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

Analyse des *MUSK*- und des *COLQ*-Gens bei Patienten mit kongenitalem myasthenen Syndrom

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

vorgelegt von
Sofia Petrova
aus
Varna/Bulgarien
2007

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Lochmüller
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. A. Imhof
	Prof. Dr. M. Speicher
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Priv.-Doz. Dr. med. Angela Abicht
	Dr. rer. biol. hum. Juliane Müller
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	13.12.2007

meiner Mutter

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

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

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

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

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **I**

A. ZUSAMMENFASSUNG **- 1 -**

B. EINLEITUNG **- 4 -**

1. Grundlagen der neuromuskulären Übertragung **- 4 -**

2. Kongenitale myasthene Syndrome **- 6 -**

2.1. Klinische Symptome bei CMS **- 6 -**

2.2. Klassifikation der CMS **- 7 -**

2.3. Zugrunde liegende Mutationen **- 8 -**
2.3.1. Mutationen ursächlich für präsynaptische CMS - 9 -
2.3.2. Synaptische CMS-Formen - 9 -
2.3.3. Mutationen in postsynaptisch exprimierten Genen - 11 -

C. ZIELSETZUNG **- 16 -**

D. MATERIAL UND METHODEN **- 18 -**

1. Patienten **- 18 -**

2. Chemikalien **- 18 -**

3. Molekulargenetische Methoden **- 18 -**

3.1. DNA-Extraktion **- 18 -**

3.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) **- 19 -**
3.2.1. Prinzip der PCR - 19 -
3.2.2. PCR-Primer - 19 -
3.2.3. PCR-Reaktionsbedingungen - 19 -

3.3. Aufreinigung der PCR-Produkte **- 20 -**

3.4. Sequenzanalyse - 20 -

3.5. Genotypenanalyse - 21 -

3.6. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus- Analyse - 21 -

E. ERGEBNISSE - 22 -

1. Analyse des *COLQ*-Gens - 22 -

1.1. Die Mutation *COLQ* T441A - 22 -

1.2. Andere im *COLQ*-Gen identifizierte Mutationen - 28 -
1.2.1. Die Mutation C386S - 28 -
1.2.2. Die Mutation R227X - 31 -
1.2.3. Die Mutation R236X - 31 -
1.2.4. Die Mutation 950delC - 32 -

2. Analyse des *MUSK*-Gens - 33 -

F. DISKUSSION - 37 -

1. Gendefekte bei CMS - 37 -

2. Das *COLQ*-Gen - 38 -
2.1.1. Die Mutation *COLQ* T441A - 39 -
2.1.2. Andere COLQ Mutationen - 41 -

3. Das *MUSK*-Gen - 42 -

4. Schlussfolgerung aus den eigenen Untersuchungen für Diagnostik und Therapie von CMS-Patienten - 44 -

5. Weitere CMS Gene - 45 -

6. Ausblick - 48 -

G. LITERATURVERZEICHNIS - 50 -

H. ANHANG - 55 -

1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen - 55 -

2. Primersequenzen - 57 -

3. Genbank Zugangsnummer - 59 -

4. Fragebogen zur klinischen Erfassung von CMS-Patienten - 60 -

5. Lebenslauf - 62 -

6. Danksagung - 64 -

7. Ehrenwörtliche Erklärung - 65 -

A. Zusammenfassung

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

Man unterscheidet synaptische, prä- und postsynaptische CMS-Formen, bisher sind zehn verschiedene Gene bekannt, deren Defekte CMS verursachen können. Dazu gehören die Gene, die für Acetylchoilinrezeptor (AChR)-Untereinheiten kodieren, das *CHAT*-Gen, welches für die Cholin-Acetyltransferase kodiert, das *RAPSN*-Gen, das *SCN4A*-Gen, das *DOK7*-Gen, sowie das *COLQ*-Gen und das *MUSK*-Gen.

Der Hauptschwerpunkt dieser Arbeit lag auf der molekulargenetischen Untersuchung des *COLQ*-Gens und des *MUSK*-Gens.

Im *COLQ*-Gen konnten wir bei 8 Patienten aus 7 unanhängigen Familien 7 verschiedene Mutationen identifizieren, 4 davon waren noch nicht beschrieben worden. Die meisten genetischen Veränderungen waren als „private“ Mutationen jeweils nur in einzelnen Patienten bzw. Familien nachweisbar. Eine Missens-Mutation des *COLQ*-Gens (T441A) fand sich dagegen interessanterweise homozygot in drei unabhängigen deutschen CMS-Familien mit insgesamt vier betroffenen Personen. Dabei führt ein homozygoter Austausch (1321 A>G) im Exon 17 dazu, dass die Aminosäure Threonin, die an dieser Position innerhalb der C-terminalen Region des ColQ-Proteins über viele Speziesgrenzen konserviert ist, durch Alanin ersetzt wird. Da diese Region für die Trimerisierung von ColQ und für die Insertion der AChE/ColQ-Komplexe in der Basallamina essentiell ist, führt der Aminosäurenaustausch, wie weitere Untersuchungen des Patientenmuskels zeigten, zu einem vollständigen Fehlen von der im synaptischen Spalt verankerten Esterase. Alter bei Erstmanifestation, Fortschreiten und Schweregrad der Erkrankung zeigten

trotz der identischen Mutation eine bemerkenswerte Variabilität zwischen den einzelnen Patienten. Verschiedene Krankheitsverläufe konnten wir auch bei den anderen 4 Patienten, bei denen insgesamt 6 Mutationen nachgewiesen wurden, beobachten. Bei 3 von ihnen zeichnete sich die Erkrankung durch einen schweren Verlauf mit intubationspflichtigen Ateminsuffizienzphasen aus, bei einer Patientin wurde ein mildes Krankheitsbild mit geringer Progredienz beobachtet. Die Abwesenheit von AChE im synaptischen Spalt bei den Patienten mit ColQ-CMS führt dazu, dass die klinischen Symptome bei allen Erkrankten auf eine Therapie mit AChE-Hemmern nicht ansprechen oder sich sogar dramatisch verschlechtern können. Deswegen ist die genaue molekulargenetische Charakterisierung bei diesen Patienten für die richtige Therapie sehr wichtig.

Das *MUSK*-Gen spielt eine wichtige Rolle für die Ausbildung der postsynaptischen Strukturen. Die Phosphorylierung von MuSK ist essentiell für die Aggregation der AChR an der posysynaptischen Membran. Aus diesen Gründen kam *MUSK* als potentielles CMS-Kandidatengen in Betracht. Zu Beginn dieser Arbeit war keine CMS-ursächliche Mutation im *MUSK*-Gen bekannt, so dass keine klaren klinischen Kriterien für die Auswahl der Patienten bestanden. Eine Mutation im *MUSK*-Gen erwarteten wir bei Patienten mit einem frühen Beginn der Symptomatik, schwer ausgeprägter Klinik wie z.B. bei Patienten mit Episoden respiratorischer Insuffizienz und progredientem Verlauf. Eine Behandlung mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren bzw. 3,4-Diaminopyridin sollte zu einer Verbesserung der Symptomatik führen. Wir untersuchten entsprechend diesen Kriterien 10 Patienten, bei denen die übrigen bekannten CMS-Gene zuvor ausgeschlossen worden waren und konnten bei 5 von ihnen insgesamt 6 Sequenzveränderungen feststellen. Diese erwiesen sich jedoch als Polymorphismen. Eine pathogene Mutation ließ sich nicht nachweisen. Erst im Jahr 2004 wurden von einer französischen Arbeitsgruppe die ersten zwei compound heterozygoten und bis jetzt einzigen *MUSK*-Mutationen beschrieben. Es scheint, dass Mutationen im *MUSK*-Gen sehr selten ein CMS verursachen, was sich durch die essentielle Rolle der Tyrosinkinase erklären lässt.

Da CMS durch unterschiedliche strukturelle oder funktionelle Veränderungen an der neuromuskulären Endplatte bedingt sind, ist eine präzise klinische und genetische Charakterisierung des CMS wichtig für alle Patienten. Genetische Beratung und pränatale Diagnostik können nur durchgeführt werden, wenn eine exakte Diagnostik auf molekularer Ebene verfügbar ist. Außerdem hat die exakte molekulargenetische

Charakterisierung kongenitaler myasthener Syndrome für die betroffenen Patienten große Bedeutung, da sich daraus unterschiedliche Konsequenzen hinsichtlich Prognose, Vererbbarkeit und Behandlungsmöglichkeiten ergeben. Zusätzlich bietet die molekulargenetische Analyse die Möglichkeit, das Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der neuromuskulären Übertragung zu erweitern.

