

AUS DEM FRIEDRICH-BAUR-INSTITUT DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT AN DER  
NEUROLOGISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK DER LUDWIG-MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
(DIREKTORIN: PROF. DR. MED. MARIANNE DIETERICH)

Molekulargenetische Analyse bei Patienten  
mit kongenitalen myasthenen Syndromen:  
Untersuchung von seltenen Krankheitsgenen und von  
Kandidatengen des Hexosaminstoffwechselweges

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

vorgelegt von Constanze Gallenmüller  
aus München  
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Axel Imhof  
Prof. Dr. Rudolf Wank

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Rolf Stucka

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2014

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

A. Abicht, M. Dusl, **C. Gallenmüller**, V. Guerguelcheva, U. Schara, A. Della Marina, E. Wibbeler, S. Almaras, V. Mihaylova, M. von der Hagen, A. Huebner, A. Chaouch, J.S. Müller and H. Lochmüller: „Congenital myasthenic syndromes: Achievements and limitations of phenotype-guided gene-after-gene sequencing in diagnostic practice: A study of 680 patients“ *Human Mutat.* (2012) **33**: 1474-1484.

**C. Gallenmüller**, W. Müller Felber, M. Dusl, R. Stucka, V. Guerguelcheva, A. Blaschek, M. von der Hagen, A. Huebner, J.S. Müller, H. Lochmüller, A. Abicht: „Salbutamol-responsive limb-girdle congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation and heteroallelic deletion in MUSK“ *Neuromuscul Disord.* (2014) **24**: 31-3

## I. Zusammenfassung

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (CMS) stellen eine Gruppe seltener hereditärer Erkrankungen dar, die auf einer Störung im Nerv-Muskel-Signalübertragungsweg beruhen. Hinsichtlich Pathogenese, Molekulargenetik und klinischer Symptomatik zeichnen sich diese Syndrome durch eine starke Heterogenität aus, die eine Einteilung in CMS-Unterformen erforderlich macht. Die bislang bekannt gewordenen krankheitsursächlichen CMS-Gene kodieren in vielen Fällen für Synapsen-assoziierte Proteine. Um so überraschender war die kürzliche Entdeckung, dass Mutationen im Gen *GFPT1*, kodierend für das Schlüsselenzym des Hexosamin-Stoffwechselwegs, und zwar der Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Amidotransferase 1 (GFAT1), krankheitsauslösend für ein CMS mit Gliedergürtelbetonung sind.

Dies ließ vermuten, dass ein neuer Pathomechanismus – nämlich Glykosylierungsstörungen – dieser CMS-Untergruppe zugrunde liegen könnte. Damit rückten weitere Gene für Enzyme des Hexosamin-Stoffwechselwegs als Kandidatengene für CMS in den Fokus. Hauptschwerpunkt dieser Promotionsarbeit war deshalb, eine Kohorte von CMS-Patienten auf krankheitsrelevante Mutationen in den Hexosamin-Biosynthese-Genen *GNPNAT1*, *PGM3*, *UAPI* und *OGT* zu untersuchen. Die Kohorte bestand aus insgesamt 44 CMS-Patienten, größtenteils solchen mit dem besonderen Phänotyp der Gliedergürtelbeteiligung (38 Patienten), zum kleineren Teil solchen mit bisher ungeklärter genetischer Ursache (6 Patienten). Jedoch konnte in keinem dieser Fälle eine mutmaßlich pathogene Sequenzveränderung in den genannten vier Kandidatengenen detektiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag darin, die vorgestellte Gliedergürtel-Kohorte auf bereits bekannte, jedoch nur äußerst selten nachgewiesene, CMS-verursachende Mutationen zu analysieren. Hierzu zählen vor allem Mutationen in *MUSK*, einem essentiellen Gen für eine an der neuromuskulären Synapsenbildung beteiligten Kinase. Weltweit sind hier überhaupt nur 5 Fälle/Familien in der Literatur beschrieben. Erstmals konnten im Rahmen dieser Arbeit bei einem Patienten die Sequenzvariante *MUSK*

p.Asp38Glu und eine größere Deletion im *MUSK*-Gen nachgewiesen werden. Funktionelle Studien auf Ebene der *MUSK*-mRNA-Transkripte im Patientenmuskel, bioinformatische Daten und die Segregationsanalyse in der Familie lassen den Schluss zu, dass diese beiden Mutationen sehr wahrscheinlich als pathogen einzustufen sind. Klinisch fiel ein ausgezeichnetes Ansprechen auf Salbutamol auf, welches bei *MUSK*-CMS-Patienten bisher noch nicht beschrieben war.

Die Analyse weiterer bekannter CMS-Gene in Patienten beider Kohorten führte zum Nachweis bereits beschriebener Frameshift-Mutationen in *CHRNE*, die bekanntermaßen zu einer verminderten Expression des Acetylcholinrezeptors an der Oberfläche von Muskelzellen führen. Neben den häufigen Mutationen c.1327delG in homozygoter Form und c.1353dupG in homozygoter und compound heterozygoter Form - beides Founder-Mutationen in der Population der Roma bzw. der nordafrikanischen Bevölkerung - wurde die Mutation c.70insG in compound heterozygoter Form gefunden. Interessanterweise lag bei zwei der hier beschriebenen vier *CHRNE*-Patienten ein Phänotyp mit prominenter Gliedergürtelschwäche vor, was für *CHRNE*-CMS-Patienten mit typischerweise im Vordergrund stehender okulärer Beteiligung ungewöhnlich ist. Zusammengefasst zeigen die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Patienten mit *CHRNE*-Mutationen klinisch eine unerwartet große Heterogenität.

Ein Patient mit distal betonter Muskelschwäche aus der Kohorte mit ungewöhnlichen Phänotypen wies die Sequenzvariante c.866C>A/p.Ser289Tyr in *CHRND* in heterozygoter Form auf. Diese bisher nicht funktionell untersuchte Variante stellt eine autosomal dominant vererbte Slow-Channel-Mutation dar und führt möglicherweise wie die an gleicher Position lokalisierte, jedoch schon funktionell charakterisierte Mutation p.Ser289Phe zu einer verlängerten Kanalöffnungszeit des Acetylcholinrezeptors. Im Unterschied zu anderen *CHRND*-Patienten war phänotypisch jedoch keine respiratorische Beteiligung erkennbar. Bei einem weiteren Patienten mit Gliedergürtelphänotyp konnten zwei Sequenzvarianten nachgewiesen werden, deren pathogenes Potential aufgrund der Ergebnisse der *in silico*- und Segregationsanalyse, wenn überhaupt, als sehr gering einzustufen ist. Zum einen fand sich in *CHRNA1* die Sequenzveränderung p.Val113Met heterozygot. Daneben war der Patient Träger der Sequenzvariante c.1137-3del in *OGT*, die abschließend auf Grund der Ergebnisse

der *in silico*- und Segregationsanalyse ebenfalls als nicht krankheitsverursachend einzuschätzen ist.

Zusammenfassend konnte im untersuchten Patientenkollektiv zwar keine krankheitsursächliche Mutation der Kandidatengene des Hexosamin-Biosynthesewegs, i.e. *GNPNAT1*, *PGM3*, *UAPI* und *OGT*, nachgewiesen werden. Die grundsätzliche pathogene Relevanz von Genen, die eine Rolle bei Glykosylierungsvorgängen spielen, wurde jedoch zwischenzeitlich durch Identifikation von Mutationen in den Genen *DPAGT1*, *ALG2* und *ALG14* bei CMS gezeigt. Eine vergleichende Gegenüberstellung der Phänotypen der im Rahmen der Arbeit genetisch aufgeklärten CMS-Patienten bestätigte die große klinische Heterogenität innerhalb der Krankheitsgruppe und zum Teil auch unter Patienten mit identischen Genotypen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen eine Erweiterung des Phänotyps sowohl für häufig als auch für seltener ursächliche CMS-Gene und machen deutlich, welche klinische Relevanz die Analyse von seltenen CMS-Genen wie *MUSK* haben kann. Im Hinblick auf Salbutamol als eine Therapieoption bei *MUSK*-CMS wird ein neuartiger medikamentöser Behandlungsansatz aufgezeigt. Neben einem besseren Verständnis für die genetischen Hintergründe der Erkrankung leisten die Ergebnisse somit auch einen Beitrag für eine bessere Versorgung bzgl. Diagnostik und Therapie von Patienten mit dieser seltenen neuromuskulären Erkrankung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>II. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1. KRANKHEITSBILD DER CMS .....	1
2. DIE NEUROMUSKULÄRE ENDPLATTE - AUFBAU UND ERREGUNGSABLAUF .....	2
3. MOLEKULARGENETISCHEN DIAGNOSTIK EINES CMS .....	4
4. GENETISCHER HINTERGRUND DER CMS .....	6
4.1 Präsynaptische CMS .....	8
4.2 Synaptische CMS .....	8
4.3 Postsynaptische CMS .....	9
4.4 Weitere CMS-Gene .....	12
5. MUTATIONEN IN <i>GFPT1</i> : GLYKOSYLIERUNGSSTÖRUNG ALS NEUER CMS-PATHOMECHANISMUS	12
6. MUTATIONEN IN <i>DPAGT1</i> , <i>ALG2</i> UND <i>ALG14</i> .....	15
7. GRUNDLEGENDES ZU GLYKOSYLIERUNGSVORGÄNGEN .....	15
8. VERERBTE UND ERWORBENE GLYKOSYLIERUNGSSTÖRUNGEN .....	17
9. VORKOMMEN GLYKOSYLIERTER PROTEINE AN DER ENDPLATTE .....	18
10. IDENTIFIKATION NEUER KANDIDATENGENE FÜR CMS: <i>GNPNAT1</i> , <i>PGM3</i> , <i>UAP1</i> UND <i>OGT</i> ....	19
10.1 <i>GNPNAT1</i> .....	19
10.2 <i>PGM3</i> .....	22
10.3 <i>UAP1</i> .....	22
10.4 <i>OGT</i> .....	22
<b>III. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>24</b>
<b>IV. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
1. PATIENTEN .....	25
2. DNA-EXTRAKTION .....	25
3. RNA-EXTRAKTION AUS MUSKELGEWEBE .....	25
4. POLYMERASEKETTENREAKTION .....	26
4.1. Prinzip der PCR .....	26
4.2 PCR-Primer .....	26

4.3 PCR-Reaktionsbedingungen.....	27
4.4. Nested-PCR.....	28
4.5 Reverse-Transkriptase-PCR.....	28
5. AUFTRENNUNG DER DNA-FRAGMENTE IN DER GELELEKTROPHORESE.....	28
6. AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE.....	29
7. SEQUENZANALYSE.....	29
8. BEGRIFFSDEFINITION VON POLYMORPHISMUS, MUTATION UND SEQUENZVARIANTE.....	30
8.1 Einzelnukleotidpolymorphismen.....	31
8.2 Insertions- und Deletionspolymorphismen.....	32
9. BEURTEILUNG VON SEQUENZVARIANTEN.....	32
<b>V. ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
1. KLINISCHE CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN PATIENTEN MIT GLIEDERGÜRTEL- PHÄNOTYP.....	34
1.1 Patient 23 und 24.....	36
1.2 Patient 37.....	38
1.3 Patient 38.....	38
1.4 Patientin 5.....	39
2. KLINISCHE CHARAKTERISIERUNG DER PATIENTEN MIT UNGEWÖHNLICHEN PHÄNOTYPEN.....	40
2.1 Patient 42.....	42
2.2 Patientin 43.....	42
2.3 Patientin 44.....	43
3. NACHGEWIESENE SEQUENZVARIANTEN IN BEKANNTEN CMS-GENEN.....	43
3.1 <i>CHRNE</i> c.1327delG/ p.Glu443Lysfs*64.....	45
3.2 <i>CHRNE</i> c.1353dupG/ p.Asn452Glu fs*4.....	45
3.3 <i>CHRNE</i> c.70insG.....	46
3.4 <i>CHRND</i> c.866C>A/ p.Ser289Tyr.....	46
3.5 <i>CHRN1</i> c.340G>A/p.Val114Met.....	46
3.6 <i>MUSK</i> p.Asp38Glu und eine bisher nicht bekannte Deletion in <i>MUSK</i> .....	46
4. MOLEKULARGENETISCHE ANALYSE DER NEUEN KANDIDATENGENE.....	48
4.1 Die Sequenzvariante <i>OGT</i> c.1137-3del.....	49
<b>VI. DISKUSSION.....</b>	<b>51</b>
1. PATHOGENE SEQUENZVARIANTEN IN <i>CHRNE</i> .....	51
2. DIE SEQUENZVARIANTE <i>CHRND</i> c.866C>A/p.SER268TYR.....	52

3. DIE SEQUENZVARIANTE <i>CHRNBI</i> C.340G>A/P.VAL114MET.....	52
4. DIE SEQUENZVARIANTE <i>MUSK</i> P.ASP38GLU UND EINE BISHER NICHT BEKANNTE DELETION IN MUSK.....	53
5. DIE SEQUENZVARIANTE <i>OGT</i> C.1137-3DEL.....	57
6. DATENQUALITÄT .....	60
7. KANDIDATENGENANSATZ VS. NEXT GENERATION SEQUENCING.....	60
8. BEWERTUNG VON SEQUENZVARIANTEN .....	62
9. GLYKOSYLIERUNGSSTÖRUNG ALS NEUARTIGER CMS-PATHOMECHANISMUS .....	63
10. AUSBLICK .....	64
<b>VII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>66</b>
<b>VIII. ANHANG .....</b>	<b>75</b>
1. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	75
2. PRIMERSEQUENZEN .....	78
3. WEITERE ABBILDUNGEN .....	85
4. FRAGEBOGEN ZUR KLINISCHEN ERFASSUNG DER CMS-PATIENTEN .....	87
5. DANKSAGUNG .....	89
6. LEBENSLAUF.....	90
7. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	90

## **II. Einleitung**

Das klinische Leitsymptom des Krankheitsbildes der Myasthenie stellt eine belastungsabhängige Muskelschwäche dar, die durch eine gestörte Erregungstransmission vom Nerv auf den Muskel an der neuromuskulären Endplatte verursacht wird. Neben der Myasthenia gravis und dem Lambert-Eaton-Syndrom, die zu den Autoimmunerkrankungen gezählt werden, existieren auch vererbte Formen der Myasthenie, die sog. kongenitalen myasthenen Syndrome (CMS). CMS werden durch Mutationen in Genen, die in der Regel für Synapsen-assoziierte Proteine kodieren, verursacht und machen ca. 10% aller Myasthenien im Kindesalter aus (Anlar, Ozdirim et al. 1996). Die wahrscheinlich unterschätzte Prävalenz von CMS in Europa liegt bei 1:500.000 (Millichap and Dodge 1960).

### **1. Krankheitsbild der CMS**

Das klinische Erscheinungsbild und der Verlauf bei CMS sind sehr variabel. Leitsymptom ist die bereits erwähnte belastungs- bzw. tageszeitabhängige Muskelschwäche. CMS betrifft typischerweise die okuläre, mimische, bulbäre und stammnahe Extremitätenmuskulatur, die glatte Muskulatur bleibt ausgespart. Symptombeginn ist in den meisten Fällen im Neugeborenen- oder Kleinkindalter, in seltenen Fällen manifestiert sich die Erkrankung erst im Erwachsenenalter (Engel 1994; Burke, Cossins et al. 2003; Beeson, Hantai et al. 2005; Muller, Herczegfalvi et al. 2007). Das klinische Spektrum reicht von einer milden Symptomatik, die z.T. bei Fieber oder Infektionen exazerbieren kann, bis hin zu einer progredienten, invalidisierenden Muskelschwäche. Bei Beteiligung der Atemmuskulatur kann es zu respiratorischer Insuffizienz mit plötzlicher Apnoe und Zyanose mit möglicher Todesfolge kommen. Beim Patienten mit neonatalem Beginn finden sich als charakteristische Symptome eine faziale, bulbäre und zum Teil auch generalisierte muskuläre Hypotonie, kraftloses Schreien, eine Trinkschwäche, eine Ptose und in seltenen Fällen das Vorliegen angeborener Gelenkkontrakturen (Arthrogryposis multiplex) als

Ausdruck einer bereits intrauterin vorliegenden Bewegungsarmut. Bei Kindern mit späterem Beginn zeigt sich eine frühzeitige Muskelermüdbarkeit mit funktionellen Einschränkungen, insbesondere beim Treppensteigen und Rennen. Die motorische Entwicklung kann verzögert verlaufen. Hauptsymptome bei betroffenen Erwachsenen bestehen in einer belastungsabhängigen Schwäche meist mit Betonung der proximalen Extremitätenmuskeln und einer im Tagesverlauf fluktuierenden Ptose und in manchen Fällen einer Ophthalmoparese (Burke, Cossins et al. 2003).

Klinisch können distinkte Unterformen unterschieden werden wie z.B. eine CMS-Unterform mit Gliedergürtelbetonung (Limb girdle-(LG)-CMS) (McQuillen 1966). Der Phänotyp kann je nach mutiertem Gen sehr unterschiedlich sein und eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist nicht immer möglich. Die klinische Diagnosestellung stützt sich im Wesentlichen auf das typische klinische Bild, das Vorliegen eines Dekrements bei repetitiver Stimulation mit 2-3 Hertz (Hz) und den fehlenden Nachweis von Autoantikörpern gegen Acetylcholinrezeptoren (AChR) (Aarli, Mattsson et al. 1975) oder MuSK (Hoch, McConville et al. 2001). Ein Nichtansprechen auf eine immunsuppressive Therapie und der muskelbiopsische Ausschluss klinisch ähnlich verlaufender Muskelerkrankungen wie z.B. kongenitaler Strukturmyopathien untermauern die Diagnose weiter.

Der Großteil der CMS-Patienten profitiert von einer Behandlung mit Acetylcholinesterase-Hemmstoffen mit Ausnahme von Patienten mit Mutationen in den Genen *COLQ* und *DOK7* oder mit sog. Slow-Channel-Syndromen, bei denen eine Behandlung die Symptomatik sogar verschlechtern kann (Engel 2007; Palace, Lashley et al. 2007; Kinali, Beeson et al. 2008; Schara and Lochmuller 2008; Schara, Della Marina et al. 2012).

## **2. Die neuromuskuläre Endplatte - Aufbau und Erregungsablauf**

Die neuromuskuläre Endplatte ist eine spezifische Form der Synapse, in der eine über die Präsynapse eintreffende elektrische Erregung über chemische Transmission an der Postsynapse zur Depolarisation und damit zur Kontraktion des Muskels führt. Die Synapse ist morphologisch in drei Teile aufgeteilt, und zwar in den präsynaptischen Teil der Endplatte, der der Nervenendigung entspricht, dem synaptischen Spalt und der in diesem

Bereich speziell strukturierten postsynaptischen Muskelfasermembran (Hughes, Kusner et al. 2006).

Die Depolarisation der präsynaptischen Membran durch ein ankommendes Aktionspotential führt zur Öffnung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen. Der Calciumeinstrom in die präsynaptische Nervenendigung wiederum bewirkt eine exozytotische Freisetzung von Acetylcholin (ACh), das in Vesikeln in der Präsynapse gespeichert vorliegt, in den synaptischen Spalt. ACh wird präsynaptisch aus Acetyl-CoA und Cholin durch das Enzym Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) synthetisiert. Das freigesetzte ACh gelangt über Diffusion durch den synaptischen Spalt an die postsynaptische Membran und bindet dort an nikotinische Acetylcholinrezeptoren (AChR), was zu einer Öffnung von selektiven Ionenkanälen führt. Durch den Einstrom von Kationen kommt es zur postsynaptischen Depolarisation und zur Generierung eines Endplattenpotentials (EPP) (Sato, Suzuki et al. 1999). Das EPP führt zur Aktivierung spannungsabhängiger Natrium-Kanäle und im Verlauf nach Erreichen des Schwellenpotentials zur Entstehung eines Aktionspotentials im Muskel, was wiederum zum Calciumeinstrom in die Muskelfaser und damit zur Kontraktion führt. Nach Abdiffusion der ACh-Moleküle von der Bindungsstelle erfolgt im synaptischen Spalt die Hydrolyse von ACh durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE), das in der Basallamina des synaptischen Spalts über ein Protein mit einem kollagenartigen Schwanzteil (engl. collagen tail (ColQ)) verankert ist. Die Zeitdauer für diesen hydrolytischen Abbau durch die AChE bestimmt die Dauer des exzitatorischen postsynaptischen Potentials.

Der postsynaptische nikotinische AChR stellt einen ligandenaktivierten Ionenkanal dar und besteht aus fünf Untereinheiten. Im embryonalen Säugetier-Muskel sind dies zwei Alpha- und jeweils eine Beta-, Gamma- und Delta-Untereinheit, wobei es im Verlauf der weiteren Entwicklung mit zunehmender Innervation des fetalen Muskels zu einem Ersatz der Gamma- durch eine Epsilon-Untereinheit kommt. Zwischen den die Zellmembran durchspannenden Untereinheiten befindet sich eine Kanalpore, durch die positiv geladene Ionen fließen können. Zur Öffnung der Kanalpore ist die Bindung von mindestens zwei Molekülen ACh an die Bindungsstelle, die auf der Alpha-Untereinheit lokalisiert ist, nötig.

Im sich entwickelnden Muskelgewebe nimmt bei der Ausbildung der Synapsen die Dichte der AChR im Bereich der postsynaptischen Membran stark zu. Dieses Clustern führt auch zu einem erniedrigten Umsatz der AChR (Gervasio and Phillips 2005) und wird über den Agrin-MuSK-Rapsyn-Signalweg gesteuert. Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglykan, das von sich entwickelnden Nervenendigungen von motorischen Neuronen in den synaptischen Spalt sezerniert wird (Nitkin, Smith et al. 1987; Hoch 1999). Agrin bindet an LRP4 (low-density lipoprotein receptor related protein 4), welches im Muskel exprimiert wird (Kim, Stiegler et al. 2008; Zhang, Luo et al. 2008; Zong, Zhang et al. 2012). An der Postsynapse wird durch das Zusammenwirken von Agrin und LRP4 eine Rezeptortyrosinkinase namens MusK (muscle specific kinase) aktiviert (Glass, Bowen et al. 1996; Glass and Yancopoulos 1997), was wiederum zur konsekutiven Aktivierung einer Second-messenger-Kaskade führt und darüber letztlich die Clusterung der AChR und anderer postsynaptischer Proteine wie Rapsyn bewirkt (DeChiara, Bowen et al. 1996; Apel, Glass et al. 1997; Finn, Feng et al. 2003; Strochlic, Cartaud et al. 2005; Ghazanfari, Fernandez et al. 2011). Bei diesem Vorgang interagieren MuSK und LRP4 über ihre extrazellulären Domänen miteinander (Zhang, Coldefy et al. 2011). In der embryonalen Synaptogenese stellt dieser Vorgang einen essentiellen Schritt dar.

Eine entscheidende Rolle im Agrin-MuSK-Rapsyn-Signalweg spielt Rapsyn (Receptor associated protein of the Synapse), ein 43 kDa großes Protein, das sich an AChR anlagert und neben der Clusterung auch die Verankerung der AChR an das subsynaptische Zytoskelett der Postsynapse über Dystroglykan vermittelt (Froehner, Luetje et al. 1990; Gautam, Noakes et al. 1995; Cartaud, Coutant et al. 1998; Marangi, Wieland et al. 2002). Für die Rapsyn-Funktionen am AChR wird der Einfluss von Dok-7 (docking protein 7) und LRP4 benötigt (Okada, Inoue et al. 2006; Zhang, Luo et al. 2008).

### **3. Molekulargenetischen Diagnostik eines CMS**

Der klinische Verdacht auf ein CMS lässt sich bei ungefähr der Hälfte der Patienten molekulargenetisch bestätigen. Eine molekulargenetische Diagnose ist insbesondere auch im Hinblick auf eine differenzierte medikamentöse Therapie anzustreben. Bei der molekulargenetischen Testung durch sequentielle Einzelgenanalyse eines Patienten mit

klinischem V.a. CMS wird zunächst schrittweise unter Beachtung der bekannten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei der Erkrankung vorgegangen. Durch eine retrospektive Analyse des Vorgehens bei 680 CMS-Verdachtspatienten aus unserem Münchner Kollektiv konnte von der CMS-Arbeitsgruppe des Friedrich-Baur-Instituts ein Algorithmus zur schrittweisen genetischen Testung bei V.a. CMS vorgeschlagen werden (Abicht, Dusl et al. 2012) (Abb. 1). Die Untersuchung des Patientenkollektivs im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte ebenfalls -soweit möglich- anhand dieses Algorithmus. Neben Ethnizität und Vererbungsmodus sind Informationen über das Vorliegen klinischer Schlüsselbefunde wie Ansprechen auf Cholinesteraseinhibitoren, das Vorliegen eines Gliedergürtelphänotyps, von Kontrakturen, Apnoen und einer Beteiligung der äußeren Augenmuskeln entscheidend.

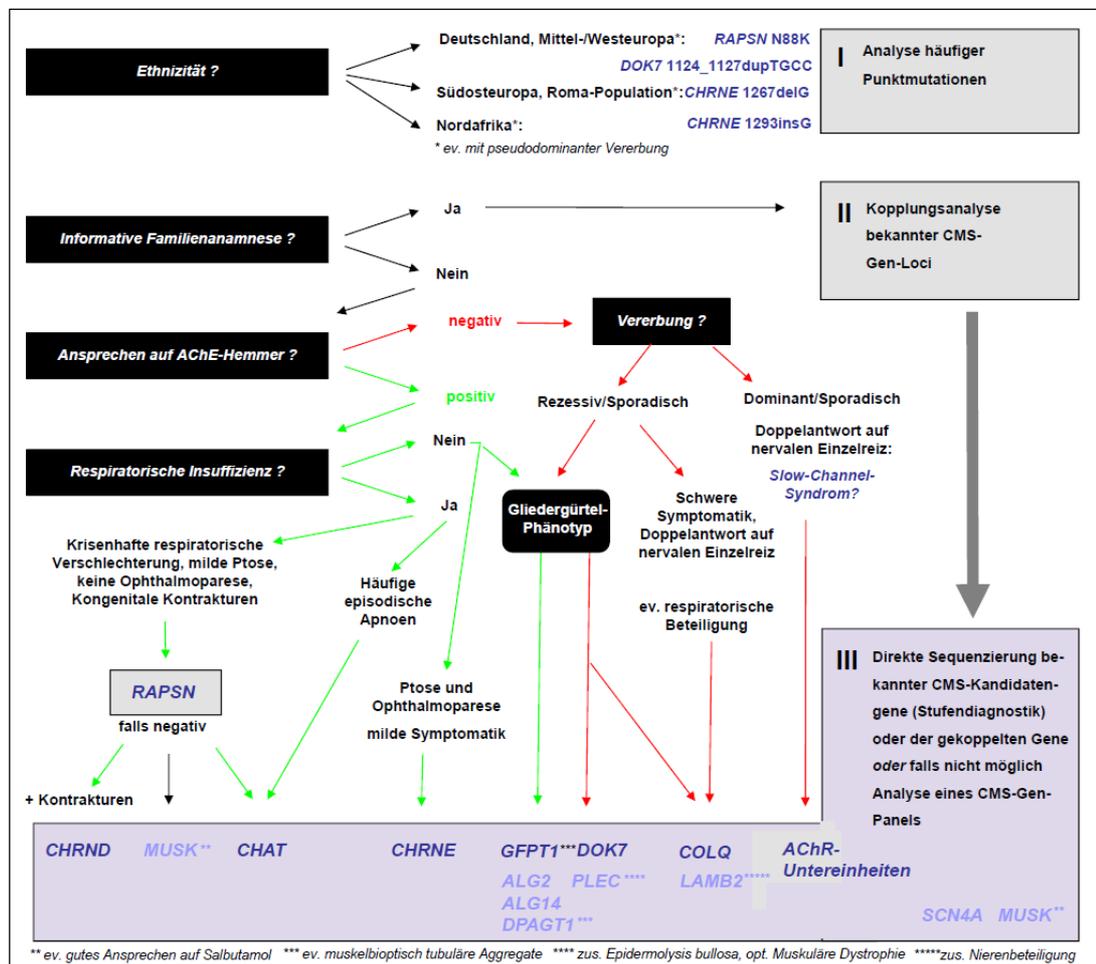


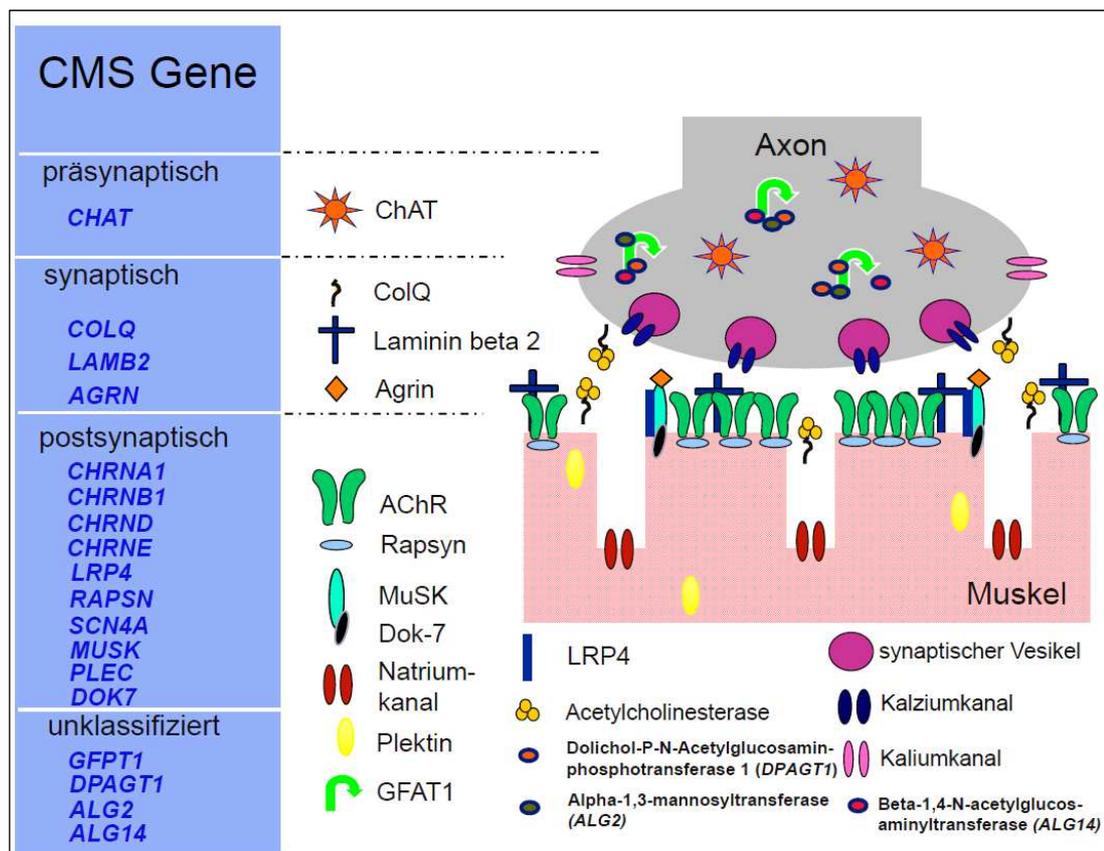
Abb. 1 Algorithmus zum Vorgehen bei der molekulargenetischen Analyse bei Patienten mit V.a. CMS, modifiziert aus Abicht, Dusl et al. „Congenital myasthenic syndromes:

*Achievements and limitations of phenotype-guided gene-after-gene sequencing in diagnostic practice: A study of 680 patients" Hum Mutat 2012 (Abicht, Dusl et al. 2012).*

#### **4. Genetischer Hintergrund der CMS**

In den vergangenen Jahren gelang es, als Ursache von CMS Mutationen in einer Reihe von verschiedenen Genen zu identifizieren, die (fast) alle für Proteine der neuromuskulären Endplatte kodieren (Abb. 2). Zu den bisher identifizierten 18 CMS-Genen gehören das Gen für die präsynaptische Acetylcholintransferase *CHAT* (Ohno, Tsujino et al. 2001), das für den Verankerungsteil der AChE kodierende Gen *COLQ* (Donger, Krejci et al. 1998; Ohno, Brengman et al. 1998; Huze, Bauche et al. 2009), die Gene für die Proteine Agrin (*AGRN*) (Huze, Bauche et al. 2009), LRP4 (*LRP4*) (Ohkawara, Cabrera-Serrano et al. 2013) und Laminin beta 2 (*LAMB2*) (Maselli, Ng et al. 2009), sowie postsynaptisch die Gene für die Untereinheiten des Acetylcholinrezeptors (*CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRND*, *CHRNE*) (Engel, Ohno et al. 1996; Ohno, Wang et al. 1996; Milone, Wang et al. 1997; Nichols, Croxen et al. 1999), für das postsynaptische Protein Rapsyn (*RAPSN*) (Ohno, Engel et al. 2002), Dok-7 (*DOK7*) (Beeson, Higuchi et al. 2006), die Muskel-spezifische Kinase (*MUSK*) (Chevessier, Faraut et al. 2004) und den spannungsabhängigen postsynaptischen Natrium-Kanal Nav 1.4 (*SCN4A*) (Tsujino, Maertens et al. 2003).

