkung mit AChR-Untereinheiten (Bartoli *et al.*, 2001; Ramaro *et al.*, 2001). Kürzlich wurden Mutationen in dem für Rapsyn kodierenden *RAPSN*-Gen, das sich auf Chromosom 11p11 befindet, als Ursache von postsynaptischen CMS identifiziert. Dabei handelt es sich um die rezessiven Mutationen N88K, L14P und 553ins5, die in vier Patienten beschrieben wurden (Ohno *et al.*, 2002).

3.2.3. Mutationen des *COLQ*-Gens als Ursache des Fehlens von Acetylcholinesterase an der Endplatte bei synaptischen CMS

Die lichtmikroskopisch nachweisbare Defizienz der AChE gilt nach der AChR-Defizienz als häufige Ursache von CMS (Donger *et al.*, 1998; Ohno *et al.*, 1998b; Ohno *et al.*, 2000). Die 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 ubiqitär exprimierte globuläre Anteil des Enzyms betroffen, der die eigentliche katalytische Aktivität enthält, sondern der muskelspezifisch exprimierte kollagenartige "Schwanz- bzw. Verankerungsteil" (ColQ), der auf einem eigenen Gen (*COLQ*) kodiert wird. Bis heute konnten 22 unterschiedliche rezessive Mutationen bei 21 unabhängigen Patienten im *COLQ*-Gen identifiziert werden, das auf Chromosom 3p24.2 lokalisiert ist und 17 Exons umfaßt (Donger *et al.*, 1998; Ohno *et al.*, 1998b; Ohno *et al.*, 2000).

3.2.4. Mutationen des *CHAT*-Gens als Ursache eines präsynaptischen CMS (CMS mit episodischen Apnoen)

Die ChAT katalysiert die Biosynthese des Neurotransmitters Acetylcholin aus Cholin und Acetyl-CoA im Cytoplasma präsynaptischer Neuronen. Das *CHAT*-Gen befindet sich auf Chromosom 10q11.2. Im ersten Intron das *CHAT*-Gens liegt das *VACHT*-Gen. Diese einzigartige Organisation, die von *C. elegans* über *D. melanogaster* bis zum Vertebratenreich konserviert ist, wird als sogenannter "Cholinerger Locus" bezeichnet (Eiden, 1998).
Kürzlich konnten Ohno *et al.* Mutationen im *CHAT*-Gen als erste molekulare Ursache für ein präsynaptisches CMS identifizieren. In funktionellen Studien zeigten sie, daß *CHAT*-Mutanten an katalytischer Aktivität einbüßen (Ohno *et al.*, 2001). Bei insgesamt fünf Patienten wurden zehn rezessive Mutationen identifiziert (Ohno *et al.*, 2001).

Auffällig bei allen Patienten waren krisenhafte Verschlechterungen des Krankheitsbildes, die meist im Rahmen von fieberhaften Infekten auftraten und mit episodischen Apnoen einher gingen (Ohno *et al.*, 2001; Byring *et al.*, 2002).Von fünf betroffenen Geschwistern dieser Patienten waren vier im Rahmen derartiger Ateminsuffizienzen verstorben (Ohno *et al.*, 2001). Dieser klinische Phänotyp führte zum Terminus CMS-EA (CMS mit episodischen Apnoen).

3.3. Neue Kandidatengene bei kongenitalen myasthenen Syndromen

Es gibt mehrere Familien mit klinisch gesichertem CMS, deren Defekte keinem der Genloci der oben genannten Proteine zugeordnet werden konnten (Engel, 2001). Aus diesem Grund ist mit weiteren, möglicherweise noch nicht identifizierten CMS-Genen zu rechnen. Dabei bieten sich insbesondere solche Gene, die spezifisch an der neuromuskulären Endplatte exprimiert werden, die aber nicht unbedingt Bestandteil des AChR-Apparats sein müssen, als Kandidaten an. Ebenso könnten Mutationen von Genen, die regulatorische Funktionen auf synapsenspezifische Gene ausüben, oder von Genen, die für die spezifische Faltung, den Transport oder das Assemblieren von Synapsenproteinen verantwortlich sind, eine gestörte Signaltransduktion an der neuromuskulären Endplatte und damit CMS verursachen.

B Zielsetzung

Die molekulare Charakterisierung von CMS verursachenden Mutationen kann neben der klinischen Bedeutung, die sie für den einzelnen Patienten hat, zusätzlich zum Verständnis synapsenspezifischer Vorgänge beitragen. Außerdem kann die Untersuchung der Haplotypen mutationstragender Allele, Herkunft und Verbreitung spezieller Mutationen erhellen.

1. Klinische Bedeutung 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 (Engel, 2001). 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 (Ohno *et al.*, 2001; Byring *et al.*, 2002). 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. SCCMS, 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, zuweilen auch im Hinblick auf neuartige Behandlungsmöglichkeiten. So wurden bei Patienten mit bislang therapierefraktären, molekulargenetisch definierten SCCMS konstante Behandlungserfolge mit Chinidinsulfat berichtet (Harper und Engel, 1998). Die genaue Klassifizierung eines CMS ist für den einzelnen Patienten daher von großer klinischer Bedeutung.

Trotz einzelner spezifischer Merkmale (Engel, 2001), gelingt eine sichere Abgrenzung der CMS-Unterformen anhand klinischer Kriterien in den meisten Fällen nicht. In der Diagnostik von CMS hatte früher die Biopsie des *M. intercostalis* einen hohen Stellenwert: nur durch aufwendige *in vitro* elektrophysiologische und morphologische Untersuchungen an diesem Nerv-Muskelpräparat war eine pathogenetische Differenzierung der einzelnen Syndrome möglich. 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 zukünftige, auf molekulargenetischer Analyse basierende Diagnostik von CMS, die eine nicht invasive Alternative zur konventionellen Diagnostik mit Intercostalismuskelbiopsie und *in vitro* Elektrophysiologie bietet.

2. Beitrag der molekularen Charakterisierung von CMS zum Verständnis pathophysiologischer Vorgänge an der neuromuskulären Endplatte

CMS stellen interessante Modelle einer gestörten Synapsenfunktion dar. Aus ihrer Analyse lassen sich Rückschlüsse auf die Pathophysiologie anderer synaptischer Vorgänge, die an dem komplexen Vorgang der Erregungsübertragung beteiligt sind, ziehen.
Am Modell des nikotinergen AChR‘s 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 (Gotti *et al.*, 1997; Lena und Changeux, 1997; Lindström, 1997). So konnte beispielsweise als Ursache einer dominant vererbten Form der Epilepsie eine Mutation der α-Untereinheit des neuronalen nikotinergen AChR identifiziert werden (Steinlein *et al.*, 1995).
Weitere molekulare Defekte, die zu einer gestörten Erregungsübertragung führen sind auch in Genen zu vermuten, in denen bisher noch keine CMS Mutationen nachgewiesen werden konnten. Solche CMS-Kanidatengene sind z.B. das *VACHT*-Gen oder das *ACHE*-Gen, welches für den globulären Teil der AChE kodiert.

3. Populationsgenetische Aspekte einzelner Mutationen

Bei eine Reihe von geographisch und/oder soziokulturell bedingt isolierten Populationen sind sogenannte Founder-Effekte für des Auftreten von bestimmten mutationstragenden Allelen beschrieben: Stammt ein Population von einer relativ kleinen Gruppe gemeinsamer Vorfahren (founder = Gründer) ab, dann kann die eingeschränkte genetische Variation in einer solchen Population, zum gehäuften Auftreten bestimmter mutationstragender Allele führen.
Eine solche isolierte Population sind die Roma, die vor etwa 900-1100 Jahren nach Europa kamen (Übersicht in Fraser, 1992). Sprachwissenschaftliche Vergleiche legen

nahe, daß die Roma ursprünglich vom indischen Subkontinent stammen, über die Zusammensetzung ihrer Vorfahrenpopulation existieren allerdings verschiedene Hypothesen (Turner, 1926; Samson, 1927; Hancock, 2000).

Aktuell wird die Anzahl der Roma auf 4-10 Millionen geschätzt, wobei die meisten in Zentral- und Südosteuropa leben (Liégeois, 1994; Marushiakova und Popov, 2001). Ihre heutige Zusammensetzung ist das Resultat verschiedener Migrationsbewegungen vom Balkan nach Westeuropa und auch Folge der Vernichtung hunderttausender Roma durch den Holocaust (Fraser, 1992).

Innerhalb der Romagesellschaft existieren verschiedene Gruppen mit eigener Identität, die sich voneinander z.B. auch durch Endogamieregelungen abgrenzen. Es werden drei Hauptgruppen unterschieden, denen jeweils mehrere Untergruppen angehören:

Die größte Gruppe stellen die Roma in Osteuropa, zu denen unter anderem die Vlax und die Xoroxane gehören. Eine zweite Gruppe bilden die Roma Mittel- und Westeuropas, die in deutschsprachigen Ländern als Sinti bekannt sind. Die dritte Gruppe sind die Romanichals in Großbritannien (Fraser, 1992).

Bisher konnten eine Reihe von sogenannten "privaten" Mutationen in der Romabevölkerung identifiziert werden, die zu verschiedenen Erbkrankheiten führen (Kalaydjieva *et al.*, 2001a; Kalaydjieva *et al.*, 2001b). Für CMS ist dies die Mutation ε1267delG im *ACHRε*-Gen, die gehäuft bei südosteuropäischen Patienten aus der Volksgruppe der Roma auftritt und für die ein gemeinsamer Ursprung des mutierten Allels innerhalb dieser Population angenommen wird (Abicht *et al.*, 1999).

Die Analyse der Haplotypen bei einem größeren ε1267delG Patientenkollektiv, könnte einen Beitrag zur Klärung von Herkunft und Geschichte der Roma leisten. Außerdem könnte durch eine gezielte Mutationssuche und der daraus resultierenden beschleunigten Diagnostik medizinische Versorgung und genetische Beratung in dieser Bevölkerungsgruppe verbessert werden.

C Material und Methoden

1. Patienten

Patientenmaterial (EDTA-Vollblut, Muskelgewebe, genomische DNA) wurde von verschiedenen Kliniken aus Deutschland und aus dem Ausland zur molekulargentischen Untersuchung eingesandt. Mittels eines Fragebogens (Anhang: CMS-Erfassungsbogen) 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.

3. DNA-Extraktion

Die Extraktion genomischer DNA erfolgte aus venösem EDTA-Vollblut mittels Qiagen Blood and Tissue Culture DNA Extraction Kit (Qiagen) und Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Die Extraktion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

4. RNA-Extraktion aus Muskelgewebe

Die Extraktion der gesamtzellulären RNA erfolgte aus Muskelgewebe, daß durch eine offene Muskelbiopsie gewonnen wurde. Die RNA-Präparation wurde entsprechend einem Standard-Protokoll durchgeführt (Chomczynski und Sacchi, 1987). Dabei sollte der Gewebeaufschluß auf Trockeneis erfolgen. Ein linsengroßes, bei -80°C tiefgefrorenes Muskelgewebe wird fein zermörsert und nach Zusatz von 500µl 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 400µl GSCN-Lsg. gelöst, gefällt, und in 400µl 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. 50µl 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.

5. Polymerase-Ketten-Reaktion

5.1. Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion

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 reaction = PCR) amplifiziert. Das von Mullis entwickelte Verfahren ermöglicht die exponentiellen *in vitro* Vermehrung definierter DNA Stücke (Mullis, 1990).

5.2. PCR-Reaktionsbedingungen

5.2.1. Standard-PCR-Protokoll

Ein typischer PCR-Ansatz enthält in 50µl Reaktionsvolumen:
5µl Reaktionspuffer 10x (ThermoPol Buffer; New England Biolabs (NEB))
1,25 mM sense Primer
1,25 mM antisense Primer
10 mM PCR Nucleotide Mix (Boehringer Mannheim oder MBI Fermentas)
1 µg genomische DNA
2,5 Units *Taq* DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim)
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 : 5min	Denaturierung der DNA
2. 35 Zyklen: (1) 94°C : 1min (2) 50°C : 1min (3) 72°C : 1min	 Aufschmelzen der DNA Doppelstränge Anlagern der Primer (Annealing) Synthese des DNA Doppelstranges (Extension)
3. 72°C : 7min	Abschließende Extension

5.2.2. Modifikationen des Standard-PCR-Protokolls

Um DNA Fragmente größer als 2kb zu amplifizieren, wurde im Reaktionsansatz Expand long Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics) verwendet und das PCR Programm wie folgt modifiziert :

1. 5 Zyklen: (1) 94°C : 6min (2) 52°C : 1min (3) 68°C : 15min
2. 35 Zyklen: (1) 94°C : 1min (2) 55°C : 1min (3) 68°C : 10min

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

5.2.3. 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.

Arbeitsprotokoll cDNA-Erststrangsynthese:
In 10µl Reaktionsansatz sind enthalten:
3µg RNA
1,25mM Primer
Die Denaturierung der RNA erfolgt unter Schütteln bei 70°C für 2min und anschließender Kühlung auf Eis für weitere 2min.

Der Reaktionsansatz wird auf 20µl erweitert unter Zusatz von:
4µl M-MuLV RT Puffer (MBI Fermentas)
50mM DTT (MBI Fermentas)
20mM PCR Nucleotide Mix (Boehringer Mannheim oder MBI Fermentas)
15 Units M-MulV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas)
Bei 42°C für 1,5 Stunden erfolgt die cDNA-Erststrangsynthese.
Der Reaktionsansatz wird anschließend in 50µl Tris Puffer (10mM Tris HCl, pH 8,5) aufgenommen und die Reverse Transkriptase bei 72°C zerstört.

5.3. 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.

5.3.1. Primer für PCR des *ACHRε*-Gens

Standardmäßig verwendete Primerpaare für die PCR des *ACHRε*-Gens (12 Exons und flankierende intronische Sequenzen) [Genbank-Zugangsnummer: AF105999] und dessen Promotorregion [Genbank-Zugangsnummer: Z84811] aus genomischer DNA:

Primername	Primersequenz	Zielregion	Fragment-länge (bp)	Annealing-temperatur [°C]
I0s E2a	5' CCTCACACAGGCACCCTGGCA 3' 5' CAGTGAGATGAGATTCGTCAG 3'	Exon 1	550	50
E1s I3a	5' CAGGCAGCAGGATGGCA 3' 5' TGCCCTGGACAAGACCTCACAC 3'	Exons 1+2+3	667	50
I3s I5a	5' TGTGAGGTCTTGTCCAGGGCAC 3' 5' AACAATAATCGTCCGGGCCTCG 3'	Exons 4+5	586	56
I5s I6a	5' AGGTACAGATGGGAACAGAG 3' 5' TCTGGACCCCGTCTAGAAGCG 3'	Exon 6	306	50
I6s I8a	5' TCTTCAGCCCGCTGTCAGCTCGGC 3' 5' GGCCACGCCCCCACCCTTCACACT 3'	Exons 7+8	525	50
I8s IE10a	5' TCGGTAGCTGGGAGGAGGAACG 3' 5' AAGGCAGCTGGCGGGGAAAACAC 3'	Exons 9+10	534	50
E10s I12a	5' CACGGAGCGAGCTCGTGTTTGA 3' 5' CTGGAGATGGGTGGGAAATTG 3'	Exons 11+12	550	50
ProAs E1a	5' GAATCTCTGTACCGCAGGGCTA 3' 5' AGCCCCTGTCCGTACCGAGAA 3'	Promotor	623	50

Primerpaar für PCR um Einzelbasenaustausch-Polymorphismus (single nucleotide exchange polymorphism = SNP) RH76075 stromabwärts des *ACHRε*-Gens aus genomischer DNA:

Primername	Primersequenz	Zielregion	Fragment-länge (bp)	Annealing-temperatur [°C]
RH76075s RH76075as	5' AAACAGGAATATCCAAGGCCAC 3' 5' CCAAACTCCAGGGAATGGA 3'	RH76075	229	50

Sense-Primer 1,6kb stromaufwärts des *ACHRε*-Gens auf Contig NT_010823:

Primername	Primersequenz
BagsBamHIs	5' CCCTGGATCCCGACCTTAGCAT 3'

5.3.2. Primer für RT-PCR der AChRε-mRNA

Primer zur cDNA-Erststrangsynthese:

Primername	Primersequenz
E12a	5’ AGGCTGGATACACGGCGCGT 3’