B. Einleitung

1. Grundlagen der neuromuskulären Übertragung

Das Spektrum der Erkrankungen, die durch Störungen der neuromuskulären Übertragung verursacht werden, ist groß. Es gibt erworbene und erbliche Erkrankungen, die charakteristische klinische Symptome wie insbesondere eine belastungsabhängige Muskelschwäche zeigen. Die kongenitalen myasthenen Syndrome (congenital myasthenic syndrome = CMS) zählen zu den erblichen Erkrankungen, die durch eine Störung der Signalübertragung im Bereich der neuromuskulären Endplatte verursacht werden. Zum Verständnis der Pathogenese und zur Differenzierung verschiedener CMS Formen sind Kenntnisse der neuromuskulären Signalübertragung sehr wichtig.

Die neuromuskuläre Endplatte besteht aus der präsynaptischen Nervenendigung, dem synaptischen Spalt und der postsynaptischen Muskelfaser (Abb.1) und ist zuständig für die schnelle und effiziente Übertragung des Aktionspotentials auf das Zielorgan, den Muskel. Im Menschen wird, so wie bei allen Säugetieren und den meisten höheren Vertebraten, jede Muskelfaser von einem einzigen myelinisierten Motoaxon innerviert. An der Endplatte verliert die Nervenfaser ihre Myelinscheide und bildet Verzweigungen, die in Vertiefungen an der Oberfläche der Muskelfaser enden. Schwann-Zellen grenzen das jeweilige Axon an seiner von der Muskelfaser abgewandten Seite ab, dadurch wird eine spezielle Art von Synapse gebildet.

In der präsynaptischen Nervenfaser befinden sich Mitochondrien, die für die Synthese und die Freisetzung von Acetylcholin (ACh) nötige Energie bereitstellen und dicht mit dem Neurotransmitter ACh bepackte Membranvesikel. Einige dieser Vesikel lagern dicht aneinander und bilden mikroskopisch sichtbare aktive Zonen. ACh wird im Cytoplasma der präsynaptischen Nervenendigung aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert, katalysiert durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT), und dann mit Hilfe eines spezifischen Transporters, des vesikulären Acetylcholintransporters (vAChT), in die synaptischen Vesikel aufgenommen.

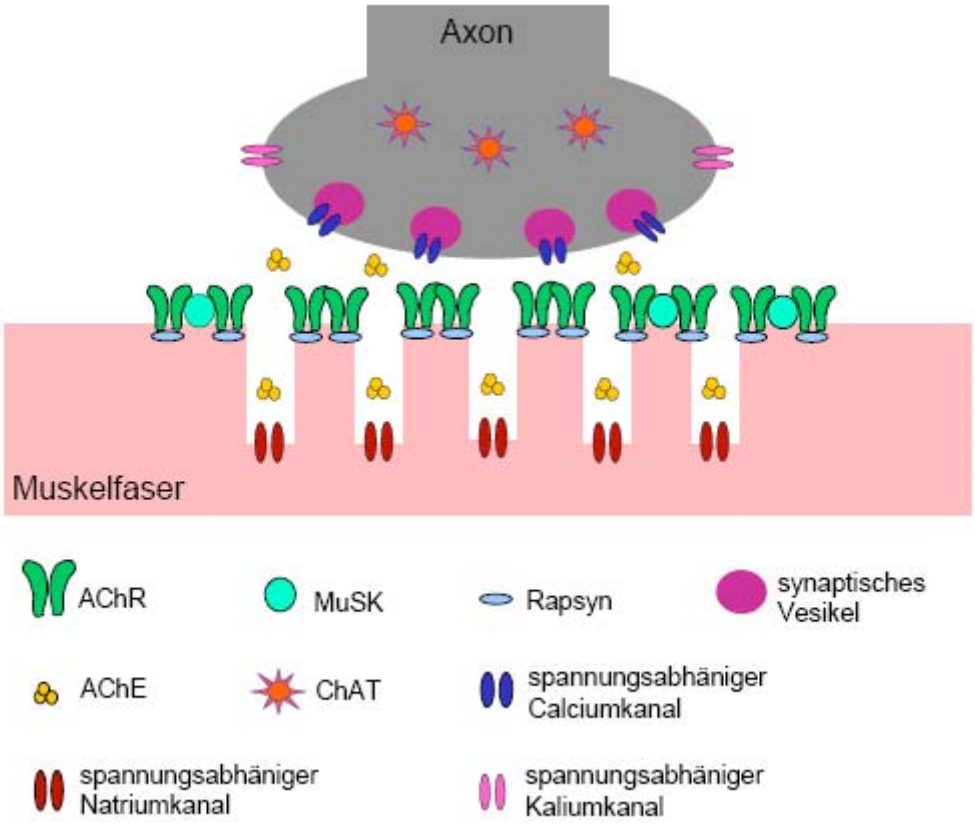

Abb. 1: Schematische Darstellung der neuromuskulären Endplatte und einiger Proteine, die bei Krankheiten mit Defekten in der Signalübertragung beteiligt sind (modifiziert nach McConville und Vincent, 2002).

In der Basalmembran des synaptischen Spaltes über eine kollagenartige Struktur (collagen tail = ColQ) verankert, befindet sich die Acetylcholinesterase AChE, die ACh hydrolysiert und dadurch die Begrenzung der Erregungsweiterleitung bewirkt.
In der postsynaptischen Basalmembran, die sehr stark gefaltet ist, befinden sich nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (AChR) und spannungsaktivierte Natriumkanäle. Die AChR sind überwiegend an den oberen Spitzen der postsynaptischen Einfaltungen lokalisiert, genau gegenüber der aktiven Zonen auf präsynaptischer Seite, während die spannungsaktivierten Natriumkanäle, die das muskuläre Aktionspotenzial generieren, überwiegend in der Tiefe der Einfältelungen lokalisiert sind. Die unterschiedliche Verteilung wird durch einen Signaltransduktionsweg, den Agrin-MusK-Rapsyn-Signalweg gesteuert. Dabei spielt neben einer muskelspezifischen Kinase (MuSK) das Protein Rapsyn eine entscheidende Rolle.

Das cytoplasmatische Protein Rapsyn befindet sich in den oberen Teilen der Basalmembran und ist essentiell für die Aggregation der AChR an der postsynaptischen Membran.
MuSK ist eine muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase, die eine wichtige Rolle bei der synaptischen Differenzierung und bei der Organisation des postsynaptischen Aufbaus spielt (Vincent, Beeson and Lang, 2000).

2. Kongenitale myasthene Syndrome

Die kongenitalen myasthenen Syndrome (congenital myasthenic syndrome = CMS) stellen klinisch und pathogenetisch eine heterogene Gruppe von hereditären Erkrankungen dar, deren gemeinsamer Defekt eine Störung der Signalübertragung im Bereich der neuromuskulären Endplatte ist.
Meistens wird die Erkrankung autosomal rezessiv vererbt oder tritt sporadisch auf. Eine autosomal dominante Vererbung ist seltener. Zur Prävalenz von CMS Fällen gibt es keine genauen Daten, im Kindesalter dürfte ihr Anteil bis zu 10 % aller Myasthenien ausmachen.
Die Beobachtung phänotypischer Unterschiede, sowie die Untersuchungen von Muskelbiopsiematerial mit Hilfe von Licht- und Elektronmikroskopen und molekulargenetische Untersuchungen führten zu der Differenzierung von mehreren CMS- Formen. Es konnte gezeigt werden, dass Defekte die zu CMS führen, sowohl auf der präsynaptischen, als auch auf der postsynaptischen Seite der neuromuskulären Endplatte lokalisiert sind oder Proteine im synaptischen Spalt betreffen (Ohno and Engel, 2004).

2.1. Klinische Symptome bei CMS

Der Beginn der Symptomatik liegt in der Regel in der frühen Kindheit, meist in den ersten zwei Lebensjahren. Verlauf und Schweregrad sind jedoch sehr unterschiedlich: die Symptomatik reicht vom schweren „floppy infant“ – Syndrom bei Geburt bis zu einer Minimalsymptomatik mit Ptose und leichter muskulärer Schwäche im Erwachsenenalter. Im Säuglingsalter fallen Trinkschwäche, kraftloses Schreien und generalisierte Hypotonie, mit oder ohne Ptose auf. In manchen Fällen kommt es –

ausgelöst durch respiratorische Infekte- zu krisenhaften Verschlechterungen, die zu einer plötzlichen Ateminsuffizienz und zum Kindstod führen können. Die motorische Entwicklung kann verzögert sein. Die Symptomatik kann sich im Verlauf der Kindheit stabilisieren und eine durchaus gute Prognose haben. Bei älteren Kindern und im Erwachsenenalter steht meist eine abnorme muskuläre Ermüdbarkeit bei Belastung im Vordergrund, die die okulären, facialen, bulbären Muskeln und die Muskeln der Extremitäten betreffen. Häufig kommt es zu einer tageszeitabhängigen Ptose mit oder ohne Störung der äußeren Augenmuskulatur. In manchen Fällen ist der Erkrankungsverlauf jedoch progredient und kann zu schwerer Behinderung und Tod in den ersten Lebensjahrzehnten führen.