Daneben führen Mutationen in *PLEC*-Gen, das für das ubiquitär exprimierte Intermediärfilament-Verbindungsprotein Plectin kodiert, bei einem Teil der Patienten neben einer Epidermolysis bullosa simplex und einer gliedergürtelbetonten Myopathie zu einem myasthenen Syndrom (Forrest, Mellerio et al. 2010; Maselli, Arredondo et al. 2011; Selcen, Juel et al. 2011; Winter and Wiche 2013). Erst kürzlich konnten bei einer Patientengruppe mit gliedergürtelbetontem CMS Mutationen im Gen *GFPT1*, das für die Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Amidotransferase 1 (GFAT1) kodiert, identifiziert werden (Senderek, Muller et al. 2011). Mittels Whole Genome Sequencing konnten vor kurzem Mutationen in weiteren Genen (*DPAGT1*, *ALG2* und *ALG14*), die wie *GFPT1* eine wichtige Rolle bei Glykosylierungsvorgängen spielen, in einer Gruppe von Patienten mit Gliedergürtel-Myasthenie identifiziert werden (Belaya, Finlayson et al. 2012; Cossins, Belaya et al. 2013).



**Abb. 2:** Bekannte CMS-Gene und ihre Genprodukte an der neuromuskulären Endplatte.

Mutationen in diesen Genen finden sich in unterschiedlicher Häufigkeit und sie führen teilweise zu phänotypischen Besonderheiten. Eine klinische Verdachtsdiagnose kann bisher nur bei einem Teil der CMS-Patienten genetisch gesichert werden. So konnte z.B. in unserem Münchener Patientenkollektiv nur bei 299 der 680 untersuchten Patienten (44%) der zugrundeliegende genetische Defekt identifiziert werden (Abicht, Dusl et al. 2012). Am häufigsten wurden hier Mutationen in *CHRNE* gefunden, danach in absteigender Häufigkeit Mutationen in *COLQ*, *RAPSN* und *DOK7*. Grundsätzlich kann in 40-50% der Patienten keine genetische Diagnose gestellt werden (Hantai, Nicole et al. 2013). Da sich Therapie, Prognose und genetische Beratung in Abhängigkeit vom jeweiligen Gendefekt deutlich unterscheiden, hat eine genaue molekulargenetische Klassifizierung eines CMS aber eine direkte klinische Implikation für den einzelnen Patienten. Die Suche nach neuen CMS-Genen und

konsequente Charakterisierung des mit dem genetischen Defekt verbundenen Phänotyps ist somit von zentraler Bedeutung. Im folgenden Abschnitt werden die häufigsten bekannten CMS-Gene und die zugehörigen Phänotypen dargestellt.

## **4.1 Präsynaptische CMS**

### **4.1.1 Mutationen in *CHAT***

Die Resynthese des Neurotransmitters ACh aus Cholin und Acetyl-CoA wird durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) katalysiert. Bei den bekannten Mutationen in *CHAT* handelt es sich um rezessive Loss-of-function Mutationen, die zu einer verminderten Expression, Veränderung der kinetischen Eigenschaften sowie Beeinträchtigung der Stabilität des Enzyms führen können (Ohno, Tsujino et al. 2001; Shen, Crawford et al. 2011). Zwischen der Menge des pro Vesikel gespeicherten ACh und der Miniatur-EPP-Amplitude besteht eine positive Korrelation (Hughes, Kusner et al. 2006), so dass es bei *CHAT*-Mutationen zu einer Verminderung der Amplitude und damit zu einem veränderten „Safety Margin“ bei der postsynaptischen Depolarisation kommt. Klinisch weisen die meisten Patienten mit Mutationen in *CHAT* einen Phänotyp mit krisenhaften Verschlechterung im Rahmen von Infekten oder episodische Apnoen auf (Ohno, Tsujino et al. 2001; Schara, Christen et al. 2010; Shen, Crawford et al. 2011; Engel, Shen et al. 2012; Dilena, Abicht et al. 2013). Die meisten Patienten zeigen ein gutes Ansprechen auf Acetylcholinesterasehemmer (Schara, Christen et al. 2010). Im Anhang findet sich eine Darstellung des *CHAT*-Gens mit den im Patientenkollektiv unserer Arbeitsgruppe bisher identifizierten CMS-Mutationen (Abb.8)

## **4.2 Synaptische CMS**

### **4.2.1 Mutationen in *COLQ***

Das Genprodukt ColQ ist für die Verankerung der AChE in der synaptischen Basalmembran verantwortlich (Kimbell, Ohno et al. 2004). Bei den bisher bekannten *COLQ*-Mutationen handelt es sich um Missense-, Frameshift-, Stop- oder Spleißstellen-Mutationen (Donger, Krejci et al. 1998; Ohno, Brengman et al. 1998; Ohno, Brengman et al. 1999; Ohno, Engel et al. 2000; Shapira, Sadeh et al. 2002; Ishigaki, Nicolle et al. 2003; Muller, Petrova et al. 2004). Ihr Vorliegen führt zu einem Mangel an AChE im synaptischen Spalt, der auch

lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann (Donger, Krejci et al. 1998; Ohno, Brengman et al. 1998; Engel, Ohno et al. 2003). Die AChE-Defizienz resultiert in einer verlängerten Wirkzeit der ACh-Moleküle im synaptischen Spalt. Dies hat eine andauernde Stimulation und konsekutive Desensibilisierung der AChR mit Ausbildung eines Depolarisationsblocks zur Folge. Als Langzeiteffekt kommt es zu einer strukturellen Veränderung der postsynaptischen Membran inklusive AChR und spannungsgesteuerter Natriumkanäle (Engel, Lambert et al. 1977). Klinisch weisen Patienten mit *COLQ*-Mutation oft ein schweres Krankheitsbild auf (Wargon, Richard et al. 2012). Eine Besserung der Symptome lässt sich mit adrenergen Agonisten wie Ephedrin oder Salbutamol sowie 3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP) erzielen, wobei der zugrundeliegende Wirkmechanismus nicht geklärt ist (Guven, Demirci et al. 2012). AChE-Inhibitoren sind bei synaptischen CMS wirkungslos (Bestue-Cardiel, Saenz de Cabezón-Alvarez et al. 2005; Mihaylova, Müller et al. 2008; Liewluck, Selcen et al. 2011).

Im Anhang findet sich eine Darstellung des *COLQ*-Gens mit den im Patientenkollektiv unserer Arbeitsgruppe bisher identifizierten CMS-Mutationen (Abb.9)

### **4.3 Postsynaptische CMS**

Die meisten postsynaptischen CMS-Formen werden durch Mutationen in Genen, die für Untereinheiten des AChR kodieren, verursacht. Diese Mutationen führen entweder zu einer verminderten Oberflächenexpression oder zu veränderten kinetischen Eigenschaften des Rezeptors, wobei der erstgenannte Mutationstyp der häufigere ist. Die kinetischen Mutationen können in dominante, „gain of function“-Mutationen mit verlängerter Kanalöffnungszeit des AChR (sog. „Slow-Channel-Mutationen“) und in rezessive, „loss of function“-Mutationen mit verkürzter Kanalöffnungszeit (sog. „Fast-Channel-Mutationen“) eingeteilt werden.

#### **4.3.1 Mutationen mit verminderter AChR-Expression**

Durch diesen Mechanismus, der morphologisch einen AChR-Mangel bewirkt, werden ungefähr ein Drittel aller CMS-Fälle verursacht, wobei es sich meistens um Mutationen in der Epsilon-Untereinheit handelt (Engel, Ohno et al. 2003; Hantai, Richard et al. 2004).

Mutationen in den anderen AChR-Untereinheiten, die zu einer verminderten Proteinexpression führen, sind seltener, da diese, im Gegensatz zu den Epsilon-Untereinheiten-Mutationen mit funktioneller Expression der fetalen Gamma-Untereinheit und partiellem „Rescue“ des Phänotyps, vermutlich oft bereits intrauterin oder im frühen Säuglingsalter letal sind (Croxen, Young et al. 2001). Der Mangel an AChR führt zu einem erniedrigtem Endplattenpotential und in der Endstrecke zu einer kompensatorischen Steigerung der Dichte der neuromuskulären Endplatten sowie einer vermehrten Freisetzung von ACh in den synaptischen Spalt (Hughes, Kusner et al. 2006).

Auf eine Beschreibung von Slow- und Fast-Channel-Syndromen wird aus Gründen der Übersichtlichkeit an dieser Stelle verzichtet und auf kürzlich veröffentlichte Reviews mit einer ausführlichen Darstellung o.g. CMS-Syndrome verwiesen (Engel 2012; Hantai, Nicole et al. 2013).

#### **4.3.2 Mutationen in *RAPSN***

Das postsynaptische Membranprotein Rapsyn vermittelt neben der Clusterung der AChR auch die Verankerung der Rezeptoren am Zytoskelett der postsynaptischen Membran (Froehner, Luetje et al. 1990; Cartaud, Coutant et al. 1998). Mutationen in *RAPSN* führen durch die herabgesetzte Clusterbildung von AChR mit Rapsyn zu einer verringerten Dichte an AChR (Ohno, Engel et al. 2002). Klinisch imponiert bei diesen Patienten oft ein CMS-Phänotyp mit rezidivierenden Apnoen, bei einigen Patienten bestehen kongenitale Gelenkkontrakturen (Burke, Cossins et al. 2003; Milone, Shen et al. 2009). Die meisten Patienten profitieren von einer Therapie mit AChE-Inhibitoren, des Weiteren zeigt bei einigen Patienten mit *RAPSN*-Mutationen die Gabe von 3,4-DAP einen positiven Effekt (Banwell, Ohno et al. 2004; Milone, Shen et al. 2009).

Im Anhang findet sich eine Darstellung des *RAPSN*-Gens mit den im Patientenkollektiv unserer Arbeitsgruppe bisher identifizierten CMS-Mutationen (Abb.10)

### 4.3.3 Mutationen in *DOK7*

Die Aktivierung von MuSK im Rahmen der Agrin-Signalkaskade wird u.a. von Dok-7 gesteuert (Okada, Inoue et al. 2006). Daneben spielt Dok-7 eine essentielle Rolle in der Synaptogenese und Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Endplatte (Selcen, Milone et al. 2008). *DOK7*-Mutationen führen neben der Zerstörung der Endplatte funktionell in der Endstrecke zu einer reduzierten AChR-Clusterbildung und letztlich zu einer verminderten postsynaptischen Antwort auf ACh (Beeson, Higuchi et al. 2006; Slater, Fawcett et al. 2006). *DOK7*-Mutationen stellen eine relativ häufige Ursache für CMS dar (Beeson, Higuchi et al. 2006; Muller, Herczegfalvi et al. 2007; Palace, Lashley et al. 2007; Anderson, Ng et al. 2008; Ben Ammar, Petit et al. 2010). Am häufigsten wird die Mutation c.1124\_1127dup nachgewiesen (Cossins, Liu et al. 2012). Patienten mit einer *DOK7*-Myasthenie zeigen charakteristischerweise eine Gliedergürtelschwäche, keine Beteiligung der Okulomotorik und in vielen Fällen eine klinische Verschlechterung auf Cholinesterasehemmer, während eine Behandlung mit Ephedrin oder Salbutamol in kleineren Fallserien wirksam war (Lashley, Palace et al. 2010; Liewluck, Selcen et al. 2011; Burke, Hiscock et al. 2013; Lorenzoni, Scola et al. 2013).

Im Anhang findet sich eine Darstellung des *DOK7*-Gens mit den im Patientenkollektiv unserer Arbeitsgruppe bisher identifizierten CMS-Mutationen (Abb.11)

### 4.3.4 Mutationen in *MUSK*

Zu den seltenen genetischen Ursachen eines postsynaptischen CMS gehören Mutationen in *MUSK* (Chevessier, Faraut et al. 2004; Mihaylova, Salih et al. 2009; Maselli, Arredondo et al. 2010; Ben Ammar, Soltanzadeh et al. 2013; Maggi, Brugnoli et al. 2013). MuSK, eine muskelspezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinase, spielt eine Schlüsselrolle im Agrin-MuSK-Rapsyn-Signalweg und ist insbesondere für die Agrin-induzierte Cluster-Bildung von AChR essentiell (Gautam, Noakes et al. 1995; DeChiara, Bowen et al. 1996; Gautam, Noakes et al. 1996).

Bisher konnten Mutationen in *MUSK* weltweit erst in fünf CMS-Familien beschrieben werden und es gibt folglich wenig Erfahrung im Hinblick auf eine effiziente medikamentöse Behandlung. Das *MUSK*-Gen befindet sich auf Chromosom 9q31.3-q32 und besteht aus 14

Exons. Autosomal rezessive Mutationen in *MUSK* wurden 2004 erstbeschrieben von Cheveasier et al. (Cheveasier, Faraut et al. 2004) bei einem einzelnen Patienten mit zwei heteroallelischen Mutationen, und zwar einer Frameshift-Mutation (c.220dupC) sowie einer Missense-Mutation (c.2368G>A/p.Val790Met). Die letztgenannte Mutation wurde außerdem zusammen mit der Frameshift-Mutation c.467delA/p.Lys156Argfs\*20 heterozygot in einer italienischen CMS-Familie mit sehr variablem Phänotyp identifiziert (Maggi, Brugnoli et al. 2013). Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich eine homozygote Missense-Mutation c.1031C>G/p.Pro344Arg als CMS-Ursache bei fünf Patienten aus einer konsanguinen sudanesischen Familie identifizieren (Mihaylova, Salih et al. 2009). Ferner wurden von Maselli et al. bei einer schwer betroffenen CMS-Patientin zwei Missense-Mutationen (p.Met605Ile und p.Ala727Val) in *MUSK* gefunden (Maselli, Arredondo et al. 2010). Ben Ammar et al. identifizierten kürzlich eine weitere Mutation p.Met835Val mit schwerem Phänotyp (Ben Ammar, Soltanzadeh et al. 2013).

#### **4.4 Weitere CMS-Gene**

Zu den seltenen und zum Teil erst kürzlich entdeckten Ursachen eines CMS gehören Mutationen in *SCNA4*, ein für einen spannungsabhängigen Natriumkanal (Nav 1.4) kodierendem Gen (Tsujino, Maertens et al. 2003), im *AGRN*-Gen (Huze, Bauche et al. 2009; Maselli, Fernandez et al. 2011), im *LAMB2*-Gen (Maselli, Ng et al. 2009) und im *PLEC*-Gen, das für das Protein Plectin kodiert (Banwell, Russel et al. 1999; Forrest, Mellerio et al. 2010; Maselli, Arredondo et al. 2011; Selcen, Juel et al. 2011).

### **5. Mutationen in *GFPT1*: Glykosylierungsstörung als neuer CMS-**

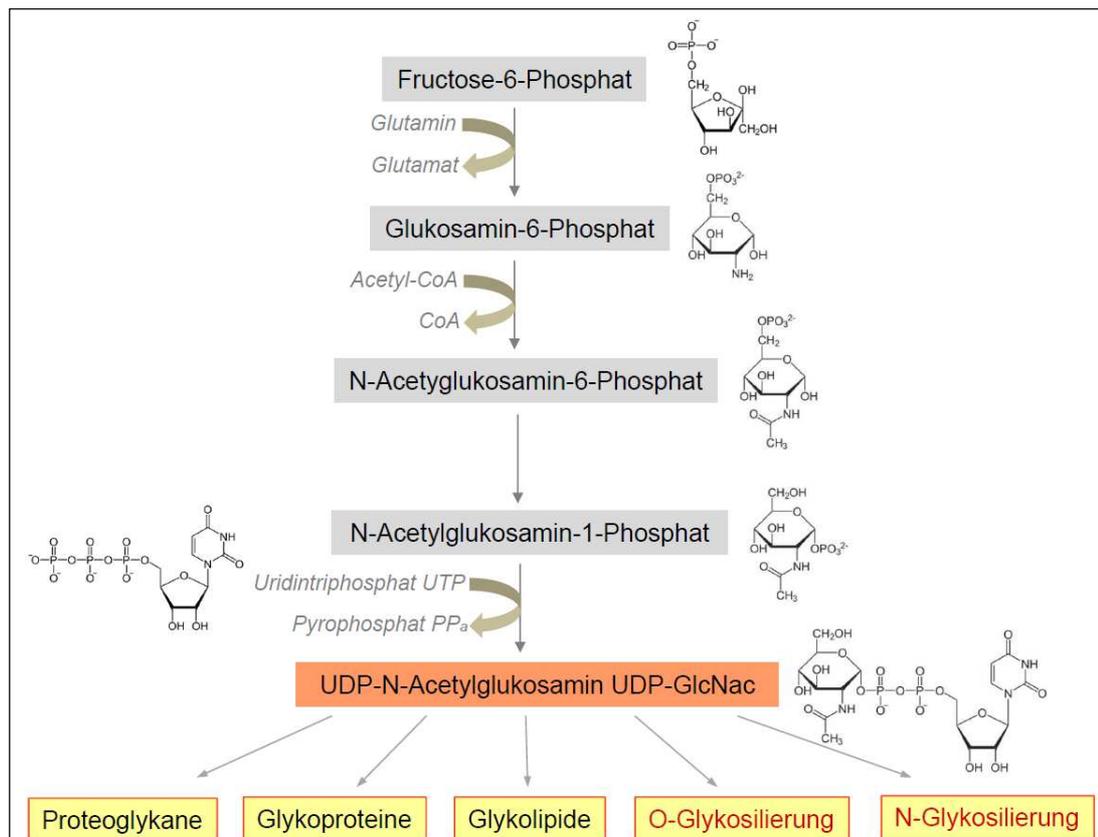
#### **Pathomechanismus**

Zusätzlich zu den oben genannten, teilweise bereits einige Jahre bekannten CMS-ursächlichen Genen, konnte kürzlich ein neues CMS-Gen identifiziert werden, das einen völlig neuen Pathomechanismus für CMS aufdeckte: Bereits seit längerem ist eine distinkte CMS-Unterform mit Gliedergürtelbetonung bekannt (McQuillen 1966). Im Gegensatz zu anderen CMS-Unterformen liegt keine oder nur eine geringe Beteiligung der okulofazialen Muskulatur vor, so dass insbesondere die Abgrenzung zu einer Muskeldystrophie oder Myopathie vom Gliedergürteltyp klinisch schwierig ist. Bei einer Reihe dieser Patienten

wurden zunächst Mutationen im *DOK7*-Gen beschrieben (Muller, Herczegfalvi et al. 2007; Palace, Lashley et al. 2007; Selcen, Milone et al. 2008; Ben Ammar, Petit et al. 2010). Auch Patienten mit Mutationen im *COLQ*-Gen wurden unter dem Bild eines Gliedergürtelphänotyps beschrieben (Mihaylova, Muller et al. 2008; Wargon, Richard et al. 2012). In einer speziellen Untergruppe, die durch das Vorliegen tubulärer Aggregate in der Muskelbiopsie und ein gutes Ansprechen auf Acetylcholinesterase-Hemmstoffe charakterisiert ist, war jedoch bis vor kurzem keine molekulargenetische Ursache bekannt. Auf dem Boden einer genomweiten Linkage-Analyse in einer großen Familie konnten dann jedoch in 13 Familien unterschiedlicher Ethnizität insgesamt 18 krankheitsursächliche Mutationen im Gen *GFPT1* identifiziert werden (Senderek, Muller et al. 2011). Interessanterweise handelt es sich hierbei um ein Gen, das für ein Protein aus einem Stoffwechselweg kodiert, der bislang nicht mit Erkrankungen der neuromuskulären Transmission in Verbindung gebracht wurde. Das Gen *GFPT1* kodiert für die Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Amidotransferase 1 (GFAT1), die das Schlüsselenzym der Hexosamin-Biosynthese darstellt (Abb. 3). Die Produkte des Hexosamin-Pathways sind essentielle Vorstufen für posttranslationale Glykosylierungsvorgänge und somit von großer Bedeutung für die Herstellung von Glykoproteinen, Glykolipiden und Proteoglykanen.

Die Glykosylierung von Proteinen kann hierbei als N- oder O-Glykosylierung erfolgen (Love and Hanover 2005). Der Pathomechanismus, über den *GFPT1*-Mutationen zu einer Störung der neuromuskulären Transmission führen, ist bisher ungeklärt. In Zebrafisch-Embryonen zeigten sich bei Downregulation des *GFPT1*-Orthologs Veränderungen des Muskelfaseraufbaus und Beeinträchtigungen bei der Entwicklung neuromuskulärer Synapsen (Senderek, Muller et al. 2011). Von Guerguelcheva et al. konnte kürzlich der CMS-Phänotyp bei *GFPT1*-Mutationen bzgl. Klinik, Elektrophysiologie, Muskelbiopsiebefund

und Therapieansprechen weiter charakterisiert werden (Guerguelcheva, Muller et al. 2011).



**Abb. 3:** Vereinfachte Darstellung der Hexosamin-Biosynthese, modifiziert aus Senderek et al., 2011 (Senderek, Muller et al. 2011).

Mit Mutationen in *GFPT1* wurden Defekte des Hexosaminstoffwechsels bzw. der Glykobiologie an der neuromuskulären Endplatte als völlig neuer Pathomechanismus für eine Störung der neuromuskulären Erregungsübertragung identifiziert. Der Hexosaminstoffwechselweg beinhaltet neben GFAT eine Reihe weiterer Enzyme, deren kodierende Gene alle potentielle Kandidatengene für CMS darstellen. Einige dieser Kandidatengene wurden im Rahmen der vorgelegten Arbeit auf krankheitsursächliche Mutationen bei einer Kohorte von Patienten mit klinisch dringendem V.a. CMS mit Gliedergürtelbeteiligung bzw. dem Vorliegen eines ungewöhnlichen Phänotyps untersucht.

## 6. Mutationen in *DPAGT1*, *ALG2* und *ALG14*

Diese neu entdeckte Bedeutung von Glykosylierungsvorgängen für eine regelrechte Funktion der neuromuskulären Transmission wird untermauert durch die erst kürzlich erfolgte Identifikation von Mutationen in *DPAGT1*, *ALG2* und *ALG14* als Ursache eines CMS (Belaya, Finlayson et al. 2012; Belaya, Finlayson et al. 2012; Cossins, Belaya et al. 2013). Die entsprechenden Enzyme *DPAGT1* (Dolichyl-Phosphat-(UDP-N-Acetylglukosamin)-N-acetylglukosaminphosphotransferase 1), *ALG2* (Alpha-1,3-mannosyltransferase) und *ALG14* (Beta-1,4-N-acetylglukosaminyltransferase) spielen eine wichtige Rolle bei N-Glykosylierungsvorgängen von Proteinen (Huffaker and Robbins 1983; Jackson, Kukuruzinska et al. 1993; Gao, Tachikawa et al. 2005; Gao, Moriyama et al. 2008; Bretthauer 2009; Lu, Takahashi et al. 2012).

Die o.g. Mutationen konnten mittels Whole Genome-Sequenzierung in drei Familien mit im Vordergrund stehender Gliedergürtel- bzw. proximaler Schwäche bei gleichzeitig nur sehr milder bis fehlender kraniobulbärer Symptomatik nachgewiesen werden. Patienten mit *DPAGT1*-assoziiertem CMS sprachen gut auf Pyridostigmin und 3,4-DAP an, bei Patienten mit *ALG2* und *-14*-CMS zeigte sich eine z.T. hervorragende Langzeitwirkung von AChE-Hemmern (Basiri, Belaya et al. 2013; Finlayson, Palace et al. 2013). Insgesamt ähneln sich die Phänotypen der publizierten *GFPT1*- und *DPAGT1*-positiven Patienten, so fand sich z.B. bei allen muskelbiopsierten *DPAGT1*-CMS-Fällen das Vorliegen von tubulären Aggregaten (Belaya, Finlayson et al. 2012; Ohno 2013). Sämtliche mit CMS assoziierte Glykosylierungsgene werden ubiquitär exprimiert.

## 7. Grundlegendes zu Glykosylierungsvorgängen

Unter Glykosylierung, die eine der wichtigsten Formen der posttranslationalen Modifikationen darstellt, versteht man das Anhängen von Zuckermolekülen an Proteine oder Lipide. Knapp 1% der Säugetier-Gene, die dann meist für Glykosyltransferasen und Glykosidasen kodieren, spielen eine Rolle bei Synthese und Modifikation der angehängten Zuckerketten, die als Glykane bezeichnet werden (Lowe and Marth 2003). Protein-Glykosylierung kann über eine O- oder N-glykosidische Bindung erfolgen. Für beide Glykosylierungsarten ist das Vorliegen des Endprodukts des Hexosamin-Stoffwechselweges UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) erforderlich (Love and Hanover 2005). Dieses

Zuckernukleotid fungiert als ein möglicher Zuckerdonor bzw. als Substrat für N- oder O-Glykosylierungsvorgänge.

Bei der N-Glykosylierung, die im endoplasmatischen Retikulum und nachgeschaltet im Golgi-Apparat stattfindet, wird ein Zuckerrest mit dem Stickstoff der freien Säureamidgruppe von einem Asparagin verknüpft (Lowe and Marth 2003). Die bereits erwähnten Gene *DPAGT1*, *ALG2* und *ALG14* kodieren hierbei für Enzyme, die die ersten Schritte der N-Glykosylierung katalysieren, wobei UDP-GlcNAc das Substrat für *DPAGT1* darstellt (Gao, Tachikawa et al. 2005; Gao, Moriyama et al. 2008; Bretthauer 2009; Lu, Takahashi et al. 2012). Eine Vielzahl von Zellmembran- oder sekretorischen Proteinen liegt N-glykosyliert vor. Die N-Glykosylierung scheint für die korrekte Faltung von Proteinen und deren Transport an die Zelloberfläche eine besonders wichtige Rolle zu spielen (Moremen, Tiemeyer et al. 2012; Bonnemaïson, Eipper et al. 2013).

Neben der „klassischen“ N-Glykosylierung von Zelloberflächen- oder sekretorischen Proteinen existiert noch die „nicht-klassische“ O-Glykosylierung durch Modifikation nukleärer oder zytoplasmatischer Proteine (Torres and Hart 1984). Bei der O-Glykosylierung, die im Golgi-Apparat erfolgt, werden Zucker an die Hydroxygruppe eines Serins, Threonins, Hydroxyprolins oder Hydroxylysins angehängt (Moremen, Tiemeyer et al. 2012). Die O-Glykosylierung ist im Gegensatz zur N-Glykosylierung reversibel. Sie ist im Wesentlichen auf Proteine im Zytoplasma und Zellkern (Hart, Housley et al. 2007) sowie in den Mitochondrien (Hu, Suarez et al. 2009) beschränkt. Die Signifikanz der O-Glykosylierung ist noch nicht ausreichend aufgeklärt, aber es gibt Hinweise, dass Defekte in der O-Glykosylierung für menschliche Erkrankungen sehr relevant sein könnten. So konnte ein vermehrtes Vorkommen O-glykosylierter Proteine mit neurodegenerativen Erkrankungen und Insulinresistenz in Verbindung gebracht werden (Wells, Vosseller et al. 2003).

Glykosylierungsvorgänge spielen bei einer Reihe von bedeutsamen physiologischen Prozessen eine Rolle (Hauptle and Hennet 2009; Larkin and Imperiali 2011). Glykosylierung schützt beispielsweise Proteine vor Degradation durch Stress-induzierte Apoptose (Ngoh, Hamid et al. 2009; Zachara, Molina et al. 2011). Glykosylierte Proteine sind an der Regulation von intrazellulären Signalwegen und der Transkriptionskontrolle

beteiligt und spielen eine wichtige Rolle im Ubiquitin-Proteasom-System. Auch nukleäres Chromatin liegt durch O-GlcNAc modifiziert vor (Kelly and Hart 1989; Sakabe, Wang et al. 2010). Eine ausbleibende Glykosylierung kann zur Fehlfaltung von Proteinen führen und die Affinität des Glykoproteins für Bindungspartner beeinflussen. Beim Proteintargeting steuern Zuckermotive außerdem den korrekten Transport eines Glykoproteins an die Zellmembran oder in den Extrazellularraum (Hanisch 2001). In Zellmembranen eingebaute Glykane erhalten Membranstabilität und -integrität und erfüllen Funktionen bei der Zell-Zell-Interaktion. Rezeptorproteine an Zelloberflächen sind im Allgemeinen glykosyliert. Physiologischerweise wird u.a. die Blutgruppe durch das Glykosylierungsmuster von Oberflächenmolekülen auf Erythrozyten determiniert.