Exonische Primer für PCR aus cDNA:

Primername	Primersequenz
E2s	5’ AGTGCGGGAGCCTGAGGATA 3’
E7s	5’ GGCGAGTGGGCCATCGACTT 3’
E7as	5’ CCTGCGCCGGCAGGAAGTA 3’
E6s	5’ AACAAGATCGACATCGACACA 3’
E9as	5’ GCAATTCATGACAATGAGCGTG 3’
E11as	5‘ GCTCTCGGCCACGAAGTTCAC 3’

5.3.3. Primer für PCR des *CHAT*-Gens

Primerpaare für die PCR des *CHAT*-Gens (18 Exons und flankierende intronische Sequenzen) [Genbank-Zugangsnummern: AF305893-AF305906] aus genomischer DNA:

Primername	Primersequenz	Zielregion	Fragment-länge (bp)	Annealing-temperatur [°C]
C1s C1a	5’ GAGAAGCATCTGCGTCTAATGCTGC 3’ 5’ GGGTGGGCTCTGGAGTGACTGT 3’	Exon 1	426	52
C2s C2a	5’ CAAAGGCTGTCACCCACGGTC 3’ 5’ ACTCCTCCTAGGACAAGTTCTC 3’	Exon 2	365	52
C3s C3a	5’ GCAGCGAGCAGAGACTTCCTCAGAC 3’ 5’ CAGGACTCAGAGGACTCCACGA 3’	Exon 3	665	52
C4s C4a	5’ TGGGCACTCCTATGGCATCTACAC 3’ 5’ CCTGCCTGGAACCCAATAGATAA 3’	Exon 4	346	52
C5s C5a	5’ ACTGTGGTCAGCACGTACAGGT 3’ 5’ AGTCCCACTCAGGACTGTTCTA 3’	Exon 5	369	52

C6s C6a	5’ CTGAGCTGAGCCCTAGAAATGGA 3’ 5’ CCTACCTGCCTCTCACCGAGAT 3’	Exon 6	418	52
C7s C7a	5’ GCTCTGGTGAAGTGTCCCGATT 3’ 5’ CTGATGGCCTGGACGTCCACTGTC 3’	Exon 7	360	52
C8s C8a	5’ GGGCGGCATACAATGGGCGATCA 3’ 5’ GGAGCCAGGAATGGAATACAGA 3’	Exon 8	348	52
C9s C9a	5’ GGTTCTGTGCCCCATTTTGCCTGA 3’ 5’ CCTCGGAGAAGGTAATGGACGTG 3’	Exon 9	372	52
C10s C10a	5’ TCAACAGCCTTGGCTTGGTCCCTA 3’ 5’ CTGAGCTCCCACACTATGGCTGA 3’	Exon 10	459	52
C11s C11a	5’ TGGCTCAAGACCTGGGTCTTGTT 3’ 5’ AGTGAGTGCGCCTGCCAGACACAA 3’	Exon 11	419	52
C12s C12a	5’ TCTGGTGTCCTGGAGAAGAGGT 3’ 5’ GTTAAGACGCTTTCCAGACTG 3’	Exon 12	305	52
C13s C13a	5’ CACTGACAGCTAAGATGATTGC 3’ 5’ GCTGGGGTCTTTGGAAACTT 3’	Exon13	324	52
C14s C14a	5’ AGGGCAGGGACTACGTCCG 3’ 5’ GTCCCTCCCTCCAGGATGCTT 3’	Exon 14	345	52
C15/16s C15/16a	5’ AGCTTGCTGAGGCAATTT 3’ 5’ GTCTTATGCCATGGTGCCCAT 3’	Exon 15+16	520	52
C17s C17a	5’ ACTCATACACATTGTTGGCAGCA 3’ 5’ GCTGAAGATCACATAGTTCAG 3’	Exon 17	418	52
C18s C18a	5’ TAATTCAGTCAAACCCCCAGGTGG 3’ 5’ GGACCCTGAGGACAGGGAGCTGTGGA 3’	Exon 18	487	52

Mismatch-Primerpaar zum Nachweis der Mutation I336T im *CHAT*-Gen:

Primername	Primersequenz	Zielregion	Fragment-länge (bp)	Annealing-temperatur[°C]
C10mms C10mmas	5’ GGATCTGTTCACTCAGTTGAGgAAGA 3’ 5’ CGGCCCACTCGCTCCTCCCGT 3’	Exon 10 (Pos 336)	107	50

g bezeichnet den Mismatch

5.3.4. Primer für PCR des *VACHT*-Gens

Primerpaare für die PCR des *VACHT*-Gens (1 Exon und flankierende intronische Sequenzen) [Genbank-Zugangsnummer: U10554] aus genomischer DNA:

Primername	Primersequenz	Zielregion	Fragment-länge (bp)	Annealing-temperatur[°C]
V1s V1as	5' GCATTAGCATGAGCGACGTAAG 3' 5' GCTGCTCTGGCCGAGCAGACTC 3'	*VACHT*	491	56
V2s V2as	5' ACGCCTCGCCGGACGGAGTCCTT 3' 5' ACGCCGAGGTGTTGGCCGTGTA 3'	*VACHT*	497	56
V3s V3as	5' CGCTGCCCACTCCGGCCAATG 3' 5' GCACCAAGAAGGGCACGCGCTT 3'	*VACHT*	522	56
V4s V4as	5' GGCATCCTCTATGAGTTCGC 3' 5' CGAGCGTGGGCAGCAGTGCTGT 3'	*VACHT*	483	56
V5s V5as	5' TCTGTTTTGGCATAGCCCTAGT 3' 5' AGCCCCCTTGACCCAAGGCGGT 3'	*VACHT*	483	50
V6s V6as	5' TACTACACCCGCAGCTAGCAT 3' 5' GACTTGGAGACCCAGTTCACCC 3'	*VACHT*	483	56

5.3.5. Primer für PCR des *ACHE*-Gens

Primer für PCR von Teilbereiche des globulären Anteils des *ACHE*-Gens [Genbank-Zugangsnummer: L42812] aus genomischer DNA:

Primername	Primersequenz	Zielregion	Fragment-länge (bp)	Annealing-temperatur[°C]
ACHE E6s ACHE E6as	5' GTGGTCGCCTGCATTTCTCCG 3' 5' TGGGGCTCGTCTGTGTTATAGC 3'	Exon 6	345	50
ACHE N-Box s ACHEN-Box as	5' GCGGAGACTCCATCTCTAT 3' 5' GAGCCGGGACGCCTGCGTT 3'	N-Box Motiv	159	56

6. Aufreinigung der PCR

Die PCR Proben wurden durch Gelelektrophorese auf Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen aufgetrennt. Dabei wurde 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 Extraktions Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert.

7. Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Soweit möglich erfolgte ein weiterer Nachweis und die Dokumentation von Mutationen und von zusätzlichen Polymorphismen mittels Restriktionsverdau. Dazu wurden 1-10µg DNA in einem Standardansatz mit 2µl 10x-Puffer und 1µl Restriktionsenzym (10-20 Units) versetzt und mit destilliertem Wasser auf 20µl Endvolumen aufgefüllt. Der Verdau erfolgte für 3 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur. Enzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas und NEB bezogen.

8. Sequenzanalyse

Die zu untersuchenden PCR-Fragmente wurden in sense und antisense Richtung sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte teilweise durch die Abteilung von Herrn Dr. H. Blum, Genzentrum LMU-München und teilweise durch die Firma Medigenomix, Martinsried/München mit DNA-Sequenziergeräten der Firma Applied Biosystems (Modele: Prism XL 96 bzw. 377) und fluoreszensmarkierten Didesoxy-Terminatoren. Die Sequenzen wurden anschließend auf potentielle Mutationen untersucht. Der Vergleich mit der entsprechenden Wildtypsequenz erfolgte computergestützt mit dem Programm MacDNASIS Pro V 1.0 (Hitachi Software Engenneering) oder online über den Server des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov./BLAST/).

Die Aminosäuresequenz von menschlichem ChAT wurde mit veröffentlichten ChAT-Sequenzen von anderen Spezies und von menschlichen Enzymen mit ähnlicher Funktion verglichen. Die Genbank-Zugangsnummern sind: P28329, ChAT Mensch; P13222, ChAT Schwein; P32738, ChAT Maus; P32738, ChAT Ratte ; AAK94673,

ChAT Huhn; P07668, ChAT *D. melanogaster*; P32756, ChAT *C. elegans*; P43155, Carnitin O-Acetyltransferase Mensch; JC7101, Carnitin O-Octanoyltransferase Mensch; S70579, Carnitin O-Palmitoyltransferase I, Muskel-Typ; NP_000089, Carnitin Palmitoyltransferase Mensch.

9. Genotypenanalyse

Die Genotypenanalyse erfolgte mit Hilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker. Die Mikrosatellitenmarker wurden online, basierend auf Informationen der Genome Database (GDB) (http://gdbwww.gdb.org/) und von Généthon (www.genethon.fr/php/index.php) ausgewählt. Für den Marker *D17S1175* wurde von Betty *et al.* (Betty *et al.*, 1994) eine Entfernung von weniger als 2kb 5' zum *ACHRε*-Gen angegeben. Die Bestimmung der Fragmentlängen erfolgte durch das Labor von Frau Priv.-Doz. Dr. A. Huebner, Klinik- und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, TU-Dresden und die Firma Medigenomix, Martinsried/München.

Folgende Mikrosatellitenmarker wurden verwendet:

ACHRε-Locus (Chromosom 17p12-13):

Name	Genetische Entfernung zum Telomer (cM)	Genetische Entfernung zum *ACHRε* (cM*)
D17S849	0,63	11,3
D17S926	0,62	11,4
D17S1798	7,4	4,6
D17S1828	10,56	1,44
D17S1175	12,0	< 5 kb
D17S1810	12,5	0,5
D17S938	17,06	4,06

* soweit nicht anders angegeben

CHAT-Locus (Chromosom 10q11):

Name	Genetische Entfernung zum Telomer (cM)	Genetische Entfernung zum *ACHRε* (cM)
D10S1787	68,6	1,1
D10S1793	68,6	1,1
D10S1766	69,7	0,5
D10S469	69,7	0,5
D10S220	70,2	1,0
D10S196	70,2	1,0

D Ergebnisse

Durch Mutationsanalyse verschiedener CMS-Kanidatengene und teilweise weiterführende funktionelle Charakterisierung noch nicht beschriebener Mutationen, konnte bei einer Reihe von CMS-Patienten der zugrunde liegende genetische Defekt aufgeklärt werden. Darüber hinaus ermöglichte die Korrelation von Geno- und Phänotypen bei einzelnen Patienten, spezifischen CMS-Mutationen charakteristische Merkmale im Krankheitsbild zuzuordnen**.** Zusätzlich konnte bei Patienten mit der Mutation ε1267delG im *ACHRε*-Gen ein Founder-Haplotyp identifiziert werden.

1. Mutationen im *ACHRε*-Gen

Insgesamt wurden bei sieben Patienten mittels PCR und direkter Sequenzierung die kodierenden Bereiche (12 Exons und flankierende intronischen Regionen), sowie die Promotorregion des *ACHRε*-Gens untersucht. Bei 20 Patienten wurde direkt mit einer PCR (Primer E10s, I12a) und anschließender Sequenzierung auf die Mutation ε1267delG getestet. Für die Haplotypenanalyse stand zusätzlich DNA von Patienten zur Verfügung, von denen bereits bekannt war, daß sie homozygote Träger der Mutation ε1267delG sind.
Abbildung 3 gibt eine Übersicht über die nachfolgend beschriebenen sieben unterschiedlichen Mutationen von CMS-Patienten im Bereich des *ACHRε*-Gens.

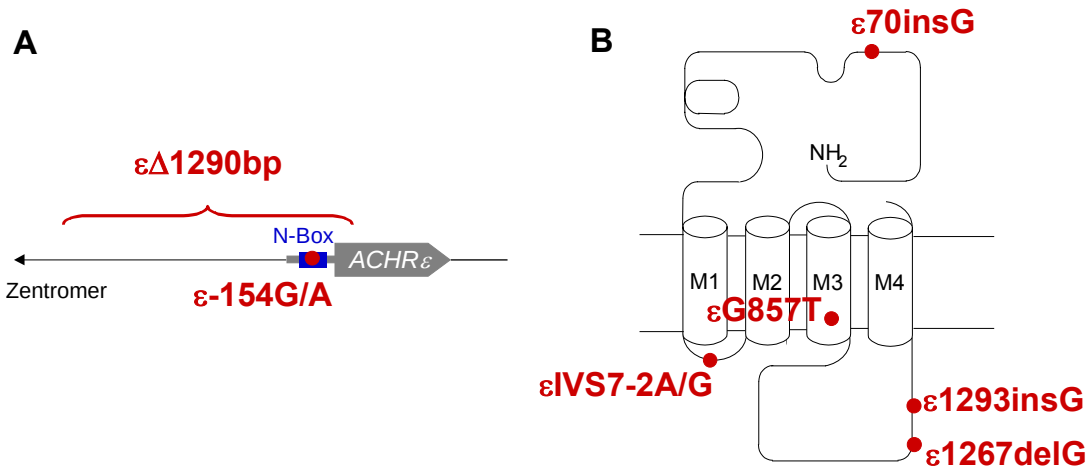

Abb. 3: Mutationen im Bereich des *ACHRε*-Gens. (A) *ACHRε*-Genlocus und flankierende chromosomale Regionen. (B) AChRε-Untereinheit.

1.1 Nachweis einer Mikrodeletion im Bereich des *ACHRε*-Gens (εΔ1290bp)

Bei einem 36jährigen Patienten konnte, zusätzlich zu einer Mutation in einer N-Box der Promotorregion des *ACHRε*-Gens (ε-154G/A), eine chromosomale Mikrodeletion im Bereich des *ACHRε*-Gens (εΔ1290bp) nachgewiesen werden.

1.1.1. Klinisches Bild des Patienten

Bei dem 36jährigen Patienten deutscher, nicht konsanguiner Eltern bestehen seit früher Kindheit myasthene Symptome, einschließlich Ptose, eingeschränkter Augenbewegung und Schwäche der Gesichts- und Extremitätenmuskulatur. Die belastungsabhängige Schwäche der Schultergürtelmuskulatur ist proximal betont. Es konnten keine AChR Antikörper nachgewiesen werden, die repetitive Stimulation des *N.accessorius* ergab ein Dekrement des Summenmuskelaktionspotentials (compound muscle action potential = CMAP) von 30%. Der Patient spricht gut auf die Therapie mit dem AChE-Hemmer Pyridostigmin an. Die Eltern und die sechs Geschwister des Patienten sind klinisch unauffällig.

1.1.2. N-Box Mutation in der Promotorregion des *ACHRε*-Gens (ε-154G/A)

Bei dem Patienten wurde an der vierten Base in einer konservierten, sechs Basenpaare langen N-Box der Promotorregion des *ACHRε*-Gens eine Mutation nachgewiesen. Es handelt sich dabei um eine Nukleotidaustausch von Guanin zu Adenin an Position -154 des *ACHRε*-Gens (ε-154G/A). Die Sequenzanalyse der kodierenden Bereiche des *ACHRε*-Gens (12 Exons und flankierende intronische Sequenzen) ergab keine weiteren Mutationen. Sowohl direktes Sequenzieren als auch Analyse mittels Restriktionsverdau ließ die Mutation beim Patienten homozygot erscheinen. Die Analyse der nicht betroffenen Familienmitglieder mittels Restriktionsverdau zeigte, daß diese die Mutation ε-154G/A entweder nicht oder heterozygot tragen. Überraschenderweise konnte beim Vater des Patienten, im Gegensatz zur Mutter, die Mutation ε-154G/A nicht heterozygot nachgewiesen werden.

1.1.3. Hypothesen aus dem scheinbar homozygoten Auftreten der Mutation ε-154G/A

Aus obigem Befund ergaben sich folgende Hypothesen:

1. Der angegebene Vater ist nicht biologischer Vater des Patienten.
2. Die N-Box Mutation auf dem väterlichen Allel des Patienten ist eine Keimbahnmutation des Vaters oder als Neumutation beim Patienten entstanden.
3. Auf dem väterlichen Allel des Patienten befindet sich im Bereich der N-Box eine Deletion bzw. eine Umordnung der Sequenz, welche eine Amplifikation von diesem Bereich mit den verwendeten Primern verhindert.