Anders als bei der autoimmun verursachten Myasthenia gravis lassen sich keine Antikörper gegen AChR nachweisen und die Patienten sprechen nicht auf eine immunsuppressive Therapie an. Die medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten hängen stark von dem zugrunde liegenden Defekt ab. Ein Teil der Patienten lässt sich mit Acetylcholinesterase-Hemmern z.B. Pyridostigmin (Mestinon®) befriedigend behandeln, alternativ oder additiv kann eine Behandlung mit dem Kalium-Kanal Blocker 3,4 – Diaminopyridin versucht werden. Bestimmte CMS Subtypen sind refraktär gegnüber einer Therapie mit Acetylcholinesterase-Hemmern oder mit 3,4 – Diaminopyridin, die Symptomatik kann sich unter diese Therapie sogar dramatisch verschlechtern. Für bestimmte CMS Unterformen kann die Behandlung mit Chinidin, Fluoxetin oder Ephedrin eine therapeutische Alternative darstellen (Ohno, Engel and Sine, 2003).

2.2. Klassifikation der CMS

Die Differenzierung der unterschiedlichen CMS Formen erfolgte in früheren Jahren durch elektrophysiologische Untersuchungen am Nerv-Muskelpräparat, meist gewonnen aus einem Interkostalmuskel. Durch ergänzende morphologische, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen gelang es, einzelne CMS weiter zu differenzieren (Engel, 1994), Rückschlüsse auf die vermutliche Pathogenese einzelner Defekte zu ziehen und prä- und postsynaptische Syndrome zu unterscheiden (Engel, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass dem Großteil von CMS postsynaptische Störungen zugrunde liegen. Seit 1994 brachte die molekulargenetische Analyse der

CMS weiteren Einblick in die ursächlichen Krankheitsmechanismen. Für einige Formen von CMS konnten die zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen identifiziert werden (Abb. 2). Diese molekulargenetischen Ergebnisse fanden Eingang in die Klassifikation der CMS (Engel and Sine, 2005).

Klassifikation der CMS

Präsynaptische Defekte:

- CMS mit Vesikelmangel und reduzierter Quantenfreisetzung
- CMS mit einem Defekt der Acetylcholin-Resynthese (CMS mit episodischen Apnoen)

**identifizierter molekulargenetischer Defekt: CHAT-Mutationen*

- Kongenitales Lambert-Eaton-Syndrom

Synaptische Defekte:

- AChE-Defizienz

**identifizierter molekulargenetischer Defekt: COLQ-Mutationen*

Postsynaptische Defekte:

- CMS mit primären kinetischen Veränderungen des Rezeptors mit/ohne AChR-Defizienz

**identifizierter molekulargenetischer Defekt: AChR-Mutationen*

- CMS mit primärer AChR-Defizienz

**identifizierter molekulargenetischer Defekt: AChR-Mutationen*

- CMS durch Mutationen im *RAPSN* -Gen
- CMS durch Mutationen im *MUSK*-Gen
- CMS durch Mutationen im *Dok7*-Gen
- CMS durch Mutationen im *SCN4A*-Gen (Na-Kanal CMS)

Zu den präsynaptischen CMS-Formen zählen CMS mit einem Defekt der Acetylcholin Resynthese und Verpackung, CMS mit Vesikelmangel und reduzierter Quantenfreisetzung und das kongenitale Lambert-Eaton-Syndrom. Die bisher einzige synaptische Form ist die Defizienz der AChE. Postsynaptische CMS, die auf Mutationen der AChR-Gene beruhen, werden unterteilt in CMS mit primären

kinetischen Veränderungen des Rezeptors mit bzw. ohne AChR-Defizienz. Dazu gehören die Slow- und Fast-Channel-Syndrome und CMS mit primärer AChR-Defizienz ohne bzw. mit geringen kinetischen Veränderungen. Zu den postsynaptischen CMS gehören weiterhin die Erkrankungen, die durch Mutationen im *MUSK*-, *SCN4A*-, *Dok7*- und *RAPSN*-Gen verursacht werden.

2.3. Zugrunde liegende Mutationen

2.3.1. Mutationen ursächlich für präsynaptische CMS

Die Cholin-Acetyltransferase katalysiert die Biosynthese des Neurotransmitters Acetylcholin aus Cholin und Acetyl-CoA im Cytoplasma präsynaptischer Neuronen. Mittlerweile konnten mehrere Mutationen im Gen kodierend für die Cholin-Acetyltransferase (*CHAT*) auf Chromosom 10q11.23 - als bislang einzige bekannte molekulare Ursache eines präsynaptischen CMS - identifiziert werden (Ohno et al., 2001). Auffällig bei allen Patienten waren krisenhafte Verschlechterungen des Krankheitsbildes, die meist im Rahmen von fieberhaften Infekten auftraten und mit episodischen Apnoen einher gingen (Byring et al., 2002; Ohno et al., 2001). Dieser klinische Phänotyp führte zum Terminus CMS-EA (CMS mit episodischen Apnoen).

2.3.2. Synaptische CMS-Formen: AChE Mangel durch Mutationen des *COLQ*-Gens

Diese CMS-Form ist durch die Abwesenheit von AChE im synaptischen Spalt charakterisiert. AChE ist ein Enzym, das für die rasche Hydrolyse von freigesetztem ACh im synaptischen Spalt verantwortlich ist und dadurch die Dauer der Signalübertragung begrenzt. Der Mangel an diesem Enzym führt zur verlängerten Wirkung von ACh auf den AChR, zu prolongierten EPPs (Endplattenpotentialen), Desensibilisierung des AChRs und zu einer Depolarisationsblockade bei physiologischer Stimulation. Es resultiert eine Endplattenmyopathie mit Verlust von AChR durch eine kationische Überladung der postsynaptischen Region.
Klinisch zeigen die meisten Patienten ein schweres Krankheitsbild, das in der neonatalen Periode beginnt und zu schweren Behinderungen führt. Bei manchen

Patienten fängt die Erkrankung erst in der Kindheit an und führt erst in der zweiten Dekade oder noch später zur Behinderung.

Folgende klinischen Eigenschaften sind hinweisend für die Diagnose:

1. Ein pathologisches Dekrement im EMG
2. Ein repetitives Summenmuskelaktionspotential (SMAP) als Antwort auf einen einzelnen Nervenstimulus, das eine kleinere Amplitude aufweist und schneller als das erste SMAP abnimmt.
3. Kein Ansprechen auf AChE Inhibitoren: Klinisch zeigt sich keine Verbesserung der Symptomatik, elektrophysiologisch zeigt sich keine Wirkung auf Dekrement oder repetitives Summenmuskelaktionspotential.
4. Langsame Pupillenreaktion, nicht obligat (Ohno/Engel 2003).

Die Diagnose wird durch den immunhistochemischen Nachweis des Fehlens der AChE an der Endplatte oder molekulargenetisch durch den Nachweis einer pathologischen Mutation im *COLQ*-Gen gestellt. *COLQ* ist das Gen, das für das synaptisch exprimierte Verankerungsprotein ColQ des Enzyms AChE kodiert.

Es existieren 2 Haupttypen von AChE im Skelettmuskel:

1. Die globuläre Form, bestehend aus Monomeren, Dimeren oder Tetrameren der T-Isoform der katalytische Einheit (AChEt).
2. Die asymmetrische Form, bestehend aus eins, zwei oder drei Homotetrameren, die an einem dreisträngigen Schwanz aus Kollagen (ColQ) befestigt sind.

Die Untereinheit des Kollagenschwanzes beinhaltet:

1. eine Prolin reiche Anheftungsdomäne = PRAD mit der N-terminalen Region, die die AChEt bindet,
2. eine kollagenartige zentrale Domäne, die mit den anderen 2 Kollagensträngen assoziiert und eine Tripelhelix bildet und
3. eine C–terminale Region, die für die Verankerung von ColQ an der Basalmembran verantwortlich ist.

Die zentrale Domäne versteckt 2 Ringe positiv geladener Reste, die elektrostatisch die ganze Untereinheit an die Heparansulfat-Proteoglykanen in der Basalmembran bindet. Die Rolle der Schwanzuntereinheit ist, die asymmetrischen Enzyme an der Basalmembran zu befestigen (Müller at al., 2004).