Das Endprodukt des Hexosamin-Stoffwechselweges UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) wird zur Herstellung von Glykosaminoglykanen (GAG) benötigt. Diese sind aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die jeweils wiederum aus einer Uronsäure und einem Aminozucker wie N-Acetylglukosamin bestehen, aufgebaut. Zu den GAG zählen u.a. die Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat, Keratansulfat, Heparin und Heparansulfat, die wiederum von Bedeutung als Bestandteil von Gelenkknorpel und Gelenkschmiere, bei der Wundheilung und der Blutgerinnung sind. Proteoglykane entstehen bei der Bindung eines GAG an ein Protein (Varki, Freeze et al. 2009; Varki and Lowe 2009).

## **8. Vererbte und erworbene Glykosylierungsstörungen**

Glykosylierungsstörungen spielen eine ursächliche Rolle bei einer Reihe von Erkrankungen, wobei bei den meisten bisher bekannten Krankheiten die N-Glykosylierung gestört ist (Jaeken and Matthijs 2007; Haeuptle and Hennet 2009; Hennet 2012). Störungen der N-Glykosylierung können mittels isoelektrischer Fokussierung von Serum-Transferrin relativ einfach diagnostiziert werden. Möglicherweise wird deshalb die Häufigkeit und Bedeutung von O- und anderen Glykosylierungsstörungen unterschätzt.

Veränderungen der Glykosylierung oder der Erkennung von Glykanen spielen eine Rolle bei einer Reihe von internistischen Erkrankungen wie z.B. bei der IgA-Nephropathie, bei endokrinologischen Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus, kardiovaskulären, rheumatologischen und einer Reihe weiterer Krankheiten (Varki and Freeze 2009).

Glykosylierungsstörungen sind auch in der Tumorigenese von Bedeutung: Hier kommt es als Folge der neoplastischen Transformation in Tumorzellen bzw. deren Vorstufen zu charakteristischen Veränderungen von Glykokonjugaten der Zellmembran, wobei die genauen funktionellen Konsequenzen dieser spezifischen Veränderungen noch unklar sind. Die veränderte Glykosylierung scheint einen Einfluss auf die Eigenschaften des Tumors z.B. das Tumorwachstum, Invasionsverhalten und Metastasierung zu haben und das Vorkommen bestimmter Glykanstrukturen kann als Marker der Tumorprogression dienen (Varki, Kannagi et al. 2009; Dall'Olio, Malagolini et al. 2012).

Zu den klassischen hereditären Glykosylierungsstörungen gehören die sog. angeborenen Erkrankungen der Glykosylierung (Congenital disorders of glycosylation, (CDG)), die kongenitale dyserythropoetische Anämie Typ II (Congenital Dyserythropoietic Anemia Type II (CDA-II)), die Erkrankungsgruppe der Galaktosämien und Erkrankungen mit Defekten in der Proteoglykansynthese, wie z.B. das Ehlers-Danlos-Syndrom. Mit Ausnahme der erst kürzlich entdeckten CMS-assoziierten Glykosylierungsgene wurde bei keiner der vielen Formen der CDG eine im Vordergrund stehende oder gar isoliert vorliegende klinische Symptomatik, die auf eine neuromuskuläre Transmissionsstörung hindeuten könnte, beschrieben (Hennet 2012). In den meisten Fällen handelt es sich bei den CDG um schwerwiegende multisystemische Erkrankungen, nebenbefundlich wird häufig vom Vorliegen einer mehr oder minder ausgeprägten muskulären Hypotonie berichtet.

Auch neuromuskuläre Erkrankungen, die mit einer Glykosylierungsstörung einhergehen, sind bekannt: Dazu gehören bestimmte Formen der kongenitalen Muskeldystrophie mit verminderter Glykosylierung des Proteins alpha-Dystroglykan und die vererbte Einschlußkörpermyopathie Typ II (HIBM2) mit Mutationen im UDP-N-Acetylglukosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase-Gen (*GNE*), das für ein Enzym im Biosyntheseweg der Sialinsäure kodiert (Martin and Freeze 2003; Varki and Freeze 2009; Varki, Freeze et al. 2009; Varki and Lowe 2009; Hennet 2012; Woods, Woods et al. 2012).

## **9. Vorkommen glykosylierter Proteine an der Endplatte**

Viele Proteine an der neuromuskulären Endplatte liegen in glykosylierter Form vor, zudem finden sich dort spezifische Glykane und zwar insbesondere N-Acetylgalaktosamine

(GalNAc) in hoher Konzentration (Sanes and Lichtman 2001; Martin 2002). Diese Glykosylierung ist hierbei eng mit einer korrekten Funktion der entsprechenden Proteine verknüpft. Zu den glykosylierten Proteinen gehören u.a. sämtliche Untereinheiten des AChR, Agrin, MuSK, LRP4, Perlecan und alpha-Dystroglykan (Gehle, Walcott et al. 1997; Martin 2003; Hoshi, Tezuka et al. 2013). Wie bereits beschrieben spielen diese Proteine eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Integrität und Funktion der neuromuskulären Synapse (Haltiwanger and Lowe 2004; Herbst, Iskratsch et al. 2009). So konnte z.B. von Herbst et al. bei Glykosyltransferase-defizienten Mäusen eine abnormale Ausbildung und beeinträchtigte Aufrechterhaltung der Synapsenstruktur an der Endplatte nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise darauf, dass der Glykosylierungsstatus von MuSK und Agrin Einfluss auf deren Proteinfunktion an der neuromuskulären Synapse hat (Parkhomovskiy and Martin 2000; Watty and Burden 2002; Xia and Martin 2002). Auch für den nach der Assemblierung im rauen endoplasmatischen Retikulum erfolgenden Transport und Einbau der AChR in die Plasmamembran der Muskelzelle scheint die Glykosylierung der Rezeptoruntereinheiten essentiell zu sein (Nomoto, Takahashi et al. 1986; Gehle and Sumikawa 1991; Gehle, Walcott et al. 1997; Wanamaker, Christianson et al. 2003).

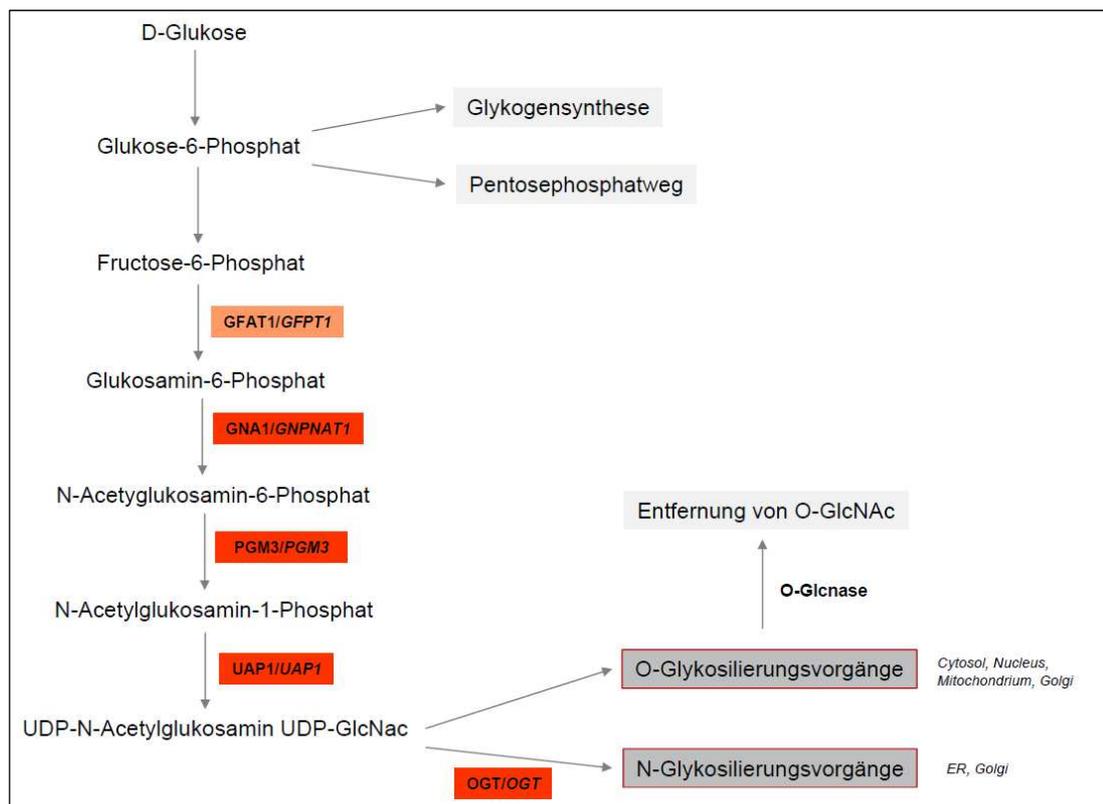
## **10. Identifikation neuer Kandidatengene für CMS: *GNPNATI*, *PGM3*, *UAPI* und *OGT***

Die kürzlich in Glykosylierungsgenen identifizierten CMS-Mutationen rücken neuromuskuläre Glykosylierungsvorgänge in den Fokus, auch wenn der zugrundeliegende Pathomechanismus bislang nicht geklärt wurde und geben Anlass zur weiteren Erforschung der neuromuskulären Glykobiologie. Hieraus ergab sich der Anstoß zur Analyse weiterer Gene des Hexosamin-Stoffwechselweges im Rahmen dieser Arbeit.

### **10.1 *GNPNATI***

Im Hexosamin-Stoffwechselweg nachgeschaltet findet sich als nächstes Enzym nach GFAT1 die Glukosamin-6-Phosphat N-Acetyltransferase (GNA1) (Abb. 4), die vom Gen *GNPNATI* auf dem humanen Chromosom 14 kodiert wird. Das Haupttranskript von *GNPNATI* besteht aus fünf Exons und es gibt Hinweise auf das Vorliegen alternativer Spleißvarianten. GNA1 wandelt durch Übertragung einer Acyl-Gruppe Glukosamin-6-Phosphat (GlcN6P) in N-Acetylglukosamin-6-Phosphat (GlcNAc-6P) um. GNA1 ist wesentlich für die

Aufrechterhaltung und Regulierung der intrazellulären Konzentration von UDP-GlcNAc (Boehmelt et al., 2000). Das murine orthologe Enzym zu GNA1, EMeg32, ist mit Golgi- und endosomalen Membranen assoziiert und bildet einen Komplex mit VCP („valosin containing protein“), einer ATPase, die eine wichtige Rolle bei Membranfusionsvorgängen während der Mitose spielt (Boehmelt et al., 2000). Homozygote Knock-Out-Mäuse für EMeg32 sterben bereits in der Embryonalphase ab. EMeg32-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF) zeigen eine verminderte Proliferation, die mit dem Ausmaß der reduzierten intrazellulären UDP-GlcNAc-Konzentration korreliert. Die Zugabe von GlcNAc oder Reexpression von EMeg32 führt zu einer Normalisierung der UDP-GlcNAc-Konzentration bei EMeg32-Knockout-MEFs und zu einem „Rescue“ der zuvor beobachteten biologischen Defekte. Im nachgeschalteten Stoffwechselweg kam es bei EMeg32-defizienten MEF außerdem zu Abweichungen insbesondere bei der zytosolischen O-Glykosylierung. Des Weiteren scheint intrazelluläres UDP-GlcNAc zelluläre Signalkaskaden bzgl. Proliferation und Apoptose zu beeinflussen, da MEF-Mutanten unempfindlich gegenüber einer Reihe von apoptotischen Stimuli sind und aktivierte Proteinkinase B (PKB) exprimieren, die eine entscheidende Rolle in der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Wachstum, Zellproliferation, Zellzyklus und Stoffwechsel spielt.



**Abb. 4** Darstellung der einzelnen Schritte des Hexosaminstoffwechsels. Die Bausteine für die UDP-GlcNAc-Synthese werden mit der Nahrung aufgenommen. Dazu gehören die Aminosäure Glutamin, das aus der Fettsäureoxidation in Mitochondrien gewonnene Acetyl-Coenzym A, Glukose und Uridin, ein Nukleosid bestehend aus Uracil und einem D-Ribose-Molekül. Glutamin ist die am häufigsten im Muskelgewebe vorkommende Aminosäure. Glukose gelangt in die Zelle und wird zunächst in Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Glukose-6-Phosphat wird dann hauptsächlich in die Glykogen-Synthese oder in den Pentosephosphatweg eingeschleust. Zwischen 2 und 5 % des im nachfolgenden Schritt entstandenen Fructose-6-Phosphat fließen in den Hexosaminstoffwechselweg, wo zunächst eine Umwandlung in Glukosamin-6-Phosphat durch das geschwindigkeitsbestimmende Enzym GFAT erfolgt. Die Regulation von GFAT erfolgt zum einen über eine negative Rückkopplung durch UDP-GlcNAc mit kompetitiver Hemmung, zum anderen durch Phosphorylierung (Love and Hanover 2005).

## 10.2 *PGM3*

*PGM3* kodiert für die Phosphoglukomutase 3 (PGM3) und befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 6. *PGM3* besteht aus 15 Exons, es existieren mindestens fünf verschiedene Spleißvarianten. Im Mausmodell ist ein komplettes Fehlen von PGM3-Aktivität bereits vor der Implantation letal (Greig et al., 2007). Tiere mit erniedrigter Enzymaktivität sind steril, weisen Pankreasveränderungen auf und zeigen eine Trizytopenie. Die Funktion bestimmter Proteine und damit auch bestimmter Zelltypen scheint besonders vulnerabel für eine Verminderung der PGM3-Aktivität zu sein. Eine besonders hohe Expression findet sich in Pankreas, Herz, Leber und Plazenta, während die Expression im Gehirn, Skelettmuskel und Nieren gering ist. Interessanterweise konnte vor kurzem das Vorliegen einer heteroallelischen Missense- und Spleißstellen-Mutation im Phosphoglukomutase 1 (*PGM1*)-Gen, das ein Homolog zum *PGM3*-Gen darstellt, als Ursache für eine Glykogenose mit Skelettmuskelbeteiligung identifiziert werden (Stojkovic, Vissing et al. 2009).

## 10.3 *UAPI*

Der letzte Schritt der UDP-GlcNAc-Biosynthese wird von dem Enzym UDP-N-Acetylglukosamin-Pyrophosphorylase 1 katalysiert (Mio, Yabe et al. 1998). Das Enzym, das vom Gen *UAPI* (synonym: *AGX1*) kodiert wird und zwei Hauptisoformen (*AGX1*, *AGX2*) hat, wird weithin exprimiert. *UAPI* hat 10 Exons und ist auf dem langen Arm von Chromosom 1 lokalisiert. Hierbei kommt die Isoform *AGX1* hauptsächlich in Hodengewebe, die zweite Isoform *AGX2* in somatischen Geweben wie Plazenta, Muskel und Leber vor. Isoform *AGX1* hat eine 2-3-fach höhere Aktivität für GalNAc-1-P (N-Acetylgalaktosamin 1-Phosphat), während die Isoform *AGX2* eine 8fach höhere Aktivität für GlcNAc-1 hat.

## 10.4 *OGT*

Das Enzyme O-GlcNAc-Transferase (*OGT*) katalysiert die Übertragung von O-GlcNAc auf Serin- oder Threonin-Reste von einer Vielzahl von Substrat-Proteinen (Jinek, Rehwinkel et al. 2004; Vocadlo 2012). Das für das Enzym kodierende *OGT*-Gen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert, beinhaltet 23 kodierende Exons und insgesamt >45 Kb der genomischen DNA. Das Enzym besteht aus einer N-terminalen Zielsignal-Region, einer Tetratricopeptid-(TRP)-Domäne, einem Verbindungssegment und einer C-terminalen

katalytischen Domäne (Shafi, Iyer et al. 2000; D'Andrea and Regan 2003; Jinek, Rehwinkel et al. 2004). Zahlreiche nicht-kodierende und mindestens fünf kodierende Transkripte sind bekannt. Es existieren somit zahlreiche Isoformen, die wahrscheinlich auf unterschiedliche Weise der Zelle eine Kontrolle über die Regulierung bestimmter Proteine durch posttranslationale Modifikation erlauben (Hanover, Yu et al. 2003). Bisher konnten drei Haupttranskripte, die für verschiedene OGT-Isoformen kodieren, genauer charakterisiert werden. Diese Isoformen beinhalten identische katalytische Domänen, unterscheiden sich jedoch in der Anzahl der TRP-Motive (Hanover, Yu et al. 2003; Love, Kochan et al. 2003). Die Übertragung von O-GlcNAc stellt wie die Proteinphosphorylierung einen Mechanismus der posttranslationalen Modifikation dar. Während es für letztgenannten Mechanismus eine Vielzahl von Kinasen und Phosphatasen gibt, sind für die Steuerung dieser O-GlcNAcylierung bisher nur zwei Enzyme, und zwar die bereits beschriebene OGT und die O-GlcNAcase (OGA), die für die Entfernung von O-GlcNAc zuständig ist, bekannt (Abb. 4) (Butkinaree, Park et al. 2010). Mittlerweile hat sich gezeigt, dass Phosphorylierung und Glykosylierung mittels Anhängen eines O-GlcNAc zwei eng miteinander verknüpfte Prozesse darstellen, die sich gegenseitig beeinflussen (Love and Hanover 2005; Zeidan and Hart 2010). Daneben konnte in Synaptosomen in terminalen Nervenendigungen von Rattenhirnen eine hohe Expression und Aktivität von OGT und OGA nachgewiesen werden, was zu der Annahme einer gewissen Bedeutung der Enzymfunktion für Neurone führt (Cole and Hart 2001). Dies und die hohe Konservierung des *OGT*-Gens heben die Bedeutung der OGT-Enzymfunktion hervor.

Die kodierenden Exons sämtlicher Gene, die für GFAT-nachgeschaltete Enzyme im Hexosaminstoffwechselweg kodieren (mit Ausnahme von OGA), wurden als mögliche CMS-Kandidatengene identifiziert und im Rahmen dieser Arbeit an einer großen Gruppe von bisher genetisch ungeklärten CMS-Patienten mit Gliedergürtelbeteiligung bzw. mit ungewöhnlichem Phänotyp molekulargenetisch untersucht.

### **III. Zielsetzung**

Zielsetzung dieser Promotionsarbeit war es, eine Kohorte von CMS-Patienten mit dem Phänotyp einer Gliedergürtelbeteiligung und weitere Patienten mit ungewöhnlichem Phänotyp, die bislang genetisch ungeklärt waren, auf krankheitsrelevante Mutationen in selteneren CMS-Genen und neuen Kandidatengenen zu untersuchen und den Phänotyp dieser Patienten zu charakterisieren.

## **IV. Material und Methoden**

### **1. Patienten**

Patientenmaterial (venöses EDTA-Vollblut, isolierte genomische DNA oder Muskelgewebe) stammte z.T. aus dem Friedrich-Baur-Institut an der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, z.T. wurde das Material von verschiedenen Kliniken aus Deutschland und aus dem Ausland zur molekulargenetischen Untersuchung eingesandt. Die Erfassung der klinischen Daten der Patienten erfolgte standardisiert mittels eines Fragebogens (siehe Anhang). Ergänzend wurde bei einem Teil der Patienten auch Material (venöses EDTA-Vollblut oder isolierte genomische DNA) von deren Angehörigen sowie von gesunden Probanden als Normalkontrollen untersucht. In allen Fällen lag eine Zustimmung des Patienten bzw. dessen Erziehungsberechtigten vor. Ein positives Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München liegt ebenso vor (Projektnummer: 084/00).

### **2. DNA-Extraktion**

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte aus Vollblut unter Verwendung des Promega Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim) entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

### **3. RNA-Extraktion aus Muskelgewebe**

Aus Muskelgewebe, das durch eine offene Muskelbiopsie gewonnen wurde, wurde die gesamtzelluläre RNA extrahiert. Es wurde entsprechend einem Standardprotokoll für die Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform Methode nach Chomczyński und Sacchi vorgegangen (Ribaldo, Gilman et al. 2001). Dabei erfolgte zunächst der Gewebeaufschluss durch feines Mörsern einer linsengroßen, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Muskelprobe auf Trockeneis. Nach Zugabe von  $500\ \mu\text{l}$  Guanidiniumthiocyanatlösung (TRIzol®-Reagent, Invitrogen) wurde die Probe mittels eines Homogenisators homogenisiert. Die festen Bestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand einer sauren Phenolbehandlung unterzogen und schließlich mit Isopropanol gefällt. Die weitere RNA-Extraktion erfolgte mittels des RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers.

## **4. Polymerasekettenreaktion**

### **4.1. Prinzip der PCR**

Die von Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR) erlaubt es, *in vitro* definierte DNA-Stücke exponentiell zu vermehren (Mullis 1990). Die Methode basiert auf drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten. Zunächst erfolgt die Denaturierung des DNA-Doppelstranges durch Hitze, wobei der Doppelstrang der Matrizen-DNA in die beiden Einzelstränge aufgetrennt wird. Hierauf folgt die Anlagerung von Oligonukleotiden („Annealing“). Dabei hybridisieren die Primer, die den zu untersuchenden DNA-Bereich am 3'- und 5'-Ende flankieren, mit ihrer komplementären Sequenz. Abschließend folgt die enzymatische Verlängerung der DNA-Einzelstränge („Extension“) mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*). Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Schritte erfolgt eine exponentielle Vermehrung des zu untersuchenden DNA-Abschnittes.

Mittels dieses Verfahrens wurden in den untersuchten bekannten CMS-Genen kodierende und nicht-kodierende Exons, bei den untersuchten Kandidatengen des Hexosaminstoffwechselweges nur die kodierenden Exons sowie flankierende intronische Regionen amplifiziert.

### **4.2 PCR-Primer**

Das Primerdesign erfolgte basierend auf der in der Genbank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> veröffentlichten Sequenzen der zu untersuchenden Gene unter Zuhilfenahme der Primer-Design-Tools „ExonPrimer“ des Instituts für Humangenetik der Technischen Universität München (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>) oder von „Primer-BLAST“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Die Synthese erfolgte durch die Firma Metabion (Martinsried). Eine Liste der verwendeten Primer findet sich im Anhang.

### 4.3 PCR-Reaktionsbedingungen

#### Standard-PCR Protokoll:

Ein typischer PCR-Ansatz mit 50 µl Reaktionsvolumen enthielt:

- 5 µl Reaktionspuffer 10x (ThermoPol Buffer, New England Biolabs)
- 50 pmol sense Primer
- 50 pmol antisense Primer
- dNTP-Mix (MBI Fermentas), Endkonzentration 0,25 mMol je dNTP
- 100-500 ng genomische DNA
- 2,5 Units Taq DNA-Polymerase
- H<sub>2</sub>O ad 50 µl Gesamtvolumen

Ein typisches PCR-Programm umfasste:

1. Denaturierung der DNA	95°C: 120 sec	
2a. Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge	95°C: 15 sec	40 Zyklen
2b. Anlagern der Primer (Annealing)	59°C: 60 sec	
2c. Synthese des DNA-Doppelstranges (Extension)	72°C: 120 sec	
3. Abschließende Extension	72°C: 7 min	

Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen erfolgte z.T. durch (zusätzliche) Verwendung von CoralLOAD PCR-Buffer, Q-Solution (beide von QIAGEN), GoTaq<sup>®</sup> Hot Start Green Master Mix (Promega) und zur Amplifikation von CG-reichen Sequenzen, von Regionen mit Alu-Elementen oder großen DNA-Abschnitten durch den Einsatz von RANGER DNA-Polymerase oder VELOCITY DNA-Polymerase (beide von Bionline). Die PCR wurde in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) durchgeführt.

#### **4.4. Nested-PCR**

Bei dieser Methode wird das Produkt der ersten PCR-Reaktion als Template für eine zweite Amplifikation eingesetzt. In der zweiten PCR-Reaktion wird ein Primerpaar verwendet, das innerhalb des ersten Paares liegt. Die falschen Amplifikationsprodukte der ersten Reaktionsrunde werden bei dieser zweiten Runde nicht mehr amplifiziert und bleiben dann unterrepräsentiert. Die Durchführung der Nested-PCR erfolgte analog zu der oben beschriebenen PCR mit Einsatz von 1/10 des Reaktionsprodukts der ersten PCR. Diese Methode erlaubt es auch sehr geringe Templatemengen nachzuweisen und wurde in dieser Doktorarbeit zur Amplifikation von genomischer DNA mit geringer Ausgangskonzentration oder cDNA eingesetzt.

#### **4.5 Reverse-Transkriptase-PCR**

Die cDNA-Synthese aus der aus Muskelgewebe gewonnenen RNA wurde mittels einer Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Hierbei erfolgt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer spezifischen, RNA-abhängigen DNA-Polymerase ausgehend von der gewonnenen Muskel-Gesamt-RNA als Matrize die Herstellung der cDNA. Dabei kommen meist zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA komplementäre Oligo-dT-Primer oder sog. Random-Hexamer-Oligonukleotide bestehend aus sechs zufällig kombinierten Nukleotiden zum Einsatz. Zur gezielten Isolation eines Transkripts können bei der reversen Transkription auch spezifische Primer verwendet werden. Mit dieser Vorgehensweise wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit mit *MUSK*-spezifischen exonischen Primern *MUSK*-spezifische cDNA synthetisiert. Dazu wurde der Transcriptor One-Step RT-PCR Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

### **5. Auftrennung der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese**

In der Gelelektrophorese können unterschiedliche DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Diese Auftrennung erfolgte in ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen. Abhängig von der Länge der zu trennenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 1-4% gewählt. Die Agarose (Invitrogen, Darmstadt) wurde je nach gewünschter Konzentration (1-4%) zusammen mit Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer erhitzt. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,1 µl/ml, Stammlösung

10mg/ml) wurde die Lösung in eine Gelkammer eingegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur, welche mit TAE-Puffer gefüllt war, eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und in die Tasche hinein pipetiert. Eine Tasche wurde jeweils mit einem Größenmarker (10 µl GeneRuler™ 100bp oder 100 bp Plus DNA Ladder, MBI Fermentas, Sankt Leon-Rot) gefüllt, der eine Längenbestimmung unbekannter DNA-Fragmente erlaubt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte bei 120 Volt über ungefähr 45 Minuten. Hierbei bewegt sich die negativ geladene DNA innerhalb des elektrischen Felds in Richtung Anode, wobei sich kürzere Fragmente schneller zur Anode hinbewegen als längere Fragmente, die durch die engen Maschen des Agarosegels zurückgehalten werden. Die aufgetrennten PCR-Produkte können schließlich durch die zuvor erfolgte Zugabe von in die DNA interkalierendes Ethidiumbromid unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden (Le Pecq and Paoletti 1966).

## **6. Aufreinigung der PCR-Produkte**

Die PCR-Fragmente wurden zunächst aus dem Gel unter UV-Licht mittels eines Skalpells herausgeschnitten. Die Aufreinigung der ausgeschnittenen Gelbereiche mit den gewünschten PCR-Produkten erfolgte mittels NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers.

## **7. Sequenzanalyse**

Die Sequenzierung erfolgte nach der 1975 von Fred Sanger entwickelten enzymatischen Kettenabbruch-Methode (Sanger and Coulson 1975; Sanger, Nicklen et al. 1977) und wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, mittels DNA-Sequencern der Firma Applied Biosystems (ABI 3730xl DNA Analyzer) mit farblich unterschiedlich markierten Didesoxy-Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) durchgeführt. Hierbei werden nach erfolgter Erzeugung von Einzelsträngen aus dem doppelsträngigen PCR-Produkt nach jedem möglichen Nukleotid entsprechend einer statistischen Verteilung ddNTPs durch eine Polymerase eingebaut. Da ddNTPs im Gegensatz zu dNTPs keine 2'-OH-Gruppe an der Ribose enthalten, führt ihr Einbau zum Kettenabbruch. Es entstehen somit Produkte jeder möglichen Länge. Am Ende der Produkte befindet sich ein farblich jeweils unterschiedlich

markiertes ddNTP, welches durch das o.g. DNA-Sequenziergeräte von Applied Biosystems abgelesen und ausgewertet wird.

Zur anschließenden Untersuchung der Sequenzen auf Sequenzvarianten bzw. potentielle Mutationen erfolgte ein Vergleich der Basenabfolge der Nukleotidsequenzen mit der entsprechenden Wildtypsequenz über die elektronisch zugängliche Gendatenbank des Servers des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### **8. Begriffsdefinition von Polymorphismus, Mutation und Sequenzvariante**

Da die o.g. Begriffe zur Beschreibung einer Sequenzveränderung in vielen Publikationen verwechselt bzw. in irreführender Weise benutzt werden, wird zunächst eine Definition dieser Begriffe erfolgen.

Eine Mutation bezeichnet zunächst allgemein eine Änderung der DNA-Sequenz und beinhaltet auch eine evolutionäre Dimension. Grundsätzlich kann nach dieser Definition eine Mutation auch keinen Krankheitswert haben, sondern aus evolutionärer Sicht beim natürlichen Selektionsprozess auch einen Vorteil für Lebewesen darstellen. Eine Mutation muss nach dieser Definition auch nicht zwingend mit einer Änderung des Phänotyps einhergehen. Trotzdem schwingt bei der Benutzung des Begriffs Mutation in der Literatur heutzutage meist eine negative Konnotation im Sinne einer Krankheitsverursachung mit (Condit, Achter et al. 2002).

Unter einem Polymorphismus (altgriechisch: πολυμορφισμός = Vielgestaltigkeit) versteht man strenggenommen gemäß einer (mittlerweile veralteten) Definition (siehe hierzu Definition „Polymorphism“ des National Human Genome Research Institute, <http://www.genome.gov/Glossary>) das Auftreten einer Genvariante mit einer Allelfrequenz größer als 1%. Die Allelfrequenz bezeichnet hierbei die Auftretenshäufigkeit einer Genvariante innerhalb einer Population. Ist die Allelfrequenz kleiner als 1 %, spricht man nach dieser Definition von einer Mutation.