1.1.4. Haplotypenanalyse am *ACHRε* Locus

Die Haplotypenanalyse des Patienten und seiner Familie mit fünf polymorphen Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 17 im Bereich des *ACHRε*-Locus ergab folgendes:

1. Eine Nicht-Vaterschaft des Vaters erscheint unwahrscheinlich, da Patient und Vater für alle getesteten Marker ein identisches Allel teilen.
2. Das Allel des Patienten mit N-Box Mutation ε-154G/A stammt von der Mutter und wurde auch an die nicht-betroffene Schwester (II/2) weitergegeben.
3. Der nicht-betroffene Bruder (II/3) hat vom Vater im Bereich des *ACHRε*-Gens den gleichen Haplotyp ererbt wie der Patient. Im Gegensatz zum Patienten ist er jedoch nicht Träger des mütterlichen Allels mit der N-Box Mutation.
4. Eine mögliche Deletion sollte sich im Bereich zwischen den Markern *D17S1175* (5' zum *ACHRε* gelegen) und *D17S1828* (3' zum *ACHRε* gelegen) befinden, da diese Marker bei dem Patienten heterozygot auftreten.

1.1.5. Polymorphismenvergleich am *ACHRε*-Locus

Mittels PCR und direkter Sequenzierung wurden bei dem Patienten zwei SNP nachgewiesen: Ein SNP in der 3' untranslatierten Sequenz des *ACHRε*-Gens (RH76075; auf Contig NT_010823, Variation 1341821:G/T) und ein SNP im Intron 3 des *ACHRε*-Gens (IVS3+54C/A).

Die Analyse der innerhalb der Familie aufgetretenen Variationen der beiden SNP ergab, daß beide mit dem mütterlichen Allel, auf dem die N-Box Mutation ε-154G/A liegt, cosegregieren. Die SNP wurden beim Vater nicht gefunden. Da bei dem Patienten jedoch beide SNP heterozygot nachgewiesen werden konnten, kann das väterliche Allel weder im Bereich der 3' untranslatierten Sequenz, noch im Bereich stromabwärts von Intron 3 des *ACHRε*-Gens deletiert bzw. umgeordnet sein.

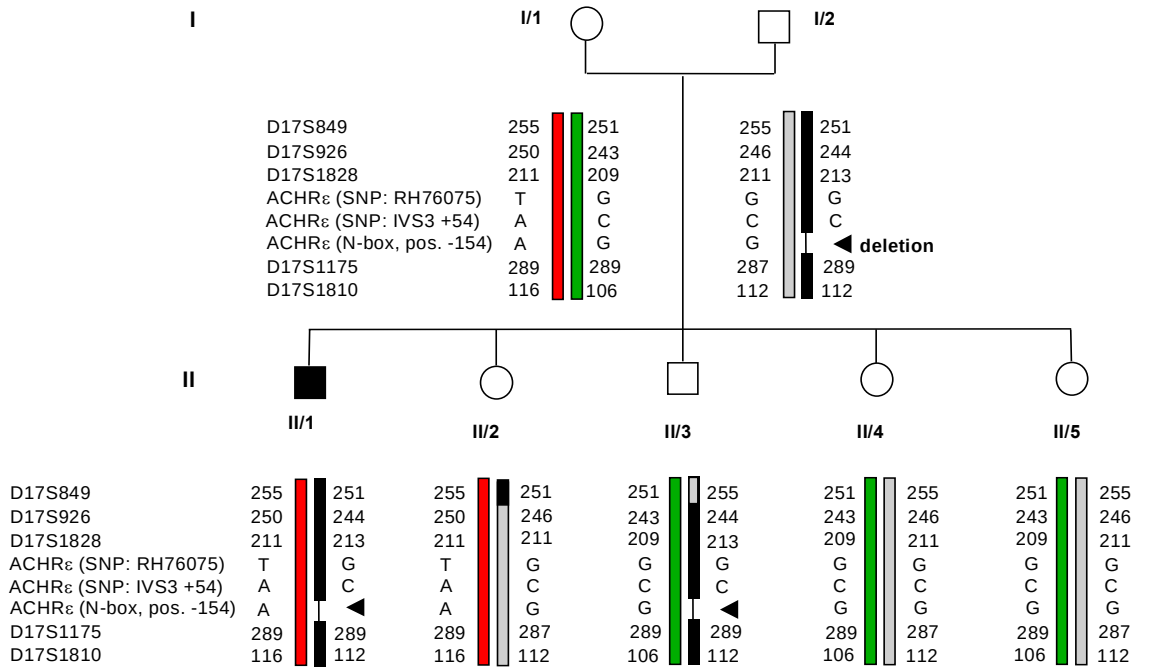

Abb. 4: Genotypenanalyse mit fünf polymorphen Mikrosatellitenmarkern, die den *ACHRε*-Locus flankieren, und zwei SNP auf dem *ACHRε*-Gen. Das mütterliche Allel mit der N-Box Mutation ist rot, das väterliche Allel mit der chromosomalen Deletion schwarz gezeichnet. Nur der Patient (II/1) trägt beide mutierten Allele.

1.1.6. Allelspezifische PCR zur Identifizierung des väterlichen Allels

Das väterliche Allel des Patienten im Bereich des *ACHRε*-Gens wurde mittels allelspezifischer PCR ermittelt.
Zuerst wurde aus genomischer DNA des Patienten (II/1), des Vater (I/2) des Bruders (II/3) sowie einer Normalkontrolle (NK) eine PCR mit dem Primer I11a durchgeführt. Anschließende Nested-PCR-Versuche mit den Antisense-Primern I5a, I3a und E2a und einem ca. 1,6kb vom *ACHRε*-Gen stromaufwärts gelegenen Sense-Primer BagsBamHIs ergaben bei dem Patienten, seinem Vater und seinem Bruder zusätzlich zu den bei ca. 2,2kb erwarteten Banden der Wildtypallele, starke Banden der Mutationsallele mit Längen zwischen 800bp und 1000bp (Abbildung 5).

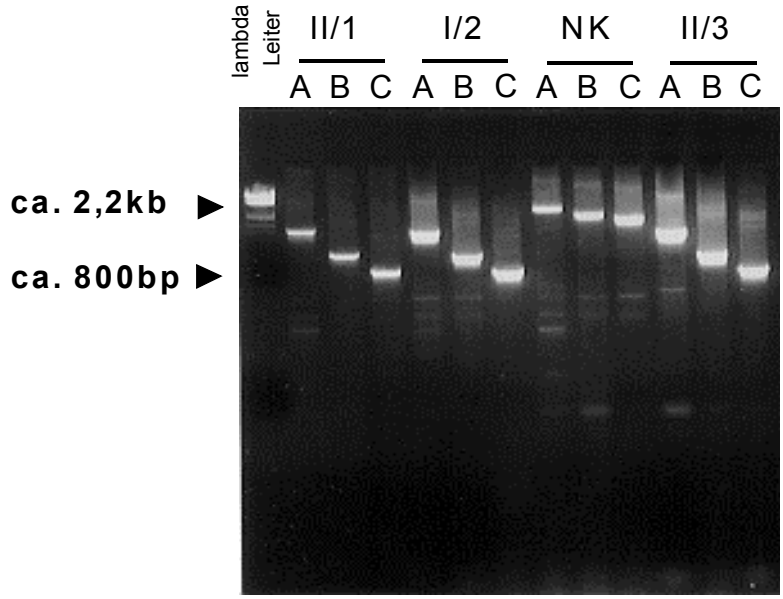

Abb. 5: Nested-PCR-Analyse des Patienten (II/1), seines Vaters (I/2) einer Normalkontrolle (NK) und eines Bruders des Patienten (II/3). Sense-Primer war immer BagsBamHIs, als Antisense-Primer wurden I5s (PCR A), I3s (PCR B), und E2a (PCR C) verwendet. Bei dem Patienten und seinen Angehörigen wurden deutlich kürzer Fragmente sind als bei der Normalkontrolle amplifiziert. Die Wildtypallele des Patienten und seiner Angehörigen erscheinen im Gel nur sehr schwach, da in der PCR das kürzere Allel bevorzugt amplifiziert wurde.

1.1.7. Identifizierung der Deletionsbruchpunkte im *ACHRε*-Gen

Durch direkte Sequenzierung der PCR-Produkte konnte gezeigt werden, daß bei dem kürzeren Fragment eine Deletion im Bereich des *ACHRε*-Gens vorliegt. Außerdem konnten die genauen Deletionsbruchstellen ermittelt werden. Bezogen auf Contig NT_010823 befindet sich die 5'-Bruchstelle innerhalb eines Alu-Elements an Position 1 335 844 und die 3'-Bruchstelle im Exon 2 des *ACHRε*-Gens an Position 1 337 135. Damit erstreckt sich die Deletion über 1290bp. Zwischen den Bruchstellen befinden sich auf dem deletierten Allel zehn Basenpaare, für die keine Homologie zu einer anderen Sequenz an diesem Locus gefunden werden konnte.

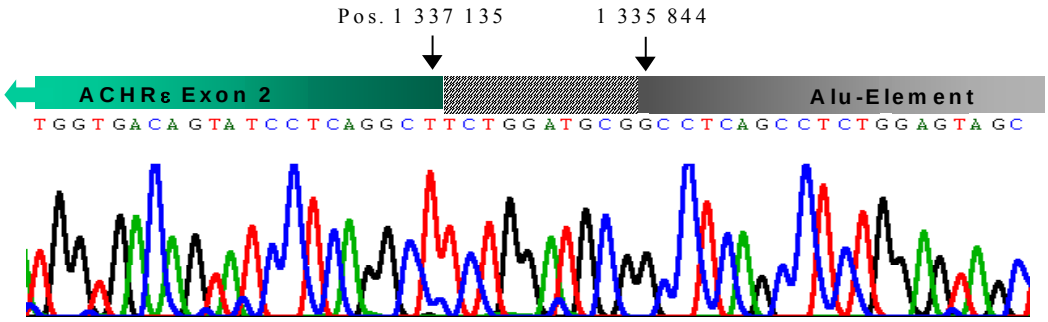

Abb. 6: Sequenz des väterlichen Allels des Patienten in antisense Richtung. Die Pfeile geben die Positionen an, an denen sich die Deletionsbruchstellen befinden

1.2. Aufkärung der transkriptionellen Konsequenzen der Mutation εIVS7-2A/G

Die Konsequenzen einer Mutation an der Spleißakzeptorstelle in Intron 7 des *ACHRε*-Gens (εIVS7-2A/G) konnten auf der Transkriptionsebene aufgeklärt werden.

1.2.1 Patienten mit der Mutation εIVS7-2A/G

Bei fünf Patienten (drei männlich und zwei weiblich) in drei unabhängigen europäischen Familien wurde die Mutation εIVS7-2A/G nachgewiesen. Zwei kroatische Geschwister, bei denen Konsanguinität der Eltern bekannt ist, sind für diese Mutation homozygot, ein ungarischer Patient und zwei russische Geschwister sind heterozygote Träger der Mutation εIVS7-2A/G. Bei ihnen wurden auf dem anderen Allel jeweils eine weitere Mutation der AChRε-Untereinheit identifiziert: bei dem ungarischen Patienten in Exon 2 (ε70insG) und bei den russischen Geschwistern in Exon 12 (ε1293insG). Beide Mutationen sind bereits von anderen beschrieben worden (Engel *et al.*, 1996; Brengman *et al.*, 2000; Sieb *et al.*, 2000) und verursachen eine Leserasterverschiebung (frameshift).

1.2.2. Klinisches Bild der Patienten mit der Mutation εIVS7-2A/G

Bei allen Patienten besteht seit Geburt oder früher Kindheit eine milde Form generalisierter und belastungsabhängiger Muskelschwäche mit Ptose und Ophthalmoparese. Außerdem war bei klinischer Untersuchung bei allen Patienten eine Schwäche der Streckermuskulatur von Hals und Handgelenken feststellbar. Diese Schwäche zeigte sich in ausgeprägter Form bei den kroatischen Geschwistern und hier besonders bei dem Jungen. Durch Medikation mit Pyridostigmin verbesserte sich bei allen Patienten die proximale Muskelschwäche, während die Ophthalmoparese unverändert weiter bestand. Elektophysiologisch war bei repetitiver Stimulation in allen Patienten ein Dekrement nachweisbar.

1.2.3. RT-PCR-Analyse der Mutation εIVS7-2A/G

Bei dem kroatischen Jungen konnte durch Analyse von RNA, die aus Muskelgewebe extrahiert wurde, ein fehlerhaft gespleißtes AChRε-Transkript nachgewiesen werden. Nach Synthese von Einzelstrang-cDNA aus Gesamt-RNA mit dem Primer E12a waren bei einer anschließenden PCR mit dem oben erwähnten antisense Primer und zwei spezifischen sense Primern (E7s und E6s) auf einem 2% Ethidiumbromid-haltigem Agarosegel keine Banden zu erkennen. Durch Nested-PCR-Analyse mit den antisense Primern E11a und E9a und dem sense Primer E7s konnten spezifische Fragmente amplifiziert werden. Die RT-PCR-Produkte von drei unabhängigen Experimenten wurden sequenziert und zeigten jeweils ein einzelnes Transkript, bei dem Exon 7 direkt an Exon 9 gespleißt war.

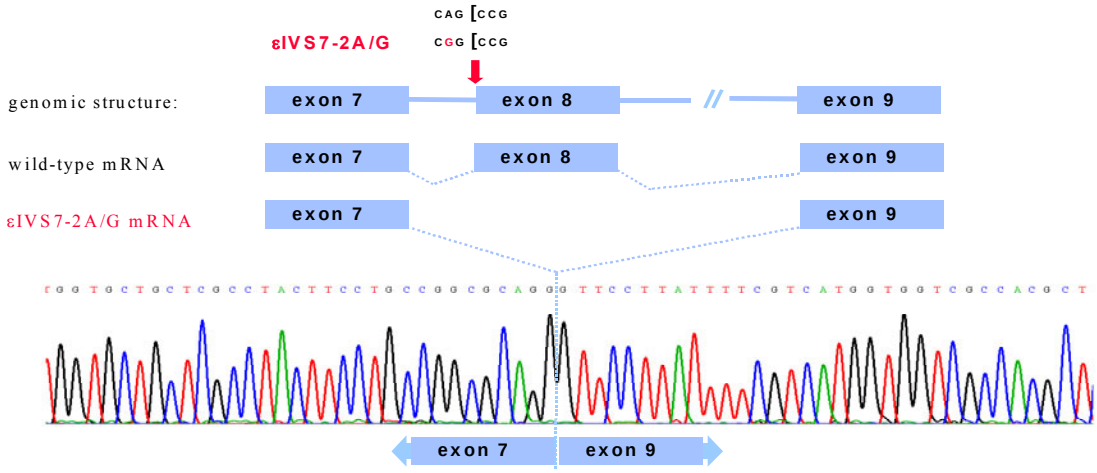

Abb. 7: Sequenz des fehlerhaft gespleißten RT-PCR-Transkriptes, das aus Muskel-RNA des kroatischen Jungen amplifiziert wurde. Exon 7 ist unter Verlust von Exon 8 direkt an Exon 9 gespleißt, daraus resultieren im Anschluß an Codon 247 14 Missense-Codons gefolgt von einem Stopcodon.

1.2.4. Haplotypenanalyse für die Mutation εIVS7-2A/G

Die Haplotypenanalyse mit vier polymorphen Mikrosatellitenmarkern, die den *ACHRε*-Locus auf Chromosom 17p13 flankieren, ergab bei allen εIVS7-2A/G Allelen für die beiden Marker die dem *ACHRε*-Gen am nächsten liegen (*D17S1175* und *D17S1810*; genetische Distanz weniger als 1cM) eine identische Fragmentlänge, während bei den weiter entfernt liegenden Markern deutliche Heterogenität in den Fragmentlängen bestand.