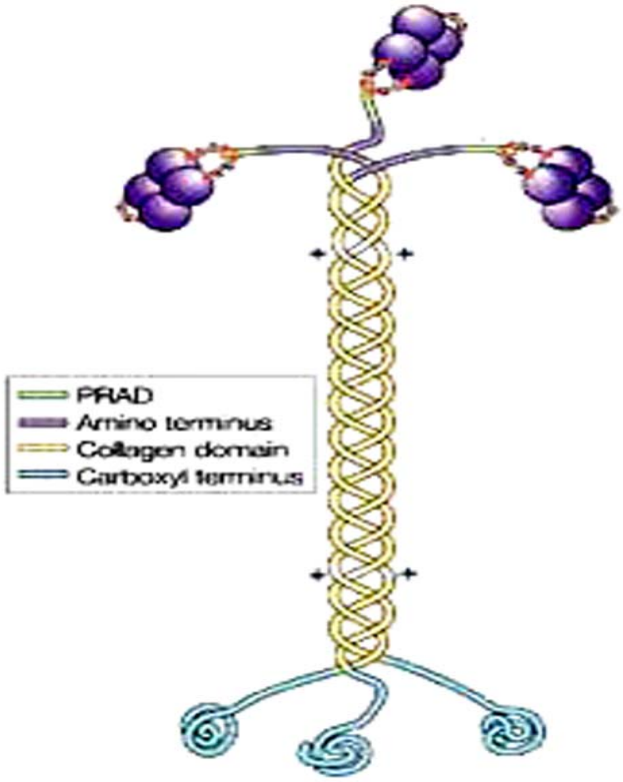

Abb. 2: Schematische Darstellung der asymmetrischen Acetylcholinesterase (AChE). Die katalytischen Untereinheiten sind durch die Prolin reiche Anheftungsdomäne = PRAD an dem dreisträngigen Schwanz aus Kollagen befestigt (modifiziert nach Ohno and Engel, 2003).

2.3.3. Mutationen in postsynaptisch exprimierten Genen

Mittlerweile wurden Mutationen aller AChR-Gene und in unterschiedlichen funktionellen Domänen der verschiedenen Untereinheiten entdeckt. Einige der Mutationen reduzieren die Expression des AChRs und einige verändern seine kinetischen Eigenschaften. Die kinetischen Mutationen werden weiter in solche, die zu einer Verlängerung der Kanalöffnungszeit führen = slow channel Mutationen und in solche, die die Kanalöffnungszeit verkürzen = fast channel Mutationen unterteilt. Die slow channel Mutationen verursachen das sog. Slow-Channel-Syndrom. Das Slow-Channel-Syndrom (SCCMS) ist bislang die einzige dominante CMS-Form. Der Großteil aller autosomal rezessiv vererbten und sporadischen CMS scheint jedoch auf Mutationen der AChRε-Untereinheit zu beruhen, die über eine verminderte

Expression des adulten AChRs zum morphologischen Bild eines AChR-Mangels führen (Engel et al., 2003b; Hantai et al., 2004).

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

Rapsyn ist ein 43kDa membranassoziiertes cytoplasmatisches Protein auf dem Chromosom 11p11.2, das direkt an die große intrazelluläre Domäne der β-Untereinheit des AChR bindet und den Rezeptor an der postsynaptischen Membran stabilisiert. Hierfür stellt die Zink-Finger-Domäne von Rapsyn eine wichtige Bindungsregion dar (Bezakova und Bloch, 1998). In nicht-muskulären Zellen wurde gezeigt, daß Rapsyn die laterale Umverteilung von AChR in Mikroaggregate an der Zelloberfläche induziert (Froehner et al., 1990; Phillips et al., 1991). Die mutmaßliche Funktion von Rapsyn als Ankerprotein steht im Einklang mit den Erkenntnissen aus Rapsyn-defizienten Mäusen. Bei diesen finden sich keine AChR-Aggregate an der neuromuskulären Endplatte; auch andere Komponenten der postsynaptischen Membranspezialisierung, wie Utrophin, Dystroglycan und Erb-Kinasen, sind nicht akkumuliert (Gautam et al., 1995). Allerdings sind bei diesen Mäusen weiterhin MuSK und verschiedene präsynaptische Komponenten synaptisch lokalisiert. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Studien von Gautam et al. (1999), die zeigten, daß Rapsyn nachgeschaltet von MuSK bei der AChR-Aggregation agiert. Rapsyn ist offensichtlich verantwortlich für die Verankerung des AChR über den Dystroglycan-Proteinkomplex mit dem Aktin-Cytoskelett (Fuhrer et al., 1999; Glass und Yancopoulos, 1997).

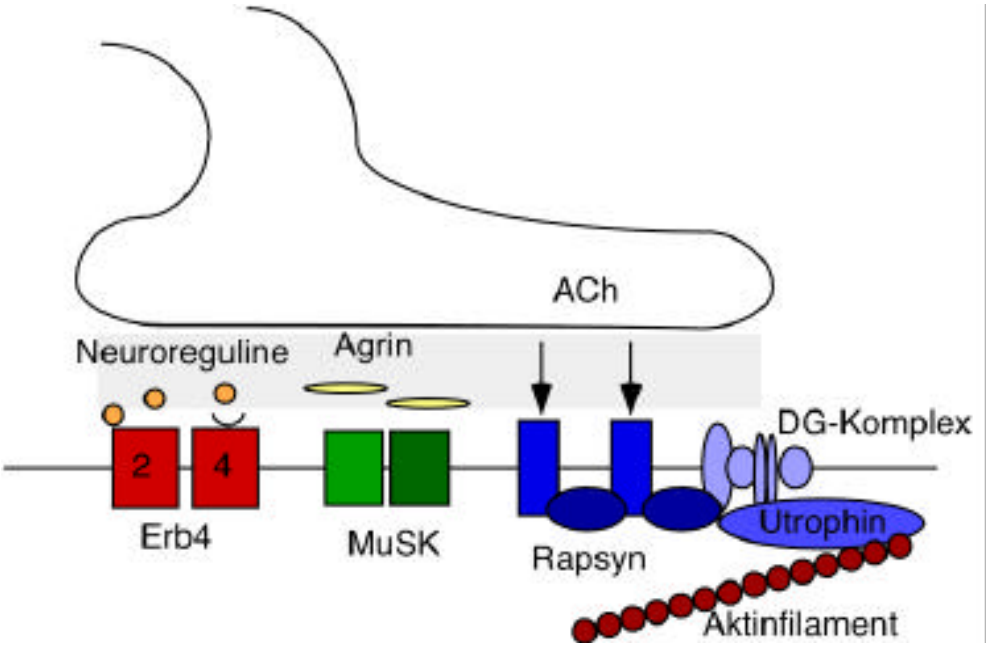

Abb. 3: Schematische Darstellung des Proteinkomplexes an der neuromuskulären Endplatte. Dargestellt sind die wichtigsten Komponenten der postsynaptischen Membran an der neuromuskulären Endplatte. Sezerniertes Agrin und Neureguline induzieren über die Aktivierung eines unbekannten Agrin-Rezeptors und MuSK bzw. Erb4-Rezeptoren die Aggregation des AChR. U.a. über den Dystroglycan- Komplex mit Utrophin werden die AChR Cluster am Cytoskelett verankert (Untersuchungen über die Bindungseigenschaften des peripheren Membranproteins Gephyrin, Dissertation von Achim Hermann, 2002).

Mutationen im *RAPSN*-Gen wurden bei Patienten mit nachgewiesener AChR Mangel, die keine Mutation in den Genen der AChR Untereinheiten hatten, untersucht. Mittlerweile wurden mehr als 20 Mutationen in *RAPSN*-Gen identifiziert. Die Mehrheit der Patienten trägt eine bestimmte Mutation, *RAPSN* N88K entweder homozygot auf beiden Allelen oder compound-heterozygot zusammen mit unterschiedlichen anderen Mutationen verschiedener Rapsyn Domänen. Weitere Untersuchungen konnten einen Founder Effekt für die Mutation N88K nachweisen, es wurde gezeigt, dass sich diese Mutation auf ein einziges ursprüngliches Mutationsereignis zurückführen lässt (Müller et al., 2004). Die Verbreitung der Mutation weist auf eine indoeuropäische Herkunft hin. Die Erkenntnis, dass die Mutation N88K eine in Europa sehr weit verbreitete Mutation ist, kann bei der Stellung der richtigen Diagnose sehr hilfreich sein und den Patienten eine Reihe von belastenden Untersuchungen ersparen.