Die Begriffe Polymorphismus und Mutation werden heutzutage in irreführender Weise benutzt, da mit dem Begriff Mutation sowohl Veränderungen ohne Krankheitswert als auch pathogene Veränderungen bezeichnet werden. Den Begriff Polymorphismus wiederum benutzen viele Autoren fälschlicherweise zur Bezeichnung einer benignen Sequenzvariante. Zwar sind viele Polymorphismen benigne Varianten ohne Krankheitswert, grundsätzlich impliziert der Begriff Polymorphismus jedoch noch keine Wertung bzgl. des pathogenen Potentials. Auch Polymorphismen können pathogenes Potential haben, wie für den Polymorphismus c.Met129Val im Codon 129 im Prion-Protein-Gen, der scheinbar die Krankheitssuzeptibilität erhöht, gezeigt werden konnte (Schulz-Schaeffer, Giese et al. 1996).

Somit sollte anstatt der Begriffe „Polymorphismus“ und „Mutation“ zunächst wertneutral und allgemein von einer Sequenzvariante gesprochen werden, was sich allerdings noch nicht vollständig durchgesetzt hat. Der Begriff Sequenzvariante kann erst im Kontext bzgl. Benignität oder Pathogenität genauer beschrieben und weiter spezifiziert werden.

Es lassen sich verschiedene Arten von Sequenzvarianten unterscheiden. Dazu gehören Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphismen, SNPs), kleine Insertions- und Deletionspolymorphismen (INDELs) und Genkopienzahlvarianten (CNVs) bzw. Multiplikationen.

### **8.1 Einzelnukleotidpolymorphismen**

Zu den häufigsten Sequenzvariationen gehören Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs), bei denen ein Austausch von einem einzelnen Nukleotid im DNA-Molekül vorliegt. Schätzungen zufolge liegt im humanen Genom ein SNP pro 200 bis 1000 Basenpaare vor (Lander, Linton et al. 2001). Bei Auftreten eines SNP im Exon spricht man von einem kodierenden SNP, beim Auftreten im Intron von einem nicht-kodierenden SNP. Ein exonischer SNP, der einen Aminosäureaustausch zur Folge hat, wird als nicht-synonymer SNP bezeichnet und vice versa. SNPs treten in verschiedenen Abschnitten der DNA ungleichmäßig häufig auf. Das im vorherigen Abschnitt beschriebene definitionsgemäße Vorliegen der genetischen Variation mit einer Häufigkeit von über 1% in der Population unterscheidet einen SNP von einer Punktmutation. SNPs zeichnen sich im Gegensatz zu Punktmutationen durch eine hohe Mutationsstabilität aus. Allgemein ist das Vorkommen

verschiedener SNPs zusammen mit anderen Arten von Sequenzvarianten und bisher in diesem Hinblick wenig erforschten epigenetischen Veränderungen für die genetische Variation innerhalb der Bevölkerung und die Individualität jedes einzelnen Menschen ausschlaggebend. Trotzdem muss erwähnt werden, dass die meisten SNPs keine Auswirkung auf den Phänotyp haben.

## **8.2 Insertions- und Deletionspolymorphismen**

Bei einer Insertion bzw. einer Deletion kommt es zum Einbau bzw. dem Verlust von mindestens einem Nukleotid. Es kann sich sowohl um eine kleinere Insertion oder Deletion <50 Nukleotide (sog. INDEL) handeln, als auch um eine Kopienzahlvariante, bei der es zu einer Duplikation, Multiplikation (Vervielfachung) oder Deletion eines gesamten Gens kommt. Deletionen oder Insertionen, die nicht genau eines oder mehrere komplette Triplet-Codons betreffen, führen in der Regel zu einer Verschiebung des Leserasters.

## **9. Beurteilung von Sequenzvarianten**

Alle gefundenen Sequenzvarianten wurden mit verschiedenen Vorhersageprogrammen auf ihr pathogenes Potential hin untersucht. Verwendet wurden u.a. „MutationTaster“ ([www.mutationtaster.org/](http://www.mutationtaster.org/)) (Schwarz, Rodelsperger et al. 2010), „PolyPhen“ ([www.genetics.bwh.harvard.edu/pph/](http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph/)) (Adzhubei, Schmidt et al. 2010), „Alamut 2.1“ ([www.interactive-biosoftware.com/](http://www.interactive-biosoftware.com/)) und das Spleiß-Stellenvorhersagetool „Fruitfly“ ([www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.htm](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.htm)). Die genannten bioinformatischen Programme bewerten u.a. den Grad der evolutionären Konserviertheit, die biochemischen Eigenschaften der jeweiligen Aminosäuren, Lokalisierung in funktionell wichtigen Proteindomänen sowie Veränderungen des Spleißverhaltens etc..

Für die Beurteilung des Vorliegens eines bekannten Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) nutzen die meisten dieser Vorhersagetools u.a. Daten der NCBI-SNP-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)).

Das Vorhersagetool „Mutation Taster“ gibt für jede untersuchte Veränderung einen p-Wert von 0 bis 1 an, wobei Werte nahe 1 für eine hohe Wahrscheinlichkeit der Vorhersage sprechen. Bei Werten unter 0,5 konnte der „MutationTaster“ keine verlässliche Vorhersage bzgl. der Pathogenität einer genetischen Variation machen. Bei Vorliegen eines bekannten

SNP liefert das Programm die Information „listed as SNP“, und die Referenznummer des SNP.

## V. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Kohorte von 38 Patienten mit Gliedergürtel-CMS bzw. deutlich proximal betonter Muskelschwäche und eine weitere Kohorte von 6 Patienten mit ungewöhnlichem bzw. möglicherweise neuartigem Phänotyp klinisch und molekulargenetisch charakterisiert (Tab.1, Tab.2). Bei allen Patienten bestand klinisch der hochgradige V.a. Vorliegen eines CMS.

Bei den meisten dieser Patienten wurde bei der genetischen Charakterisierung gemäß des im Abschnitt „Molekulargenetische Diagnostik eines CMS“ geschilderten Algorithmus vorgegangen und im Vorfeld und/oder im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von bekannten CMS-Genen sequenziert (Tab. 3, 4). Nach Ausschluss von Mutationen in bekannten CMS-Genen wurden im Rahmen dieser Arbeit bei den Patienten aus beiden Kohorten mehrere Gene des Hexosamin-Stoffwechselweges sequenziert, die aufgrund der vorangegangenen Identifizierung des Gens *GFPT1* und weiterer Glykosylierungsgene als neue CMS-ursächliche Kandidatengene in Betracht kamen.

Zunächst folgt eine klinische Charakterisierung der beiden Kohorten mit besonders ausführlicher Darstellung der Patienten, bei denen im Rahmen dieser Arbeit eine bekannte pathogene Sequenzvariante oder verdächtige Sequenzvariante identifiziert werden konnte.

### 1. Klinische Charakterisierung der untersuchten Patienten mit Gliedergürtel-Phänotyp

Eine prominente Gliedergürtelbeteiligung machte sich bei den meisten Patienten durch das Vorliegen einer Scapula alata und/oder eines auffälligen Gangbilds („Watschelgang“) bemerkbar. Die Muskelschwäche der untersuchten Patienten war in allen Fällen belastungsabhängig. Bei den meisten der Patienten wurden die motorischen Meilensteine in der Kindheit zunächst regelrecht erreicht. Der Erkrankungsbeginn lag zwischen Geburt und Erwachsenenalter, erste Symptome waren zum Beispiel Probleme beim Rennen oder Treppen steigen. Bei auffällig vielen Patienten bestand auch eine zusätzliche okuläre Beteiligung im Sinne einer Ophthalmoparese und/oder Ptosis, oft begleitet von fazialer Muskelschwäche. Eine respiratorische Beteiligung lag nur bei wenigen Patienten vor. Beim

Großteil der Patienten war ein signifikantes Dekrement als elektrophysiologischer Hinweis auf eine synaptische Transmissionsstörung nachweisbar. In keiner der durchgeführten bzw. untersuchten Muskelbiopsien fand sich ein Hinweis auf das Vorliegen tubulärer Aggregate. Ein Großteil der Patienten zeigte ein gutes Ansprechen auf AChE-Inhibitoren. Bei einigen wenigen Patienten kam es unter der Therapie zu einer Verschlechterung der Beschwerden, wobei sich bei zwei von diesen Patienten (die Brüder 23 und 24, Tab. 1) eine Medikation mit Salbutamol als sehr wirksam erwies. Die Ethnizität der meisten Patienten ist kaukasisch, ein Patient gehört der Volksgruppe der Roma an. Die weiteren klinischen Charakteristika der Patienten der Gliedergürtelkohorte werden in Tab. 1 dargestellt.

No.	Sequenzvariante(n)	Geschlecht	Herkunft	Erkrankungsbeginn	Aktuelles Alter (Jahre)	Erreichen motorischer Meilensteine	Respiratorische Beteiligung	Gliedergürtel- bzw. proximale Beteiligung	Bulbäre Beteiligung	Okuläre Beteiligung	Signifikantes Dekrement	Tubuläre Aggregate in Muskelbiopsie	Therapieeffekt AChE-Inhibitoren
1	-	m	Deutschland	Kindheit	30	normal	-	√	-	√	√	-	√
2	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	√	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
3	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	√	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
4	-	m	Spanien	Kindheit	17	verzögert	-	√	-	-	-	n.u.	√
5	CHRN1 c.340G>A het. OGT c.1137-3del het.	w	Serbien	Kindheit	36	normal	-	√	-	-	√	-	√
6	-	w	Schweden	Kindheit	38	normal	√	√	√	-	√	n.u.	√
7	-	w	Schweden	Jugendalter	33	normal	-	√	-	-	√	-	√
8	-	w	Deutschland	Kindheit	8	verzögert	-	√	-	√	√	-	√
9	-	m	Iran	Kindheit	16	normal	-	√	√	√	√	n.u.	√
10	-	w	k.a.	Jugendalter	15	normal	-	√	-	√	√	n.u.	k.a.
11	-	w	Großbritannien	Jugendalter	13	normal	-	√	-	√	n.u.	-	√
12	-	m	Deutschland	Kindheit	19	normal	-	√	-	√	√	-	√
13	-	w	k.a.	Jugendalter	68	normal	√	√	√	√	√	n.u.	√
14	-	m	Belgien/ Kolumbien	Kindheit	8	verzögert	-	√	√	√	√	-	?
15	-	m	Spanien	Kindheit	8	verzögert	-	√	-	-	-	n.u.	-
16	-	w	Iran	Jugendalter	21	normal	-	√	-	√	?	n.u.	-
17	-	w	Deutschland	Jugendalter	47	normal	-	√	-	-	-	n.u.	-
18	-	w	Spanien	Kindheit	61	normal	-	√	-	-	n.u.	-	n.u.
19	-	m	Chile	Geburt	24	normal	-	√	√	√	-	-	-
20	-	m	Chile	Geburt	7	verzögert	√	√	√	√	√	-	-
21	-	m	Chile	Geburt	14	verzögert	-	√	√	√	-	-	√
22	-	m	Deutschland	Kindheit	50	verzögert	-	√	√	√	-	-	√
23	MUSK c.114T>A/Deletion	m	Türkei	Kindheit	17	normal	-	√	√	-	√	-	-
24	MUSK c.114T>A/Deletion	m	Türkei	Kindheit	15	normal	-	√	√	-	√	-	n.u.
25	-	w	Italien	Kindheit	57	normal	-	√	√	√	-	n.u.	√
26	-	m	Italien	Kindheit	46	k.A.	-	√	√	√	√	n.u.	-
27	-	w	Deutschland	Erwachsenenalter	46	k.A.	√	√	-	-	√	k.A.	√
28	-	m	Portugal	Kindheit	16	normal	√	√	-	√	√	n.u.	√
29	-	w	Deutschland	Kindheit	15	verzögert	√	√	√	√	-	-	√
30	-	m	Deutschland	Geburt	11	verzögert	√	√	√	√	-	n.u.	√
31	-	m	Deutschland	Kindheit	13	verzögert	-	√	-	-	n.u.	n.u.	√
32	-	w	Eritrea	Kindheit	12	-	-	√	√	√	√	n.u.	√
33	-	m	Deutschland	Geburt	13	verzögert	-	√	√	-	-	n.u.	√
34	-	m	Deutschland	Erwachsenenalter	70	normal	√	√	√	√	√	-	√
35	-	w	Türkei	Kindheit	5	verzögert	-	√	-	√	√	n.u.	√
36	-	m	Schweiz	Geburt	36	normal	-	√	√	√	√	√	√
37	CHRNE c.1327delG hom.	m	Spanien	Geburt	12	verzögert	√	√	√	√	√	n.u.	√
38	CHRNE c.1353dupG/c.70insG	m	Portugal	Kindheit	29	normal	k.A.	√	k.A.	√	√	-	√

**Tab. 1** Klinische Charakteristika der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten mit Gliedergürtelbeteiligung

### 1.1 Patient 23 und 24

Patienten 23 und 24 sind zwei aus einer türkischen, nicht konsanguinen Familie stammende Brüder. Der ältere Bruder (Patient 23) wurde termingerecht geboren und entwickelte sich in

den ersten Monaten normal. Es lagen keine Trinkschwäche oder respiratorische Probleme vor und die motorischen Meilensteine wurden zunächst zeitgerecht erreicht, z.B. freies Laufen im Alter von zwölf Monaten. Allerdings fiel der Mutter bereits damals auf, dass das Kind sich vermehrt an Objekten in den Stand hochzog. Über die nächsten Jahre trat eine zunehmende belastungsabhängige Schwäche auf, die ärztlicherseits, als der Patient im Alter von 3,5 Jahren neuropädiatrisch untersucht wurde, auch beim damals neun Monate alten Bruder (Patient 24) bemerkt wurde. Im Verlauf kam es zu einer zunehmenden Muskelschwäche bei beiden Brüdern, die zu einer Gehunfähigkeit in den Nachmittagen beim älteren Bruder im Alter von 15 Jahren führte. Der jüngere Bruder ist gehfähig und kann Treppen steigen, ermüdet jedoch schnell. Beide Brüder besuchen die Regelschule. Klinisch zeigen beide Brüder eine deutliche Gliedergürtel- und faziale Schwäche ohne okuläre oder bulbäre Symptome sowie Skoliose. Im Alter von neun Jahren erfolgte beim älteren Bruder eine Muskelbiopsie, die minimale myopathische Veränderungen zeigte. In einer Ultraschalluntersuchung des Muskels fand sich eine vermehrte Echogenität des M. quadrizeps femoris bei Patient 23, die Muskelsonographie des Bruders zeigte keine Auffälligkeiten. Im Alter von 11 Jahren wurde bei Patient 23 eine repetitive Stimulation des N. accessorius durchgeführt, die ein signifikantes Dekrement zeigte. Repetitive Summenmuskelaktionspotentiale nach einem einzelnen Stimulus konnten nicht detektiert werden. Laborchemisch war bei beiden Brüdern die Kreatinkinase im Normbereich und es konnten keine Antikörper gegen AChR nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit oralem Pyridostigmin im Alter von zehn Jahren führte bei Patient 23 zu einer Verschlechterung der Symptome und wurde nach drei Wochen wieder abgesetzt. Ein zweiter Behandlungsversuch mit oralem Pyridostigmin im Verlauf zeigte einen ähnlichen Effekt. Im Alter von 13 bzw. 16 Jahren wurde bei beiden Brüdern eine Medikation mit Salbutamol in einer Dosierung von 2 x 4 mg/Tag begonnen. Zu diesem Zeitpunkt war es Patient 23 nachmittags nicht möglich alleine aus dem Rollstuhl aufzustehen. Patient 24 konnte nachmittags nur unter Zuhilfenahme des Geländers Treppen steigen. Bereits eine Woche nach Beginn der Salbutamol-Therapie konnte Patient 23 am Geländer und Patient 24 ohne Hilfsmittel Treppen steigen. Einer Erhöhung der Salbutamol-Dosis auf 3 x 4 mg/Tag führte zu einer weiteren Verbesserung der Symptome bei beiden Brüdern.

## 1.2 Patient 37

Der aus Spanien stammende Patient gehört der Volksgruppe der Roma an und hat mehrere an CMS erkrankte Familienangehörige, und zwar einen Bruder und einen Cousin seiner Mutter. Bei den Eltern liegt als Cousin und Cousine eine Konsanguinität vor. Die Krankheit manifestierte sich bereits bei der Geburt. Im Verlauf erreichte der Patient die motorischen Meilensteine erst verzögert, wobei die allgemeine Krankheitsprogression langsam war. Im Vordergrund steht eine nur mäßig ausgeprägte, belastungsabhängige und generalisierte Schwäche jedoch mit einer so deutlichen proximalen Betonung, dass die Erkrankung klinisch als Gliedergürtel-Myasthenie eingeordnet wurde. Zusätzlich liegt neben einer Augenbeteiligung im Sinne einer Ptosis eine bulbäre Beteiligung mit Schluckbeschwerden vor. Infektionen führten im Verlauf mehrmals zu einer krisenhaften Verschlechterung der Symptome. Bei der repetitiven Nervenstimulation fand sich ein grenzwertig signifikantes Dekrement (10%) der fazialen Muskulatur. Die Kreatinkinase im Serum war im Normbereich, elektromyographisch zeigten sich myopathische Veränderungen. Es liegt ein gutes Ansprechen auf orale AChE-Inhibitoren vor. Antikörper gegen AChR und MuSK waren differentialdiagnostisch nicht bestimmt worden. Kontrakturen oder Dismorphien lagen nicht vor.

Beim im Rahmen dieser Arbeit nicht molekulargenetisch untersuchten Bruder von Patient 37 imponiert ein ähnlicher Phänotyp, jedoch mit schwererer Ausprägung der Muskelschwäche. Neben einer deutlichen Gliedergürtelschwäche mit einem „Watschelgang“ liegt eine auf 500 Meter eingeschränkte Gehstrecke vor. Bei dem Bruder zeigte sich ebenfalls ein mit 10% grenzwertiges Dekrement bei repetitiver Stimulation der fazialen Muskulatur und ein Ansprechen auf AChE-Inhibitoren.

Bei Patient 37 konnte die bekannte pathogene Sequenzvariante c.1327delG homozygot in *CHRNE* nachgewiesen werden.

## 1.3 Patient 38

Der aus Portugal stammende Patient erkrankte nach zunächst unauffälliger motorischer Entwicklung im Kleinkindesalter im Alter von fünf Jahren und weist einen progredienten Krankheitsverlauf auf. Im Vordergrund stand eine proximal betonte Muskelschwäche mit zusätzlicher Beteiligung der extraokulären Muskeln. Neben einer Ophthalmoparese lag eine

Ptoxis vor. Es fielen weder Kontrakturen oder Dismorphien auf. Die Gehstrecke des bei der letzten Untersuchung 29 Jahre alten Patienten war nicht eingeschränkt. In der repetitiven Stimulation ließ sich das Vorliegen eines myasthenen Syndroms mit einem deutlich pathologischen Dekrement sowohl fazialer (40%) als auch proximaler (20%) Muskelgruppen objektivieren. Distal war kein Dekrement nachweisbar. Die Kreatinkinase im Serum und die Elektromyographie zeigten Normalbefunde. Der Befund der Muskelbiopsie war mit einer Typ-2-Faser-Atrophie unspezifisch verändert. Die Familienanamnese ist positiv mit einer ebenfalls an einem CMS erkrankten Mutter, sowie einem betroffenen Onkel und einer betroffenen Tante. Angaben über eine etwaige Konsanguinität innerhalb der Familie lagen nicht vor. Die Gabe von AChE-Inhibitoren führte zu einer klinischen Besserung. Das Vorliegen von Anti-AChR- und -MuSK-Antikörpern wurde nicht untersucht.

Bei Patient 38 konnten die bekannten pathogenen Sequenzvarianten c.1353dupG und c.70insG in *CHRNE* in jeweils heterozygotem Zustand nachgewiesen werden. Bei sämtlichen erkrankten Familienmitgliedern ließ sich konsekutiv die pathogene Variante *CHRNE* c.1353dupG homozygot nachweisen.

#### **1.4 Patientin 5**

Die aus Serbien stammende, mittlerweile 36jährige Patientin erkrankte im Alter von drei Jahren nach zunächst regelrechtem Erreichen der motorischen Meilensteine. Im Vordergrund steht ein sehr milder Verlauf mit einem nur langsamen Fortschreiten der Erkrankung. Klinisch-neurologisch imponiert eine anhaltende, belastungsabhängige, nur mäßig ausgeprägte Schwäche der Schulter- und Beckengürtelmuskulatur. Dies äußert sich im Vorliegen einer Scapula alata und eines watschelnden Gangbildes. Eine Einschränkung der Gehstrecke liegt nicht vor. Die Muskelbiopsie zeigte unspezifische Veränderungen, elektromyographisch fanden sich diskrete Zeichen einer Myopathie. Eine Erhöhung der Kreatinkinase oder das Vorliegen von Antikörpern gegen AChR ließ sich nicht nachweisen. Die Patientin profitiert von einer Therapie mit AChE-Inhibitoren, des Weiteren hatte ein im Alter von zwölf Jahren durchgeführter Versuch einer Medikation mit Kortikosteroiden eine diskrete klinische Besserung zur Folge. Die Familienanamnese bzgl. neuromuskulärer Erkrankungen ist leer. Der Krankheitsverlauf ist sehr mild und schränkt die Patientin kaum

in ihren alltäglichen Tätigkeiten und ihrer Lebensqualität ein. Vor zwei Jahren brachte die Patientin nach komplikationsloser Schwangerschaft ein bisher gesundes Kind zur Welt.

Bei Patientin 5 konnte die bisher nicht als pathogen beschriebene Sequenzvariante c.340G>A/p.Val114Met in *CHRNBI* heterozygot nachgewiesen werden. Außerdem fand sich im Kandidatengen *OGT* eine weitere Variante unklarer Signifikanz (c.1137-3del) in heterozygotem Zustand.

## **2. Klinische Charakterisierung der Patienten mit ungewöhnlichen Phänotypen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere sechs Patienten mit klinisch hochgradigem Verdacht auf CMS jedoch z.T. ungewöhnlichen bzw. nicht-klassischen Phänotypen klinisch und molekulargenetisch untersucht (Tab. 2). Die meisten der Patienten haben mittlerweile das Erwachsenenalter erreicht, was durch das Vorliegen eines mildereren Phänotyps und einer langsameren Krankheitsprogression erklärt werden kann. Der Erkrankungsbeginn war variabel, wobei die späte Erstmanifestation bei Patient 40 im 21. Lebensjahr hervorzuheben ist. Bei allen Patienten außer bei Patient 44 war ein signifikantes Dekrement in der repetitiven Stimulation nachweisbar, was als deutlicher Hinweis auf das Vorliegen einer neuromuskulären Transmissionsstörung gewertet werden kann. Dies wird durch einen positiven Tensilon-Test bei Patienten 39 und 40 unterstrichen bzw. durch ein gutes Ansprechen auf AChE-Inhibitoren bei einem Großteil der Patienten. Die weiteren klinischen Charakteristika der Patienten dieser Kohorte werden in Tab. 2 dargestellt.

No.	Sequenzvariante(n)	Geschlecht	Herkunft	Erkrankungsbeginn	Aktuelles Alter (Jahre)	Erreichen motorischer Meilensteine	Respiratorische Beteiligung	Betont distale Beteiligung	Gliedergürtel- bzw. proximale Beteiligung	Bulbäre Beteiligung	Okuläre Beteiligung	Signifikantes Deitremment	Tubuläre Aggregate in Muskelbiopsie	Therapieeffekt AChE-Inhibitoren	Besonderheiten
39	-	w	Kanada	Kindheit	35	normal	✓	-	-	✓	✓	✓	n.u.	✓	Tensilon-Test positiv; Single CMAP-Antwort.
40	-	w	Polen	Erwachsenenalter	32	normal	-	-	-	✓	✓	✓	k.A.	✓	Onset im Erwachsenenalter (mit 21 Jahren); Tensilon-Test positiv; Antikörper gegen AChR, Musk und Titin negativ.
41	-	w	Norwegen	Jugendalter	42	normal	-	✓	-	-	-	✓	-	k.A.	Schwester mit CMS
42	CHRNE c.1293insG hom.	m	Portugal	Geburt	17	verzögert	-	-	-	✓	✓	✓	-	✓	Kein Nachweis von AChR-Antikörpern; Ansprechen auf Kortikosteroide;
43	CHRNE c.1293insG/c.70insG	w	Italien/Afrika	Geburt	36	verzögert	-	-	-	✓	✓	✓	-	✓	Bulbäre und okuläre Beteiligung im Vordergrund
44	CHNRD c.866C>A het.	w	Schweden	k.A.	12	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Mutter mit CMS

**Tab. 2** Klinische Charakteristika der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten mit mit ungewöhnlichen Phänotypen.

## 2.1 Patient 42

Bei dem aus Portugal stammenden Patient 42 zeigten sich die ersten Symptome bereits bei der Geburt. Im Verlauf war die motorische Entwicklung deutlich verzögert, der Patient konnte erst im Alter von zwei Jahren frei laufen. Der Krankheitsverlauf war fortschreitend. In der Familie des Patienten liegt eine Konsanguinität vor. Klinisch imponiert neben einer mäßiggradigen, generalisierten Muskelschwäche eine faziale Schwäche und eine Ptosis. In der repetitiven Stimulation ließ sich das Vorliegen einer Transmissionsstörung mit einem deutlich pathologischen Dekrement sowohl fazialer (26,5%), proximaler (24,6%) als auch distaler (37,5%) Muskelgruppen objektivieren. Der Patient zeigte sowohl ein Ansprechen auf AChE-Inhibitoren als auch auf Kortikosteroide als möglicher Hinweis auf eine autoimmunologisch verursachte Transmissionsstörung. Eine infantile Myasthenia gravis wurde jedoch bei Erstmanifestation bei Geburt und außerdem negativen Nachweis von AChR-Antikörpern differentialdiagnostisch für sehr unwahrscheinlich erachtet.

Bei Patient 42 konnten die bekannte pathogene Sequenzvariante *CHRNE* c.1353dupG homozygot nachgewiesen werden.

## 2.2 Patientin 43

Bei der Patientin, die kaukasische, afrikanische und indianische Vorfahren hat, steht eine bulbäre und okuläre Schwäche im Vordergrund. Neben einer Ptosis und mimischen Schwäche hat die Patientin Schwierigkeiten beim Kauen und Schlucken. Sie erkrankte bereits bei der Geburt und zeigte bei progredientem Verlauf bereits in der Kindheit eine Verzögerung der motorischen Entwicklung. Trotz des Fortschreitens ist die Gehstrecke nicht eingeschränkt. Zusätzlich liegt noch eine schwerwiegende generalisierte Muskelschwäche unter besonderer Beteiligung der Hand- und Fingerstreckmuskulatur vor. Bei der Patientin konnte eine Transmissionsstörung durch Nachweis eines signifikanten Dekrements sowohl fazialer (25 %), proximaler (24,6%) als auch distaler (57%) Muskelgruppen gesichert werden. Die Patientin profitiert von einer Medikation mit AChE-Inhibitoren.

Bei Patientin 43 konnten die bekannten pathogenen Sequenzvarianten *CHRNE* c.1353dupG und c.70insG jeweils heterozygot nachgewiesen werden.

### 2.3 Patientin 44

Über die aus Schweden stammende Patientin kaukasischen Ursprungs liegen nur wenig klinische Informationen vor, bei ihr liegt allerdings ein sehr ähnliches Krankheitsbild wie bei ihrer klinisch besser charakterisierten Mutter vor. Diese erkrankte im Alter von sechs Jahren und zeigte eine generalisierte Muskelschwäche mit zusätzlicher Schwäche der Nackenmuskulatur. Im Verlauf kristallisierte sich das Vorliegen einer distalen Betonung der Paresen heraus, weshalb die Patientin der Kohorte mit ungewöhnlichen Phänotypen zugeordnet wurde. Elektrophysiologisch konnte ein signifikantes Dekrement nachgewiesen werden. Die Familienanamnese ist positiv und deutet auf das Vorliegen eines autosomal-dominanten Vererbungsmodus hin. Therapieversuche mit Pyridostigmin, Quinidin sowie mit Fluoxetin verliefen frustan und führten zu ausgeprägten Nebenwirkungen. Eine signifikante respiratorische Beteiligung lag nicht vor.

Patientin 44 sowie ihre Mutter wiesen die bekannte pathogene Sequenzvariante c.866C>A/p.Ser289Tyr in *CHRND* heterozygot auf.

### 3. Nachgewiesene Sequenzvarianten in bekannten CMS-Genen

In der Gruppe der Patienten mit Gliedergürtelphänotyp konnten bei insgesamt vier nicht verwandten Patienten Sequenzvarianten in bekannten CMS-Genen nachgewiesen werden (Tab. 3).