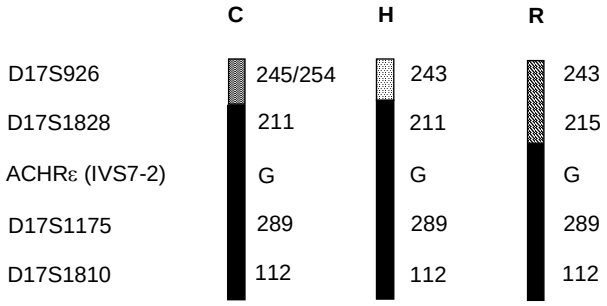

Abb. 8: Haplotypen der drei CMS-Familien mit der Mutation εIVS7-2A/G auf Chromosom 17 für einen Bereich um den *ACHR*-Locus. C bezeichnet das Allel der kroatischen Patienten, H das des ungarischen Patienten und R das der russischen Patienten. Die Fragmentlängen der beiden dem *ACHRε*-Gen am nächsten gelegenen Marker sind in allen drei Allelen identisch.

1.3. Nachweis weiterer Mutationen im *ACHRε*-Gen bei CMS-Patienten

1.3.1. Mutationen εG857T und ε1293insG

1.3.1.1. Mutationsanalyse des *ACHRε*-Gens

Bei zwei Brüdern aus Portugal konnte neben der heterozygoten, bereits mehrfach beschriebenen Frameshift-Mutation ε1293insG ein heterozygoter, bisher nicht beschriebener Nukleotidaustausch nachgewiesen werden: Guanin ist an Position 857 im Exon 8 des *ACHRε*-Gens durch Thymin ersetzt (εG857T). Daraus resultiert ein Aminosäureaustausch von Arginin nach Methionin an Codon 286.
Die nicht-betroffenen Eltern sind jeweils heterozygote Träger von einer Mutation (Vater εG857T, Mutter ε1293insG).

1.3.1.2. Klinisches Bild der Patienten

Bei beiden Brüdern (20 und 8 Jahre) bestehen seit frühester Kindheit myasthene Symptome. Zusätzlich zu generalisierter, belastungsabhängiger Muskelschwäche, Ptose und Ophthalmoparese wird bei dem älteren Bruder von Schluckschwierigkeiten im Säuglingsalter berichtet. Bei beiden konnte nach repetitiver Stimulation ein Dekrement nachgewiesen werden und beide sprechen auf die Behandlung mit Pyridostigmin an.

1.3.2. Mutationen ε1293insG und ε70insG

1.3.2.1. Mutationsanalyse des *ACHRε*-Gens

Bei zwei Schwestern aus Portugal konnten heterozygot die beiden, bereits beschriebenen, Frameshift-Mutation ε1293insG und ε70insG nachgewiesen werden. Die nicht-betroffenen Eltern sind jeweils heterozygote Träger von einer der Mutationen (Vater ε1293insG, Mutter ε70insG).

1.3.2.2. Klinisches Bild der Patienten

Bei beiden Schwestern (16 und 13 Jahre) besteht seit frühester Kindheit eine generalisierte belastungsabhängige Muskelschwäche mit Ptose, die bei der jüngeren Schwester ausgeprägter ist. Bei beiden konnte nach repetitiver Stimulation ein Dekrement nachgewiesen werden und beide sprechen auf die Behandlung mit Pyridostigmin an.

1.4. Phänotyp von Patienten mit der Mutation ε1267delG

Bei 62 CMS-Patienten (30 weiblich und 32 männlich), aus 46 unabhängigen Familien, die homozygote Träger der Mutation ε1267delG sind, wurden Daten zum klinischen Phänotyp ausgewertet. Die Patienten stammen alle aus südosteuropäischen Ländern und/oder fühlten sich der Volksgruppe der Roma zugehörig. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Patienten zwischen 6 Monaten und 47 Jahren alt. Tabelle 2 gibt die Häufigkeit an, mit der klinische Symptome bei CMS-Patienten mit der Mutation ε1267delG auftreten.

Ptose	100	%	62 von 62 Patienten
positiver Effekt von AChE-Hemmern	100	%	62 von 62 Patienten
keine deutliche Verschlechterung mit zunehmendem Alter	100	%	62 von 62 Patienten
EMG: Dekrement*	100	%	49 von 49 Patienten
Alter bei Krankheitsbeginn < 2 Jahre	97	%	60 von 62 Patienten
Ophthalmoparese	97	%	60 von 62 Patienten
faciale und/oder bulbäre Schwäche	93	%	56 von 60 Patienten
generalisierte Schwäche	84	%	52 von 62 Patienten
verzögerte motorische Entwicklung	32	%	16 von 50 Patienten
Gehfähigkeit nicht erhalten (Rollstuhlfahrer)	0	%	0 von 62 Patienten
Auffällige Dysmorphiezeichen	0	%	0 von 58 Patienten

*wenn repetitive Stimulation nach standardisierten Methoden an zwei distalen und zwei proximalen Muskeln und/oder facialen Muskeln durchgeführt wurde

Tab. 2: klinische Symptome bei CMS-Patienten, die homozygote Träger der Mutation ε1267delG sind und die Häufigkeit mit der sie bei dem untersuchten Patientenkollektiv gefunden wurden.

1.5. Haplotypenanalyse von Patienten mit der Mutation ε1267delG

Zur Analyse der Haplotypen wurden dankenswerterweise DNA-Proben von weiteren CMS-Patienten mit der Mutation ε1267delG durch Herrn Prof. Dr. A. Engel, Department of Neurology and Neuromuscular Diseases, Mayo Klinik, Rochester, und Herrn Dr. D. Beeson, Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford zur Verfügung gestellt.

Die Haplotypenanalyse von 57 unabhängigen CMS-Patienten (24 männlich und 33 weiblich), die homozygote Träger der Mutation ε1267delG sind, erfolgte mit drei polymorphen Mikrosatellitenmarkern (*D17S1175*, *D17S1810* und *D17S1828*), die den *ACHRε*-Locus in einem Bereich von ca. 2,1cM umfassen und mit einem SNP (ε1233C/T) in Exon 11 des *ACHRε*-Gens. 40 der 57 Patienten (70%) gaben an, der Volksgruppe der Roma anzugehören. Um die verschiedenen Markerwerte einzelnen Allelen zuzuordnen, wurden auch Markerwerte von Angehörigen der Patienten, soweit DNA erhältlich war, bestimmt. Dadurch konnten bei allen Patienten die Haplotypen mit den Markern *D17S1175* und *D17S1810* ermittelt werden. Die Zuordnung des dritten Markers *D17S1828* gelang bei sechs Allelen (drei Patienten) nicht.
Insgesamt wurden für die 114 untersuchten Allele 15 verschiedene Haplotypen ermittelt.

1.5.1. Herkunft der Patienten mit der Mutation ε1267delG

Die Patienten mit der Mutation ε1267delG, bei denen eine Haplotypenanalyse durchgeführt wurde, stammen aus 11 verschiedenen Ländern bzw. Regionen. Angaben über die Herkunft ihrer Vorfahren wurden nicht berücksichtigt, so daß beide Allele eines Patienten immer dem direkten Herkunftsland des Patienten zugeordnet wurden.
Die Tabellen 3a und 3b geben Auskunft über die Zusammensetzung des untersuchten Patientenkollektives:
In Tabelle 3a wird die Anzahl der Patienten und die daraus resultierende Anzahl der Allele aus einem bestimmten Land, bzw. aus einer bestimmten Region angegeben. Außerdem wird angegeben, welchen Anteil die Patienten, bzw. Allele aus einem bestimmten Land/einer bestimmten Region an der Gesamtzahl der untersuchten Patienten, bzw. Allele haben.
Tabelle 3b gibt die Anzahl der haploidentischen Patienten aus einem bestimmten Land/einer bestimmten Region an. Weiterhin wird angegeben, welchen Anteil die haploidentischen Patienten jeweils an der Zahl aller Patienten aus dem gleichen Herkunftsland/der gleichen Herkunftsregion haben.

Tab. 3a: Herkunft der haplotypisierten Patienten mit der homozygoten Mutation ε1267delG: Anzahl der Patienten und ihr Anteil an der Gesamtzahl aller untersuchten Patienten.

Herkunft	Anzahl der Patienten (Anzahl der Allele)	Anteil der Patienten bzw. Allele an der Gesamtzahl der untersuchten Patienten bzw. Allele (Patienten / Gesamtzahl der Patienten)
Ägypten	1 (2)	2 % (1 / 57)
Böhmen	1 (2)	2 % (1 / 57)
Bulgarien	18 (36)	32 % (18 /57)
Griechenland	1 (2)	2 % (1 / 57)
Indien (West)	2 (4)	4 % (2 / 57)
Indien (Süd)	2 (4)	4 % (2 / 57)
Jugoslawien	9 (18)	16 % (9 / 57)
Pakistan	3 (6)	5 % (3 / 57)
Rumänien	1 (2)	2 % (1 / 57)
Türkei	1 (2)	2 % (1 / 57)
Ungarn	18 (36)	32 % (18 / 57)
gesamt	57 (114)	100% (57 / 57)

Tab. 3b: Herkunft der haplotypisierten Patienten mit der homozygoten Mutation ε1267delG: Anzahl haploidentischer Patienten aus dem jeweiligen Herkunftsland/der jeweiligen Herkunftsregion und ihr Anteil an der Anzahl aller Patienten mit der gleichen Herkunft.

Herkunft	Anzahl der haploidentischen Patienten	Anteil haploidentischer Patienten aus dem jeweiligen Herkunftsland/der jeweiligen Herkunftsregion (haploidentische Patienten / Anzahl der Patienten mit der gleicher Herkunft)
Ägypten	1	100 % (1 / 1)
Böhmen	1	100 % (1 / 1)
Bulgarien	11	61 % (11 / 18)
Griechenland	1	100 % (1 / 1)
Indien (West)	2	100 % (2 / 2)
Indien (Süd)	2	100 % (2 / 2)
Jugoslawien	4	44 % (4 / 9)
Pakistan	1	33% (1 / 3)
Rumänien	1	100 % (1 / 1)
Türkei	1	100 % (1 / 1)
Ungarn	9	50 % (9 / 18)
gesamt	34	60% (34 / 57)

Die Patienten aus Bulgarien und Ungarn stellen, mit jeweils fast einem Drittel aller Patienten, die beiden größten Patientengruppen dar. 16% der Patienten stammen aus dem Gebiet des ehemaligen Jugoslawiens (einschließlich Kosovo und Mazedonien). Aus Indien und Pakistan konnte DNA von insgesamt sechs Patienten untersucht werden, welches einem Anteil von 11% entspricht. Zwei der indischen Patienten stammen aus der südindischen Provinz Andhra Pradesh, zwei stammen aus Gegenden im Westen von Indien, ein Patient davon aus der Provinz Gujarat und eine Patientin aus Bombay. Bei den restlichen Patienten kommt jeder einzelne Patient jeweils aus einem anderen Land bzw. einer anderen Region.
Bei den Patienten aus Pakistan ist der Anteil der Patienten mit haploidentischen Allelen am kleinsten (33%), gefolgt von Jugoslawien (44%), Ungarn (50%) und Bulgarien (61%). Bei den übrigen Patienten waren alle Marker auf beiden Allelen identisch.

1.5.2. Haplotypen der Patienten mit der Mutation ε1267delG

Bei Berücksichtigung des zu der mutierten Stelle nur etwa 100bp stromaufwärts auf dem *ACHRε*-Gen gelegenen SNP (ε1233C/T, Exon11) und des dem *ACHRε*-Gen am nächsten gelegenen Markers *D17S1175* (Entfernung zum *ACHRε*-Gen kleiner als 5kb) können zwei Haupthaplotypen unterschieden werden (Abbildung 9). Dabei tritt der eine Haplotyp (Haupthaplotyp II) nur ein einziges Mal homozygot bei einer indischen Patientin aus Bombay auf, während alle anderen Patienten (n=56) dem anderen Haupthaplotypen (Haupthaplotyp I) zugeordnet werden können. Bei dem Haupthaplotypen I ist an Nukleotidposition 1233 im *ACHRε*-Gen Cytosin durch Thymin ersetzt (ε1233C/T). Der Polymorphismus hat keinen Aminosäureaustausch zur Folge. Alle südosteuropäischen Patienten/Roma können diesem "Roma-Founder"-Haplotypen zugeordnet werden. Die Patientin aus Bombay hingegen ist homozygot für einen anderen Polymorphismus im Intron 11 des *ACHRε*-Gens (IVS11+20del20). Für den Marker *D17S1175* zeigen ebenfalls alle Patienten, außer der Patientin aus Bombay, den gleichen Wert (280). Bei der Patientin aus Bombay beträgt der ermittelte Wert bei diesem Marker 286.
Bei weiterer Differenzierung des Haupthaplotypen I ergeben sich für den Marker *D17S1810* (genetische Entfernung zum *ACHRε*-Gen 0,5cM) bereits fünf verschiedene Fragmentlängen (Haplotypen IA- IE), wobei der Wert 116, mit einem Anteil von 91%, deutlich dominiert. Unter Einbeziehung des dritten Markers D17S1828 (genetische Entfernung zum *ACHRε*-Gen 1,6cM) existieren bei diesem Haplotyp (ID) 10 verschiedenen Untergruppen (ID1- ID10). (Anhang: Tabellen A1-A3).

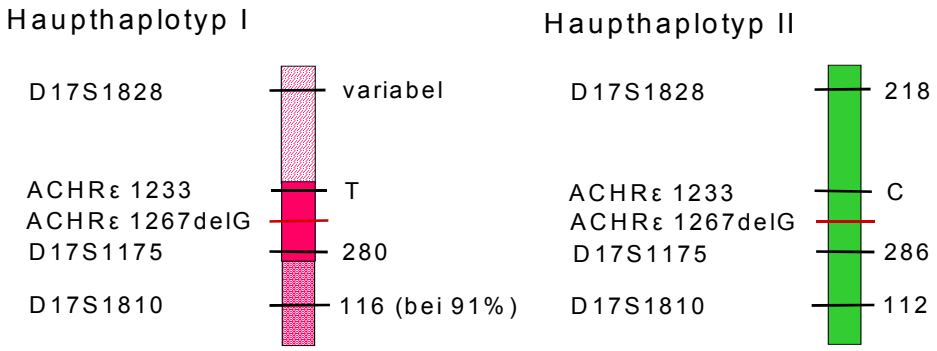

Abb. 9: Haupthaplotypen des *ACHRε*-Locus bei Patienten mit der Mutation ε1267delG

1.5.3. Korrelation zwischen Haplotypen und Herkunft der Patienten mit der Mutation ε1267delG

Beim Vergleich der ermittelten Haplotypen zwischen Patienten unterschiedlicher Herkunft (Tabelle 4), ist die unterschiedlich große Anzahl der Patienten aus den verschiedenen Ländern bzw. Regionen zu berücksichtigen. In den beiden größten Patientenkollektiven Bulgarien und Ungarn können jeweils acht Haplotypenuntergruppen unterschieden werden, es dominieren jedoch verschiedene Haplotypenuntergruppen (Bulgarien: ID6, 42%; Ungarn: ID4, 39%). Auch bei Patienten aus dem Gebiet des ehemaligen Jugoslawiens findet sich mit vier verschiedenen Haplotypen eine relativ heterogene Haplotypenverteilung. Bei zusammengefaßter Betrachtung aller Allele von Patienten aus Indien und Pakistan ergeben sich acht verschiedene Haplotypen.
Bei den übrigen Patienten, bei denen nur bei einem Patienten pro Herkunftsland bzw. Herkunftsregion Haplotypen erstellt werden konnten, wurde trugen alle Patienten jeweils auf beiden Allelen den gleichen Haplotyp.