MuSK (muscle-specific kinase) ist eine muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase, die eine wichtige Rolle bei der synaptischen Differenzierung und bei der Organisation des postsynaptischen Aufbaus spielt. MuSK ist ein Teil des Agrin-MuSK-Rapsyn-Signalwegs, über den der Prozess des Clusterns eingeleitet wird (Abb.3). Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglykan und wird von der Nervenendigung in den synaptischen Spalt freigesetzt (Hoch, 1999). Agrin wird auch von Schwann-Zellen und von Myotuben selbst synthetisiert, jedoch ist nur die von der präsynaptischen Nervenendigung synthetisierte Spleissform z+ in der Lage, das Zusammenfügen postsynaptischer Komponenten zu induzieren (Hoch, 1999). Verschiede Arbeiten zeigten, dass der Rezeptor für das Agrin-Signal die postsynaptische Rezeptor-Tyrosinkinase MuSK ist (Glass et al., 1996). So sind zum Beispiel MuSK-defiziente Mäuse nicht in der Lage, postsynaptische Strukturen auszubilden, trotz normaler AChR-Expression der Muskelzellen (DeChiara et al., 1996).
Aufgrund der Rolle von MuSK bei der Ausbildung postsynaptischer Strukturen (Valenzuela et al., 1995) galt das *MUSK*-Gen auf Chromosom 9q31.3 als potentielles CMS-Kandidatengen. Jedoch gelang es erst 2004, bei einer französischen Patientin zwei compound heterozygote *MUSK*-Mutationen nachzuweisen (Chevessier et al., 2004), eine Frameshift-Mutation 220insC und eine Missense-Mutation V790M. Die Erkrankung manifestierte sich direkt nach Geburt durch Ptose, respiratorische Probleme und Ermüdbarkeit bei körperlicher Betätigung. Im Kindes- und Jugendalter verbesserte sich die Symptomatik; dann kam es im Alter von 22 Jahren während einer Schwangerschaft zu einer akuten Verschlechterung der Muskelschwäche. Eine Behandlung mit Esteraseinhibitoren und 3,4-Diaminopyridin verlief erfolgreich. Eine Muskelbiopsie zeigte schwerwiegende strukturelle Veränderungen an der Endplatte und eine reduzierte AChR- und MuSK-Expression. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die Mutation V790M in Exon 14 nicht die Kinase-Aktivität verändert, sondern das Expressionsniveau und die Stabilität des Proteins erniedrigt und dadurch zu einem verminderten Agrin-abhängigen Clustern der AChR führt.

Dok-7 ist ein Mitglied der cytoplasmatischen Moleküle der Dok Familie und induziert die Aktivierung der Tyrosinkinase MuSK und damit auch das Clustern des AChR an der Membran (Okada et al., 2006). Mutationen im *DOK7*-Gen beeinflussen Größe und Struktur der neuromuskulären Endplatte und führen zu einem charakteristischen CMS Bild mit Muskelschwäche, die vor allem die proximalen Muskelgruppen betrifft.

Da die Erkrankung bei Patienten mit *DOK7* Mutation erst in der frühen Kindheit, aber nicht schon bei Geburt anfängt, ist es davon auszugehen, dass die Mutation wahrscheinlich wenig Auswirkung auf die initiale Synapsenformierung hat, sondern zu einer gestörten Reifung und Erhaltung der Synapsenstruktur führt (Beeson et al., 2006). Vor kurzem konnten die ersten Mutationen im *DOK7*-Gen identifiziert werden (Beeson et al., 2006). Eine sehr häufig vorkommende Mutation bei dieser Gruppe von Patienten ist die Mutation 1124_1127dupTGCC, darüber hinaus wurden andere Frameshift-, Nonsense- und Spleißmutationen nachgewiesen. Es hat sich herausstellt, dass *DOK7* Mutationen eine häufige Ursache für CMS sind, die sich häufiger unter dem besonderen Phänotyp einer Gliedergürtelmyasthenie präsentieren (Müller et al., 2007 und Palace et al., 2007).

Bis jetzt wurden weltweit nur bei einer Patientin 2 heterozygote Mutationen im *SCN4A*-Gen identifiziert. Die 20-jährige Patientin litt schon seit Geburt unter einer generalisierten ermüdungsabhängigen Muskelschwäche mit Ptosis und intermittierend auftretenden Episoden einer Atem- und Bulbärparalyse, die zu einer hypoxischen Hirnschädigung führten. Mutationen im *SCN4A*-Gen sind als Ursache der periodischen Paralyse bekannt, das *SCN4A*-CMS unterscheidet sich durch eine Reihe klinischer und elektrophysiologischer Charakteristika von der periodischen Paralyse. Eine Therapie mit Pyridostigminen brachte eine Verbesserung der Ausdauer, die Zusatzmedikation mit Acetacolamid beugte weitere Episoden respiratorischer und bulbärer Schwäche vor.

C. Zielsetzung

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die molekulargenetische Charakterisierung der kongenitalen myasthenen Syndrome. Im Mittelpunkt steht dabei die molekulargenetische Untersuchung des *COLQ* Gens und des *MUSK* Gens. Auf Mutationen in diesen beiden Genen wurden Patienten untersucht, bei denen Mutationen der AChR-epsilon Untereinheit und des *RAPSN* Gens - als die 2 häufigsten genetischen CMS-Ursachen ausgeschlossen waren.

Neben der klinischen Bedeutung, die sie für den einzelnen Patienten hat, kann diese zusätzlich zum Verständnis synapsenspezifischer Vorgänge beitragen. Außerdem kann die Untersuchung der Haplotypen mutationstragender Allele Herkunft und Verbreitung spezieller Mutationen deutlich machen.

Zu Beginn dieser Arbeit waren weltweit keine Mutationen des *MUSK* Gens bekannt. Aufgrund seiner wichtigen Rolle bei der Ausbildung postsynaptischer Strukturen galt dieses Gen als potentielles CMS Kandidatengen. Untersucht werden sollten Patienten, bei denen die Erkrankung früh angefangen hat und einen schwer ausgeprägten Verlauf aufwies.

Im Gegensatz dazu waren – seit der Erstbeschreibung von *COLQ*-Mutationen als Ursache synaptischer CMS (Donger et al., 1998; Ohno et al., 1998b) – bereits etwa 30 unterschiedliche COLQ-Mutationen (missense-, frameshifting-, und nonsense-Mutationen) identifiziert worden (Ohno and Engel, 2004a). Typisch bei dieser Form ist, dass eine Behandlung mit AChE-Hemmern die Symptomatik nicht verbessert und sogar dramatisch verschlechtern kann, da die gestörte Expression des Verankerungsproteins ColQ zu einer Abwesenheit von AChE im synaptischen Spalt führt. Umso wichtiger ist der Nachweis der Mutationen bei diesen Patienten, bei denen die Therapie mit AChE-Hemmern kontraindiziert ist und die manchmal dauerhaft falsch therapiert wurden.

Ein wichtiger Aspekt der molekulargenetischen Charakterisierung ist die klinische Bedeutung für den Patienten und den Behandelnden. In den meisten Fällen gelingt eine sichere Abgrenzung der CMS-Unterformen anhand klinischer Kriterien nicht.
Die genetische Untersuchung erlaubt einerseits eine definitive Einordnung des CMS, was die vor wenigen Jahren noch erforderlichen invasiven Eingriffe (z.B. Biopsie des M. intercostalis) nicht immer zuließen, anderseits werden den Patienten die Risiken des invasiven Eingriffs (Vollnarkose, Pneumothorax) erspart, so dass die molekulargenetische Charaktrisierung die früher angewandte Untersuchungen ersetzen konnte.
Die genetische Charakterisierung des CMS stellt nicht nur eine rationelle, verlässliche und wenig belastende Basis dar, die Diagnose der Erkrankung zu stellen und die richtige Therapie einzuleiten, sondern ermöglicht eine kompetente genetische Beratung für den Patienten und seine Familie. Zudem soll untersucht werden, ob aus dem klinischen Phänotyp von CMS-Patienten auf den zugrundeliegenden Genotyp geschlossen werden kann und umgekehrt (Genotyp-Phänotyp-Korrelation).