No.	Pathogene Mutation	Sequenzvariate(n)	Negative Genetik
1	-		CHRNE; RAPSN Exon 2
2	-		GFPT1; DOK7
3	-		GFPT1; DOK7
4	-		CHRNE; COLQ Exon 2 & 16; RAPSN Exon 2
5		CHRN1 c.340G>A het. OGT c.1137-3del het.	CHRNA1; CHRND; CHRNE; DOK7; GFPT1; RAPSN
6	-		DOK7; GFPT1; RAPSN
7	-		DOK7; GFPT1; RAPSN
8	-		CHAT; CHRNA1; CHRN1; CHRND; CHRNE; DOK7; GFPT1; RAPSN
9	-		CHRNE; GFPT1
10	-		DOK7 Exon 7; GFPT1
11	-		DOK7 Exon 7; GFPT1
12	-		CHAT; CHRNE; COLQ; DOK7; GFPT1; RAPSN; SCN4A
13	-		CHRNA; CHRND; COLQ Exon 2 & 16; GFPT1; DOK7; RAPSN Exon 2
14	-		DOK7 Exon 7; GFPT1; RAPSN Exon 2
15	-		COLQ; GFPT1; DOK7 Exon 7
16	-		DOK7 Exon 7; GFPT1; RAPSN Exon 2
17	-		CHRNE; COLQ; DOK7
18	-		CHRND SCCMS Exons; COLQ Exon 16; DOK7 Exon 7; GFPT1; RAPSN
19	-		CHRNA1; CHRN1; CHRNE; COLQ; DOK7 Exon 7; MUSK; RAPSN; SCN4A
20	-		CHAT; COLQ; DOK7 Exon7; RAPSN; SCN4A
21	-		CHAT; CHRNA1; CHRN1; CHRND; CHRNE; COLQ; DOK7 Exon 7; LRP4 Exon 10; MUSK; RAPSN; SCN4A;
22	-		CHAT; CHRNA1; CHRN1; CHRND; CHRNE; COLQ; DOK7; GFPT1; RAPSN; SCNA4
23	MUSK c.114T>A/Deletion		CHRNE; DOK7; GFPT1; RAPSN Exon 2
24	MUSK c.114T>A/Deletion		-
25	-		CHRNA1; CHRN1; CHRNE; COLQ; DOK7 Exon 7; GFPT1; LRP4 Exon 10; RAPSN
26	-		CHRNA1; CHRN1; CHRND; CHRNE; COLQ; DOK7; GFPT1; LRP4 Exon 10; RAPSN
27	-		CHRNA1; CHRN1; CHRND; CHRNE; COLQ; DOK7; GFPT1; RAPSN Exon 2
28	-		CHAT; CHRN1; CHRND; CHRNE; DOK7 Exon 7; RAPSN
29	-		CHAT; CHRNA1; CHRN1; CHRNE; COLQ; DOK7; GFPT1; MUSK; RAPSN
30	-		CHAT; CHRNA1; CHRN1; CHRND; CHRNE; COLQ; DOK7; MUSK; RAPSN
31	-		CHRNE; COLQ; DOK7; RAPSN
32	-		CHAT; CHRN1; CHRNE; DOK7 Exon 7; MUSK; RAPSN
33	-		CHRNA1; CHRN1; CHRND; CHRNE; CHRNG; COLQ; DOK7 Exon 7; MUSK; RAPSN
34	-		CHRNA1; CHRN1; CHRNE; DOK 7 Exon 7; RAPSN
35	-		CHAT; CHRNA1; CHRN1; CHRND; CHRNE; COLQ; GFPT1; DOK7; RAPSN
36	-		CHRNE; DOK7 Exon 7; RAPSN
37	CHRNE c.1327delG hom.		-
38	CHRNE c.1353dupG/c.70insG		-

*Tab. 3 Patienten der Gliedergürtelkohorte mit den jeweils detektierten Sequenzvarianten. In der Spalte „Negative Genetik“ sind die beim jeweiligen Patienten unauffällig getesteten Gene aufgeführt. Die meisten dieser negativen Gene*

wurden hierzu direkt sequenziert, in wenigen Fällen waren die entsprechenden Gene (auch) mittels einer Linkage-Analyse ausgeschlossen worden. Bei Patient 5 bzw. Patient 23 und 24 war die Untersuchung von *CHRN1* bzw. *MUSK* bis auf die aufgeführte Sequenzvariante bzw. Mutation unauffällig.

In der Gruppe der Patienten mit ungewöhnlichen Phänotypen konnten bei insgesamt drei Patienten Mutationen in bekannten CMS-Genen nachgewiesen werden (Tab. 4).

No.	Pathogene Mutation	Sequenzvariante(n)	Negative Genetik
39	-	-	<i>CHAT</i> ; <i>CHRN1</i> ; <i>CHRNE</i> ; <i>CHRND</i> ; <i>COLQ</i> ; <i>DOK 7</i> Exon 7; <i>LRP4</i> Exon 10; <i>MUSK</i> ; <i>RAPSN</i>
40	-	-	<i>CHRNE</i> ; <i>DOK7</i> Exon 7; <i>RAPSN</i> Exon 2
41	-	-	<i>CHRN1</i> ; <i>CHRNE</i> ; <i>COLQ</i> ; <i>DOK7</i> ; <i>GFPT1</i> ; <i>RAPSN</i> Exon 2
42	<i>CHRNE</i> c.1353dupG hom.	-	-
43	<i>CHRNE</i> c.1353dupG/c.70insG	-	-
44	<i>CHNRD</i> c.866C>A het.	-	<i>CHRNA1</i> SCCMS Exons; <i>CHRNE</i> SCCMS Exons

**Tab. 4** Patienten der Kohorte der ungewöhnlichen Phänotypen mit den jeweils detektierten Sequenzvarianten. Bei allen Patienten war eine extensive Testung anderer bekannter CMS-Gene negativ verlaufen.

### 3.1 *CHRNE* c.1327delG/ p.Glu443Lysfs\*64

Bei Patient 37 konnte das homozygote Vorliegen der Variante c.1327delG (alte Nomenklatur: c.1267delG) identifiziert werden. Hier kommt es durch die Deletion eines Guanosin in Exon 12 zu einer Verschiebung des Leserasters (sog. Frameshift-Mutation) (p.Glu443Lysfs\*64). Hierdurch entsteht ein prämaures Stop-Codon. Dies führt zu einem vorzeitigen Translationsstop und damit zur Entstehung einer nicht voll funktionsfähigen Epsilon-Untereinheit und sekundär zu einer ACh-Rezeptordefizienz. Es handelt sich um eine bekannte pathogene CMS-Mutation (Abicht, Stucka et al. 1999).

### 3.2 *CHRNE* c.1353dupG/ p.Asn452Glufs\*4

Die Variante c.1353dupG (alte Nomenklatur: c.1293insG) wurde bei Patient 38 und 43 in heterozygoter und bei Patient 42 in homozygoter Form identifiziert. Diese Mutation führt durch Insertion eines Guanosins an Position 1353 in Exon 12 zu einer Verschiebung des

Leserasters (p.Asn452Glufs\*4) und nach dem bei der Mutation c.1327delG beschriebenen Mechanismus zur Entstehung einer verminderten AChR-Expression. Es handelt sich ebenfalls um eine bekannte pathogene CMS-Mutation (Engel, Ohno et al. 1996; Mihaylova, Scola et al. 2010).

### **3.3 *CHRNE* c.70insG**

Diese Sequenzvariante konnte bei Patient 38 und 43 in heterozygoter Form identifiziert werden. Sie hat eine Insertion eines Guanodin-Rests an Nukleotidposition 70 im Exon 2 und ebenfalls eine Verschiebung des Leserasters zur Folge. Dies resultiert in einer Rezeptordefizienz. Es handelt sich um eine bekannte pathogene CMS-Mutation (Ohno, Anlar et al. 1998; Mihaylova, Scola et al. 2010).

### **3.4 *CHRND* c.866C>A/ p.Ser289Tyr**

Es handelt sich um einen heterozygoten Austausch von Cytidin gegen ein Adenosin an Position 866, der bei Patientin 44 zu einem Aminosäureaustausch eines Serins zu einem Tyrosin führt (p.Ser289Tyr). Es handelt sich um eine bekannte pathogene CMS-Mutation (Chaouch, Muller et al. 2012). Bei der Segregationsanalyse zeigte sich das heterozygote Vorliegen der Variante auch bei der ebenfalls erkrankten Mutter.

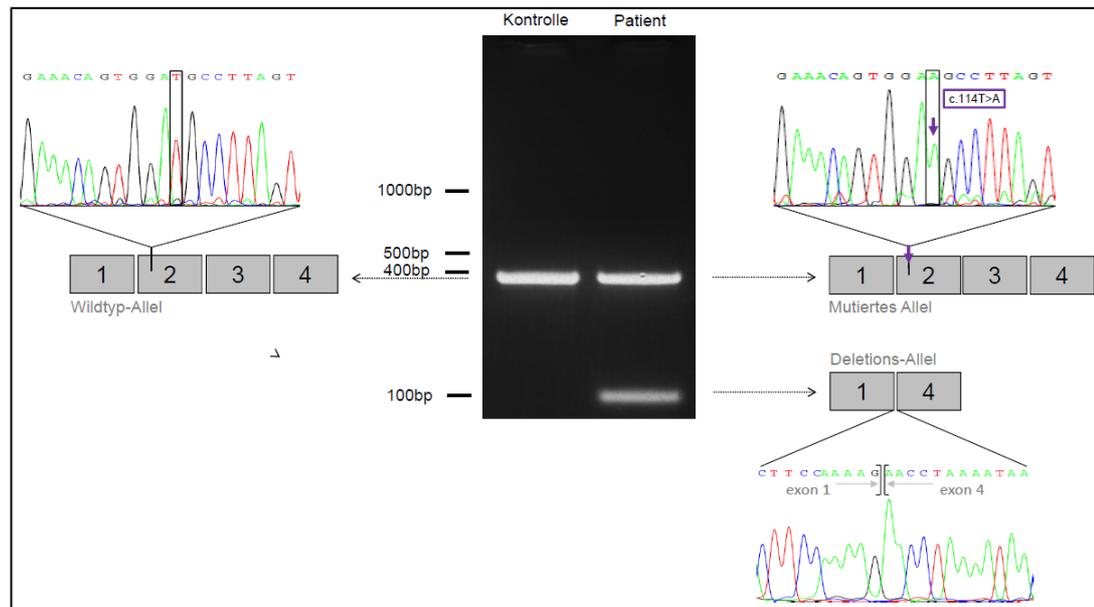
### **3.5 *CHRNA1* c.340G>A/p.Val114Met**

Ein Basenaustausch eines Guanosins zu einem Cytidin an Position 340 in Exon 4 führt bei dieser Sequenzvariante von Patientin 5 zu einem Aminosäureaustausch eines Valins gegen ein Methionin (GTG→ATG). Eine Analyse mit Alamut klassifizierte die Veränderung als „unclassified variant“ wobei die Variante als bekannter SNP (rs149433073) verzeichnet ist. Polyphen-2 ordnete die Variante als „probably damaging“ (HumDiv Score 1.000 mit Sensitivität: 0.00 und Spezifität: 1.0, HumVar Score 0.998 mit Sensitivität: 0.18; Spezifität: 0.98). In einer Segregationsanalyse wurde diese Sequenzvariante heterozygot ebenfalls beim nicht an einem CMS erkrankten Vater identifiziert, bei der gesunden Mutter konnte sie nicht nachgewiesen werden.

### **3.6 *MUSK* p.Asp38Glu und eine bisher nicht bekannte Deletion in *MUSK***

Die Sequenzanalyse der kodierenden Regionen von *MUSK* bei den beiden betroffenen Brüdern 23 und 24 zeigte das Vorliegen eines scheinbar homozygoten Austausches eines

Thymidins gegen ein Adenosin im Exon 2 an der Nukeotidposition 114, der zu einem Aminosäureaustausch (p.Asp38Glu) führt. Zuvor waren in dieser Familie unter der Annahme eines autosomal rezessiven Erbgangs die Loci der Gene *CHRNA1*, *CHAT*, *RAPSN*, *DOK7*, *CNTN1*, *COL6A3*, *SEPN1*, *MTM1*, *TNNT1* und *CFL2* mittels einer Linkage-Analyse ausgeschlossen worden und die Gene *COLQ*, *DOK7*, *RAPSN*, *CHAT*, *CHRNE*, *CHRNA1*, *CHRND*, *CHRNE* und *GFPT1* zusätzlich direkt sequenziert worden, ohne dass eine pathogene Mutation nachweisbar war. Die Sequenzvariante c.114T>A konnte weder in den einschlägigen SNP-Datenbanken noch in 50 Ethnie-gemachten Kontrollchromosomen nachgewiesen werden. Eine Analyse mittels des Vorhersageprogramms PolyPhen-2 schätzte ein pathogenes Potenzial der Sequenzvariante, die zu einem Austausch einer hoch konservierten Aminosäure führt, mit einem Score von 0.988 (Sensitivität: 0.72; Spezifität: 0.96) für wahrscheinlich ein. In der Segregationsanalyse lag die Sequenzvariante heterozygot bei der Mutter vor, beim Vater konnte die Variante nicht nachgewiesen werden. Da die Vaterschaft genetisch bestätigt werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise das Vorliegen einer heteroallelischen Deletion bei der Sequenzanalyse der genomischen DNA nicht erkannt worden war. Aus diesem Grund wurde konsekutiv eine cDNA-Untersuchung aus dem Muskelgewebe des älteren Bruders durchgeführt. Eine nach reverser Transkription der Muskel-RNA durchgeführte PCR-Amplifikation der cDNA mittels einer Reihe von Primern und nested Primern über den gesamten kodierenden Anteil deckte das Vorliegen eines Fragments mit 100 Basenpaaren Länge in der Gelelektrophorese auf, das kürzer war als das erwartete 400 bp-Wildtyp-Fragment (Abb. 5). Nach direkter Sequenzierung des 100 Basenpaar-Fragments und anschließender Sequenzanalyse mittels FASTA-Sequenzvergleich konnte festgestellt werden, dass das *MUSK*-Exon 1 an Exon 4 gepleisst war, somit Exons 2 und 3 fehlten. Das längere Fragment entsprach dem Wildtyp-Allel, wobei die in Exon 2 lokalisierte Sequenzvariante c.114T>A nur beim Patienten, nicht in der Kontrolle gefunden wurde. Das Vorhandensein von etwaigen intronischen Spleißstellenmutationen wurde durch die direkte Sequenzierung von jeweils 100 bp der flankierenden Regionen der Exons 1-4 ausgeschlossen. Sowohl die Sequenzvariante p.Asp38Glu als auch die beschriebene Deletion in *MUSK* waren zuvor nicht in der Literatur beschrieben worden.



**Abb. 5** Identifikation des mutmaßlichen Deletions-Allels durch PCR-Amplifikation von cDNA aus der Muskel-RNA von Patient 23. Das zu erwartende 400 bp-Wildtyp-Fragment war sowohl bei Patient 23 als auch in einer Kontrollprobe nachweisbar. Die heteroallele Deletion wird durch ein nur beim Patienten vorhandenes 100 bp-Fragment repräsentiert.

#### 4. Molekulargenetische Analyse der neuen Kandidatengene

Zur Untersuchung der Hypothese, dass auch Mutationen in anderen Genen des Hexosaminstoffwechselwegs bei CMS eine Rolle spielen könnten, wurden die oben beschriebenen Kandidatengene des Hexosamin-Pathways untersucht. Analysiert wurden hierbei die beiden Patientenkollektive mit insgesamt 44 Patienten, bei denen im Rahmen dieser Arbeit im ersten Schritt keine Mutation in bekannten CMS-Genen, die mit dem jeweiligen Phänotyp kompatibel erschienen, detektiert werden konnte.

Gen	Sequenzvariante	Art der Variante	Region	Voraussage Mutation Taster	Reference ID
<b>GNPNAT1</b>	c.155-90C>G	Basenaustausch	Intron	Polymorphismus, "listed as SNP"	rs2296494
<b>PGM3</b>	c.541+94A>T	Basenaustausch	Intron	Polymorphismus, "listed as SNP"	rs477061
<b>PGM3</b>	c.1281A>G/p.Glu427Glu	Basenaustausch	Exon	Polymorphismus, "listed as SNP"	rs542948
<b>PGM3</b>	c.1396G>A/p.Asp466Asn	Basenaustausch	Exon	Polymorphismus, "listed as SNP"	rs473267
<b>PGM3</b>	c.65T>A	Basenaustausch	Intron	Polymorphismus, "listed as SNP"	rs73749738
<b>UAP1</b>	c.-42C>T	Basenaustausch	Intron	Polymorphismus, "listed as SNP"	rs118173142
<b>OGT</b>	c.1137-3del	Deletion	Intron	"Disease causing" → Spleißstellen-Veränderung	
<b>OGT</b>	c.1167-72G>A	Basenaustausch	Intron	Polymorphismus, "listed as SNP"	rs3736670
<b>OGT</b>	c.2619T>C/p.His873His	Basenaustausch	Exon	Polymorphismus	
<b>OGT</b>	c.2700G>A/p. Leu900Leu	Basenaustausch	Exon	Polymorphismus	

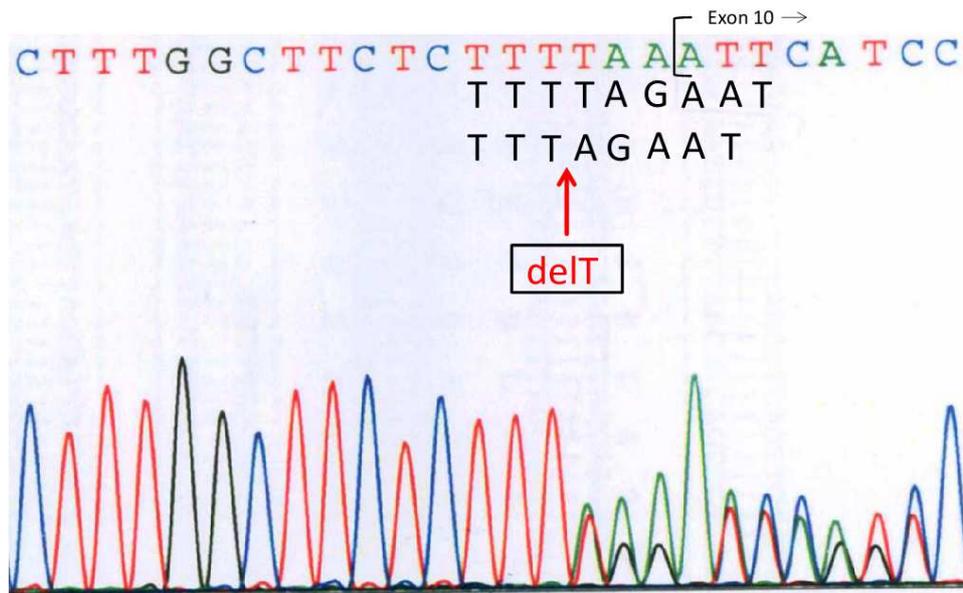
**Tab. 5** Auflistung der in den Kandidatengenomen identifizierten Sequenzvarianten bei den untersuchten Patienten.

Bis auf *OGT* c.1137-3del führen die dabei identifizierten Sequenzvarianten entweder zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz oder sind bekannte SNPs. Nur die genannte Sequenzvariante im *OGT*-Gen, die im Folgenden genauer analysiert wird, wurde in der Software-gestützten Analyse mit dem Programm „Mutation Taster“ als möglicherweise „Disease causing“ bewertet.

Bis auf die Sequenzvariante unklarer Pathogenität in *OGT* konnte damit in dem untersuchten Patientenkollektiv keine pathogen erscheinende Mutation in den Kandidatengenomen des Hexosamin-Stoffwechselweges identifiziert werden.

#### 4.1 Die Sequenzvariante *OGT* c.1137-3del

Es handelt sich um eine heterozygot vorliegende Deletion eines Thymidins im Intron wenige Basenpaare vor Beginn des Exon 10 des *OGT*-Gens.



**Abb. 6:** Sequenz von Patient 5 mit Deletion eines Thymidins im Polypyrimidin-Trakt vor Exon 10 des *OGT*-Gens.

Diese 1-Basenpaar-Deletion betrifft den Polypyrimidin-Trakt, eine intronische, kurz vor der Spleißakzeptorstelle gelegene Sequenzabfolge, an die sich auf mRNA-Ebene bestimmte Spleißfaktoren anlagern. Zusammen mit weiteren assoziierten Proteinen bilden diese Faktoren das Spliceosom aus, das dann die entsprechende Intronsequenz aus der Prä-mRNA entfernt. Wie einleitend beschrieben, besteht das Enzym *OGT* u.a. aus einer TRP-Domäne mit vielen hintereinandergeschalteten TRPs. In der TRP 10-Domäne ist zusätzlich ein funktionell wichtiges Kernlokalisierungssignal enthalten (Jinek, Rehwinkel et al. 2004). In 50 Kontrollchromosomen konnte *OGT* c.1137-3del nicht nachgewiesen werden. Vom „MutationTaster“ wurden für diese Sequenzvariation eine Veränderung des Spleißverhaltens vorausgesagt und diese Veränderung als „disease causing“ bewertet ( $p=0,999924474091493$ ), Alamut ordnete die Veränderung als „unclassified variant“ ein. Das Spleiß-Stellen-Vorhersageprogramm „Fruitfly“ wiederum sagte eine Effizienz der Spleiß-Site für die Sequenzvariante von 0,96 und von 0,97 für die Wildtyp-Sequenz voraus, womit sich die Effizienz der Spleiß-Stelle kaum verändern würde. In den einschlägigen Datenbanken wird die Veränderung als bekannter SNP (rs200680783) geführt. In der Segregationsanalyse konnte der nichterkrankte Vater als heterozygoter Träger der Variante identifiziert werden, bei der ebenfalls gesunde Mutter lag diese Sequenzvariante nicht vor.

## VI. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Subgruppen eines großen CMS-Patientenkollektivs klinisch charakterisiert und molekulargenetisch untersucht auf Mutationen in bekannten CMS-ursächlichen Genen und neuen Kandidatengen.

### 1. Pathogene Sequenzvarianten in *CHRNE*

Mutationen im *CHRNE*-Gen, kodierend für die epsilon-Untereinheit des AChR, führen zu einer AChR-Defizienz und gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen bei CMS-Patienten. Der klinische Phänotyp einer AChR-Defizienz ist in der Literatur vielfach beschrieben und zeichnet sich insbesondere durch eine okulär betonte Symptomatik mit einer Ptosis und vor allem auch einer ausgeprägten Ophthalmoparese aus. Die generalisierte Muskelschwäche ist dagegen bei vielen Patienten relativ mild ausgeprägt und wenig progredient. Eine respiratorische Beteiligung liegt meist nicht vor.

Bei den Patienten 37 und 38 aus unserem Kollektiv liegt neben einer okulären Beteiligung v.a. eine im Vordergrund stehende Gliedergürtelschwäche vor. Interessanterweise wurden Mutationen des Gens *CHRNE* bislang noch nie bei Patienten beschrieben, die mit dem Bild einer prominenten Gliedergürtelbeteiligung auffielen. Auch das Vorliegen einer respiratorischen Beteiligung wie bei Patient 37 ist für *CHRNE*-Patienten eher untypisch, jedoch in Einzelfällen beschrieben (Kinali, Beeson et al. 2008). Wie zu erwarten war liegt bei allen Patienten mit *CHRNE*-CMS aus unserem Kollektiv eine mehr oder minder schwere okuläre Beteiligung i.S. einer Ophthalmoparese bzw. Ptose vor. Klinisch zeigen die im Rahmen dieser Arbeit mit einer *CHRNE*-Mutation identifizierten Patienten einen sehr heterogenen Phänotyp. So liegt bei Patient 38 eine seit der Kindheit manifeste Gliedergürtelmyasthenie vor, während bei Patient 43 nach einem Krankheitsbeginn bei Geburt eine okuläre und bulbäre Beteiligung im Vordergrund steht, beide Patienten haben jedoch bzgl. *CHRNE* denselben Genotyp. Die gute Wirksamkeit von AChE-Inhibitoren passt dagegen gut zum Phänotyp einer AChR-Defizienz (Schara, Della Marina et al. 2012). Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen *CHRNE* c.1327delG, c.1353dupG und c.70insG sind in der Literatur mehrfach beschrieben und wurden ausführlich charakterisiert (Nichols, Croxen et al. 1999; Engel, Ohno et al. 2003; Hantai, Richard et al. 2004). Ihre Pathogenität wurde in funktionellen Untersuchungen bestätigt.

## 2. Die Sequenzvariante *CHRND* c.866C>A/p.Ser268Tyr

Eine weitere Sequenzvariante c.866C>A betrifft das Gen *CHRND*, das für die delta-Untereinheit des AChR kodiert. Diese gefundene Veränderung wurde in der Literatur bereits als pathogen beschrieben, jedoch fehlen funktionelle Untersuchungen (Chaouch, Muller et al. 2012).

Polyphen-2 bewertete die Veränderung als „probably damaging“ mit einem HumDiv-Score von 0.999 (Sensitivität 0.14, Spezifität 0.99) und einem HumVar-Score von 0.970 (Sensitivität 0.60, Spezifität 0.93). Die Veränderung führt zum Austausch eines hoch konservierten Serins zu einem Threonin, wobei sich diese beiden Aminosäuren bzgl. ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Interessanterweise wurde an der gleichen Aminosäureposition in der Vergangenheit bereits die CMS-Mutation p.Ser268Phe beschrieben. Dieser Aminosäureaustausch führt jedoch zu einer Verlängerung der Öffnungszeit des AChR (Navedo, Lasalde-Dominicci et al. 2006).

Die Variante konnte heterozygot auch bei der ebenfalls an CMS erkrankten Mutter der Patientin nachgewiesen werden. Damit ist trotz fehlender funktioneller Untersuchungen und niedriger Sensitivität der Vorhersage von Polyphen-2 davon auszugehen, dass es sich um eine autosomal-dominante Mutation im Sinne eines Slow-Channel Syndroms handelt. Im Unterschied zu anderen *CHRND*-Patienten war phänotypisch bei der Patientin und ihrer Mutter keine respiratorische Beteiligung vorhanden.

## 3. Die Sequenzvariante *CHRNBI* c.340G>A/p.Val114Met

Eine unklare Sequenzvariante betrifft das Gen *CHRNBI*, kodierend für die beta-Untereinheit des AChR, die zu einem Austausch der chemisch-physikalisch ähnlichen Aminosäure Valin gegen ein Methionin führt.

Die Tertiärstruktur der extrazellulären Domäne des AChRs setzt sich aus einer komplexen Struktur aus mehreren  $\beta$ -Faltblättern zusammen, wobei das Valin an Aminosäureposition 114 innerhalb eines der außen gelegenen  $\beta$ -Faltblätter lokalisiert ist. Dort trägt das Valin mit seiner apolaren Seitenkette zur Ausbildung von hydrophoben Regionen für die Ligandenbindung und Regulation des Kationenstroms durch den Rezeptor bei (Unwin 2005). Eine direkte Bindung des Liganden an den Valinrest findet nicht statt. Ein Sequenzvergleich verschiedener Spezies zeigt, dass Valin an dieser Position nur mäßig konserviert vorliegt. In der Vergangenheit war die Sequenzvariante *CHRNBI* p.Val114Met bereits bei einem CMS-

Patienten, der von der CMS-Arbeitsgruppe des Friedrich-Baur-Instituts untersucht worden war, in heterozygoter Form gefunden worden. Die Segregationsanalyse zeigte sowohl in der Familie von Patient 5 als auch in dem früher untersuchten Fall, dass die nicht-betroffenen Väter jeweils heterozygot Träger der Variante waren, jedoch nicht die (ebenfalls nicht-betroffenen) Mütter (Abicht, Dusl et al. 2012). Eine autosomal dominante Vererbung scheidet bei heterozygoter Trägerschaft des gesunden Vaters aus, somit kommt nur noch ein autosomal rezessiver Vererbungsmodus in Betracht. Eine in diesem Fall zu fordernde zweite heteroallele Mutation wurde jedoch nicht gefunden. Die bioinformatische Analyse mittels PolyPhen-2 bzgl. des HumDiv-Scores war bei niedriger Sensitivität nicht aussagekräftig. Ob es sich bei p.Val114Met um eine pathogene Variante oder lediglich um eine seltene Variation ohne Krankheitswert handelt kann nicht abschließend beurteilt werden, da im Rahmen dieser Arbeit keine funktionellen Untersuchungen der Auswirkungen der Sequenzveränderung durchgeführt wurden. Insbesondere aufgrund der Ergebnisse der Segregationsanalyse und der Tatsache, dass die Veränderung als SNP in den einschlägigen Datenbanken bekannt ist, ist diese Sequenzvariante wahrscheinlich jedoch nicht pathogen.

#### **4. Die Sequenzvariante *MUSK* p.Asp38Glu und eine bisher nicht bekannte Deletion in *MUSK***

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue Missense-Variante in *MUSK* und eine heteroallele genomische Deletion, die die Exons 2 und 3 von *MUSK* umfasst, identifiziert werden (Gallenmuller, Felber et al. 2013). Mutationen in *MUSK* sind zwar nur selten Ursache für ein CMS, jedoch zeigte sich gerade in diesem Fall, wie wertvoll es ist, auch die selteneren CMS-Gene in die molekular-genetische Untersuchung mit einzubeziehen. Das Gen *MUSK* liegt auf Chromosom 9q31.3-q32 und umfasst 14 Exons. Das entsprechende Protein MuSK trägt wesentlich zur Organisation und Aufrechterhaltung des postsynaptischen Gerüsts bei (Gautam, Noakes et al. 1995; DeChiara, Bowen et al. 1996; Gautam, Noakes et al. 1996). Die Funktion von MuSK ist essentiell für den Agrin-MuSK-Rapsyn-Signalweg, insbesondere für die Cluster-Bildung von AChR, die über Agrin vermittelt wird. Die Bindung von Agrin an das im Muskelgewebe exprimierte LRP4 führt zu einer Aktivierung von MuSK (Glass and Yancopoulos 1997). Diese Aktivierung ist ein entscheidender Schritt für die Ausbildung von Nervenendigungen während der

Embryonalentwicklung. Die MuSK-Aktivierung führt konsekutiv zur Aktivierung mehrerer Kinasen stromabwärts, zur Cluster-Bildung von essentiellen postsynaptischen Proteinen wie Rapsyn und AChR, zur synapsenspezifischen Gentranskription und der Erzeugung retrograder Signale, die die präsynaptische Differenzierung steuern (Finn, Feng et al. 2003; Strohlic, Cartaud et al. 2005; Ghazanfari, Fernandez et al. 2011).

Das MuSK-Protein besteht aus einer großen Ektodomäne mit IgG-ähnlichen Motiven, einer Transmembran-Helix und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne (Glass, Apel et al. 1997; Zhou, Glass et al. 1999). MuSK benötigt eine duale Aktivierung, und zwar extrazellulär über Agrin und intrazellulär über Dok-7, welche letztlich zu einer Autophosphorylierung und einer gesteigerten Kinaseaktivität führt. Bei diesem Vorgang interagieren Lrp4 und MuSK über ihre extrazellulären Domänen miteinander, (Zhang, Coldefy et al. 2011; Zong, Zhang et al. 2012). Es besteht keine direkte Interaktion zwischen Agrin und MuSK, Agrin bindet jedoch LRP4. Dok-7 aktiviert MuSK durch eine Dimerisierung, worüber eine Autophosphorylierung und in der Folge eine Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität von MuSK ermöglicht wird (Bergamin, Hallock et al. 2010).