Tab. 4: Anteil der Haplotypen bei Allelen gleicher Herkunft

Herkunft	Haplotyp	Anteil bei Allelen gleicher Herkunft (Anzahl der Allele mit dem Haplotyp x / Anzahl aller Allele aus dem gleichen Herkunftsland/der gleichen Herkunftsregion)	
Ägypten	I D3	100 %	(2 /2)
Böhmen	I D4	100 %	(2 / 2)
Bulgarien	I B	3 %	(1 / 36)
	I C	3 %	(1 / 36)
	I D 1	3 %	(1 / 36)
	I D 3	8 %	(3 / 36)
	I D4	11 %	(4 / 36)
	I D6	42 %	(15 / 36)
	I D9	3 %	(1 / 36)
	I D10	16 %	(7 / 36)
	I E	3 %	(1 / 36)
	nicht zuordenbar	6 %	(2 / 36)
Griechenland	I D6	100 %	(2 / 2)
Indien (West)	II	50 %	(2 / 4)
	I D7	50 %	(2 / 4)
Indien (Süd)	I D4	50 %	(2 / 4)
	I D6	50 %	(2 / 4)
Jugoslawien	I D3	28 %	(5 / 18)
	I D4	39 %	(7 / 18)
	I D5	6 %	(1 / 18)
	I D6	28 %	(5 / 18)
Pakistan	I D2	17 %	(1 / 6)
	I D5	17 %	(1 / 6)
	I D6	50 %	(3 / 6)
	I D9	17 %	(1 / 6)
Rumänien	I D7	100 %	(2 / 2)
Türkei	I D6	100 %	(2 / 2)
Ungarn	I A	11 %	(4 / 36)
	I D3	25 %	(9 / 36)
	I D4	39 %	(14 / 36)
	I D5	6 %	(2 / 36)
	I D6	8 %	(3 / 36)
	I D7	3 %	(1 / 36)
	I D8	6 %	(2 / 36)
	I E	3 %	(1 / 36)

2. Nachweis einer neuen Mutationen im *CHAT*-Gen (CHAT I336T)

Insgesamt wurden bei 11 Patienten mittels PCR und direkter Sequenzierung die kodierenden Bereiche des *CHAT*-Gens (18 Exons und flankierende intronische Regionen) untersucht. Bei einer vorausgegangenen Mutationsanalyse des *ACHRε*-Gens (12 Exons, flankierende intronischen Regionen, sowie Promotorregion) war bei keinem dieser Patienten eine Mutation nachgewiesen worden.
Bei drei CMS-Patienten aus zwei unabhängigen Familien türkischen Ursprungs wurde eine neue Mutation im Exon 10 des *CHAT*-Gens (I336T) homozygot nachgewiesen.

2.1. Familienanamnese und klinisches Bild bei Patienten mit der Mutation CHAT I336T

In Familie 1, die aus einer Stadt in der Nähe von Istanbul stammt, sind beide Kinder, ein 13 Jahre alter Junge (II:1) und ein 11 Jahre altes Mädchen (II:2) an CMS erkrankt. Bei Familie 2 handelt es sich um Kurden aus dem Osten der Türkei. Eine 6jährige Tochter (II:4) ist betroffen, die übrigen vier Geschwister sind es nicht. In beiden Familien ist Konsanguinität der Eltern bekannt.
Klinisch zeigen alle drei Patienten das Bild einer CMS-EA. Zusätzlich zu einer moderaten myasthenen Symptomatik, einschließlich Ptose und ermüdbarer Muskelschwäche wird bei allen Patienten von wiederholten respiratorischen Krisen mit plötzlichen Apnoen, meist im Rahmen von fieberhaften Infekten, berichtet. Bei dem männlichen Patienten aus Familie 1 (II:1), der zusätzlich an einem metastasierenden Leberzellkarzinom, wahrscheinlich infolge einer perinatalen Hepatitis B Infektion, erkrankt ist, sind die myasthenen Symptome ausgeprägter und er bedarf permanenter Beatmung.

2.2. Kopplungsanalyse für den *CHAT*-Locus in den zwei CMS-EA Familien

Die Analyse der Haplotypen in beiden Familien mit sechs polymorphen Mikrosatellitenmarkern, die den *CHAT*-Locus auf Chromosom 10q11 flankieren, ergab:

1. In Familie 1 teilen die beiden erkrankten Kinder den gleichen Haplotypen und sind homozygot für das vermutete krankheitsverursachende Allel.
2. In Familie 2 ist nur die erkrankte Tochter (II:4) homozygote Trägerin des vermuteten Krankheitsallels, während die anderen Geschwister dieses nicht (II:2) oder heterozygot (II:1, II:3, II:5) tragen.
3. Die vermuteten Mutationsallele der beiden Familien zeigen für 4 von 6 Markern identische Fragmentlängen.

Der Zwei-Punkt LOD-score für den Marker D10S1793 beträgt für beide Familien zusammen 2,46 (Familie 1: 1,29, Familie 2: 1,17). Das deutet daraufhin, daß CMS-EA in diesen beiden Familien mit dem *CHAT*-Locus gekoppelt ist.

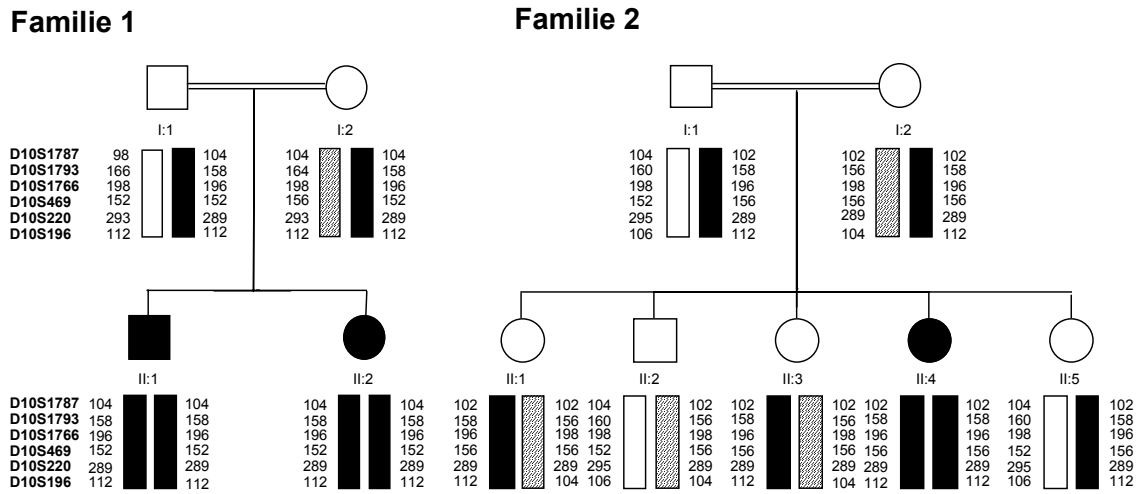

Abb. 10: Genotypenanalyse der beiden CMS-EA Familien mit sechs polymorphen Mikrosatellitenmarkern, die den *CHAT*-Locus flankieren. Die schwarz gezeichneten Allele haben bei vier der sechs Marker in den beiden Familien identische Fragmentlängen. Außerdem cosegregieren die schwarzen Allele in einem rezessiven Erbgang mit der Krankheit: die Patienten sind jeweils homozygote Träger dieser Allele, die konsanguinen Eltern und die nicht-betroffenen Geschwister in Familie 2 tragen diese Allele heterozygot oder gar nicht.

2.3. Mutationsanalyse des *CHAT*-Gens

In der kodierenden Sequenz des *CHAT*-Gens war bei allen drei Patienten Thymin an Position 1007 in Exon 10 durch Cytosin ersetzt (T1007C). Diese Punktmutation führt zu einem Austausch von Isoleucin zu Threonin an Codon 336 (CHAT I336T). In den anderen 17 Exons des *CHAT*-Gens konnten keine weiteren Mutationen gefunden werden. Im untranslatierten Exon 2 des *CHAT*-Gens waren allen drei Patienten homozygot für einen bereits beschriebenen Polymorphismus (AF305894: Position 118). Die Analyse der Angehörigen hinsichtlich der beobachteten Mutation (CHAT I336T) mittels PCR und Restriktionsverdau ergab, daß die nicht-betroffenen Familienmitglieder diese Mutation entweder heterozygot tragen, oder daß sie nicht Träger der Mutation sind.

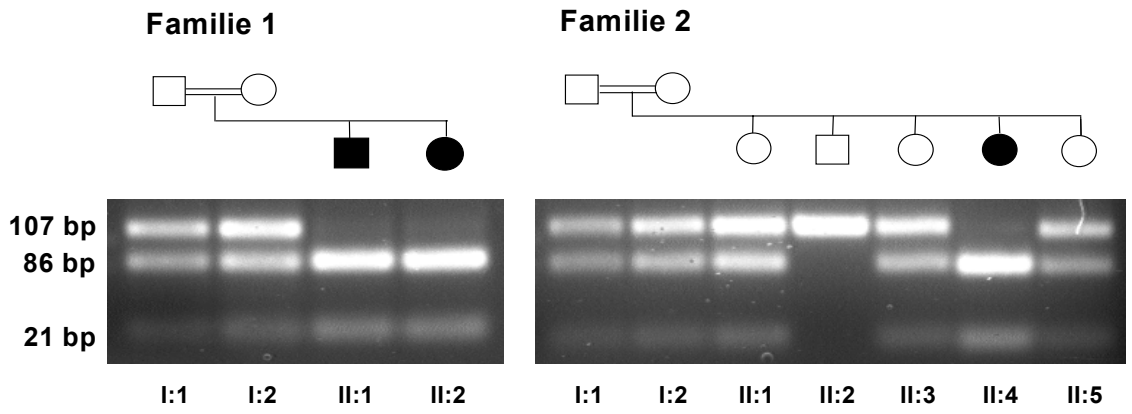

Abb. 11: Restriktionsverdau für die Mutation CHAT I336T in zwei türkischen CMS-EA Familien auf einem 4% Agarosegel. Die PCR mit den Primern C10mms und C10mmas ergibt ein 107bp langes Fragment, in das die Mutation I336T eine BbvII Schnittsielle einführt. Das Wildtypallel bleibt unverdaut, während das mutierte Allel zwei Fragmente ergibt (86bp und 21bp). Die Patienten in Familie 1 (II:1 und II:2) und Familie 2 (II:4) sind homozygot für CHAT I336T, die nicht betroffenen Familienmitglieder tragen die Mutation entweder heterozygot (Eltern I:1 und I:2 in Familie 1 und 2, sowie Geschwister II:1, II:3 und II:5 in Familie 2) oder überhaupt nicht (II:2 in Familie 2).

2.4. Überprüfung der Mutation CHAT I336T in DNA von Normallkontrollen

Bei Überprüfung der DNA von 130 Normallkontrollen, einschließlich 50 Normallkontrollen von Personen türkischer Herkunft, mittels PCR und Restriktionsverdau konnte die Mutation CHAT I336T nicht nachgewiesen werden.

2.5. Sequenzanalyse des *VACHT*-Gens

Bei Analyse der auf dem gleichen Locus gelegenen kodierenden Sequenz des *VACHT*-Gens mittels PCR und anschließender Sequenzanalyse konnte bei den Patienten keine Mutation nachgewiesen werden.

2.6. Sequenzvergleich

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von menschlichem ChAT mit dem anderer Spezies, bzw. mit menschlichen Enzymen ähnlicher Funktion zeigt, daß Isoleucin an der Position 336 im menschlichen ChAT hoch konserviert ist. Andere Säugetiere und andere Enzyme mit ähnlicher Funktion besitzen an korrespondierender Stelle ebenfalls Isoleucin.

Abb. 12: Vergleich der Aminosäuresequenz von menschlichem ChAT mit dem anderer Spezies (A), bzw. mit menschlichen Enzymen mit ähnlicher Funktion (B). Isoleucin an Position 336, das bei den beschriebenen CMS-EA Patienten durch Threonin ersetzt ist, ist hoch konserviert.

3. Mutationssuche in Bereichen des *ACHE*-Gens

Für die AChE sind mehrere Isoformen beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstehen (Taylor *et al.*, 1994). Hauptform im Gehirn und im Muskelgewebe ist das AChE-S-Transkript ("synaptische" Form), das durch Spleißen von Exon 4 an Exon 6 entsteht. Zur synapsen- und gewebsspezifischen Steuerung der AChE Expression im Skelettmuskel ist ein intronischer Enhancer, der eine N-Box enthält, notwendig (Chan *et al.*, 1999).

3.1. Mutationssuche im Bereich der N-Box des *ACHE*-Gens

Mittels PCR und nachfolgender Sequenzierung des Bereiches einer konservierten N-Box im Intron 1 des *ACHE*-Gens konnte bei 26 Patienten mit der klinischen Diagnose CMS keine Mutation nachgewiesen werden.

3.2. Mutationssuche im Exon 6 des *ACHE*-Gens

Mittels PCR und nachfolgender Sequenzierung von Exon 6 und flankierenen intronischen Bereichen des *ACHE*-Gens konnte bei 28 Patienten mit der klinischen Diagnose CMS keine Mutation nachgewiesen werden.

4. Mutationssuche im *VACHT*-Gen

Das *VACHT*-Gen hat eine Länge von ca. 2500bp. Es besteht aus nur einem Exon, das sich im ersten Intron des *CHAT*-Gens befindet.
Mittels PCR und nachfolgender Sequenzierung der kodierenden Sequenz des *VACHT*-Gens und der flankierenden Bereiche konnte bei 12 Patienten mit der klinischen Diagnose CMS keine Mutation nachgewiesen werden.

E Diskussion

1. Mutationen im *ACHRε*-Gen

Mutationen der AChRε-Untereinheit scheinen für einen Großteil aller autosomal rezessiv vererbten und sporadischen CMS verantwortlich zu sein, die über eine verminderte Expression des adulten AChR‘s zum morphologischen Bild eines AChR-Mangels führen (Milone *et al.*, 1998; Abicht *et al.*, 1999; Abicht *et al.*, 2000; Engel, 2001). Möglicherweise kann durch kompensatorische Hochregulation der fetalen γ-Untereinheit die Funktion der ε-Untereinheit teilweise ersetzt werden, so daß der Krankheitsverlauf gemildert wird (Croxen *et al.*, 2001).
In der vorliegenden Arbeit konnten neben bereits beschriebenen Mutationen, auch neue Mutationen im *ACHRε*-Gen bei CMS-Patienten nachgewiesen und weiter charakterisiert werden.

1.1. Mikrodeletion εΔ1290bp

Erstmals konnte eine chromosomale Deletion des *ACHRε*-Gens nachgewiesen werden (εΔ1290bp), die zusammen mit einer N-Box Mutation auf dem anderen Allel (ε-154G/A) zu dem Krankheitsbild CMS führt. Dabei überdeckt die Deletion das hemizygote Auftreten der N-Box Mutation.
Die hemizygote N-Box Mutation (ε-154G/A) führt, belegt durch *in vivo* Expressionsstudien mit AChRε-Promotorkonstrukten (Abicht *et al.*, 2002), zu einer verminderten AChR-Expression. Übereinstimmend wurde dies auch für eine andere N-Box Mutation (ε-156C/T) beschrieben (Nichols *et al.*, 1999).
Die Deletion umfaßt die gesamte Promotorregion, Exon 1 und große Teile von Exon 2 des *ACHRε*-Gens. Sie könnte durch eine nicht homologe Rekombination von elterlichen Allelen entstanden sein (Roth und Wilson, 1988).
Mit Hilfe der meisten Untersuchungen, die die zugrundeliegenden genetischen Defekte von CMS aufklären wollen und dabei insbesondere die kodierenden Regionen des AChR‘s und anderer CMS-Kanidatengene überprüfen, können Mutationen einzelner Basen relativ einfach aufgedeckt werden. Es besteht aber die Gefahr, daß chromosomale Deletionen oder Umordnungen bei den konventionellen PCR-Analysen übersehen werden.
Die Häufigkeit, mit der chromosomale Deletionen auf den Genen der AChR-Untereinheiten auftreten, ist nicht bekannt. Im Dystrophin-Gen werden chromosomale

Deletionen für bis zu 60% aller Duchenne Muskeldystrophie-Fälle verantwortlich gemacht (Oudet *et al.*, 1992; Mendell *et al.*, 2001). Da das *ACHRε*-Gen aber relativ klein ist und über keine Repeat-Sequenzen, die zu Rekombinationsereignissen neigen, verfügt, könnte man spekulieren, daß große Deletionen im Vergleich zum Dystrophin-Gen seltener auftreten.