D. Material und Methoden

1. Patienten

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

2. Chemikalien

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

3. Molekulargenetische Methoden

3.1. DNA-Extraktion

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

3.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.2.1. Prinzip der PCR

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

3.2.2. PCR-Primer

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

3.2.3. PCR-Reaktionsbedingungen

Standard-PCR-Protokoll:
Ein typischer PCR-Ansatz enthält in 50 µl Reaktionsvolumen:
5 µl Reaktionspuffer 10x (ThermoPol Buffer; New England Biolabs (NEB))
50 pmol sense Primer
50 pmol antisense Primer
dNTP-Mix (MBI Fermentas oder NEB), Endkonzentration: 0,25 mM je dNTP
100-500 ng genomische DNA
2,5 Units *Taq* DNA-Polymerase (Roche)

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

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) durchgeführt.
Ein typisches PCR Programm umfasst:

1. 94°C : 5 Minuten	Denaturierung der DNA
2. 40 Zyklen: (1) 94°C : 1 Minute (2) 56°C : 1 Minute (3) 72°C : 2 Minute	 Aufschmelzen der DNA Doppelstränge Anlagern der Primer (Annealing) Synthese des DNA Doppelstranges (Extension)
3. 72°C : 7 Minuten	Abschließende Extension

3.3. Aufreinigung der PCR-Produkte

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

3.4. Sequenzanalyse

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

3.5. Genotypenanalyse

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

3.6. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus- Analyse

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

E. Ergebnisse

1. Analyse des *COLQ*-Gens

1.1. Die Mutation *COLQ* T441A

Wir untersuchten 4 Patienten, stammend aus 3 unabhängigen deutschen Familien. Bei den Patienten, Patient 1 (45 Jahre alt), Patient 2 (46 Jahre alt), Patientin 3 (64 Jahre alt) und Patientin 4 (13 Jahre alt), begann die Erkrankung schon im Säuglingsalter bzw. in der frühen Kindheit, wurde aber erst vor kurzem als CMS diagnostiziert. Wir identifizierten bei diesen Patienten eine jeweils homozygote *COLQ*-Mutation (T441A) in Exon 17. Bei dieser Mutation wird an der Nukleotidposition 1321 ein A durch ein G ausgetauscht (1321A>G), so dass an der Proteinposition 441 Threonin durch Alanin ersetzt wird (Abb.4). Bei dieser Aminosäure handelt es sich um eine über Speziesgrenzen konservierte Position innerhalb der C-terminalen Region des ColQ-Proteins (Abb.5). In über 100 untersuchten Normalkontrollen war diese Mutation nicht nachweisbar.
Die klinischen Symptome waren, trotz der identischen Mutation, sehr variabel. Die beiden Patienten aus Familie 1 wiesen eine sehr milde myasthene Symptomatik auf.

Patient 1: Die ersten Auffälligkeiten traten bei ihm im Vorschulalter auf. Bis zu diesem Zeitpunkt war die motorische Entwicklung normal, er war auffällig ruhiger als andere Kinder, konnte sich körperlich schlecht gegen andere Kinder durchsetzen und fiel häufiger beim Rennen hin. Im Alter von 8 Jahren fielen schlechte Leistungen im Sportunterricht auf, im Alter von 18 Jahren wurde er wegen schlechter physischer Verfassung vom Militärdienst befreit.
Die erste Vorstellung beim Neurologen erfolgte wegen Muskelschwäche im Alter von 30 Jahren. Mit 40 Jahren stellte er sich wegen Rückenschmerzen in einer

neuromuskulären Sprechstunde vor, in der den Verdacht auf ein kongenitales myasthenes Syndrom geäußert wurde; die genetische Untersuchung durch unser Labor wurde veranlasst. Die Hauptbeschwerden bei dieser Vorstellung waren eine bis auf 1 km eingeschränkte Gehstrecke, eine belastungsabhängige Muskelschwäche, insbesondere beim Treppensteigen oder bei Tätigkeiten über dem Kopf und belastungsabhängige Schwäche und Schmerzen der Rückenmuskulatur. Bei der klinischen Untersuchung zeigten sich weder eine Ptose noch Defizite der Okulomotorik oder eine faziale und bulbäre Schwäche. Die Pupillen waren mittelweit und reagierten prompt und seitengleich auf Licht. Die Muskelkraft in Ruhe war erhalten. Auffällig war eine belastungsinduzierte Schwäche der axialen Muskeln und der proximalen Muskeln der Extremitäten, die sich nach einer 1-2 minütigen Belastung zu einer schlaffen Parese entwickelte, und sich nach weiteren 1-2 Minuten Pause vollkommen erholte. Die distalen Muskeln waren zum größten Teil nicht betroffen. Es bestand eine leichte Kyphose im zervikothorakalen Bereich. Die spinalen MRT Aufnahmen zeigten keine degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule oder Hinweise für einen Morbus Scheuermann. Eine Injektion kurz wirkender Cholinesterase-Hemmern führte zu einer Verschlechterung der Symptome, genauso wie die Behandlung mit Pyridostigmin. Die Therapie mit 3,4-Diaminopyridin blieb ohne Wirkung. Die momentane klinische Untersuchung zeigt keine zusätzlichen Symptome außer, dass die Gehstrecke auf 500 Meter beschränkt ist. Der Patient ist verheiratet, hat keine Kinder und arbeitet weiterhin als Verkaufsmanager.

Patientin 2: aus der gleichen Familie wies einen milderen Verlauf auf. Ihre schwachen sportlichen Leistungen brachten ihren Sportlehrer dazu, ihre Eltern zu kontaktieren. Als sie 3 Jahre alt war, fiel einem Nachbarn die kyphotische Haltung ihrer zervikalen Wirbelsäule auf, im Alter von 5 Jahren erhielt sie Physiotherapie. Die erste Vorstellung beim Neurologen erfolgte mit 39 in derselben Klinik, in der sich ihr Bruder untersuchen lassen hatte. Ihre Hauptsymptome waren eine leicht eingeschränkte Gehstrecke und eine belastungsinduzierte Muskelschwäche. Die klinische Untersuchung ergab ähnliche Befunde wie bei Pat.1: keine Schwäche in Ruhe ausgenommen einer milden fazialen und peronealen Schwäche und einer ausgeprägten belastungsinduzierten Schwäche der proximalen Muskeln. Zeichen für einen fazialen, okulären oder bulbären Befall gab es nicht. Genauso wie bei ihrem Bruder war die zervikothorakale Kyphose nicht durch degenerative Veränderungen

der Wirbelsäule verursacht, wie man es in den konventionellen Röntgenbildern feststellen konnte. In den letzten 6 Jahren hat sich eine leichte Progression der Erkrankung gezeigt, das Gehen fiel ihr etwas schwerer. Sie arbeitet weiterhin halbtags als Lehrerin und ist Mutter von 3 gesunden Kindern, 11, 13 und 15 Jahre alt.

Patientin 3: zeigte einen schweren, progessiven Krankheitsverlauf mit Beginn in der neonatalen Periode. Ihre Eltern waren nicht konsanguin und die Familienanamnese bezüglich neuromuskulärer Erkrankungen war negativ. Sie hat eine gesunde Schwester und einen gesunden Bruder. Noch im frühen Kindesalter fielen eine generalisierte Hypotonie und reduzierte Spontanbewegungen auf. Die motorische Entwicklung war verzögert: frei laufen konnte sie erst mit 3, über häufiges Hinfallen wurde berichtet. In der Schule war sie nie in der Lage, am Sportunterricht teilzunehmen. Manchmal fiel ihr beim Schreiben der Stift aus der Hand und sie konnte erst nach einer kurzen Pause weiter schreiben. Sie war nie in der Lage mehr als 100 m frei zu gehen und benutzte einen Rollstuhl seit dem Alter von 14. In den nächsten 15 Jahren zeigte sich nur eine milde Progression der Erkrankung. Mit 31 wurde die Patientin in einer externen Klinik neurologisch untersucht und es erfolgte die Diagnose: Benigne kongenitale Myopathie. Mit 55 entwickelte sie progressive belastungsabhängige Dyspnoe. Mit 63 musste sie wegen akuter respiratorischer Insuffizienz vorübergehend beatmet werden. Sie bekam eine nächtliche nasale Hochdruckbeatmung und stellte sich in unserem neuromuskulären Zentrum vor. Klinisch zeigten alle Hirnnerven eine normale Funktion, eine Hyperlordose der thorakolumbalen Wirbelsäule fiel auf. Es bestand eine mäßig ausgeprägte proximale Muskelatrophie und eine milde symmetrische Schwäche der proximalen Muskeln in Ruhe, die sich nach Belastung rasch in eine vollständige Parese umwandelte. Die distale Muskulatur war nur leicht betroffen. Sie war in der Lage, vom Stuhl aufzustehen und ein paar Schritte zu gehen, ansonsten war sie auf den Rollstuhl angewiesen. Die behandelnden Ärzte äußerten den Verdacht auf ein CMS und führten neurophysiologische Untersuchungen durch. Wie bei den anderen Patienten trat eine Verschlechterung der Symptome nach Therapie mit Pyridostigmin auf, die Behandlung mit 3,4-Diaminopyridin brachte eine leichte Verbesserung der respiratorischen Funktion.

Patientin 4: Bei ihr fiel im dritten Lebensjahr eine deutliche muskuläre Schwäche auf, die eine tagesabhängige Schwankung mit Verschlechterung gegen Abend aufwies. Nach einer verzögerten motorischen Entwicklung mit freiem Laufen mit 24 Monaten zeigte sich in den nachfolgenden Jahren eine Zunahme der Muskelschwäche und Reduktion der Gehstrecke, mittlerweile liegt die Gehstrecke unter 50 Metern. Symptome wie Sensibilitätsstörungen, Doppelbilder oder Ptose bestanden zu keinem Zeitpunkt. Unter Therapie mit Mestinon trat eine Verschlechterung der Symptomatik auf.
Die neurologische Untersuchung zeigte eine unauffällige mimische Muskulatur und Okulomotorik, keine Dysarthrie, keine Zungenatrophie, der Simpsontest war negativ. Die Patientin war in der Lage, die Arme bis zur Horizontalen zu bringen, bei repetitiver Armelevation war eine deutliche Ermüdung zu verzeichnen. Hochkommen vom Boden war für sie nur mit Abstützen möglich, Zehenspitzen- und Hackengang waren nicht möglich.