Bei beiden Patienten 23 und 24 lag ein myasthenes Syndrom mit tageszeitabhängiger Schwäche, Gliedergürtelbetonung und einem Dekrement in der repetitiven Stimulation vor. Die Aussparung der extraokulären Augenmuskeln, der unspezifische Befund der Muskelbiopsie, die erhöhte Kreatinkinase im Serum, die myosonographischen Veränderungen in einem der Brüder und das Nichtansprechen auf Acetylcholinesterasehemmer sprachen zunächst gegen das Vorliegen einer neuromuskulären Übertragungsstörung und verzögerte eine korrekte Diagnosestellung. Die im Hinblick auf eine Transmissionsstörung durchgeführte umfangreiche genetische Diagnostik blieb ebenfalls zunächst ohne Ergebnis. Erst die Identifikation der bisher nicht beschriebenen Sequenzvariante p.Asp38Glu und der heteroallelischen Deletion, die als wahrscheinlich krankheitsverursachend eingestuft wurden, führten zu dem erfolgreichen Therapieversuch mit Salbutamol, der zu einer eindrucksvollen klinischen Verbesserung führte (Gallenmuller, Felber et al. 2013). Therapieerfolge mit Salbutamol waren bisher bei CMS-Patienten mit Mutationen in *COLQ*, im AChR mit konsekutivem primärem AChR-Mangel, in *RAPSN* und in *DOK7* und in einem Patienten mit *DPAGTI*-Mutation beschrieben worden (Liewluck, Selcen et al. 2011; Sadeh, Shen et al. 2011; Engel 2012; Lorenzoni, Scola et al. 2013). Des Weiteren berichteten Maselli et al. von einem moderaten Ansprechen auf Salbutamol bei

einer Patientin mit zwei Missense-Mutationen in *MUSK*, allerdings ohne Angabe der eingesetzten Dosierung (Maselli, Arredondo et al. 2010). Der Wirkmechanismus von Salbutamol bei CMS ist nicht bekannt. Ein so deutliches Ansprechen auf Salbutamol wie in der von uns beschriebenen Familie war bisher für Patienten mit *MUSK*-Mutationen nicht in der Literatur beschrieben worden (Maselli, Arredondo et al. 2010), allerdings konnten Mutationen in *MUSK* bisher weltweit erst in fünf CMS-Familien identifiziert werden (Ben Ammar, Soltanzadeh et al. 2013; Maggi, Brugnoli et al. 2013). Das berichtete Ansprechen der beiden Brüder auf Salbutamol stellt einen vielversprechenden Behandlungsansatz für die anderen bisher bekannten *MUSK*-Patienten dar.

Bisher fehlen funktionelle Untersuchungen, die einen genauen Wirkmechanismus der Variante p.Asp38Glu, die in Patient 23 und 24 gefunden wurde, aufzeigen könnten. Für die Pathogenität dieser Variante spricht die Segregation mit dem Phänotyp in der Familie und das Nichtvorhandensein in 50 Kontrollchromosomen. Eine Analyse mittels PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>) (Adzhubei, Schmidt et al. 2010) schätzte ein pathogenes Potenzial der Sequenzvariante, die zu einem Austausch einer hoch konservierten Aminosäure führt, als wahrscheinlich ein mit einem Score von 0.988 (Sensitivität: 0.72; Spezifität: 0.96). Drei der vier bisher publizierten Missense-Mutationen befinden sich in der C-terminalen Domäne des Proteins, die die konservierte katalytische Tyrosinkinase-Domäne enthält, und zwar p.Val790Met (Chevessier, Faraut et al. 2004), p.Met605Ile und p.Ala727Val (Maselli, Arredondo et al. 2010). Hinweise auf die molekulare Pathogenität der genannten Mutationen erbrachten funktionelle Untersuchungen von MuSK-Mutanten, bei denen die Interaktionsfähigkeit mit Dok-7 gestört war (Chevessier, Faraut et al. 2004; Okada, Inoue et al. 2006; Maselli, Arredondo et al. 2010). Im Unterschied dazu ist die hier erstbeschriebene Sequenzvariante p.Asp38Glu in der Extrazellulärdomäne des Proteins lokalisiert, und zwar noch näher am N-Terminus als eine kürzlich von unserer Arbeitsgruppe gefundene Missense-Mutation *MUSK* p.Pro344Arg (Mihaylova, Salih et al. 2009). Bisher wurden die beiden genannten N-terminalen Mutationen nicht funktionell untersucht. Vermutlich beeinflussen Mutationen im extrazellulären Teil des Proteins nicht die intrazellulär stattfindende Interaktion mit Dok-7, dafür aber die extrazelluläre Interaktion mit Agrin (Bergamin, Hallock et al. 2010). Das betroffene Aspartat an der Position 38 ist Teil desjenigen  $\beta$ -Faltblattstranges der (extrazellulären) Ig-like-Domäne von MuSK, der

zusammen mit einer hydrophoben Region auf der Oberfläche der Ig-like-Domäne eines anderen MuSK-Moleküls interagiert und somit zur MuSK-Homodimerisierung beiträgt (Stiegler, Burden et al. 2006). Die Dimerisierung von MuSK führt konsekutiv zu einer Anlagerung von LRP4 mit Ausbildung des funktionalen LRP4-MuSK-Komplexes (Zhang, Luo et al. 2008; Zong, Zhang et al. 2012). Denkbar ist auch, dass die Mutation eine inkorrekte Faltung der Ig1-Domäne verursacht, die zu einer Retention von MuSK innerhalb der Zelle führen könnte. In Mäusen führt die komplette Ausschaltung von MuSK zu einem letalen Phänotyp mit einer fehlenden postsynaptischen Differenzierung, wobei die betroffenen Mäuse bereits bei der Geburt an Ateminsuffizienz versterben (DeChiara, Bowen et al. 1996). Im Unterschied dazu zeigen Mäuse mit zwei Loss-of-function-Mutationen in MuSK einen CMS-ähnlichen Phänotyp (Chevessier, Girard et al. 2008). In der Tat konnten bisher keine CMS-Patienten mit zwei biallelischen Null-Mutationen identifiziert werden. Solche Mutationen, die zu einem kompletten Verlust der Genfunktion führen, sind vermutlich nicht mit dem Leben vereinbar und führen wahrscheinlich bereits im Mutterleib zu einem pränatalen CMS-Phänotyp mit fetaler Akinesie mit konsekutivem tödlichen respiratorischen Versagen bei der Geburt. Nullmutation in anderen bekannten CMS-Genen wie *RAPSN*, *DOK7* und in für AChR-Untereinheiten kodierenden Genen führen entsprechend zu letalen und nichtletalen Phänotypen mit fetaler Akinesie (Ravenscroft, Sollis et al. 2011). Genomische Deletionen entstehen relativ häufig de novo, jedoch entgehen compound heterozygote exonische Deletionen oft dem Nachweis in der Routinesequenzierung. Unser Ergebnis mit einer bisher nicht bekannten heteroallelischen Deletion in *MUSK* als Ursache eines CMS unterstreicht die Wichtigkeit einer gezielten Suche nach Deletionen bei hinreichendem klinischem Verdacht. Obwohl funktionelle Studien fehlen liegt eine Pathogenität der beiden Sequenzvarianten aus o.g. Gründen nahe und könnte somit die Gliedergürtelmyasthenie der beiden Brüder erklären. Bisher war eine Deletion in *MUSK* als Ursache eines CMS nicht bekannt.



*Abb. 7 Darstellung der Brüder 23 und 24. Bei Patient 23 konnte die bisher nicht bekannte Sequenzvariante *MUSK* p.Asp38Glu in Blut-DNA und eine heteroallele Deletion in *MUSK* über eine cDNA-Analyse aus Muskelgewebe nachgewiesen werden. Beim Bruder (Patient 24) konnte in der Blut-DNA nur das höchstwahrscheinlich hemizygot Vorliegen der Sequenzvariante *MUSK* p.Asp38Glu festgestellt werden, Muskelgewebe lag nicht vor.*

### **5. Die Sequenzvariante *OGT* c.1137-3del**

Eine weitere Sequenzveränderung, die als unklar klassifiziert werden musste, stellt die Variante c.1137-3del im *OGT*-Gen dar. Für die Sequenzvariante, die im Polypyrimidin-Trakt wenige Basenpaare vor Beginn des Exon 10 vom X-chromosomalen *OGT*-Gen lokalisiert ist, wurden vom „MutationTaster“ Spleißstellen-Veränderungen und ein

krankheitsverursachendes Potential vorhergesagt. Die Wahrscheinlichkeit dieser Vorhersage war bei einem p-Wert nahe 1 als hoch einzustufen. Die Sequenzvariante stellt laut dem Programm Alamut einen bekannten SNP dar; dieser SNP ist jedoch als sehr seltene Variante einzustufen (Minor allele frequency (MAF)=0.4%).

Bei der Transkription erfolgt zunächst eine Abschrift sowohl der kodierenden Exons als auch der nicht-kodierenden Introns in eine Prä-messenger-RNA (Prä-mRNA). Hierauf folgt der Spleiß-Prozess, bei dem die Introns entfernt werden, um am Ende eine reife, intronfreie mRNA zu erhalten. Entscheidend für dieses Spleißing ist, dass die Übergangsbereiche zwischen Exon und Intron von der Spleißmaschinerie korrekt erkannt werden. Diese besteht aus dem sog. Spliceosom und erkennt an den Exon-Intron-Übergängen jeweils eine Spleißdonorstelle (gekennzeichnet durch ein GU-Dinukleotid) und eine Spleißakzeptorstelle (gekennzeichnet durch ein AG-Dinukleotid) (Burset, Seledtsov et al. 2000). Für ein regelrechtes Spleißen ist auch der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorstelle von Bedeutung (Mount 1982). Ca. 10% aller vererbten monogenen Erkrankungen werden durch Spleiß-Stellen-Punktmutationen verursacht (Stenson, Ball et al. 2003).

Zur Unterstützung des Spleißprozesses agieren bestimmte Spleiß-Faktoren, die u.a. am sog. Polypyrimidin-Trakt binden. Diese ca. 15-20 Basenpaare lange Abfolge aus Pyrimidinbasen ist typischerweise 5-40 Basenpaare stromaufwärts vor der Akzeptor-Spleißstelle im 3'-Bereich des zu spleißenden Introns lokalisiert (Gao, Masuda et al. 2008). Die Sequenzvariante *OGT* c.1137-3del liegt in genau diesem Polypyrimidin-Trakt und verkürzt diesen um einen Thymidin-Rest.

Die Deletion dieses Thymidin-Restes verkürzt zwar den Pyrimidin-Trakt um ein Basenpaar, verändert jedoch nicht den Trakt als solches. Es blieb somit die Möglichkeit, dass eine Abstandsänderung – z.B. zwischen Donor- und Akzeptorstelle – eine Rolle spielt. Interessanterweise zeigte sich, dass dieser Abstand bei Menschen, Schimpansen, Rhesusaffen und Katzen konserviert ist, in der Maus liegt dagegen ein um ein Basenpaar verlängerter Abstand vor. Diese Verlängerung scheint die Effizienz des Traktes nicht zu kompromittieren, was als Anhaltspunkt für das Nichtvorliegen einer Pathogenität durch die Sequenzvariante dient. Auch die Ergebnisse der Segregationsanalyse sprechen gegen eine Pathogenität der Variante: Da der gesunde Vater heterozygoter Träger der Mutation ist, erscheint ein X-chromosomal dominanter oder X-chromosomal-rezessiver Erbgang mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Der einzig vorstellbare Vererbungsmodus, der

eine fehlende Symptomatik beim heterozygoten Vater und gleichzeitig eine Erkrankung der die Mutation heterozygot tragenden Tochter erklären könnte, wäre ein X-chromosomaler Erbgang mit einer sogenannten „zellulären Interferenz“. Dieser Erbgang ist sehr selten und wurde kürzlich für Mutationen im X-chromosomalen Gen *PCDH19* postuliert, die ursächlich sind für eine Epilepsie, die nur bei Mädchen beobachtet wird und die über gesunde männliche Anlageträger weitergegeben wird (Dibbens, Tarpey et al. 2008; Depienne and LeGuern 2012). Dieses Phänomen wird mit der Hypothese einer „zellulären Interferenz“ erklärt, wonach letztendlich das Nebeneinander von mutierten und nicht mutierten Proteinen bei den betroffenen weiblichen Heterozygoten schädigender ist, als eine homozygote Zellpopulation mit gleichartig mutierten Proteinen, wie sie beim heterozygoten Mann, der nur ein die Mutation tragendes X-Chromosom besitzt, vorliegt. Dieses Phänomen der „zellulären Interferenz“ wurde erstbeschrieben für das sog. kraniofrontonasale Syndrom von Wieland et al. (Wieland, Jakubiczka et al. 2004). Aufgrund der Tatsache, dass jedoch das *OGT*-Gen nicht wie *PCDH19* für ein Strukturprotein, sondern für ein Enzym kodiert, und aufgrund der intronischen Lokalisation der Variante erscheint dieser Erklärungsmechanismus unwahrscheinlich. Auch vom Spleißstellen-Vorhersageprogramm „Fruitfly“ wurde nur eine sehr geringe Veränderung der Effizienz der Spleißstelle für die Sequenzvariante von 0,96 und von 0,97 für die Wildtyp-Sequenz vorausgesagt, was ebenfalls gegen eine Pathogenität der identifizierten Veränderung spricht. Zusammengefasst kann die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines krankheitsverursachenden Potentials der Variante c.1137-3del als sehr gering eingeschätzt werden. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die sichere Einschätzung der Pathogenität einer Sequenzveränderung in der Nähe der essentiellen Donor- oder Akzeptorstelle ohne funktionelle Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde, sehr schwierig ist (Gao, Masuda et al. 2008).

Interessanterweise wurde in der Literatur von einer großen Familie mit einer neuen x-chromosomal vererbten Form einer kongenitalen Faserdysproportionsmyopathie berichtet (Clarke, Smith et al. 2005). Die Betroffenen in der Familie zeigen einen CMS-ähnlichen Phänotyp und in einer Linkage-Analyse der Familie konnten zwei Kandidatenbereiche identifiziert werden, wobei der Locus des *OGT*-Gens in einem dieser Bereiche lokalisiert ist. Durch direkte Nachfrage bei der Arbeitsgruppe um Nigel F. Clarke, die mittlerweile eine genomweite Sequenzierung der Familie durchgeführt hatte, konnte in Erfahrung gebracht

werden, dass nach Sichtung der Daten aus dem Next Generation Sequencing der Familie o.g. Sequenzvariante bei dem Indexpatienten aus der betroffenen Familie nicht vorliegt und auch keine andere pathogene Mutation in diesem Gen identifiziert wurde.

## **6. Datenqualität**

Die Datenqualität ist für die Aufstellung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen von größter Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die klinischen Daten mittels eines Fragebogens (siehe Anhang) erhoben. Teilweise standen zusätzlich ärztliche Befundberichte zur Verfügung. Das klinische Bild eines Patienten ist auf der Grundlage eines Fragebogens z.T. nur schwer zu erfassen und Daten zum Krankheitsverlauf fehlen in einem Großteil der Fälle. Insofern wäre ein Follow-up und eventuell auch eine klinische Nachuntersuchung der Patienten wünschenswert, insbesondere auch um ein besseres Bild des Langzeitverlaufs zu gewinnen. Somit wäre die Schaffung eines CMS-Patientenregisters – ähnlich wie dies für andere seltene neuromuskuläre Erkrankungen bereits zur Verfügung steht (Lochmuller and Straub 2007; Buchner, Gallenmuller et al. 2012; Nagel, Unal et al. 2013) - sicher eine sinnvolle Einrichtung.

## **7. Kandidatengenansatz vs. Next Generation Sequencing**

Grundsätzlich untermauern die Ergebnisse dieser Arbeit die klinische Heterogenität bei CMS. In der Zukunft werden sich durch die Methodik des „Next Generation Sequencing“ (NGS) die Möglichkeiten der genetischen Diagnostik erweitern. Es ist anzunehmen, dass sich dann auch die Kenntnisse zu den klinischen Phänotypen der CMS-Unterformen erweitern werden, wenn eine noch größere Anzahl von Patienten genetisch untersucht wird und Mutationen auch bei Patienten identifiziert werden, die ein für das untersuchte Gen eigentlich untypisches klinisches Bild aufweisen. Dies ist an anderen Erkrankungen vielfach belegt (Furtado, Payami et al. 2004; Lupski, Reid et al. 2010; Bras, Verloes et al. 2012; Guerreiro, Lohmann et al. 2012; Heron, Smith et al. 2012; Wan, Yourshaw et al. 2012). In der klinischen Praxis wäre ein diagnostischer Test, der schnell, spezifisch, nicht-invasiv und kostengünstig ist, optimal. Bisher erfüllt NGS nur einen Teil dieser Voraussetzungen (Foo, Liu et al. 2012). Ein Vorteil von NGS besteht darin, dass nicht notwendigerweise eine Familie mit mehreren Betroffenen vorliegen muss. Außerdem werden *de novo*-

Mutationen sicherer entdeckt (Veltman and Brunner 2012). Ein Großteil der Glykosylierungsgene bei CMS wäre ohne NGS nicht entdeckt worden.

Trotz der genannten Vorteile des NGS werden andere Methoden zur Identifizierung neuer Gene weiterhin erfolgreich eingesetzt. Im Kandidatengenansatz wird zunächst eine Hypothese aufgestellt, nach der bestimmte Gene zur fraglichen Erkrankung in Beziehung stehen könnten. Diese Gene kodieren hierbei für bestimmte Proteine, die möglicherweise mit der Ausprägung eines bestimmten Phänotyps in Zusammenhang stehen bzw. in physiologischen Prozessen, die wiederum für die Erkrankung wichtig sein könnten, eine bedeutende Rolle spielen. Es werden somit a priori Gene mit vermuteter ätiologischer Rolle ausgewählt. Das Potential dieses Ansatzes konnte kürzlich für das Noonan-Syndrom durch Identifizierung neuer krankheitsursächlicher Gene aus dem ERK-Signalweg (Ras-extrazellulär aktivierter Kinase-Signalweg) gezeigt werden (Roberts, Araki et al. 2007). Der Kandidatengenansatz ist im wesentlichen dadurch limitiert, dass nach Anwendung o.g. Kriterien bei der Genauswahl - insbesondere bei polygenen Erkrankungen und bei nicht vollständig bekannter Pathophysiologie einer Erkrankung - sehr viele Gene zur Testung in Frage kommen (Tabor, Risch et al. 2002; Daly 2003).

Auch die sog. Kopplungsanalyse zur Suche neuer krankheitsursächlicher Gene wird erfolgreich angewendet und kam z.B. bei der Identifizierung des als CMS-krankheitsverursachenden Glykolysierungsgens *GFPT1* zum Einsatz (Senderek, Muller et al. 2011) und deckte so einen bisher unbekanntem CMS-Pathomechanismus auf. Nachteil dieser Methode ist, dass eine ausreichend große Familie mit gehäuften Auftreten der entsprechenden Erkrankung verfügbar sein muss.

Im Zuge der neuen Hochdurchsatzsequenzierungen in Forschung und Routinediagnostik ist eine Erweiterung der Kenntnisse über den mit bestimmten Genmutationen vergesellschafteten Phänotypen zu erwarten. Eine genaue Beschreibung des Phänotyps wird jedoch weiterhin zur Interpretation der Ergebnisse des NGS essentiell sein, da methodenbedingt eine Reihe von Varianten in möglicherweise krankheitsursächlichen Genen gefunden werden wird und für die korrekte Interpretation einer möglichen Pathogenität die Integration der NGS-Daten mit den klinischen Daten unerlässlich sein wird (Hennekam and Biesecker 2012).

## 8. Bewertung von Sequenzvarianten

Eine bedeutende Herausforderung in der genetischen Diagnostik und Forschung stellt die Bewertung von gefundenen Sequenzvarianten bzgl. ihres krankheitsverursachenden Potentials dar. Die Verfügbarkeit von schnellen und zuverlässigen Bewertungsmethoden wird in der Zukunft durch die Vielzahl von Varianten, die bei der Exom- oder Genomsequenzierung gefunden werden, noch an Wichtigkeit zunehmen.

Die valideste Methode der Beurteilung einer Variante bzgl. ihrer Pathogenität stellen funktionelle Untersuchungen dar, bei denen in Laborexperimenten nachgewiesen wird, ob sich eine Sequenzveränderung negativ auf die Zellfunktion bzw. den Organismus auswirkt. Im optimalen Fall wird hierbei durch ein sog. Rescue-Experiment untersucht, ob sich eine gestörte Zellfunktion durch Einbringung des gesunden Gens wieder beheben lässt. Aus Zeit- und Kostengründen sind solche Laboruntersuchungen jedoch nur in Einzelfällen realisierbar, somit werden in den meisten Fällen andere Methoden zur Überprüfung einer Sequenzvariante zur Anwendung kommen.

Hierzu werden meist verschiedene Datenbanken und Vorhersage-Computerprogramme, die eine Variante automatisiert mit Referenzsequenzen vergleichen, auf Annotation in den einschlägigen SNP-Datenbanken überprüfen und die Information liefern, ob eine gefundene Variante bereits als Ursache einer Erkrankung identifiziert ist, verwendet. Falls eine Variante bislang nicht bekannt ist, werden von den Vorhersageprogrammen eine Reihe von Aspekten, die die Natur einer Variante näher charakterisieren, untersucht. Hierzu gehört, ob die vorliegende Variante zu einem Aminosäureaustausch führt. Falls ja, wird der evolutionäre Konservierungsgrad der entsprechenden Aminosäure bei verschiedenen Spezies untersucht. Hierbei macht die Änderung einer hoch konservierten, d.h. bei vielen Spezies vorliegenden Aminosäure, das das Vorliegen eines pathogenen Potentials wahrscheinlicher während Veränderungen in weniger konservierten Aminosäuren eher als neutral zu bewerten sind (Miller and Kumar 2001). Außerdem wird bei einer Änderung der Aminosäure bewertet, ob es sich um einen Austausch zweier physikalisch-chemisch unterschiedlicher Aminosäuren oder um einen Austausch zwischen zwei chemisch sehr ähnlichen Aminosäuren handelt, wobei ersterer angenommen wird mehr pathogene Relevanz zu besitzen. Daneben kann ein Vorhersageprogramm die Lokalisation eines Aminosäureaustausches bewerten, wobei eine Lage innerhalb einer funktionellen Domäne eines Proteins z.B. einer Bindungsstelle für

Interaktionspartner, einen weiteren Hinweis auf Pathogenität darstellt. Limitationen bestehen grundsätzlich in der Verlässlichkeit der Vorhersagen für Varianten, die Spleiß-Stellen betreffen oder in intronischen bzw. regulatorischen Bereichen lokalisiert sind.

Neben den genannten funktionellen oder computerbasierten Untersuchungen existieren noch weitere Methoden, eine Sequenzvariante zu beurteilen. Hierzu gehört die Erhebung einer genauen und ausführlichen Familienanamnese. Die hilft in einem Teil der Fälle, den vorliegenden Vererbungsmodus zu bestimmen. Auch eine Segregationsanalyse, bei der untersucht wird, bei welchen anderen Familienmitgliedern eine bestimmte Sequenzvariante in welcher Form vorliegt und ob diese im Stammbaum nur bei Patienten mit dem klinischen Phänotyp einer Erkrankung auftritt („Kosegregation“) ist außerordentlich hilfreich. Eine weitere Methode stellt die Bestimmung der Häufigkeit des Vorliegens einer Sequenzvariante in Normalkontrollen dar. Für eine Pathogenität spricht hier, dass eine Variante in einer ausreichend großen Zahl gesunder Kontrollpersonen aus derselben Population nicht nachgewiesen werden kann. Ein großer Nachteil hierbei ist, dass für seltene Varianten für eine ausreichende Aussagekraft eine große Anzahl an Normalkontrollen getestet werden muss und somit der hohe Zeit- und Kostenaufwand der erforderlichen Sequenzanalyse von mehreren hundert Proben.

Zusammengefasst ist die Anwendung einer Kombination dieser Methoden zur Einschätzung des pathogenen Potentials einer Sequenzveränderung vielversprechend, kann jedoch mit Ausnahme funktioneller Analysen keine vollständige Sicherheit geben.

## **9. Glykosylierungsstörung als neuartiger CMS-Pathomechanismus**

Sämtliche mit CMS vergesellschafteten Glykosylierungsgene werden ubiquitär exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei Glykosylierungsvorgängen von einer Vielzahl von Proteinen in verschiedenen Organen, was eine Reihe von Fragen im Hinblick auf den Pathomechanismus im Muskelgewebe aufwirft. So sollten Veränderungen in diesen Genen folglich zu einem multisystemischen Phänotyp führen. Rezessive Mutationen in *DPAGT1* und *ALG2* konnten passenderweise in der Vergangenheit als Ursache von CDG Typ Ij und Ii, die sich neben einer muskulären Hypotonie durch zentralnervöse Beteiligung i.S. von epileptischen Anfällen, Augenbeteiligung und Gerinnungsstörungen auszeichnen, identifiziert werden (Thiel, Schwarz et al. 2003; Imtiaz, Al-Mostafa et al. 2012; Wurde, Reunert et al. 2012; Iqbal, Shahzad et al. 2013). Die rein neuromuskuläre Beteiligung bei CMS durch

Mutationen in *GFPT1*, *DPAGT1*, *ALG2* und *ALG14* könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass i.S. eines Dosis-Effekts beim reinen CMS-Phänotyp die entsprechende Proteinaktivität für eine normale Funktion anderer Organe ausreicht, nicht jedoch für eine regelrechte Transmission an der motorischen Endplatte (Hantai, Nicole et al. 2013). Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass bei einem Teil der *DPAGT1*-CMS-Patienten eine auffällige Veränderung der Glykosylierung des Serum-Transferrins vorliegt, was in diesen Fällen auf das Vorliegen eines generalisierten Glykosylierungsdefekts hinweist (Belaya, Finlayson et al. 2012). Die Glykosylierung des Serum-Transferrins wird als Screening-Test zur Detektion von CDG und anderer Stoffwechselerkrankungen eingesetzt und zeigt häufig, jedoch keineswegs in allen Fällen, bei CDG charakteristische Veränderungen. Dass bei anderen *DPAGT1*-Individuen die Transferrin-Untersuchung normal war, könnte wiederum darauf hindeuten, dass beim CMS - im Unterschied zum CDG-Phänotyp - eine gewisse *DPAGT1*-Enzymrestfunktion vorhanden ist.

Der Pathomechanismus, über den Glykosylierungsstörungen ein CMS verursachen, ist bislang ungeklärt und hierzu sind weitere Untersuchungen nötig. Kürzlich konnte in Myoblasten von *GFPT1*-CMS-Patienten gezeigt werden, dass eine Defizienz von *GFPT1* zu einer Verminderung der Expression von AChR an der Endplatte führt (Zoltowska, Webster et al. 2013). Dieser Mechanismus konnte auch bei *ALG14*- und *DPAGT1*-assoziiertem CMS nachgewiesen werden, wobei die elektrophysiologischen Eigenschaften der AChR nicht verändert waren (Belaya, Finlayson et al. 2012; Cossins, Belaya et al. 2013). Es lässt sich vermuten, dass durch die Mutationen der genannten Glykosylierungsgene eine regelrechte Glykosylierung der Untereinheiten des AChR ausbleibt, dies den Transport einer ausreichenden Anzahl an AChR an die Zelloberfläche verhindert und in der Endstrecke zu einer verminderten Anzahl von AChR an der Postsynapse führt.

## 10. Ausblick

Trotz umfangreicher Bemühungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nur bei einem Teil der bisher nicht genetisch gesicherten CMS-Patienten eine pathogene Sequenzveränderung gefunden werden. Da für Patienten mit *DPAGT1*, *ALG2* und *ALG14*-CMS ein Phänotyp mit Gliedergürtelbeteiligung und nur sehr milder Beteiligung oder gar Aussparung der fazialen, extraokulären und bulbären Muskulatur beschrieben ist und dies zum Phänotyp einiger der

Patienten aus der Gliedergürtelkohorte passt, planen wir, diese Gene in den Patienten mit den entsprechenden Phänotypen zu testen (Belaya, Finlayson et al. 2012; Belaya, Finlayson et al. 2012; Cossins, Belaya et al. 2013).

## VII. Literaturverzeichnis

- Aarli, J. A., C. Mattsson, et al. (1975). "Antibodies against nicotinic acetylcholine receptor and skeletal muscle in human and experimental myasthenia gravis." *Scand J Immunol* **4**(8): 849-852.
- Abicht, A., M. Dusl, et al. (2012). "Congenital myasthenic syndromes: Achievements and limitations of phenotype-guided gene-after-gene sequencing in diagnostic practice: A study of 680 patients." *Hum Mutat*.
- Abicht, A., R. Stucka, et al. (1999). "A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin." *Neurology* **53**(7): 1564-1569.
- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, et al. (2010). "A method and server for predicting damaging missense mutations." *Nat Methods* **7**(4): 248-249.
- Anderson, J. A., J. J. Ng, et al. (2008). "Variable phenotypes associated with mutations in DOK7." *Muscle Nerve* **37**(4): 448-456.
- Anlar, B., E. Ozdirim, et al. (1996). "Myasthenia gravis in childhood." *Acta Paediatr* **85**(7): 838-842.
- Apel, E. D., D. J. Glass, et al. (1997). "Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold." *Neuron* **18**(4): 623-635.
- Banwell, B. L., K. Ohno, et al. (2004). "Novel truncating RAPSN mutations causing congenital myasthenic syndrome responsive to 3,4-diaminopyridine." *Neuromuscul Disord* **14**(3): 202-207.
- Banwell, B. L., J. Russel, et al. (1999). "Myopathy, myasthenic syndrome, and epidermolysis bullosa simplex due to plectin deficiency." *J Neuropathol Exp Neurol* **58**(8): 832-846.
- Basiri, K., K. Belaya, et al. (2013). "Clinical features in a large Iranian family with a limb-girdle congenital myasthenic syndrome due to a mutation in DPAGT1." *Neuromuscul Disord* **23**(6): 469-472.
- Beeson, D., D. Hantai, et al. (2005). "126th International Workshop: congenital myasthenic syndromes, 24-26 September 2004, Naarden, the Netherlands." *Neuromuscul Disord* **15**(7): 498-512.
- Beeson, D., O. Higuchi, et al. (2006). "Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy." *Science* **313**(5795): 1975-1978.
- Belaya, K., S. Finlayson, et al. (2012). "Identification of DPAGT1 as a new gene in which mutations cause a congenital myasthenic syndrome." *Ann N Y Acad Sci* **1275**: 29-35.
- Belaya, K., S. Finlayson, et al. (2012). "Mutations in DPAGT1 cause a limb-girdle congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates." *Am J Hum Genet* **91**(1): 193-201.
- Ben Ammar, A., F. Petit, et al. (2010). "Phenotype genotype analysis in 15 patients presenting a congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7." *J Neurol* **257**(5): 754-766.
- Ben Ammar, A., P. Soltanzadeh, et al. (2013). "A mutation causes MuSK reduced sensitivity to agrin and congenital myasthenia." *PLoS One* **8**(1): e53826.
- Bergamin, E., P. T. Hallock, et al. (2010). "The cytoplasmic adaptor protein Dok7 activates the receptor tyrosine kinase MuSK via dimerization." *Mol Cell* **39**(1): 100-109.
- Bestue-Cardiel, M., A. Saenz de Cabezón-Alvarez, et al. (2005). "Congenital endplate acetylcholinesterase deficiency responsive to ephedrine." *Neurology* **65**(1): 144-146.
- Bonnemaison, M. L., B. A. Eipper, et al. (2013). "Role of adaptor proteins in secretory granule biogenesis and maturation." *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 101.
- Bras, J., A. Verloes, et al. (2012). "Mutation of the parkinsonism gene ATP13A2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis." *Hum Mol Genet* **21**(12): 2646-2650.
- Bretthauer, R. K. (2009). "Structure, expression, and regulation of UDP-GlcNAc: dolichol phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase (DPAGT1)." *Curr Drug Targets* **10**(6): 477-482.
- Buchner, B., C. Gallenmüller, et al. (2012). "The German Network for Mitochondrial Disorders (mitoNET)." *Medizinische Genetik* **24**(3): 193-199.
- Burke, G., J. Cossins, et al. (2003). "Rapsyn mutations in hereditary myasthenia: distinct early- and late-onset phenotypes." *Neurology* **61**(6): 826-828.
- Burke, G., A. Hiscock, et al. (2013). "Salbutamol benefits children with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations." *Neuromuscul Disord* **23**(2): 170-175.