1.2. Spleißmutation εIVS7-2A/G

Für eine Mutation an der Spleißakzeptorstelle von Intron 7 des *ACHRε*-Gens (IVS7-2A/G) konnten die funktionellen Konsequenzen auf Ebene der Transkription, aufgeklärt werden. Außerdem scheinen die betroffenen Allele von einem gemeinsamen Founder-Allel zu stammen. In einem Abstrakt wurde bereits von einem Patient, der heterozygot für die Mutation εIVS7-2A/G ist, berichtet (Brengman *et al.*, 2000).
Die Mutation εIVS7-2AG wurde in der vorliegenden Arbeit in drei unabhängigen Familien beschrieben: einmal homozygot bei 2 kroatischen Geschwistern und zweimal heterozygot bei einem ungarischen Patienten und bei zwei russischen Geschwistern, zusammen mit den Frameshift-Mutationen (ε70insG und ε1293insG). Beide Frameshift-Mutationen sind bereits mehrfach beschrieben und resultieren wahrscheinlich in einem vorzeitigen Kettenabbruch (Engel *et al.*, 1996; Brengman *et al.*, 2000; Sieb *et al.*, 2000). Der Krankheitsverlauf ist bei allen Patienten relativ mild und vergleichbar mit dem von Patienten mit anderen bereits beschriebenen *ACHRε*-Mutationen, die zu verminderter Expression des Rezeptors führen (Engel *et al.*,1996; Ohno *et al.*, 1998a; Abicht *et al.*, 1999; Abicht *et al.*, 2000; Engel, 2001). Die bei den kroatischen Geschwistern deutlicher hervortretende selektive Schwäche der Hals-, Hand- und Fingerstreckmuskulatur besteht für gewöhnlich nicht bei CMS mit AChR-Mangel, sondern wird häufiger bei älteren Patienten mit SCCMS oder Endplatten AChE-Mangel gefunden (Engel, 2001). Im Gegensatz dazu sprechen der autosomal rezessive Erbgang, die Abwesenheit eines repetitiven CMAP‘s, die gute Ansprechbarkeit auf AChE-Hemmer und der relativ milde Krankheitsverlauf gegen die Diagnose eines SCCMS (Engel, 2001). Ursächlich für einen AChR-Mangel-untypischen Phänotyp der kroatischen Patienten könnten möglicherweise zusätzliche genetische Kofaktoren sein, wie z.B. modifizierende Gene.

Folgendes spricht für die Pathogenität der Mutation εIVS7-2A7G:

1. Die Mutation εIVS7-2AG betrifft das hochkonservierte vorletzte Nukleotid am 3' Ende von Intron 7 und zerstört dadurch die Spleißakzeptor-Konsensussequenz, die der GT-AG Regel folgt (Burset *et al.,* 2000; Burset *et al.,* 2001).
2. Die Mutation wurde in drei unabhängigen CMS-Familien nachgewiesen.
3. Die Mutation wurde sowohl homozygot in einer konsanguinen Familie, als auch heterozygot mit bereits beschriebenen Mutationen auf dem anderen Allel gefunden.
4. Die Mutation cosegregiert in allen Stammbäumen mit dem klinischen Phänotyp.
5. Die Mutation führt zu einem fehlerhaft gespleißten Transkript:
   Die RT-RCR Analyse aus Muskel-RNA des kroatischen Jungen zeigt den Verlust von Exon 8 in der reifen m-RNA. Auf Translationsebene resultieren daraus 14 Missense-Codons im Anschluß an Codon 247, gefolgt von einem Stopcodon. Dies könnte, wie bereits für eine andere Spleißmutation im *ACHRε*-Gen (εIVS9+1G/T) gezeigt wurde (Croxen *et al.*, 2001), eine stark reduzierte Expression der AChRε-Untereinheiten an der Synapse zur Folge haben.

Die Haplotypenanalyse deutet darauf hin, daß die untersuchten Allele mit der Mutation εIVS7-2A/G von einem gemeinsamen Founder-Allel abstammen. Um diese Annahme zu bestätigen, müßte eine größere Anzahl unabhängiger Allele zur Verfügung stehen.

1.3. Mutation εG857T

Bei zwei Brüdern aus Portugal, konnte heterozygot der bisher noch nicht beschriebene Nukleotidaustausch εG857T an der letzten Base von Exon 8 des *ACHRε*-Gens nachgewiesen werden. Als zweite heterozygote Mutation wurde die bereits erwähnte Frameshift-Mutation ε1293insG identifiziert. Die Eltern sind jeweils heterozygote Träger von einer der beiden Mutationen.
Aus dem Nukleotidaustausch resultiert voraussichtlich ein Aminosäureaustausch von Arginin nach Methionin an Codon 286, aufgrund der Nähe der Mutation zur Spleißdonorstelle, ist aber auch ein Einfluß auf den Spleißprozeß denkbar (Engel *et al.*, 1998). Der Krankheitsverlauf beider Brüder ist relativ mild und vergleichbar dem von Patienten mit anderen bereits beschriebenen AChRε-Mutationen, die zu verminderter Expression des Rezeptors führen (Engel, 1994; Engel, 2001).

1.4. Mutation ε1267delG

Die Mutation ε1267delG tritt gehäuft bei CMS-Patienten auf, die aus Südosteuropa stammen und/oder der Volksgruppe der Roma angehören (Abicht *et al.*, 1999, Abicht *et al.*, 2000). Die Deletion ε1267delG befindet sich im Exon 12, an der Grenze zum Intron 11 des *ACHRε*-Gens und bewirkt eine Leserasterverschiebung: nach Codon 422 entstehen 63 Missense-Codons, gefolgt von einem Stopcodon. Dadurch wird die cytoplasmatische Schleife und die vierte Transmembrandomäne der AChRε-Untereinheit zerstört. Die Mutation ε1267delG könnte aufgrund ihrer Nähe zur Spleißakzeptorstelle aber auch zu abweichenden Spleißprodukten führen (Croxen *et al.*, 1999). Als Konsequenzen der Mutation ε1267delG ergaben sich in Expressionstudien Hinweise auf einen fehlenden Einbau der mutierten ε-Rezeptoruntereinheit in den AChR und eine verminderte Expression von adulten Rezeptoren an der Endplatte (Croxen *et al.*, 1999). Kompensatorisch wird eine Hochregulation der fetalen γ-Untereinheit diskutiert (Croxen *et al.*, 2001).

1.4.1. Phänotyp bei Patienten mit der Mutation ε1267delG

Die Auswertung klinischer Daten von 62 CMS-Patienten, die homozygote Träger der Mutation ε1267delG sind, ergab, daß der Phänotyp dieser Patienten dem von Patienten mit anderen Mutationen der ε-Untereinheit (Frameshift- oder Missense-Mutationen mit verminderter Rezeptorexpression) sehr ähnlich ist. Die myasthene Symptomatik trat bei den untersuchten ε1267delG Patienten meist schon im frühen Kleinkindalter auf. Neben bilateraler Ptose sind bulbäre und generalisierte, bei Ermüdung auftretende Schwäche der Arm und Beinmuskulatur, kennzeichnend. Die Mehrheit der ε1267delG Patienten (95%) haben zusätzlich eine Ophthalmoparese, bei anderen CMS-Patienten wird dagegen eine Beteiligung der Oculomotorik bei nur etwa 50% der Patienten beschrieben (Abicht *et al.*, 1999).
Alle ε1267delG Patienten, die mit AChE-Hemmern behandelt wurden, sprachen gut auf die Medikation an. Insgesamt zeigten die meisten ε1267delG Patienten einen relativ milden Krankheitsverlauf, die Ausprägung des Krankheitsbilds variierte jedoch bei den einzelnen Patienten deutlich. Sie reicht von bloßer Ptose mit Beteiligung der Extraocularmuskulatur bis hin zu einer ausgeprägten generalisierten Schwäche. Bei 30% der Patienten wurde eine verzögerte motorische Entwicklung beobachtet, bei keinem der erwachsenen Patienten jedoch von einem Verlust der Gehfähigkeit berichtet.

1.4.2. Haplotypen bei Patienten mit der Mutation ε 1267delG

Für die Mutation ε1267delG wurde bereits ein Founder-Effekt in der Romapopulation vermutet (Abicht *et al.*, 1999). Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv bestätigen diese Beobachtung. Insgesamt wurden die Haplotypen von 57 unabhängigen CMS-Patienten, die homozygote Träger der Mutation ε1267delG sind, analysiert. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Patienten aus Südosteuropa. 70% der Patienten gaben an, der Volksgruppe der Roma anzugehören. Es konnten aber auch Patienten aus Indien und Pakistan in die Untersuchungen einbezogen werden.
Insgesamt konnten 15 verschiedene Haplotypen unterschieden werden. Mit Ausnahme einer Patientin aus Bombay haben alle anderen Patienten einen zusätzlichen SNP im Exon 11 des *ACHRε*-Gen (ε1233C/T) und für den der Mutation am nächst liegenden Marker *D17S1175* (Entfernung kleiner als 5kb) die gleiche Fragmentlänge. Bei einem weiteren Marker (*D17S1810*, genetische Entfernung 0,5cM) konnte bei 91% der Patienten die gleiche Fragmentlänge nachgewiesen werden. Dadurch konnte ein "Kernhaplotyp" für die ε1267delG-Allele der Roma definiert werden.

Daraus ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

1. Wahrscheinlich haben mindestens zwei Deletionsereignissen stattgefunden, die zu der Mutation ε1267delG führten.
2. Das gemeinsame Auftreten eines Haupthaplotypen (Haupthaplotyp I), sowohl bei den europäischen, als auch bei nahezu allen indischen und pakistanischen Patienten, untermauert sprachwissenschaftliche Theorien über die Herkunft der Roma vom indischen Subkontinent. Es ist von einem gemeinsamen Founder-Allel auszugehen, das sowohl bei indisch/pakistanischen Patienten als auch bei Roma auftritt. Es ist anzunehmen, daß die Mutation ε1267delG auf diesem Allel bereits vor der Formierung der Roma-Vorfahrenpopulation entstanden ist (Morar, persönliche Mitteilung).

   Insgesamt konnten bei den indischen und pakistanischen Patienten sieben verschiedene Variationen des Haupthaplotypen I nachgewiesen werden. Während alle untersuchten indischen Patienten für die drei Marker haploidentisch waren, zeigten von den pakistanischen Patienten nur 25% auf beiden Alleln gleiche Fragmentlängen für die drei untersuchten Markern. Um das Alter dieses Founder-Allels zu bestimmen und um abzuschätzen, wie verbreitet dieses Allel in der Roma-Vorfahrenpopulation war, sollen weitere Marker am *ACHRε*-Locus untersucht werden. Möglicherweise könnte durch Analyse einer größeren Anzahl von ε1267delG Allelen indischen und pakistanischen Ursprungs die genaue

Herkunft und die Zusammensetzung der Roma-Vorfahrenpopulation weiter aufgeklärt werden.

3. Bei einem Teil der Patienten deutet das haploidentische Auftreten der Marker auf eine engere Verwandtschaft beider Alle hin. Konsanguinität der Eltern wird dabei nicht von allen Patienten berichtet. Das haploidentische Auftreten könnte mit der tradierten Gesellschaftsstruktur der Roma zusammenhängen, durch die Heiraten innerhalb einer Gruppe bevorzugt werden.
4. Bei Roma aus verschiedenen Herkunftsländern dominieren z.T. verschiedene Haplotypen. Um jedoch Rückschlüsse auf des Auftreten der Mutation in bestimmten Gruppen der Roma zu ziehen, müßten weiterführende Untersuchungen zur genauen Gruppenzugehörigkeit einzelner Patienten erfolgen.

CMS tritt im Vergleich zu anderen Erbkrankheiten bei den Roma insgesamt relativ häufig auf (Kalaydjieva *et al.*, 2001a; Kalaydjieva *et al.*, 2001b). Dies könnte zum einen an dem relativ moderaten Krankheitsbild liegen, bei dem auch pseudodominante Erbgänge beschrieben sind (Herczegfalvi *et al.*, 2000), zum anderen scheint die Mutation schon in der Vorfahrenpopulation in Indien/Pakistan vorhanden gewesen zu sein. Über einen sogenannten "Flaschenhals-Effekt" (bottel neck effect) könnte dann die Verbreitung in der Romapopulation erfolgt sein.
Aufgrund des relativ hohen Anteils der Mutation ε1267delG bei südosteuropäischern Patienten, bzw. Patienten die sich den Roma zugehörig fühlen, könnte eine gezielte Mutationssuche die Diagnostik bei diesen Patienten erleichtern. Außerdem ist von einer erhöhten Carrier-Frequenz für die Mutation ε1267delG in dieser Bevölkerungsgruppe auszugehen. Erste Tests ergaben unterschiedliche Carrier-Frequenzen für die Mutation ε1267delG innerhalb verschiedener Romagruppen. Im Durchschnitt liegt sie bei 4%, in einzelnen Gruppen kann sie jedoch bis zu 8% betragen (Kalaydjieva, persönliche Mitteilung). Ein Neugeborenen-Screening bei diesen Risikogruppen würde durch frühzeitige Diagnosestellung und Einleitung entsprechender Therapie- und Präventionsmaßnahmen Komplikationen, die bei CMS auftreten, verhindern.

2. Mutation I336T im *CHAT*-Gen

Präsynaptisch bedingtes CMS tritt extrem selten auf und stellt sowohl klinisch als auch genetisch ein heterogenes Krankheitsbild dar. Bis vor kurzem waren die genetischen Ursachen präsynaptischer CMS-Formen unbekannt. Als erste molekulare Ursache für ein präsynaptisches CMS konnten Ohno *et al.* Mutationen im *CHAT*-Gen identifizieren und in funktionellen Studien zeigen, daß ChAT-Mutanten an katalytischer Aktivität einbüßen (Ohno *et al.*, 2001). Das bei diesen Patienten auffallend häufig beobachtete Auftreten episodischer Apnoen führte zu dem Terminus CMS-EA (Ohno *et al.*, 2001; Byring *et al.*, 2002).

Bei drei Patienten aus zwei unabhängigen, konsanguinen CMS-EA Familien konnte eine neue Mutation im *CHAT*-Gen (CHAT I336T) homozygot nachgewiesen werden. Folgende Gründe sprechen für CHAT I336T als krankheitsverursachende Mutation:

1. Die Mutation konnte in 260 Kontrollchromosomen nicht nachgewiesen werden.
2. Die Mutation cosegregiert mit dem klinischen Phänotypen in einem autosomal rezessiven Erbgang.
3 Der kombinierte Zwei-Punkt LOD-Score für den *CHAT*-Locus beträgt 2,46.
4. In der kodierenden Sequenz des *VACHT*-Gens, das sich auf dem gleichen Locus befindet, konnten keine Mutationen nachgewiesen werden.
5. Die Mutation betrifft eine Aminosäure, die bei verschiedenen Spezies und verwandten Enzymen hoch konserviert ist.

Über die molekularen Konsequenzen der Mutation *CHAT* I336T kann aufgrund fehlender funktioneller Studien nur spekuliert werden. Die bisher von Ohno *et al.* beschriebenen Mutationen befinden sich in unterschiedlichen Bereichen des Proteins. Die Mutation *CHAT* I305T, die der Mutation *CHAT* I336T am nächsten liegt, scheint sowohl Expression, als auch katalytische Aktivität des Enzyms zu verringern. Bei keinem der Patienten mit homozygoter oder zusammengesetzt heterozygoter Mutation wurde bisher von eimem kompletten Verlust der enzymatischen Funktion berichtet (Ohno *et al.*, 2001), wahrscheinlich ist eine Restaktivität von ChAT zum Überleben notwendig.

Aufgrund der geringen Anzahl von CMS-EA Patienten, bei denen ChAT-Mutationen nachgewiesen werden konnten (Ohno *et al.*, 2001; Byring *et al.*, 2002), sollten Genotyp-Phänotyp Korrelationen mit Vorsicht erfolgen. Folgende Beobachtungen könnten jedoch Auswirkungen auf Diagnose und Therapie der Patienten haben:

1. Bei allen beschriebenen Patienten mit ChAT-Mutationen wird von lebensbedrohlichen und im Vorfeld oft falsch diagnostizierten Apnoe-Ereignissen berichtet.
2. In Ruhephasen zeigen die Patienten oft nur eine minimale myasthene Symptomatik. Insbesondere Ptose und Ophthalmoplegie, die bei postsynaptischen CMS häufig auftreten, fehlen oft.
3. Repetitive Stimulationstests im Ruhezustand können ein pathologisches Dekrement vermissen lassen, dies kann erst nach längerer Anstrengung oder Vostimulation auftreten.
4. Der Schweregrad des Krankheitsbildes ist variabel und kann von anderen genetischen oder umweltbedingten Faktoren abhängen. Bei dem Patienten II:1 ist der Krankheitsverlauf im Vergleich zu seiner Schwester (II:2) und der Patientin in der CMS-EA Familie 2 (II:4) deutlich gravierender. Wahrscheinlich stellen die zusätzlichen, von CMS unabhängigen Krankheiten (Hepatitis, Leberzellkarzinom, Metastasen) einen permanenten Stressor für den Patienten dar. Dadurch könnte die neuromuskuläre Reizweiterleitung zusätzlich verschlechtert werden, ähnlich den beobachteten Infektionen, die in allen Patienten das Auftreten von episodischen Apnoen begünstigte. Darüber hinaus könnten noch weitere modifizierenden Faktoren zu Unterschieden im Krankheitsbild beitragen.