Elektrophysiologische Untersuchung: Alle vier Patienten zeigten im EMG fehlende Spontanaktivität und ein myopathisches Muster. Bei Patient 1 wurde ein kontinuierliches EMG während Ruhe und Belastung für einige Minuten durchgeführt. Es zeigten sich eine progressive Verkürzung und Polyphasien der Potentiale der motorischen Einheit und ein vollständiger Verlust der willkürlichen elektrischen Aktivität, gefolgt von schneller Wiederherstellung in Ruhe. Die repetitive Nervenstimulation bei 3 Hz ergab bei den vier Patienten ein pathologisches Dekrement bis zu 40% im Bereich der proximalen Muskelgruppen, während dies bei den distalen Muskeln nicht der Fall war. Beide Patienten, Patient 1 und Patient 2 zeigten nach einem Einzelstimulus eine späte Komponente des SAPs, die bei jeder folgenden Messung eine niedrigere Amplitude aufwies.

Weitere Untersuchungen: Bei allen Patienten war die CK (Kreatininkinase) normal, die Antikörper gegen den AChR waren negativ. Auf den MRT Aufnahmen der Oberschenkelmuskeln von Patientin 3 ist eine fettige Degeneration und Atrophie der proximalen Muskeln sichtbar. Bei allen 4 Patienten wurde zu diagnostischen Zwecken eine Muskelbiopsie durchgeführt. Bei allen wurden dezente und nicht spezifische myopathische Veränderungen mit leicht erhöhter Variabilität der Fasergröße und einigen zentralen Kernen beobachtet. Die Endplatten wurden nicht untersucht.

Haplotypanalyse (Abb.4): Die Haplotypanalyse in Familie 1 schloss die chromosomalen Loci der bekannten CMS Kandidatengene *CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE* und *CHAT* aus. Zusätzlich wurde der Genlocus der katalytischen Untereinheit AChE auf dem Chromosom 7q22 ausgeschlossen. Die Haplotypanalyse mit Hilfe von sieben dem *COLQ*-Gen (auf dem Chromosom 3p24) benachbarten polymorphen Mikrosatellitenmarker zeigte, dass die zwei betroffenen Geschwister denselben Haplotyp tragen, den die nicht betroffenen Familienmitgliedern nicht aufweisen. Patientin 3 zeigt bei zwei intragenischen Polymorphismen (IVS5-27G/C und IVS7-23G/A) und drei dem *COLQ*-Gen benachbarten Mikrosatelliten-Marker (D3S3613 telomer, D3S1286 und D3S3726 centromer von *COLQ*) denselben Haplotyp wie die beiden Patienten aus Familie 1 (Abb. 4), so dass sich diese Mutation wahrscheinlich auf ein Founder-Ereignis zurückführen lässt. Wenn man annimmt, dass der Marker D3S1286 auf dem väterlichen Allel bei den Patienten 1 und 2 von 296 nach 298 mutiert ist (d.h. keine Rekombination stattfand), ergibt sich ein gemeinsames Fragment von mindestens 4 Mb.

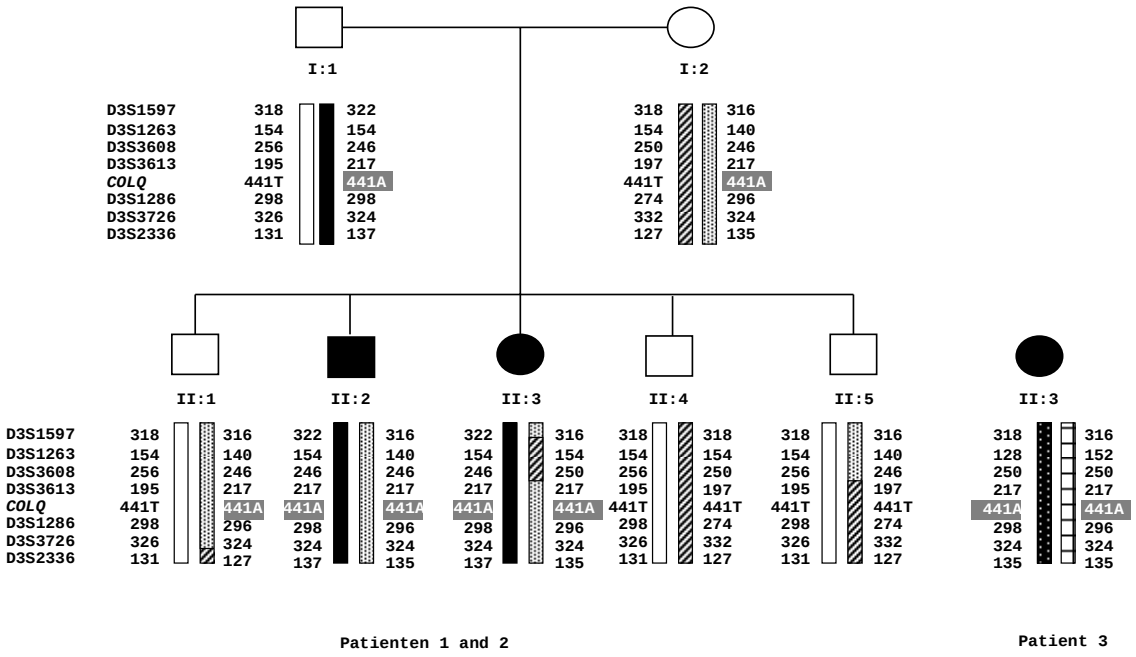

Abb. 4: Haplotypenanalyse in Familie 1 und Patientin 3 mit der Mutation COLQ T441A. Alle drei Patienten tragen identische intragenische Polymorphismen und identische Werte bei den Markern D3S3613, D3S1286 und D3S3726.

Mutationsanalyse: Bei allen 4 Patienten zeigte die Sequenzanalyse des *COLQ* Gens eine jeweils homozygote ColQ Mutation im Exon 17, bei der an der Nukleotidposition 1321 ein A durch ein G ausgetauscht wurde (1321A>G). Die Mutation führt auf Proteinebene dazu, dass an der Position 441 Threonin durch Alanin ersetzt wird. Die mutierte Aminosäure ist bei anderen Spezies wie z.B. Rate und Torpedo konserviert (Abb. 5).

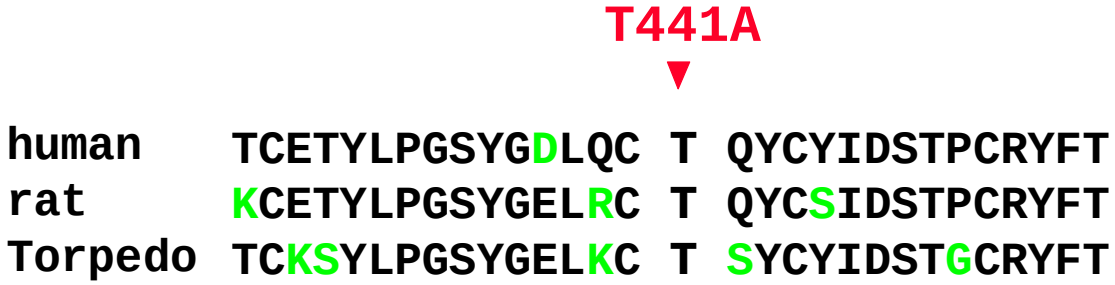

Abb. 5: Vergleich der Aminosäurensequenzen des *COLQ*-Gens des Menschen, der Rate und des *Torpedo californica*. Die Aminosäure Threonin an der Position 441 und die Nachbaraminosäure sind hoch konserviert.

Keiner der Patienten trägt eine andere Variation in der für COLQ kodierenden Sequenz, alle Patienten haben 2 identische homozygote intronische Polymorphismen (IVS5-27C/G und IVS7-23A/G). Bei den Patienten 1,2 und 4 wurden keine Mutationen in der kodierenden Region des *CHRNE* Gens entdeckt, die Patientin 3 wies zusätzlich eine heterozygote Mutation in der ε-Untereinheit des AChRs auf. Die Untersuchung der Familie 1 zeigt ein rezessives Vererbungsmuster: die nicht betroffenen Eltern sowie ein gesunder Bruder tragen die Mutation heterozygot, zwei gesunde Brüder tragen die Mutation nicht, nur die betroffenen Geschwister tragen 2 mutierte Allele. (Abb. 6) Der abgebildete Restriktionsverdau zeigt, dass die Mutation eine neue *Hin6I*-Schnittstelle in Exon 17 einführt. Die Mutation T441A konnte in 90 Allelen von anderen CMS Patienten und 200 Allelen von Normalkontrollen nicht identifiziert werden.