- Burset, M., I. A. Seledtsov, et al. (2000). "Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes." *Nucleic Acids Res* **28**(21): 4364-4375.
- Butkinaree, C., K. Park, et al. (2010). "O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress." *Biochim Biophys Acta* **1800**(2): 96-106.
- Cartaud, A., S. Coutant, et al. (1998). "Evidence for in situ and in vitro association between beta-dystroglycan and the subsynaptic 43K rapsyn protein. Consequence for acetylcholine receptor clustering at the synapse." *J Biol Chem* **273**(18): 11321-11326.
- Chaouch, A., J. S. Muller, et al. (2012). "A retrospective clinical study of the treatment of slow-channel congenital myasthenic syndrome." *J Neurol* **259**(3): 474-481.
- Chevessier, F., B. Faraut, et al. (2004). "MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome." *Hum Mol Genet* **13**(24): 3229-3240.
- Chevessier, F., E. Girard, et al. (2008). "A mouse model for congenital myasthenic syndrome due to MuSK mutations reveals defects in structure and function of neuromuscular junctions." *Hum Mol Genet* **17**(22): 3577-3595.
- Clarke, N. F., R. L. Smith, et al. (2005). "A novel X-linked form of congenital fiber-type disproportion." *Ann Neurol* **58**(5): 767-772.
- Cole, R. N. and G. W. Hart (2001). "Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals." *J Neurochem* **79**(5): 1080-1089.
- Condit, C. M., P. J. Achter, et al. (2002). "The changing meanings of "mutation:" A contextualized study of public discourse." *Hum Mutat* **19**(1): 69-75.
- Cossins, J., K. Belaya, et al. (2013). "Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14." *Brain* **136**(Pt 3): 944-956.
- Cossins, J., W. W. Liu, et al. (2012). "The spectrum of mutations that underlie the neuromuscular junction synaptopathy in DOK7 congenital myasthenic syndrome." *Hum Mol Genet* **21**(17): 3765-3775.
- Croxen, R., C. Young, et al. (2001). "End-plate gamma- and epsilon-subunit mRNA levels in AChR deficiency syndrome due to epsilon-subunit null mutations." *Brain* **124**(Pt 7): 1362-1372.
- D'Andrea, L. D. and L. Regan (2003). "TPR proteins: the versatile helix." *Trends Biochem Sci* **28**(12): 655-662.
- Dall'Olio, F., N. Malagolini, et al. (2012). "Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes." *Front Biosci* **17**: 670-699.
- Daly, A. K. (2003). "Candidate gene case-control studies." *Pharmacogenomics* **4**(2): 127-139.
- DeChiara, T. M., D. C. Bowen, et al. (1996). "The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo." *Cell* **85**(4): 501-512.
- Depienne, C. and E. LeGuern (2012). "PCDH19-related infantile epileptic encephalopathy: an unusual X-linked inheritance disorder." *Hum Mutat* **33**(4): 627-634.
- Dibbens, L. M., P. S. Tarpey, et al. (2008). "X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment." *Nat Genet* **40**(6): 776-781.
- Dilena, R., A. Abicht, et al. (2013). "Congenital Myasthenic Syndrome Due to Choline Acetyltransferase Mutations in Infants: Clinical Suspicion and Comprehensive Electrophysiological Assessment Are Important for Early Diagnosis." *J Child Neurol*.
- Donger, C., E. Krejci, et al. (1998). "Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic)." *Am J Hum Genet* **63**(4): 967-975.
- Engel, A. G. (1994). "Congenital myasthenic syndromes." *Neurol Clin* **12**(2): 401-437.
- Engel, A. G. (2007). "The therapy of congenital myasthenic syndromes." *Neurotherapeutics* **4**(2): 252-257.
- Engel, A. G. (2012). "Congenital myasthenic syndromes in 2012." *Curr Neurol Neurosci Rep* **12**(1): 92-101.

- Engel, A. G., E. H. Lambert, et al. (1977). "A new myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency, small nerve terminals, and reduced acetylcholine release." Ann Neurol **1**(4): 315-330.
- Engel, A. G., K. Ohno, et al. (1996). "End-plate acetylcholine receptor deficiency due to nonsense mutations in the epsilon subunit." Ann Neurol **40**(5): 810-817.
- Engel, A. G., K. Ohno, et al. (1996). "New mutations in acetylcholine receptor subunit genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome." Hum Mol Genet **5**(9): 1217-1227.
- Engel, A. G., K. Ohno, et al. (2003). "Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade." Muscle Nerve **27**(1): 4-25.
- Engel, A. G., K. Ohno, et al. (2003). "Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction." Nat Rev Neurosci **4**(5): 339-352.
- Engel, A. G., X. M. Shen, et al. (2012). "New horizons for congenital myasthenic syndromes." Ann N Y Acad Sci **1275**: 54-62.
- Finlayson, S., J. Palace, et al. (2013). "Clinical features of congenital myasthenic syndrome due to mutations in DPAGT1." J Neurol Neurosurg Psychiatry.
- Finn, A. J., G. Feng, et al. (2003). "Postsynaptic requirement for Abl kinases in assembly of the neuromuscular junction." Nat Neurosci **6**(7): 717-723.
- Foo, J. N., J. J. Liu, et al. (2012). "Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases." Nat Rev Neurol **8**(9): 508-517.
- Forrest, K., J. E. Mellerio, et al. (2010). "Congenital muscular dystrophy, myasthenic symptoms and epidermolysis bullosa simplex (EBS) associated with mutations in the PLEC1 gene encoding plectin." Neuromuscul Disord **20**(11): 709-711.
- Froehner, S. C., C. W. Luetje, et al. (1990). "The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes." Neuron **5**(4): 403-410.
- Furtado, S., H. Payami, et al. (2004). "Profile of families with parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2)." Mov Disord **19**(6): 622-629.
- Gallenmuller, C., W. M. Felber, et al. (2013). "Salbutamol-responsive limb-girdle congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation and heteroallelic deletion in MUSK." Neuromuscul Disord.
- Gao, K., A. Masuda, et al. (2008). "Human branch point consensus sequence is yUnAy." Nucleic Acids Res **36**(7): 2257-2267.
- Gao, X. D., S. Moriyama, et al. (2008). "Interaction between the C termini of Alg13 and Alg14 mediates formation of the active UDP-N-acetylglucosamine transferase complex." J Biol Chem **283**(47): 32534-32541.
- Gao, X. D., H. Tachikawa, et al. (2005). "Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation." J Biol Chem **280**(43): 36254-36262.
- Gautam, M., P. G. Noakes, et al. (1996). "Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice." Cell **85**(4): 525-535.
- Gautam, M., P. G. Noakes, et al. (1995). "Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice." Nature **377**(6546): 232-236.
- Gehle, V. M. and K. Sumikawa (1991). "Site-directed mutagenesis of the conserved N-glycosylation site on the nicotinic acetylcholine receptor subunits." Brain Res Mol Brain Res **11**(1): 17-25.
- Gehle, V. M., E. C. Walcott, et al. (1997). "N-glycosylation at the conserved sites ensures the expression of properly folded functional ACh receptors." Brain Res Mol Brain Res **45**(2): 219-229.
- Gervasio, O. L. and W. D. Phillips (2005). "Increased ratio of rapsyn to ACh receptor stabilizes postsynaptic receptors at the mouse neuromuscular synapse." J Physiol **562**(Pt 3): 673-685.
- Ghazanfari, N., K. J. Fernandez, et al. (2011). "Muscle specific kinase: organiser of synaptic membrane domains." Int J Biochem Cell Biol **43**(3): 295-298.

- Glass, D. J., E. D. Apel, et al. (1997). "Kinase domain of the muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) is sufficient for phosphorylation but not clustering of acetylcholine receptors: required role for the MuSK ectodomain?" Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8848-8853.
- Glass, D. J., D. C. Bowen, et al. (1996). "Agrin acts via a MuSK receptor complex." Cell **85**(4): 513-523.
- Glass, D. J. and G. D. Yancopoulos (1997). "Sequential roles of agrin, MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation." Curr Opin Neurobiol **7**(3): 379-384.
- Guergueltcheva, V., J. S. Muller, et al. (2011). "Congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates caused by GFPT1 mutations." J Neurol.
- Guerreiro, R. J., E. Lohmann, et al. (2012). "Exome sequencing reveals an unexpected genetic cause of disease: NOTCH3 mutation in a Turkish family with Alzheimer's disease." Neurobiology of Aging **33**(5): 1008 e1017-1023.
- Güven, A., M. Demirci, et al. (2012). "Recurrent COLQ mutation in congenital myasthenic syndrome." Pediatr Neurol **46**(4): 253-256.
- Haeuptle, M. A. and T. Hennet (2009). "Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides." Hum Mutat **30**(12): 1628-1641.
- Haltiwanger, R. S. and J. B. Lowe (2004). "Role of glycosylation in development." Annu Rev Biochem **73**: 491-537.
- Hanisch, F. G. (2001). "O-glycosylation of the mucin type." Biol Chem **382**(2): 143-149.
- Hanover, J. A., S. Yu, et al. (2003). "Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene." Arch Biochem Biophys **409**(2): 287-297.
- Hantai, D., S. Nicole, et al. (2013). "Congenital myasthenic syndromes: an update." Current Opinion in Neurology **26**(5): 561-568.
- Hantai, D., P. Richard, et al. (2004). "Congenital myasthenic syndromes." Curr Opin Neurol **17**(5): 539-551.
- Hart, G. W., M. P. Housley, et al. (2007). "Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins." Nature **446**(7139): 1017-1022.
- Hennekam, R. C. and L. G. Biesecker (2012). "Next-generation sequencing demands next-generation phenotyping." Hum Mutat **33**(5): 884-886.
- Hennet, T. (2012). "Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation." Biochim Biophys Acta **1820**(9): 1306-1317.
- Herbst, R., T. Iskratsch, et al. (2009). "Aberrant development of neuromuscular junctions in glycosylation-defective Large(myd) mice." Neuromuscul Disord **19**(5): 366-378.
- Heron, S. E., K. R. Smith, et al. (2012). "Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Nat Genet **44**(11): 1188-1190.
- Hoch, W. (1999). "Formation of the neuromuscular junction. Agrin and its unusual receptors." Eur J Biochem **265**(1): 1-10.
- Hoch, W., J. McConville, et al. (2001). "Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies." Nat Med **7**(3): 365-368.
- Hoshi, T., T. Tezuka, et al. (2013). "Mesdc2 plays a key role in cell-surface expression of Lrp4 and postsynaptic specialization in myotubes." FEBS Lett **587**(23): 3749-3754.
- Hu, Y., J. Suarez, et al. (2009). "Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose." J Biol Chem **284**(1): 547-555.
- Huffaker, T. C. and P. W. Robbins (1983). "Yeast mutants deficient in protein glycosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(24): 7466-7470.
- Hughes, B. W., L. L. Kusner, et al. (2006). "Molecular architecture of the neuromuscular junction." Muscle Nerve **33**(4): 445-461.
- Huze, C., S. Bauche, et al. (2009). "Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function." Am J Hum Genet **85**(2): 155-167.

- Imtiaz, F., A. Al-Mostafa, et al. (2012). "Further Delineation of the Phenotype of Congenital Disorder of Glycosylation DPAGT1-CDG (CDG-Ij) Identified by Homozygosity Mapping." *JIMD Rep* **2**: 107-111.
- Iqbal, Z., M. Shahzad, et al. (2013). "A compound heterozygous mutation in DPAGT1 results in a congenital disorder of glycosylation with a relatively mild phenotype." *Eur J Hum Genet* **21**(8): 844-849.
- Ishigaki, K., D. Nicolle, et al. (2003). "Two novel mutations in the COLQ gene cause endplate acetylcholinesterase deficiency." *Neuromuscul Disord* **13**(3): 236-244.
- Jackson, B. J., M. A. Kukuruzinska, et al. (1993). "Biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: the *alg2* mutation." *Glycobiology* **3**(4): 357-364.
- Jaeken, J. and G. Matthijs (2007). "Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**: 261-278.
- Jinek, M., J. Rehwinkel, et al. (2004). "The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha." *Nat Struct Mol Biol* **11**(10): 1001-1007.
- Kelly, W. G. and G. W. Hart (1989). "Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin." *Cell* **57**(2): 243-251.
- Kim, N., A. L. Stiegler, et al. (2008). "Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK." *Cell* **135**(2): 334-342.
- Kimbell, L. M., K. Ohno, et al. (2004). "C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse." *J Biol Chem* **279**(12): 10997-11005.
- Kinali, M., D. Beeson, et al. (2008). "Congenital myasthenic syndromes in childhood: diagnostic and management challenges." *J Neuroimmunol* **201-202**: 6-12.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Larkin, A. and B. Imperiali (2011). "The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation." *Biochemistry* **50**(21): 4411-4426.
- Lashley, D., J. Palace, et al. (2010). "Ephedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7." *Neurology* **74**(19): 1517-1523.
- Le Pecq, J. B. and C. Paoletti (1966). "A new fluorometric method for RNA and DNA determination." *Anal Biochem* **17**(1): 100-107.
- Liewluck, T., D. Selcen, et al. (2011). "Beneficial effects of albuterol in congenital endplate acetylcholinesterase deficiency and Dok-7 myasthenia." *Muscle Nerve* **44**(5): 789-794.
- Lochmuller, H. and V. Straub (2007). "[MD-NET--muscular dystrophy network]." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **50**(12): 1518-1523.
- Lorenzoni, P. J., R. H. Scola, et al. (2013). "Salbutamol therapy in congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutation." *J Neurol Sci* **331**(1-2): 155-157.
- Love, D. C. and J. A. Hanover (2005). "The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code"." *Sci STKE* **2005**(312): re13.
- Love, D. C., J. Kochan, et al. (2003). "Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase." *J Cell Sci* **116**(Pt 4): 647-654.
- Lowe, J. B. and J. D. Marth (2003). "A genetic approach to Mammalian glycan function." *Annu Rev Biochem* **72**: 643-691.
- Lu, J., T. Takahashi, et al. (2012). "Alg14 organizes the formation of a multiglycosyltransferase complex involved in initiation of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis." *Glycobiology* **22**(4): 504-516.
- Lupski, J. R., J. G. Reid, et al. (2010). "Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy." *N Engl J Med* **362**(13): 1181-1191.
- Maggi, L., R. Brugnani, et al. (2013). "Marked phenotypic variability in two siblings with congenital myasthenic syndrome due to mutations in MUSK." *J Neurol*.

- Marangi, P. A., S. T. Wieland, et al. (2002). "Laminin-1 redistributes postsynaptic proteins and requires rapsyn, tyrosine phosphorylation, and Src and Fyn to stably cluster acetylcholine receptors." *J Cell Biol* **157**(5): 883-895.
- Martin, P. T. (2002). "Glycobiology of the synapse." *Glycobiology* **12**(1): 1R-7R.
- Martin, P. T. (2003). "Glycobiology of the neuromuscular junction." *J Neurocytol* **32**(5-8): 915-929.
- Martin, P. T. and H. H. Freeze (2003). "Glycobiology of neuromuscular disorders." *Glycobiology* **13**(8): 67R-75R.
- Maselli, R. A., J. Arredondo, et al. (2011). "Congenital myasthenic syndrome associated with epidermolysis bullosa caused by homozygous mutations in PLEC1 and CHRNE." *Clin Genet* **80**(5): 444-451.
- Maselli, R. A., J. Arredondo, et al. (2010). "Mutations in MUSK causing congenital myasthenic syndrome impair MuSK-Dok-7 interaction." *Hum Mol Genet* **19**(12): 2370-2379.
- Maselli, R. A., J. M. Fernandez, et al. (2011). "LG2 agrin mutation causing severe congenital myasthenic syndrome mimics functional characteristics of non-neural (z-) agrin." *Hum Genet*.
- Maselli, R. A., J. J. Ng, et al. (2009). "Mutations in LAMB2 causing a severe form of synaptic congenital myasthenic syndrome." *J Med Genet* **46**(3): 203-208.
- McQuillen, M. P. (1966). "Familial limb-girdle myasthenia." *Brain* **89**(1): 121-132.
- Mihaylova, V., J. S. Muller, et al. (2008). "Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes." *Brain* **131**(Pt 3): 747-759.
- Mihaylova, V., M. A. Salih, et al. (2009). "Refinement of the clinical phenotype in musk-related congenital myasthenic syndromes." *Neurology* **73**(22): 1926-1928.
- Mihaylova, V., R. H. Scola, et al. (2010). "Molecular characterisation of congenital myasthenic syndromes in Southern Brazil." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**(9): 973-977.
- Miller, M. P. and S. Kumar (2001). "Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation." *Hum Mol Genet* **10**(21): 2319-2328.
- Millichap, J. G. and P. R. Dodge (1960). "Diagnosis and treatment of myasthenia gravis in infancy, childhood, and adolescence: a study of 51 patients." *Neurology* **10**: 1007-1014.
- Milone, M., X. M. Shen, et al. (2009). "Myasthenic syndrome due to defects in rapsyn: Clinical and molecular findings in 39 patients." *Neurology* **73**(3): 228-235.
- Milone, M., H. L. Wang, et al. (1997). "Slow-channel myasthenic syndrome caused by enhanced activation, desensitization, and agonist binding affinity attributable to mutation in the M2 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit." *J Neurosci* **17**(15): 5651-5665.
- Mio, T., T. Yabe, et al. (1998). "The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism." *J Biol Chem* **273**(23): 14392-14397.
- Moremen, K. W., M. Tiemeyer, et al. (2012). "Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(7): 448-462.
- Mount, S. M. (1982). "A catalogue of splice junction sequences." *Nucleic Acids Res* **10**(2): 459-472.
- Muller, J. S., A. Herczegfalvi, et al. (2007). "Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes." *Brain* **130**(Pt 6): 1497-1506.
- Muller, J. S., S. Petrova, et al. (2004). "Synaptic congenital myasthenic syndrome in three patients due to a novel missense mutation (T441A) of the COLQ gene." *Neuropediatrics* **35**(3): 183-189.
- Mullis, K. B. (1990). "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction." *Ann Biol Clin (Paris)* **48**(8): 579-582.
- Nagel, G., H. Unal, et al. (2013). "Implementation of a population-based epidemiological rare disease registry: study protocol of the amyotrophic lateral sclerosis (ALS) - registry Swabia." *BMC Neurol* **13**: 22.
- Navedo, M. F., J. A. Lasalde-Dominicci, et al. (2006). "Novel beta subunit mutation causes a slow-channel syndrome by enhancing activation and decreasing the rate of agonist dissociation." *Mol Cell Neurosci* **32**(1-2): 82-90.
- Ngoh, G. A., T. Hamid, et al. (2009). "O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(5): H1711-1719.

- Nichols, P., R. Croxen, et al. (1999). "Mutation of the acetylcholine receptor epsilon-subunit promoter in congenital myasthenic syndrome." Ann Neurol **45**(4): 439-443.
- Nitkin, R. M., M. A. Smith, et al. (1987). "Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ." J Cell Biol **105**(6 Pt 1): 2471-2478.
- Nomoto, H., N. Takahashi, et al. (1986). "Carbohydrate structures of acetylcholine receptor from Torpedo californica and distribution of oligosaccharides among the subunits." Eur J Biochem **157**(2): 233-242.
- Ohkawara, B., M. Cabrera-Serrano, et al. (2013). "LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated musk signaling in a position-specific manner." Hum Mol Genet.
- Ohno, K. (2013). "Glycosylation defects as an emerging novel cause leading to a limb-girdle type of congenital myasthenic syndromes." J Neurol Neurosurg Psychiatry **84**(10): 1064.
- Ohno, K., B. Anlar, et al. (1998). "Myasthenic syndromes in Turkish kinships due to mutations in the acetylcholine receptor." Ann Neurol **44**(2): 234-241.
- Ohno, K., J. Brengman, et al. (1998). "Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9654-9659.
- Ohno, K., J. M. Brengman, et al. (1999). "Congenital end-plate acetylcholinesterase deficiency caused by a nonsense mutation and an A->G splice-donor-site mutation at position +3 of the collagenlike-tail-subunit gene (COLQ): how does G at position +3 result in aberrant splicing?" Am J Hum Genet **65**(3): 635-644.
- Ohno, K., A. G. Engel, et al. (2000). "The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency." Ann Neurol **47**(2): 162-170.
- Ohno, K., A. G. Engel, et al. (2002). "Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome." Am J Hum Genet **70**(4): 875-885.
- Ohno, K., A. Tsujino, et al. (2001). "Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 2017-2022.
- Ohno, K., H. L. Wang, et al. (1996). "Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit." Neuron **17**(1): 157-170.
- Okada, K., A. Inoue, et al. (2006). "The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis." Science **312**(5781): 1802-1805.
- Palace, J., D. Lashley, et al. (2007). "Clinical features of the DOK7 neuromuscular junction synaptopathy." Brain **130**(Pt 6): 1507-1515.
- Parkhomovskiy, N. and P. T. Martin (2000). "Alpha-galactosidase stimulates acetylcholine receptor aggregation in skeletal muscle cells via PNA-binding carbohydrates." Biochem Biophys Res Commun **270**(3): 899-902.
- Ravenscroft, G., E. Sollis, et al. (2011). "Fetal akinesia: review of the genetics of the neuromuscular causes." J Med Genet **48**(12): 793-801.
- Ribaud, R., M. Gilman, et al. (2001). "Preparation of RNA from tissues and cells." Curr Protoc Immunol **Chapter 10**: Unit 10 11.
- Roberts, A. E., T. Araki, et al. (2007). "Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome." Nat Genet **39**(1): 70-74.
- Sadeh, M., X. M. Shen, et al. (2011). "Beneficial effect of albuterol in congenital myasthenic syndrome with epsilon-subunit mutations." Muscle Nerve **44**(2): 289-291.
- Sakabe, K., Z. Wang, et al. (2010). "Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(46): 19915-19920.
- Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (2001). "Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus." Nat Rev Neurosci **2**(11): 791-805.
- Sanger, F. and A. R. Coulson (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." J Mol Biol **94**(3): 441-448.

- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Sato, N., M. Suzuki, et al. (1999). "Evaluation of the malignancy of glioma using 11C-methionine positron emission tomography and proliferating cell nuclear antigen staining." Neurosurg Rev **22**(4): 210-214.
- Schara, U., H. J. Christen, et al. (2010). "Long-term follow-up in patients with congenital myasthenic syndrome due to CHAT mutations." Eur J Paediatr Neurol **14**(4): 326-333.
- Schara, U., A. Della Marina, et al. (2012). "Congenital myasthenic syndromes: current diagnostic and therapeutic approaches." Neuropediatrics **43**(4): 184-193.
- Schara, U. and H. Lochmuller (2008). "Therapeutic strategies in congenital myasthenic syndromes." Neurotherapeutics **5**(4): 542-547.
- Schulz-Schaeffer, W. J., A. Giese, et al. (1996). "Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene determines cerebellar pathology in Creutzfeldt-Jakob disease." Clin Neuropathol **15**(6): 353-357.
- Schwarz, J. M., C. Rodelsperger, et al. (2010). "MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations." Nat Methods **7**(8): 575-576.
- Selcen, D., V. C. Juel, et al. (2011). "Myasthenic syndrome caused by plectinopathy." Neurology **76**(4): 327-336.
- Selcen, D., M. Milone, et al. (2008). "Dok-7 myasthenia: phenotypic and molecular genetic studies in 16 patients." Ann Neurol **64**(1): 71-87.
- Senderek, J., J. S. Muller, et al. (2011). "Hexosamine biosynthetic pathway mutations cause neuromuscular transmission defect." Am J Hum Genet **88**(2): 162-172.
- Shafi, R., S. P. Iyer, et al. (2000). "The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5735-5739.
- Shapira, Y. A., M. E. Sadeh, et al. (2002). "Three novel COLQ mutations and variation of phenotypic expressivity due to G240X." Neurology **58**(4): 603-609.
- Shen, X. M., T. O. Crawford, et al. (2011). "Functional consequences and structural interpretation of mutations of human choline acetyltransferase." Hum Mutat **32**(11): 1259-1267.
- Slater, C. R., P. R. Fawcett, et al. (2006). "Pre- and post-synaptic abnormalities associated with impaired neuromuscular transmission in a group of patients with 'limb-girdle myasthenia'." Brain **129**(Pt 8): 2061-2076.
- Stenson, P. D., E. V. Ball, et al. (2003). "Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update." Hum Mutat **21**(6): 577-581.
- Stiegler, A. L., S. J. Burden, et al. (2006). "Crystal structure of the agrin-responsive immunoglobulin-like domains 1 and 2 of the receptor tyrosine kinase MuSK." J Mol Biol **364**(3): 424-433.
- Stojkovic, T., J. Vissing, et al. (2009). "Muscle glycogenosis due to phosphoglucomutase 1 deficiency." N Engl J Med **361**(4): 425-427.
- Strochlic, L., A. Cartaud, et al. (2005). "The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: new partners, new functions." Bioessays **27**(11): 1129-1135.
- Tabor, H. K., N. J. Risch, et al. (2002). "Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations." Nat Rev Genet **3**(5): 391-397.
- Thiel, C., M. Schwarz, et al. (2003). "A new type of congenital disorders of glycosylation (CDG-II) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis." J Biol Chem **278**(25): 22498-22505.
- Torres, C. R. and G. W. Hart (1984). "Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc." J Biol Chem **259**(5): 3308-3317.
- Tsujino, A., C. Maertens, et al. (2003). "Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7377-7382.
- Unwin, N. (2005). "Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution." J Mol Biol **346**(4): 967-989.
- Varki, A. and H. H. Freeze (2009). "Glycans in Acquired Human Diseases."

- Varki, A., H. H. Freeze, et al. (2009). "Glycans in Development and Systemic Physiology."
- Varki, A., R. Kannagi, et al. (2009). "Glycosylation Changes in Cancer."
- Varki, A. and J. B. Lowe (2009). "Biological Roles of Glycans."
- Veltman, J. A. and H. G. Brunner (2012). "De novo mutations in human genetic disease." Nat Rev Genet **13**(8): 565-575.
- Vocadlo, D. J. (2012). "O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation." Curr Opin Chem Biol **16**(5-6): 488-497.
- Wan, J., M. Yourshaw, et al. (2012). "Mutations in the RNA exosome component gene EXOSC3 cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration." Nat Genet **44**(6): 704-708.
- Wanamaker, C. P., J. C. Christianson, et al. (2003). "Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly." Ann N Y Acad Sci **998**: 66-80.
- Wargon, I., P. Richard, et al. (2012). "Long-term follow-up of patients with congenital myasthenic syndrome caused by COLQ mutations." Neuromuscul Disord **22**(4): 318-324.
- Watty, A. and S. J. Burden (2002). "MuSK glycosylation restrains MuSK activation and acetylcholine receptor clustering." J Biol Chem **277**(52): 50457-50462.
- Wells, L., K. Vosseller, et al. (2003). "A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance." Cell Mol Life Sci **60**(2): 222-228.
- Wieland, I., S. Jakubiczka, et al. (2004). "Mutations of the ephrin-B1 gene cause craniofrontonasal syndrome." Am J Hum Genet **74**(6): 1209-1215.
- Winter, L. and G. Wiche (2013). "The many faces of plectin and plectinopathies: pathology and mechanisms." Acta Neuropathol **125**(1): 77-93.
- Woods, A. G., C. W. Woods, et al. (2012). "Congenital disorders of glycosylation." Adv Neonatal Care **12**(2): 90-95.
- Worsley-Hunt, R., V. Bernard, et al. (2011). "Identification of cis-regulatory sequence variations in individual genome sequences." Genome Med **3**(10): 65.
- Wurde, A. E., J. Reunert, et al. (2012). "Congenital disorder of glycosylation type Ij (CDG-Ij, DPAGT1-CDG): extending the clinical and molecular spectrum of a rare disease." Mol Genet Metab **105**(4): 634-641.
- Xia, B. and P. T. Martin (2002). "Modulation of agrin binding and activity by the CT and related carbohydrate antigens." Mol Cell Neurosci **19**(4): 539-551.
- Zachara, N. E., H. Molina, et al. (2011). "The dynamic stress-induced "O-GlcNAc-ome" highlights functions for O-GlcNAc in regulating DNA damage/repair and other cellular pathways." Amino Acids **40**(3): 793-808.
- Zeidan, Q. and G. W. Hart (2010). "The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways." Journal of Cell Science **123**(Pt 1): 13-22.
- Zhang, B., S. Luo, et al. (2008). "LRP4 serves as a coreceptor of agrin." Neuron **60**(2): 285-297.
- Zhang, W., A. S. Coldefy, et al. (2011). "Agrin binds to the N-terminal region of Lrp4 protein and stimulates association between Lrp4 and the first immunoglobulin-like domain in muscle-specific kinase (MuSK)." J Biol Chem **286**(47): 40624-40630.
- Zhou, H., D. J. Glass, et al. (1999). "Distinct domains of MuSK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations." J Cell Biol **146**(5): 1133-1146.
- Zoltowska, K., R. Webster, et al. (2013). "Mutations in GFPT1 that underlie limb-girdle congenital myasthenic syndrome result in reduced cell-surface expression of muscle AChR." Hum Mol Genet **22**(14): 2905-2913.
- Zong, Y., B. Zhang, et al. (2012). "Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling." Genes Dev **26**(3): 247-258.