Die Analyse der Haplotypen in den beiden betroffenen CMS-EA Familien deutet auf einen gemeinsamen Ursprung des krankheitsverursachenden Allels hin. Die beiden Familien stammen aus voneinander weit entfernten Gegenden der Türkei, eine Verwandtschaft untereinander ist nicht bekannt. Um einen Founder-Effekt für die Mutation CHAT I336T zu belegen, müßte die Mutation bei weiteren CMS-EA Patienten nachgewiesen und deren Haplotypen analysiert werden.

3. Mutationssuche in weiteren CMS-Kanidatengenen

In den untersuchten Bereichen weiterer CMS-Kanidatengene (*ACHE*, *VACHT)* konnten keine Mutationen bei Patienten mit der klinischen Diagnose eines CMS nachgewiesen werden. Dies schließt jedoch einen molekularen Defekt bei diesen Proteinen nicht völlig aus, da z.T. nicht das gesamte Gen und auch nicht die Promotorregionen dieser Gene untersucht wurden. Der genetischen Defekt, der bei diesen Patienten zu einer gestörten Erregungsweiterleitung führt, kann aber auch auf Mutationen in anderen, bereits

bekannten CMS-Gene (*COLQ*, *RAPSN*) oder in möglichen anderen CMS-Kanidatengenen an der neuromuskulären Endplatte beruhen.

4. Weiterführende Überlegungen

Die Analyse ursächlicher genetischer Defekte und deren pathophysiologischer Bedeutung bildet die Grundlage für eine sichere Einordnung von CMS. Bisher sind mehrere Proteine im Bereich der neuromuskulären Endplatte bekannt, bei denen genetische Defekte, die den verschiedenen CMS-Formen zugrunde liegen, identifiziert werden konnten. Dabei scheint die Mehrzahl der CMS-Fälle auf Mutationen im *ACHRε*-Gen zu beruhen.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch molekulargenetische Analyse im *ACHRε*- und im *CHAT*-Gen CMS-verursachende Mutationen nachgewiesen werden. Ein Mutationsnachweis gelang jedoch nicht bei allen Patienten mit klinisch gesicherter Diagnose. Bei diesen Patienten könnten Defekte in weiteren Synapsen-assoziierten Proteinen im Bereich der neuromuskulären Endplatte, die im Rahmen dieser Arbeit nicht analysierte wurden, Ursache für CMS sein. Dabei kommen neben bereits beschriebenen CMS-Genen (Gene für die AChR α-, β- und δ-Untereinheiten, ColQ, Rapsyn), auch eine Vielzahl weiterer Gene als Kanidatengene für CMS in Frage, beispielsweise die Gene für MuSK, Agrin oder β-Dystroglykan (Vincent *et al.*, 1997; Vincent *et al.*, 2000). Die Mutationssuche in diesen Genen könnte, zumindest in geeigneten Familien mit mehreren betroffenen und nicht betroffenen Mitgliedern, mittels begrenzter Kopplungsanalyse durch Ausschluß oder nähere Eingrenzung einzelner Genloci vereinfacht werden.

Die Pathogenität der in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebenen Mutationen (εΔ1290bp, CHAT I336T) kann aufgrund der oben beschriebenen Gründe als gesichert angenommen werden. Zur genauen Charakterisierung der funktionellen Auswirkungen dieser Mutationen auf die neuromuskuläre Übertragung sollten diese Mutationen in geeigneten *in vitro* Expressionssystemen untersucht werden. Sowohl für AChR- als auch für ChAT- Mutationen sind solche Expressionssysteme beschrieben. Dabei werden bei AChR-Mutanten neben der Rezeptor-Expression auch Auswirkungen der Mutation auf die Kanaleigenschaften untersucht (Beeson *et al.*, 1996). Entsprechend wird bei ChAT-Mutationen die jeweilige Enzym-Expression und -Aktivität beschrieben (Ohno *et al.*, 2001).

Außerdem lassen sich aus der Korrelation von Geno- und Phänotypen von CMS-Patienten Daten gewinnen, die für den einzelnen CMS-Patienten hinsichtlich Diagnostik, Beratung und Therapie hilfreich sind. Retrospektiv fallen bei Mutationen in bestimmten Genen z.T. charakteristische symptomatische Merkmale auf. Ein Beispiel hierfür ist das gehäufte Auftreten episodischer Apnoen bei Patienten mit Mutationen im *CHAT*-Gen, die ansonsten eine eher moderaten myasthenen Symptomatik haben. Bei Familienmitgliedern solcher Patienten wird auch von Fällen plötzlichen Säuglingstods berichtet und über einen Zusammenhang mit ChAT-Mutationen spekuliert (Byring *et al.*, 2002).

F Zusammenfassung

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (CMS) bilden klinisch und pathogenetisch eine heterogene Gruppe von relativ seltenen hereditären Erkrankungen des Kindesalters. Sie werden durch unterschiedliche genetische Defekte im Bereich der neuromuskulären Endplatte verursacht und manifestieren sich mit variabler Symptomatik, bei der eine ermüdbare Muskelschwäche das herausragende Kennzeichen ist.
Die exakte Klassifizierung eines CMS ist dabei neben dem wissenschaftlichem Interesse auch von klinischer Relevanz, da sich aus ihr für die betroffenen Patienten und ihre Familien unterschiedliche Konsequenzen hinsichtlich Prognose, Vererbbarkeit und pharmakologischer Therapie ergeben.

In der vorliegenden Arbeit konnten post- und präsynaptische CMS verursachende genetische Defekte identifiziert werden. Dabei betreffen die meisten der nachgewiesenen Mutationen, analog zu anderen Untersuchungen, die ε-Untereinheit des nikotinergen Acetylcholinrezeptors (AChRε). Einige Ergebnisse sind hierbei von besonderem wissenschaftlichem Interesse: Bei einer 1200bp großen Mikrodeletion auf dem *ACHRε*-Gen handelte sich um die erste chromosomale Deletion, die bei CMS nachgewiesen werden konnte. Eine zusätzliche Mutation in der Promotorregion des *ACHRε*-Gens (ε-154G/A) führt bei dem Patienten zur Manifestation des Krankheitsbilds.
Bei einer Mutation an der Spleißakzeptorstelle von Intron 7 im *ACHRε*-Gen (εIVS7-2A/G), die bei insgesamt fünf Patienten aus drei unabhängigen Familien auftritt, konnte der fehlerhafte Spleißvorgang durch Analyse des resultierenden Transkripts aufgezeigt werden: Exon 7 wird, unter Verlust von Exon 8, direkt an Exon 9 gespleißt, aufgrund einer Leserahmenverschiebung entsteht ein vorzeitiges Stopcodon.

Während die meisten Mutationen im *ACHRε*-Gen nur bei einigen wenigen Patienten nachgewiesen werden, stellt die Mutation ε1267delG in der Volksgruppe der Roma die häufigste Ursache für CMS dar. Die relativ große Anzahl von Patienten mit dieser Mutation, die untersucht werden konnte, ermöglichte eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Zukünftig wird eine direkte Testung auf die Mutation ε1267delG die Diagnosestellung bei Patienten dieser Volksgruppe deutlich vereinfachen und beschleunigen. Darüber hinaus sollte diskutiert werden, ob aufgrund der hohen Carrier-Frequenz für diese Mutation ein Neugeborenen-Screening für die betroffenen Bevölkerungsgruppen angeboten werden sollte. Bei frühzeitiger Diagnosestellung können rechtzeitig Therapie- und Präventionsmaßnahmen eingeleitet werden, und bei

entsprechender Medikation mit Acetylcholinesterase-Hemmern mögliche Komplikationen, wie Apnoe und plötzlicher Kindstod vermieden werden.
Die Haplotypenanalyse von dieser Patienten mit der Mutation ε1267delG eröffnet neue Erkenntnisse über Ursprung und Verbreitung des mutierten Alleles in der Romabevölkerung. Es wurde ein Kernhaplotyp identifiziert, der auch bei Patienten aus Indien und Pakistan nachgewiesen werden konnte. Das gemeinsame Auftreten eines solchen Founder-Allels untermauert die, hauptsächlich auf sprachwissenschaftlichen Vergleichen beruhende These, daß die Vorfahren der Roma vom indischen Subkontinent stammen.

Weitaus seltener als Mutationen im AChR treten Mutationen auf der präsynaptischen Seite der neuromuskulären Endplatte bei CMS auf. Im Gen für Cholin-Acetyltransferase (ChAT) konnte bei drei Patienten aus zwei unabhängigen Familien eine neue Mutation (CHAT I336T) homozygot nachgewiesen werden sind. Bei allen CHAT I336T Patienten wird, zusätzlich zu der myasthenen Symptomatik von einem, für Mutationen in diesem Gen typischen, gehäuften Auftreten von Apnoen, berichtet.

Insgesamt bietet die molekulargenetische Analyse von CMS neben der Bedeutung, die sie für den einzelnen Patienten hat, die Möglichkeit das Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der neuromuskulären Übertragung zu erweitern.

Literatur

Abicht A, Stucka R, Karcagi V, Herczegfalvi A, Horvath R, Mortier W, Schara, U, Ramaekers V, Jost W, Brunner, J, Jansen G, Seidel U, Schlotter B, Müller-Felber W, Pongratz D, Rudel R, Lochmüller H (1999). A common mutation (ε1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. Neurology; 53:1564-1569.

Abicht A, Stucka R, Song IH, Karcagi V, Kugler K, Baumgarten-Walczak A, Stier C, Pongratz D, Mortier W, Müller-Felber W, Rudel R, Lochmüller H (2000). Genetic analysis of the entire AChR ε-subunit gene in 52 congenital myasthenic families. Acta Myologica; 19:23-28.

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

Abicht A, Stucka R, Schmidt C, Briguet A, Höpfner S, Song IH, Pongratz D, Müller-Felber W, Ruegg MA, Lochmüller H (2002). A newly identified chromosomal microdeletion and an N-box mutation of the AChR epsilon gene cause a congenital myasthenic syndrome. Brain; 125:1005-1013.

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

Bartoli M, Ramarao MK, Cohen, JB (2001). Interactions of the rapsyn RING-H2 domain with dystroglycan. J Biol Chem; 276:24911-24917.

Beeson D, Amar M, Bermudez I, Vincent A, Newsom-Davis J (1996). Stable functional expression of the adult subtype of human muscle acetylcholine receptor following transfection of the human rhabdomyosarcoma cell line TE671 with cDNA encoding the epsilon subunit. Neurosci Lett; 207:57-60.

Betty M, Beeson D, West L, Vincent A, Newsom-Davis J (1994). D17S1175: dinucleotide repeat polymorphism 5' to CHRNE. Hum Mol Genet; 3:2083.

Brengman JM, Ohno K, Milone M, Shen X-M, Friedman JRL, Feldman RG, Engel AG (2000). Identification and functional characterization of eight novel acetylcholine receptor (AChR) mutations in six congenital myasthenic syndrome (CMS) kinships. Neurology; 54 (Suppl 3):P03.064.

Bundey SA (1972). A genetic study of infantile and juvenile myasthenia gravis. J Neurol Neurosurg Psychiatry; 35:41-51.

Burset M, Seledtsov IA, Solovyev VV (2000). Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. Nucleic Acids Res; 28:4364-4375.

Burset M, Seledtsov IA, Solovyev VV (2001). SpliceDB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. Nucleic Acids Res; 29:255-259.

Byring RF, Pihko H, Tsujino A, Shen XM, Gustafsson B, Hackman P, Ohno K, Engel AG, Udd B (2002). Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. Neuromuscul Disord; 12:548-553.

Chan RY, Voudreau-Larviere C, Angus LM, Manakal FA, Jasmin BJ (1999). An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse- and tissue- specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. Proc Natl Acad Sci; 96:4627-4632.

Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem; 162:156-159.

Croxen R, Newland C, Betty M, Vincent A, Newsom-Davis J, Beeson D C, Betty M (1999). Novel functional epsilon-subunit polypeptide generated by a single nucleotide deletion in acetylcholine receptor deficiency congenital myasthenic syndrome. Ann Neurol; 46:1076-1082.

Croxen R, Young C, Slater C, Haslam S, Brydson M, Vincent A, Beeson D (2001). End-plate gamma- and epsilon-subunit mRNA levels in AChR deficiency syndrome due to epsilon-subunit null mutations. Brain; 124:1362-1372.

Croxen R, Hatton C, Shelley C, Brydson M, Chauplannaz G, Oosterhuis H, Vincent A, Newsom-Davis J, Colquhoun D, Beeson D (2002). Recessive inheritance and variable penetrance of slow-channel congenital myasthenic syndromes. Neurology; 59:162-168.

Donger C, Krejci E, Serradell AP, Eymard B, Bon S, Nicole S, Chateau D, Gary F, Fardeau M, Massoulie J, Guicheney P (1998). Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). Am J Hum Genet; 3:967-975.

Eiden LE (1998). The cholinergic gene locus. J Neurochem; 2227-2240.

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

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

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

Engel AG (1994). Myasthenic Syndromes. In: Engel A, Franzini-Amstrong C, (Hrsg.). Myology: Basic and Clinical, 2. Aufl., New York: Mac Graw-Hill;1798-1835.

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

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

Engel AG (2001). 73rd ENMC International Workshop: Congenital myasthenic syndromes. 22-23 October, 1999. Neuromuscul Disord; 11:315-321.

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

Engel AG, Ohno K, Sine S (2002). The spectrum of congenital myashenic syndromes. Mol Neurobiol; 26:347-367.

Fraser A (1992). The Gypsies. Oxford: Blackwell Publishers.

Froehner SC, Luetje CW, Scotland PB, Patrick J (1990). The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in Xenopus oocytes. Neuron; 5:403-410.

Gotti C, Fornasari D, Clementi F (1997). Human neuronal nicotinic receptors. Prog Neurobiol; 53:199-237.

Hancock I (2000). The emergency of Romani as a koine outside of India. In: Scolarship and the Gypsy Struggle: Commitment in romani Studies. Acton TA, (Hrsg.). Hatfield: University of Hertfordshire Press; 1-13.

Harper CM, Engel AG (1998). Quinidine sulfate therapy for the slow-channel congenital myasthenic syndrome. Ann Neurol; 43:480-484.

Herczegfalvi A, Abicht A, Karcagi V, Lochmüller H (2000). Case report: Congenital myasthenic syndrome in a gypsie family showing a pseudodominant pattern of inheritance. Acta Myologica; 19:49-51.

Hutchinson DO, Walls TJ, Nakano S, Camp S, Taylor P, Harper CM, Groover RV, Peterson HA, Jamieson DG, Engel AG (1993). Congenital endplate acetylcholinesterase deficiency. Brain; 116:633-653.

Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F (2001a). Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. BMC Med Genet; 2,5.

Kalaydjieva L, Morar B, Gresham D, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise C, Angelicheva D, Calafell F, Oefher PJ, Shen P, Tournev I, De Pablo R, Kucinskas V, Perez-Lezaun A, Marushiakova E, Popov V (2001b). Social and biological history of the Roma (Gypsies). Acta Myologica; 20:181-187.

Kalaydjieva L (2002). Persönliche Mitteilung.

Lena C, Changeux JP (1997). Pathological mutations of nicotinic receptors and nicotine-based therapies for brain disorders. Curr Opin Neurobiol; 7:674-682.

Liégeois JP (1994). Roma, Gypsies, Travellers. Strasbourg: Council of Europe Press.

Lindström J (1997). Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. Mol Neurobiol; 15:193-222.

Marushiakova E, Popov V (2001). Historical and ethnological background. In: Guy W, (Hrsg.). Beetween past and future: The Roma of Central and Eastern Europe. Hatfield: University of Hertfordshire Press; 33-53.

McConville J, Vincent A (2002). Diseases of the neuromuscular junction. Curr Opin Pharmacol; 2:296-301.