## VIII. Anhang

### 1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholinrezeptor/en
<i>AGRN</i>	Gen kodierend für Agrin
<i>ALG2</i>	Gen kodierend für Alpha-1,3-mannosyltransferase
<i>ALG14</i>	Gen kodierend für Beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase
bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
CDA II	Kongenitale dyserythroetische Anämie Typ II, engl. Congenital Dyserythropoieic Anemia Type II
cDNA	complementary DNA
CDG	Angeborene Erkrankungen der Glykosylierung, engl. Congenital disorders of glycosilation
<i>CHAT</i>	Gen kodierend für Cholin-Acetyltransferase (ChAT)
<i>CHRNA1</i>	Gen kodierend für die $\alpha$ -Untereinheit des AChR
<i>CHRN1</i>	Gen kodierend für die $\beta$ -Untereinheit des AChR
<i>CHRND</i>	Gen kodierend für die $\delta$ -Untereinheit des AChR
<i>CHRNE</i>	Gen kodierend für die $\varepsilon$ -Untereinheit des AChR
CMAP	Compound muscle action potential (Summenmuskelaktionspotential)
CMS	Congenital myasthenic syndrome (Kongenitales myasthenes Syndrom)

CNV	Genkopienzahlvariante, engl. Copy number variation
<i>COLQ</i>	Gen kodierend für ColQ
°C	Grad Celsius
3,4-DAP	3,4-Diaminopyridin
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
<i>DOK7</i>	Gen kodierend für docking protein 7 (Dok-7)
<i>DPAGT1</i>	Gen kodierend für Dolichyl-Phosphat-(UDP-N-Acetylglukosamin)-N-acetylglukosamin-phosphotransferase 1
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EMeg32	murines orthologes Enzym zu GNA1 (Glukosamin-6-Phosphat N-Acetyltransferase)
EPP	Endplattenpotential
GAG	Glykosaminoglykan
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GalNAc-1-P	N-Acetylgalaktosamin 1-Phosphat
<i>GFPT1</i>	Gen kodierend für Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Amidotransferase 1 (GFAT1)
GlcNAc-6P	N-Acetylglukosamin-6-Phosphat
GlcN6P	Glukosamin-6-Phosphat
<i>GNE</i>	Gen kodierend für UDP-N-Acetylglukosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase
<i>GNPNAT1</i>	Gen kodierend für Glukosamin-6-Phosphat N-Acetyltransferase (GNA1)
HIBM2	vererbte Einschlußkörpermyopathie Typ II, engl. hereditary inclusion body myopathy

---

Hz	Hertz
INDEL	Kleiner Insertions- und Deletionspolymorphismus
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
<i>LAMB2</i>	Gen kodierend für Laminin beta 2
LG-CMS	Limb girdle-(LG)-CMS
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
<i>LRP-4</i>	Gen kodierend für Low-density lipoprotein receptor related protein 4 (LRP4)
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
µg	Mikrogramm
min	Minuten
µl	Mikroliter
mM	millimolar
mRNA	Boten (messenger)- Ribonukleinsäure
<i>MUSK</i>	Gen kodierend für Muskelspezifische Kinase (MuSK)
NGS	Next Generation Sequencing
OGA	O-GlcNAcase
O-GlcNAc	O-glykosidisch gebundenes N-Acetylglukosamin
<i>OGT</i>	Gen kodierend für O-GlcNAc-Transferase (OGT)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
<i>PGM3</i>	Gen kodierend für Phosphoglukomutase 3 (Pgm3)
PKB	Proteinkinase B

<i>PLEC</i>	Gen kodierend für Plektin
Prä-mRNA	Prä-messenger-RNA
<i>RAPSN</i>	Gen kodierend für Receptor-associated protein of the synapse (Rapsyn)
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleic acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SCCMS	Slow-Channel CMS
<i>SCN4A</i>	Gen kodierend für den spannungsabhängigen Natriumkanal Nav 1.4
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus, engl. Single Nucleotide Polymorphism
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	<i>Thermus Aquaticus</i> Polymerase
TPR	Tetratricopeptide repeat
<i>UAPI</i>	Gen kodierend für 1-UDP-N-Acetylglukosamin-Pyrophosphorylase 1, synonym <i>AGXI</i>
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetylglukosamin
<i>VCP</i>	Gen kodierend für Valosin containing protein (VCP)
z.B.	zum Beispiel

## 2. Primersequenzen

Alle Primer sind in 5'>3' Richtung angegeben.

*GNPNATI* Primer, genomisch:

gna1s TGCAGATAAACCGAGACAATGAC  
gna1as ACCAGACACACCTGTTAGATAAACCC  
gna2s ATTTAATGTTAGATTCAGGCTGGG  
gna2as TTAGCCATGACACACACTCATTG  
gna3s TCTTATGCAGGCAGAAGCACTG  
gna3as ACAACTCAGCCACATTAACATTTG  
gna4s CAAACAAGAGCAAGTCATGTTATC  
gna4as CTATGCCTATAACCAAATTGATCCAC  
gna5s GAAATACATACTGAAACAGCCTTCAC  
gna5as ACAGAGAAGCTGAGGCAAATCC  
gna6s GCCATAATCTAAACCTGTTTCTAAGG  
gna6as ATTTATGGAGGTCACCTCGGC

*UAPI* Primer, genomisch:

uap1s GCCAGAGAATGAGTGACGCACTAG  
uap1as TCCCGAGCCCCGCCGTCTCCTCGC  
uap2s GTGCCTGGTACATATTATTGTCTTAC  
uap2as TATTAGTGACATGATCCAGCTACC  
uap3s AAGACAGCTGTATAGCCTTACTTCC  
uap3as AAGTCAATAGTGGTCATCTATCAAGC  
uap4s AACAGCTAATGAATGTGTCTTACCC  
uap4as AACATTTGATGATTTATGTTGTTATCC  
uap5s TCTTAACCCTAGTTTGGAAACAATC  
uap5as TAAACTTGGTTTGA CT TCTGGAATG  
uap6s TGCCTGTCAAGGTATATAAAGATGG  
uap6as TCCCTCTCAAGTGTCTTAGTTTCTG  
uap7s TGA ACTGAACTTAAATGCTCTTCAC  
uap7as AAATGCCATGTGAGATATGTGC  
uap8s TGT TAAAGGGTTAGAAGCTGTGTATG  
uap8as GGCAAAGCTACTGTTATTTACATC  
uap9s GCAAGTAACATGGGAAGCAAAG  
uap9as CACTGT CGAATAATCAAATAAAGCC

uap10s TCATCATTATAGCAAGTCCAGC  
uap10as TCTTCAAGTACAAATGACACTCC

*PGM3* Primer, genomisch:

pgm2\_1s GAGACAGACCTATTCGTTTGGG  
pgm2\_1as TAAGGCTTGGTCTTGTAATAATGG  
pgm2\_2s CTTAAGAAATTACTTGTTATGCCCCG  
pgm2\_2as TAAGGCTTGGTCTTGTAATAATGG  
pgm3s ACTGTCTTTGGTTGAAGGGAAAC  
pgm3as GTAGACATGCAACTCAGGGTAGTTC  
pgm4s GAACTAGATTGTGAAAGGCTACTGG  
pgm4as TTGTATTAGTTCAGAATTTCCCAGC  
pgm5s GATTTGTCACCCTGAAATTCCTAC  
pgm5as ACATAGACCAGAACCTTGTGTAGCC  
pgm6s AA ACTATTCTGTTGTTCCAGGTG  
pgm6as AGACTTCTCAATGTCTAAATGTGGC  
pgm7s TTTGCAGTGAAAGAATTTGACC  
pgm7as CTGCCCACTAATGTAAAGAATTTG  
pgm8s TTGGCATAAACTAAGGCACAAC  
pgm8as TATGAGGGCAGTATCTTTCTCACAG  
pgm9s ACTAGGTATGCAAGAAACATTTGAC  
pgm9as ATTATTACCTCCCAGATATAGAAGTCTC  
pgm10s AACTTACTGTGTGTGCTTGCCTC  
pgm10as GCTGAATCTGTGATCCTAGGTAGAAG  
pgm11s CATCCATTTCCAAGATTTGC  
pgm11as GAATTGGGATAATAGGTTTTACTTAGC  
pgm12s TAGTGGTAACTCTAAGCATTTGTGG  
pgm12as ACACTTTCAGGAAGTCTAGAATAAGTC  
pgm13s CCAGAGTTCCAAGTAACATGGTC  
pgm13as AATCCAGTAGGCTGCATTGTAAAC

*OGT* Primer, genomisch:

ogt1s	GGAGGACTACATGGAATCTCGAC
ogt1as	GGAAGGAGTGATACAAGGTAGAGG
ogt2s	GAAGATATACATAACGTGCAGAACAC
ogt2as	GTCATACTGATAATATAACCACCACC
ogt3s	ACTGTTTGAGTTGCATATGGGC
ogt3as	GATTAAGACCCATTATCCACCATTC
ogt4s	CACTGAAGTTTGTGTCAGGCAGTATC
ogt4as	AAGATAGCTCAATGAAGAGTTGAAGAC
ogt5s	GAATAATGATATCACCTTCTTCCC
ogt5as	TAAGTCACATACTGCCTATACCGC
ogt6s	ATGTAATTGAAAGTCTGCAAGGACC
ogt6as	GGTCCAAACTGTCAAGTGTCAATAC
ogt7s	AGTTGTAACAAACCATCCATTAAGC
ogt7as	AAACCCTAAGCTCAAGCAATCC
ogt8s	TCAGTGGAGGCTTTATGATTCTG
ogt8as	ATGGTAAACTTAACTGCTTTCCTC
ogt9_10s	GGGTTTAAATGTACTTGAGCAAAG
ogt9_10as	AAATCAGGCTTAAGTTTCAGAGC
ogt11_12s	CAATCTGGCTTCCATTCATAAG
ogt11_12as	GGTGGTGTTCACCTTATAATCGTTA
ogt13_14s	AACAGGTGTGAGGTATAGGTTTGG
ogt13_14as	GCCATGCTGATTAACACAAATG
ogt15s	TGGGAATCTGAATTATGTAAATGC
ogt15as	TTTCAAATATCAGTTAACCAGAGGG
ogt16_17s	CTTGATGAATTTAGAGGTAAGTGTACTG
ogt16_17as	GTGTTACTGCTATCTGCATTGTCTC
ogt18s	ACATTTATGACAATCGGATAGTTCTG
ogt18as	TCCTAGAGTTATCATGAGGTTAAGGG
ogt19s	TGGATCTTATGGATTGAAATATTGG
ogt19as	AGCTCCTAAATGGGAGTGGAAG
ogt20s	TGGTAGAATTATTAGAGACCTCTGGG

---

ogt20as	TGAAGAGAATGAAGTGAGAACAAGTC
ogt21s	TGTGTGGAGGCTTAACATAAATAAC
ogt21as	CCAGAGGGCATACAACTAGTTCAC
ogt22s	CAAATGCGACTAGGTATTTATAGGG
ogt22as	GAGATCAGACCTTCCAGACCTATG

*CHRNE* Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

proAs	GAATCTCTGTACCGCAGGGCTA
e1a	AGCCCCTGTCCGTACCGAGAA
i0s	CCTCACACAGGCACCCTGGCA
e2a	CAGTGAGATGAGATTCGTCAG
i1s	TTCCCAGGCACAGCATAAT
i3a	TGCCCTGGACAAGACCTCACAC
i3s	TGTGAGGTCTTGTCCAGGGCAC
i5a	AACAATAATCGTCCGGGCCTCG
i5s	AGGTACAGATGGGAACAGAG
i6a	TCTGGACCCCGTCTAGAAGCG
i6s	TCTTCAGCCCGCTGTCAGCTCGGC
i8a	GGCCACGCCCCCACCCTTCACACT
inn8s	AGATCCACATCAGGGTGTCCA
ie10a	AAGGCAGCTGGCGGGGAAAACAC
e10s	CACGGAGCGAGCTCGTGTTTGA
i12a	CTGGAGATGGGTGGGAAATTG

*CHRNBI* Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

B1s	AACTGAAGTGCTGTCTGTCATC
B1a	CCAGAGCTTGTCCATTGGTC
B2s	GAGGCAGGTCTTAAACTAACG
B2a	GCTGGATATTCAAGGAAATTG
B3s	CCCTTGACCCACAGTTTATG
B3a	GGGAGTCAGGATGTCTAAGG
B4s	CATGATTTCCCTTCTCTGTGCC

---

B4a	ACAGGGCTATATTGGGCATCAC
B5s	TCACAGCTAGTTTCATCAAGTC
B5a	AAGCCCAATCTATGATGCTTTG
B6s	TGAATGGCCTGGAAACATGGTC
B6a	GTGCAACATTTCAACACTCAAC
B7s	GTTTCCCTTCTGGTCTGAAAGC
B7a	GCGAGTGCTGGTGCGGAATTTG
B8s	CAAACCAGTGGTAGGAGGACTC
B8a	GGGCTTGACAGTATCACCAAAC

*CHRND* Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

DNs	CTGGAGCTTTCTTGGGATGGGA
DNa	CCTCTGACTGGGACGTGCATCT
D1s	CTCATTCCACAGCCCTGTAGAC
D1a	TCTAGCTTCCTCCATGGCTATC
D2s	AGAGTGGGTGAATGTGTGCGGA
D2a	CACCGTGTGAGCCAAGATGGT
D3s	GACCTGAATCCGCACTCTGT
D3a	CAGCACTAATCCAGACAGG
D4s	CCTGTCTGGATTAGTGCTGCC
D4a	GGATAGCTTTGCATTCAGGAAG
D5s	GTAGACAGCCCATCTGCGTCTC
D5a	TGGCCACCTGGCCCTCACACC
D6s	TTTCATCAGGGTATGATGGT
D6a	CAGGCTCAAGTGATCCACCTC
D7s	TGGTGACAGAATGAGACTCCG
D7a	GGAACCCTGCCCTCTTAAGAT
D8s	GCCAGCATTATCCTGCAAGCC
D8a	TCGGGTGGCCCCTGTCTTGATT

*MUSK* Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

M1s	CCCAAGCCCACCATACTATAA
-----	-----------------------

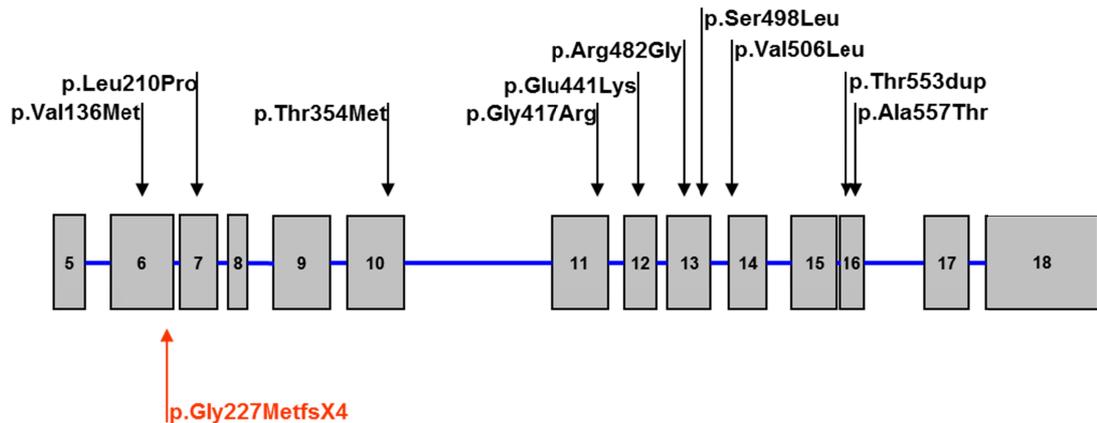
---

M1as	GAGCCTGTGGAGCTGCTGACAC
M2s	GGGATGGATACCCCATTCTC
M2as	CTCTGGGGAAACAGAATTCTC
M3s	GTGTACCAAGTCAACTTTC
M3as	CAGAAGTCACTCAAGTTTCC
M4s	GTAAGTGTGTAAGTACTGAGTGTG
M4as	CTGTCTTTGCATTTGGTGA
M5s	GGGCTGCCACATCTCTTCTC
M5as	GTGGCCAATAAAGGTCAAAGCG
M6s	GGTGTAGGTGAGACCAATGA
M6as	CTGCACACAGGGGAACATGG
M7s	CTAGGTCACCTCCGGAGTATCC
M7as	GGCTATGTTTGCAGTGTACC
M8s	GCACCCAGGCATTAACCTCC
M8as	GAATGCCAAGAAATAGC
M9s	GTATCTAAGGAAGGCAGAACT
M9as	CACAGAATTTAGGCTCTGCCA
M10s	GAGAGCGGCTGTACATTCTG
M10as	GTGAGATATCTGGATGCTCA
M11s	CATGATGGGGGTGCTTAAT
M11as	TACTTACAGCATTCCCACC
M12s	CCAAGCTAATAGTTTGGTAGC
M12as	GGCTGCCTTAGTATAACTT
M13s	ACTGAAACGTCTCACTGAT
M13as	TGCGTGAGACTTAACCAGC
M14s	TCTTGTTGGGCCTCTGGTGTA
M14as	TCATATGTTCTGACATGGTCG

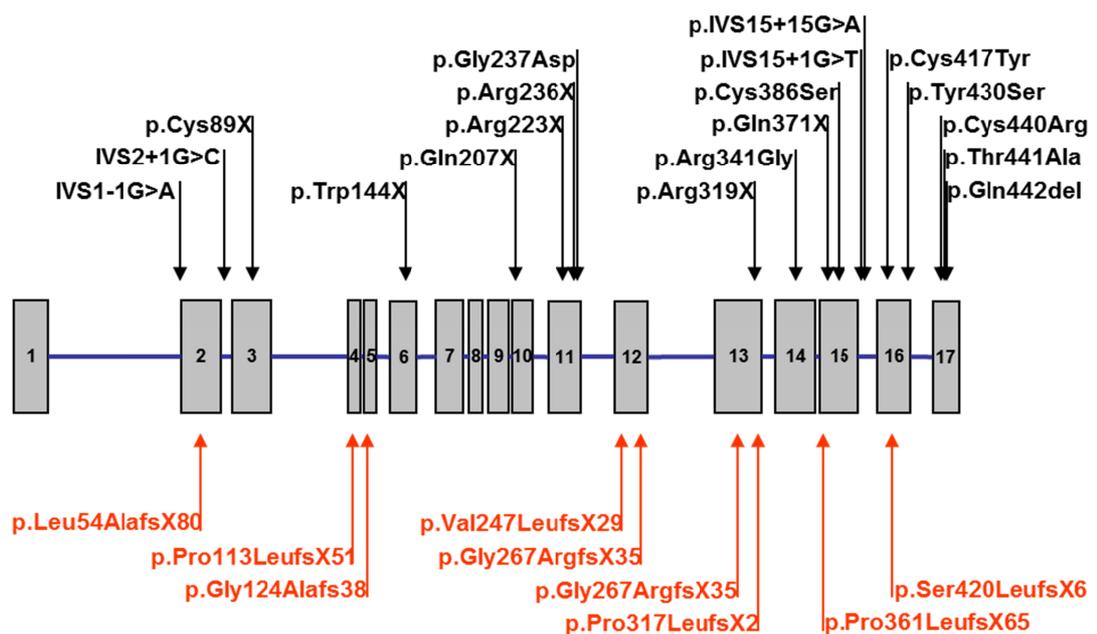
*MUSK* Primer, exonisch, für RT-PCR

cMusk_1s	CCTTCAGCGGAAGTGGAGAAA
cMusk_4as	TGGTTTGGGATTACCCATTG

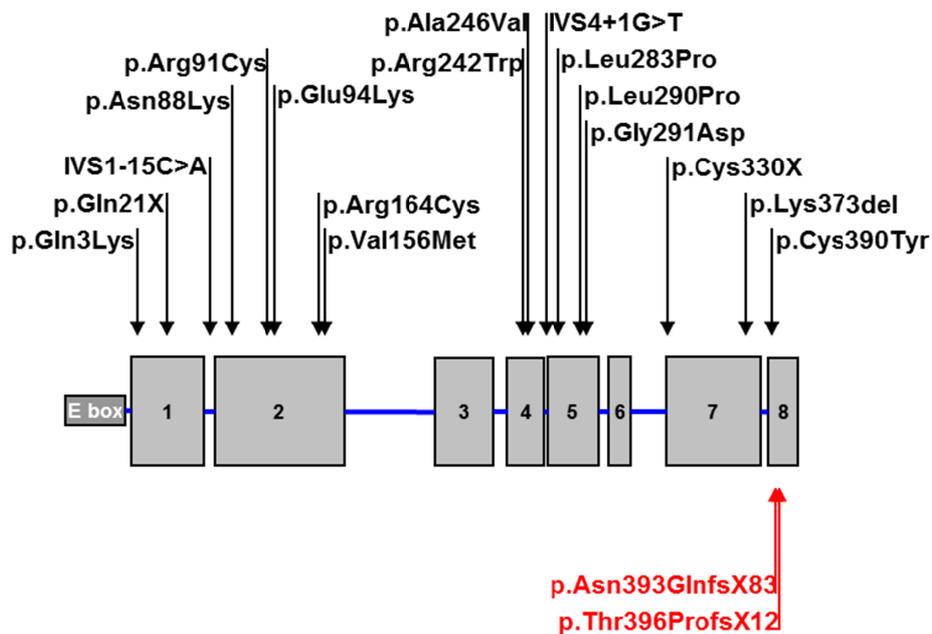
### 3. Weitere Abbildungen



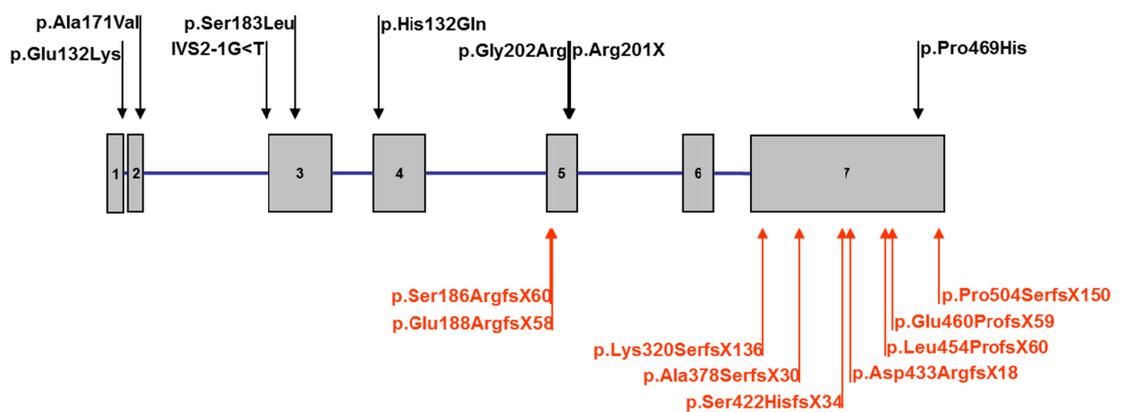
**Abb. 8:** Darstellung des CHAT-Gens (Exons grau unterlegt) mit den im Patientenkollektiv unserer Arbeitsgruppe bisher identifizierten CMS-Mutationen. Punktmutationen sind in schwarz, Frameshift-Mutationen in rot dargestellt.



**Abb. 9:** Darstellung des COLQ-Gens (Exons grau unterlegt) mit den im Patientenkollektiv unserer Arbeitsgruppe bisher identifizierten CMS-Mutationen. Punktmutationen sind in schwarz, Frameshift-Mutationen in rot dargestellt.



**Abb 10:** Darstellung des RAPSIN-Gens (Exons grau unterlegt) mit den im Patientenkollektiv unserer Arbeitsgruppe bisher identifizierten CMS-Mutationen. Punktmutationen sind in schwarz, Frameshift-Mutationen in rot dargestellt.



**Abb. 11:** Darstellung des DOK7-Gens (Exons grau unterlegt) mit den im Patientenkollektiv unserer Arbeitsgruppe bisher identifizierten CMS-Mutationen. Punktmutationen sind in schwarz, Frameshift-Mutationen in rot dargestellt.

#### 4. Fragebogen zur klinischen Erfassung der CMS-Patienten

## Congenital Myasthenic Syndromes - Clinical Data -

**SAMPLES FOR MOLECULAR GENETIC TESTINGS**

Contact:  
 Hanns Lochmüller (MD): Hanns.Lochmuller@newcastle.ac.uk  
 Angela Abicht (MD), Angela.Abicht@med.uni-muenchen.de  
 Marina Dusl, Marina.Dusl@med.uni-muenchen.de  
 phone: 49-89-2180-78180, fax: 49-89-2180-78184

samples of

**patient**  
 name: \_\_\_\_\_  
 date of birth: \_\_\_\_\_  
 female   
 male

relatives: .....  
 .....  
 .....

if possible, please send samples of  
affected and / or unaffected relatives...

DNA / 10 ml EDTA-blood

to

**Labor für Molekulare Myologie  
AG Prof. Lochmüller  
Marchioninstr. 17  
D-81377 München**

**REPORT TO/sample sent by:**

**institute** (please indicate complete  
postal address including area code):

**supervising  
physician:**

**e-mail and telephone**

**CLINICAL DATA**

---

**1. FAMILY HISTORY**

are there affected relatives?

no information

no

yes ...if yes, who is affected?  
 \_\_\_\_\_

how many healthy siblings does the patient have?  
 \_\_\_\_\_

ethnic origin of the family?  
 \_\_\_\_\_

consanguinity in the family?

no information

no

yes ...if yes, please explain / show pedigree  
 \_\_\_\_\_

**2. HISTORY**

onset of disease:  at birth  
 first year of life  
 childhood at age: \_\_\_\_\_  
 adolescence at age: \_\_\_\_\_  
 adulthood at age: \_\_\_\_\_

motor milestones:  normal  
 delayed  
 ability to walk at age: \_\_\_\_\_

course of disease:  
 progressive  
 no / slight progression  
 tendency towards remission

exacerbations / episodic crisis  
 no  
 yes →  sudden severe weakness  
 with respiratory insufficiency  
 precipitated by: \_\_\_\_\_  
 frequency/age: \_\_\_\_\_

**3. CLINICAL SYMPTOMS**

weakness:  
 generalized  
 selected muscle groups →  ocular muscles  
 others: \_\_\_\_\_  
 exercise induced  
 constant  
 moderate weakness  
 severe weakness →  ambulation not restricted  
 restricted: walking distance: \_\_\_\_\_  
 loss of ambulation / wheelchair

Involved muscle groups:  
 ocular muscles →  ptosis  
 extraocular muscles / limited eye movement  
 bulbar muscles →  facial weakness  
 nasal speech  
 swallowing difficulties  
 chewing difficulties

extremities  distal = proximal  
 predominantly proximal muscle groups involved  
 predominantly distal muscle groups involved

limb girdle  scapulae alatae  
 waddling gait

axial muscle involvement (scoliosis ?)  
 respiratory muscles

muscular atrophy:  no  yes  
 abnormal tendon reflexes:  no  yes

**4. SPECIALS**

slow pupillary light response:  no  yes

selectively severe weakness of cervical, wrist and finger extensor muscles:  no  yes

congenital contractures:  no  yes

congenital malformations/dysmorphisms:  no  yes

please specify: \_\_\_\_\_

**5. ELECTROPHYSIOLOGY**

EMG:  not done  normal  
 neuropathic changes  myopathic changes  
 others: \_\_\_\_\_

decremental response:  
 distal muscle groups  proximal muscle groups  
 yes ( % )  yes ( % )  
 no  no  
 not determined  not determined

facial muscles  response to single nerve stimuli:  
 yes ( % )  single CMAP response  
 no  double CMAP response  
 not determined  not determined

... further studies  
 single fiber EMG \_\_\_\_\_ nerve conduction \_\_\_\_\_

**6. SERUM-CREATINEKINASE/MUSCLE BIOPSY**

CK-level  no info  normal  mildly elevated < 5x normal  elevated > 5x normal

Muscle biopsy  not done  normal  type II atrophy  tubular aggregates

**7. ANTI-ACETYLCHOLINE RECEPTOR/ANTI-MUSK ANTIBODIES**

anti-AChR	anti-MuSK
<input type="checkbox"/> not present	<input type="checkbox"/> not present
<input type="checkbox"/> present	<input type="checkbox"/> present
<input type="checkbox"/> not determined	<input type="checkbox"/> not determined

**8. THERAPY:**

intravenous AChE-inhibitors (e.g. tensilone)  
 not done  no or no clear effect  
 positive effect  worsening of symptoms

AChE-inhibitors (orally, e.g. mestinone)  
 no treatment  no or no clear effect  
 positive effect  worsening of symptoms

3,4-Diaminopyridine  
 no treatment  no effect  successful

other therapeutic trials (e.g. ephedrine fluoxetine, quinidine)?  
 \_\_\_\_\_

immunosuppressive treatment (steroids, immunoglobulins, etc...)  
 not done  
 unsuccessful

Thank you !

## **5. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Promotionsarbeit unterstützt haben:

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Marianne Dieterich für die Möglichkeit zur Dissertation und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Friedrich-Baur-Institut.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Angela Abicht für die Überlassung des Themas, ihre fachliche Unterstützung, die hervorragende Betreuung, ihre Motivation und Geduld, die kritische Durchsicht dieser Arbeit und für die ausgezeichnete Zusammenarbeit. Herrn Prof. Dr. Hanns Lochmüller danke ich herzlich für die Begleitung dieser Arbeit, seine stete Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik. Daneben bedanke ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. Dr. Sabine Krause und Prof. Dr. Maggie Walter, M.A. für die Unterstützung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rolf Stucka für die hervorragende Betreuung, fachliche Unterstützung im Labor, seine stete Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft in allen Fragen, mit der er mich während der Promotion begleitete. Außerdem möchte ich mich herzlich bei Frau Marina Dusl für die Einarbeitung und Betreuung, die Vorarbeiten zum Thema und die fachliche Unterstützung bedanken. Auch den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe im Labor für Molekulare Myologie möchte ich für ihre freundliche und kompetente Hilfe danken.

Ein Dank gilt außerdem den Patienten, ihren Familien und den betreuenden Ärzten, durch deren Mitarbeit diese Arbeit überhaupt erst möglich wurde.

Zuletzt möchte ich vor allem meiner Familie für Ihre Geduld, stete Motivation und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit und der Ermöglichung des Medizinstudiums danken. Außerdem bedanke ich mich bei allen meinen Freunden, die mich beim Fortgang dieser Arbeit motiviert und unterstützt haben.

## **6. Lebenslauf**

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.

## **7. Ehrenwörtliche Erklärung**

### Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Molekulargenetische Analyse bei Patienten mit kongenitalen myasthenen Syndromen:  
Untersuchung von seltenen Krankheitsgenen und von Kandidatengen des  
Hexosaminstoffwechselweges“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13.04.2014

---

Constanze Gallenmüller