Mendell JR, Buzin CH, Feng J, Yan J, Serrano C, Sengani DS, Wall C, Prior TW, Sommer SS (2001). Enhanced deletion rate of small mutations of the dystrophin gene precludes necessity for muscle biopsy in most Dychenne muscular dystrophy patients. Neurology; 56 (Suppl 3):A79.

Middleton LT (1996). 34th ENMC International Workshop: Congenital myasthenic syndromes, 10-11 June 1995. Neuromuscul Disord; 6:133-136.

Milone M, Ohno K, Fukudome T, Shen XM, Brengman J, Griggs RC, Engel AG (1998). Congenital myasthenic syndrome caused by novel loss-of-function mutations in the human AChR epsilon subunit gene. Ann N Y Acad Sci; 841:184-188.

Mora M, Lambert EH, Engel AG (1987). Synaptic vesicle abnormality in familial infantile myasthenia. Neurology; 37:206-214.

Morar B (2002). Persönliche Mitteilung.

Mullis KB (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. Ann Biol Clin (Paris); 48:579-582.

Nichols P, Croxen R, Vincent A, Rutter R, Hutchinson M, Newsom-Davis J, Beeson D (1999). Mutation of the acetylcholine receptor promotor ε-subunit in congenital myasthenic syndrome. Ann Neurol; 45:439-443.

Ohno K, Anlar B, Ozdirim E, Brengman JM, DeBleecker JL, Engel AG (1998a). Myasthenic syndromes in Turkish kinships due to mutations in the acetylcholine receptor. Ann Neurol; 44:234-241.

Ohno K, Brengman J, Tsujino A, Engel AG (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; 95:9654-9659.

Ohno K, Alnar B, Engel AG (1999). Congenital myasthenic syndrome caused by a mutation in the Ets-binding site of the promotor region of the acetylcholine receptor epsilon subunit gene. Neuromuscular Dissorders; 10:213-204.

Ohno K, Engel AG, Brengman JM, Shen XM, Heidenreich F, Vincent A, Milone M, Tan E, Demirci M, Walsh P, Nakano S, Akiguchi I (2000). The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. Ann Neurol; 47:162-170.

Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Harper CM, Bajzer Z, Udd B, Beyring R, Robb S, Kirkham FJ, Engel AG (2001). Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. Proc Natl Acad Sci U S A; 98:2017-2022.

Ohno K, Engel AG (2002a). Congenital myasthenic syndromes: genetic defects of the neuromuscular junction. Curr Neurol Neurosci Rep; 2:78-88.

Ohno K, Engel AG (2002b). Congenital myasthenic syndromes: gene mutations. Neuromuscular Dissorders; 12:807-811.

Ohno K, Engel AG, Shen XM, Selcen D, Brengman J, Harper CM, Tsujino A, Milone M (2002). Rapsyn Mutations in Humans Cause Endplate Acetylcholine-Receptor Deficiency and Myasthenic Syndrome. Am J Hum Genet; 70:875-885.

Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey P, Mandel JL (1992). Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. Hum Mol Genet; 1:599-603.

Ramarao MK, Cohen, JB (1998). Mechanism of nicotinic acetylcholine receptor cluster formation by rapsyn. Proc Natl Acad Sci U S A; 95:4007-4012.

Ramarao MK, Bianchetta MJ, Lanken J, Cohen, JB (2001). Role of rapsyn tetratricopeptide repeat and coiled-coil domains in self-association and nicotinic acetylcholine receptor clustering. J Biol Chem; 276:7475-7483.

Roth DB, Wilson JH (1988). Illegitime recombination in mammallian cells. In: Genetic recombination. Kucherlapati R, Smith GR, (Hrsg.). Washington (DC): American Society for Microbiology; 621-53.

Rothbart HB (1937). Myasthenia gravis in children. JAMA; 108:715-717.

Samson J (1927). Notes on Professor RL Turner´s "The position of Romani in Indo-Aryan". Journal of the Gypsy Lore Society; 6:57-68.

Sieb JP, Kraner S, Schrank B, Reitter B, Goebel TH, Tzartos SJ, Steinlein OK (2000). Severe congenital myasthenic syndrome due to homozygosity of the 1293insG ε-acetylcholine receptor subunit mutation. Ann Neurol; 48:379-383.

Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF (1995). A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Nat Genet; 11:201-203.

Taylor P, Radic Z (1994). The cholinesterase:from genes to proteins. Annu Rev Toxicol; 34:281-320.

Turner RL (1926). The position of Romani in Indo-Aryan. Journal of the Gypsy Lore Society; 5:145-189.

Vincent A, Newsom-Davis J, Wray D, Shillito P, Harrison J, Betty M, Beeson D, Mills K, Palace J, Molenaar P, Murray N (1993). Clinical and experimental observations in patients with congenital myasthenic syndromes. Ann N Y Aca Sci; 681:451-460.

Vincent A, Newland C, Croxen R, Beeson D (1997). Genes at the junction-candidates for congenital myasthenic syndromes. Trends Neurosci; 20:15-22.

Vincent A, Beeson D, Lang B (2000). Molecular targets for autoimmune and genetic disorders of neuromuscular transmission. Eur J Biochem; 267:6717-6728.

Wallis TJ, Engel AG, Nagel AS, Harper CM, Trastek VF (1993). Congenital myasthenic syndrome associated with paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release. Ann N Y Acad Sci; 681:461-468.

H Anhang

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen
Erfassungsbogen CMS
Tabellen A1-A3
Danksagung
Lebenslauf
Ehrenwörtliche Erklärung

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA
AChE / *ACHE*	Acetylcholinesterase / *Gen für globulären Anteil der Acetylcholinesterase*
AChR	Acetylcholinrezeptor/en (nikotinerg)
AChRε / *ACHRε*	Acetylcholinrezeptor epsilon-Untereinheit / *Gen*
bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C. elegans	*Caenothabditis elegans*
ChAT / *CHAT*	Cholin-Acetyltransferase / *Gen*
ColQ / *COlQ*	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
FCCMS	Fast-Channel CMS
SCCMS	Slow-Channel CMS
D. melanogaster	*Drosophila melanogaster*
DNA	Desoxyribonuclic acid (Desoxyribonukleinsäure)
cDNA	complementary DNA
DTT	Dithiothreitol
ENMC	European Neuromuscular Centers
EDTA	Ethylenediamino tetraacido acid (Ethylendiamino-Tetraessigsäure)
GSCN-Lsg.	Guanidiniumthiocyanat-Lösung
HCl	Salzsäure

kb	Kilobasen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LOD	Logarithmus of odds
Mg^{2+}	Magnesiumkationen
min	Minuten
mM	milli Mol
MuSK	Muskelspezifische Kinase
M. intercostalis	*Musculus intercostalis*
µg	mikro Gramm
µl	mikro Liter
NMJ	Neuromuscular junction (Neuromuskuläre Endplatte)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
Pos.	Position
Rapsyn / *RAPSN*	Receptor-assoziated protein of the synapse / *Gen*
RNA	Ribonuklein acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SNP	Single nucleotide exchange polymorphism (Einzelbasenaustausch-Polymorphismus/en)
Tab.	Tabelle
Tris	Trometamol
TU	Technische Universität
VAChT / *VACHT*	vesikuläre Acetylcholintransferase / *Gen*
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Erfassungsbogen CMS

ERFASSUNGSBOGEN
ZUR DIAGNOSTIK KONGENITALER MYASTHENER SYNDROME

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

PROBENVERSAND ZUR MOLEKULARGENETISCHEN DIAGNOSTIK:

10 ml EDTA-BLUT

zu senden an

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

!!! wichtig !!!

Versand bei **Raumtemperatur**

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

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

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

eingesandtes EDTA-Blut:

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

WICHTIGE ANGABEN ZUM PATIENTEN

Vorname:

Name:

Geburtsdatum:

männlich ❑
weiblich ❑

Kontaktadresse:
einsendende Klinik:

Ansprechpartner/ uberweisender Arzt:

Telefon:

1. FAMILIENANAMNESE

Aus welchem Land stammt die Familie?

Ist Blutsverwandtschaft in der Familie bekannt? ❑ ja ❑ nein ❑ keine Information

Sind andere Familienmitglieder erkrankt?: ❑ ja ❑ nein ❑ keine Information

...falls ja, wer ist genau betroffen:

Wieviele gesunde Geschwister hat der Patient?

---

bitte Rückseite beachten..

2. Anamnestische Angaben

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

Motorische Entwicklung:
- ❑ normal
- ❑ verzögert

Laufen erlernt mit Mon.

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

Krisenhafte Verschlechterungen (z.B. im Rahmen von Infekten):
- ❑ nein
- ❑ ja

mit respiratorischer Insuffizienz: ❑ ja ❑ nein ❑ in früher Kindheit

3. Neurologischer Untersuchungsbefund

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

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

Gehfähigkeit

❑ voll erhalten ❑ eingeschränkt ❑ stark / völlig eingeschränkt

Gehstrecke ca.:

Muskeleigenreflexe:

❑ normal ❑ abgeschwächt

Muskuläre Trophik:

❑ normal ❑ Atrophien

Kongenitale Kontrakturen: ❑ nein ❑ ja

Dysmorphe Stigmata: ❑ nein ❑ ja:

4. Elektrophysiologie

EMG
- ❑ nicht durchgeführt
- ❑ myopathisch
- ❑ neurogen
- ❑ unauffällig
- ❑ anderes:

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

Anmerkung:

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

Reaktion auf Einzelreiz:
- ❑ **normal**
- ❑ **repetitiv**
- ❑ **nicht geprüft**

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

... evtl. weitere Befunde

Einzelfaser EMG: NLG:

5. Labor / Muskelbiopsie

Muskelbiopsie durchgeführt: ❑ nein ❑ ja, Befund:

Serum Creatinkinase (CK):

5. Azetylcholin-Rezeptor-Antikörper

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

6. Ansprechen auf Azetylcholinesterase Hemmer:

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

langfristige Mestinontherapie:
- ❑ **erfolgreich**
- ❑ **ohne Effekt**
- ❑ **nur anfangs erfolgreich**
- ❑ **nicht durchgeführt**

6. Weitere Therapie:

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

...über ergänzende Krankenberichte sind wir sehr dankbar

Vielen Dank für die Beantwortung unserer Fragen! Sollte der Nachweis einer entsprechenden Mutation gelingen, geht Ihnen selbstverständlich ein Befund zu! Wir bitten allerdings um Geduld: Da es sich um noch keine Routinediagnostik handelt, ist mit dem Ergebnis unter Umständen erst in mehreren Monaten zu rechnen.

Tabellen A1-A3:

Verschiedene Haplotypen bei Allelen mit der Mutation ε1267delG, die sich aufgrund von Variationen bei SNP ε1233C/T und verschiedenen Fragmentlängen der Marker *D17S1175*, *D17S1810*, *D17S1828* ergeben.

Tab. A1: Haplotypen mit verschiedenen Variationen bei SNP ε1233 und verschiedenen Fragmentlängen von Marker *D17S1175*

Haplotyp	SNP 1233 AChRε	Fragment-Länge *D17S1175*	Herkunft	Anzahl der Allele	Gesamtzahl der Allele gleicher Herkunft	Anteil bei Allelen gleicher Herkunft
I	C	280	unterschiedlich	112	114	98 %
II	T	286	Indien (West)	2	4	50 %

Tab. A2: Haplotypenuntergruppen der Gruppe I mit verschiedenen Fragmentlängen von Marker *D17S1810*

Haplotyp	Fragmentlänge *D17S1810*	Herkunft	Anzahl der Allele	Gesamtzahl der Allele gleicher Herkunft	Anteil bei Allelen gleicher Herkunft
I A	Nullallel	Ungarn	4	36	11 %
I B	110	Bulgarien	1	36	3 %
I C	112	Bulgarien	1	36	3 %
I D	116	unterschiedlich	104	114	91 %
I E	120	Bulgarien	1	36	3 %
		Ungarn	1	36	3 %

Tab. A3: Haplotypenuntergruppen bei Haplotyp I D mit verschiedenen Fragmentlängen von Marker *D17S1828*

Haplotyp	Fragmentlänge *D17S1828*	Herkunft	Anzahl der Allele	Gesamtzahl der Allele gleicher Herkunft	Anteil bei Allelen gleicher Herkunft
I D1	200	Bulgarien	1	36	3 %
I D2	206	Pakistan	1	6	17 %
I D3	208	Ägypten	2	2	100 %
		Bulgarien	3	36	8 %
		Jugoslawien	5	18	28 %
		Ungarn	9	36	25 %
I D4	210	Böhmen	2	2	100 %
		Bulgarien	4	36	11 %
		Indien (Süd)	2	4	50 %
		Jugoslawien	7	18	39 %
		Ungarn	14	36	39 %
I D5	212	Jugoslawien	1	18	6 %
		Pakistan	1	6	17 %
		Ungarn	2	36	6 %
I D6	214	Bulgarien	15	36	42 %
		Griechenland	2	2	100 %
		Indien (Süd)	2	4	50 %
		Jugoslawien	5	18	28 %
		Pakistan	3	6	50 %
		Türkei	2	2	100 %
		Ungarn	3	36	8 %
I D7	216	Indien (West)	2	4	50 %
		Rumänien	2	2	100 %
		Ungarn	1	36	3 %
I D8	220	Ungarn	2	36	8 %
I D9	224	Bulgarien	1	36	3 %
		Pakistan	1	6	16 %
I D10	226	Bulgarien	7	36	19 %

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Hanns Lochmüller sehr herzlich für die interessante Aufgabenstellung und die stets sehr gute und intensive Betreuung im Verlaufe dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Angela Abicht, die sowohl durch Hilfe bei beim Erlernen molekularbiologischer Techniken, als auch durch die, mit großem persönlichen Engagement betriebene Etablierung der Untersuchungen zu Kongenitalen Myasthenen Syndromen, zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Rolf Stucka für seine äußert kompetente Hilfe bedanken, durch die es gelang, auch schwierige molekularbiologische Fragestellungen zu bearbeiten. Frau Prof. Luba Kalaydjieva, Frau Dr. Bharti Morar und Frau Priv.-Doz. Dr. Angela Huebner danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit bei den verschiedenen Haplotypenuntersuchungen.

Sehr herzlich danke ich auch allen anderen, mit denen ich im Verlauf dieser Arbeit zusammenarbeiten durfte: Patrick Dunant, Ursula Klutzny, Dr. Sabine Krause, Dr. Nancy Larochelle, Gina Mildner, Juliane Müller, Sofia Petrova, In-Ho Song, Christian Thirion und Dr. Maggie Walter. Die außergewöhnlich gute Atmosphäre und freundschaftliche Zusammenarbeit in dieser Arbeitsgruppe machte mir den Laboralltag zu einer Freude.

Weiterhin danke ich allen Ärzten, die klinische Daten erfaßt und Patientenmaterial zur Diagnostik eingesandt haben, insbesonderem Frau Prof. Dr. N. Barisic, Herrn Dr. D. Beeson, Herrn Prof. A. Engel, Frau Dr. A. Herczegfalvi, Frau Dr. V. Karcagi, Herrn Dr. K. Krampfl, Herrn Prof. Dr. W. Müller-Felber, Herrn Dr. I. Tournev, Frau Dr. U. Schara und Frau Dr. O. Sidorova.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Carolin Schmidt
Geburtsdatum:	28.02.73
Familienstand:	ledig
Geburtsort:	Bad Kreuznach
Adresse:	An der Stemmerwiese 2
	81373 München

Ausbildung

1979- 1983	Grundschule Süd, Bad Kreuznach
1983- 1992	Gymnasium an der Stadtmauer, Bad Kreuznach
1992	Abitur
1992- 1993	Freiwilliges Soziales Jahr
1993- 1997	Pharmaziestudium an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
1995	1. Pharmazeutisches Staatsexamen
1997	2. Pharmazeutisches Staatsexamen
1998	3. Pharmazeutisches Staatsexamen
1997- 1998	Praktisches Jahr:
	1.Hälfte: Antonius Apotheke, Planegg
	2.Hälfte: Apotheke des Klinikums der Universität Mainz

Berufliche Tätigkeit

1999	Einhorn Apotheke, Bad Kreuznach

Wissenschaftliche Tätigkeit

2000- 2002	Friedrich-Baur-Institut, Klinik für Neurologie und Genzentrum, LMU München

Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den .....

.....
(Carolin Schmidt)

Dissertation eingereicht am: 15.01.2003