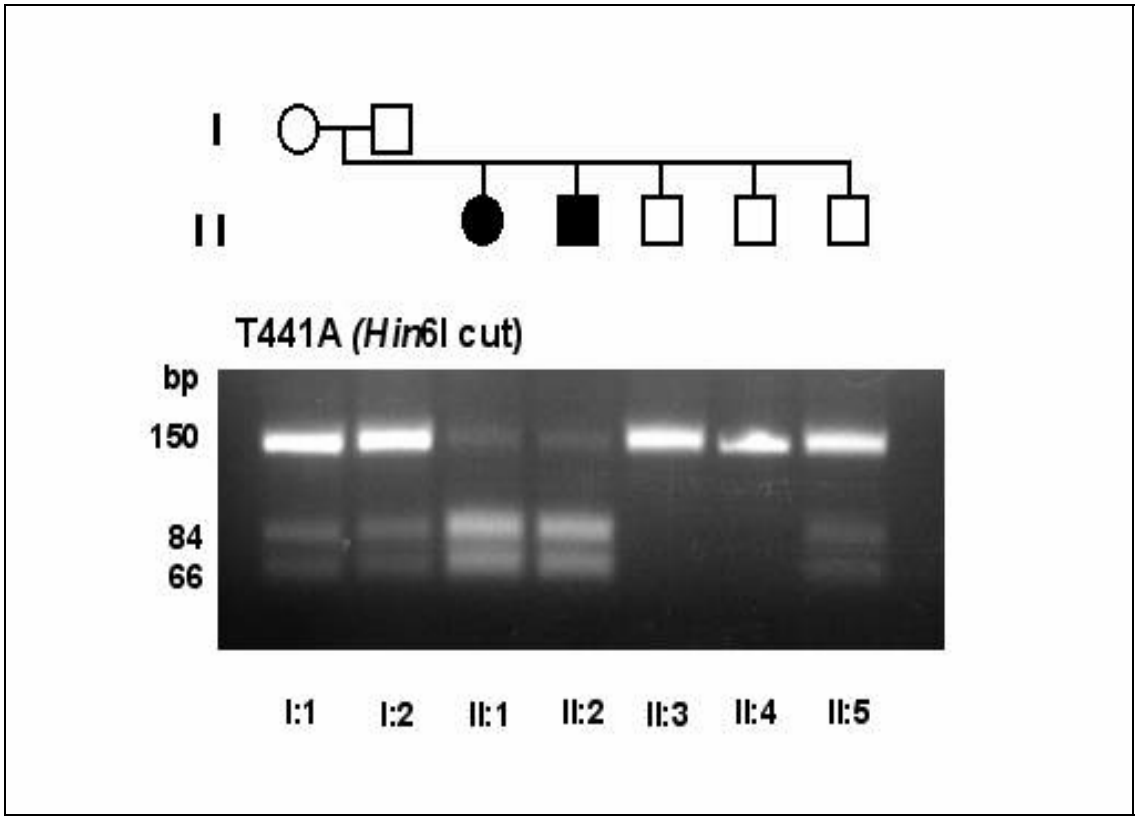

Abb. 6: RFLP-Analyse in Familie 1 mit der Mutation COLQ T441A. Die Mutation führt eine neue Hin6I-Schnittstelle in Exon 17 ein. Die beiden Patienten (II:1 und II:2) sind homozygot für die Mutation, die Eltern sowie ein gesunder Bruder (II:5) heterozygot. Die beiden anderen Geschwister tragen die Mutation nicht.

1.2. Andere im *COLQ*-Gen identifizierte Mutationen

Wir konnten bei insgesamt 4 Patienten 3 neue und 3 schon beschriebene Mutationen im *COLQ*-Gen als Ursache für ein CMS identifizieren. Die klinischen und elektrophysiologischen Charakteristika aller Patienten, bei denen im Rahmen dieser Arbeit COLQ-Mutationen nachgewiesen wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

1.2.1. Die Mutation C386S

Bei einem sehr schwer betroffenen deutschen Patienten konnten wir die Diagnose eines CMS durch den Nachweis von zwei heterozygoten *COLQ*-Mutation (W148X und C386S) molekulargenetisch sichern. Die Mutation W148X wurde bereits als pathogene Mutation beschrieben (Ohno et al., 2000), der Basenaustausch von G nach A an Nukleotidposition 444 (Exon 6) führt zu einem Translationstop nach Codon 147.

Die bislang noch nicht beschriebene Mutation C386S betrifft ein hoch konserviertes Cystein der C-terminalen Region, das als essentiell für Proteininsertion und -assemblierung angesehen wird (Ohno et al., 1998b). Der Basenaustausch von G nach C an Nukleotidposition 1157 (Exon 15) führt zu einem Aminosäureaustausch, Cystein wird durch Serin ersetzt.

Das schwere Krankheitsbild dieses Patienten, mittlerweile 14 Jahre alt, begann sofort nach der Geburt mit muskulärer Hypotonie, kongenitaler Ptose und intubationspflichtiger Ateminsuffizienz. Unter rezidivierenden intubationspflichtigen Episoden mit Stridor, respiratorischer Insuffizienz und Kreislaufdepression war er im Alter von 2 3/12 Jahren nicht in der Lage, frei zu laufen. Die neurologische Untersuchung ergab eine deutlich ausgeprägte Muskelhypotonie mit Haltungsmangel und BWS Kyphose, eine beidseitige Ptose mit Zunahme bei Ermüdung und eine eingeschränkte Augenmotilität.

Bei einer Episode mit respiratorischer Insuffizienz musste er im Alter von 8 Jahren tracheotomiert werden, bei persistierender Hyperkapnie musste eine intermittierende positive Druckbeatmung via Stoma begonnen werden. Die Lungenfunktionsprüfung ergab eine restriktive Störung, bei der elektrophysiologischen Untersuchung zeigten *Nn. Medianus, ulnaris* und *accessorius* bds. eine unauffällige Antwort auf eine repetitive Stimulation bei 3 Hz.

Patient	Geschlecht	Herkunft	Beginn der Erkrankung	Verzögerte motorische Entwicklung	Respiratorische Krisen	Ptose/ Ophthalmoparese/ faziale Schwäche/ Dysphagie	Progredienz der Erkrankung	Ausprägung der Erkrankung	Elektrophysiologische Untersuchungen			Fehlendes Ansprechen auf AChE-Hemmern	Mutationen
									RNS Dekrement	Doppeltes SMAP	Myo pathische Muster		
1	F	Deutsch	Geburt	+	+	+/+/+/-	-	mäßig	+	+	Kd	+	IVS1-1G>A/950delC
**2	M	Deutsch	Geburt	+	+	+/+/+/-	+	schwer	kd	kd	Kd	Nd	IVS1-1G>A/950delC
3	F	Pakistanisch	<1	+	-	+/-/+/-	-	mild	-	kd	+	±	R227X/R227X
4	M	Deutsch	Geburt	+	+	+/+/+/-	+	schwer	+	+	-	±	W148X/C386S
5	F	Türkisch	Geburt	+	+	+/+/+/-	+	schwer	-	-	-	±	R236X/ R236X
6	F	Deutsch	<1	+	-	-/-/-/-	+	mild	+	+	-	+	T441A/T441A
7	M	Deutsch	8	-	-	-/-/-/-	+	mild	+	+	+	+	T441A/T441A
8	F	Deutsch	3	+	-	-/-/-/-	+	mild	+	+	+	+	T441A/T441A
9	F	Deutsch	Geburt	+	+	-/-/-/-	+	schwer	+	-	+	+	T441A/T441A

Tabelle 1: Zusamenfassung der Daten von *ColQ* Patienten

RNS: repetitive Nervenstimulation

+ ja; - nein; ± erstmal positive Wirkung, danach Wirkungsverlust oder Verschlechterung

** verstorben, kd keine Daten; nd nicht durchgeführt;

Die Mutation R227X

Bei einer Patientin pakistanischer Herkunft wurde ein homozygoter Basenaustausch von C nach T an Nukleotidposition 706 in Exon 11 identifiziert. Diese Punktmutation führt zu einem Translationsstop nach Codon 226 (COLQ R227X) und wurde bislang noch nicht als Ursache einer AChE-Defizienz beschrieben. Die Eltern der Patientin sind jeweils heterozygote Träger der Mutation.
Die mittlerweile 4 Jahre alte Patientin fiel schon im Alter von 6 Monaten durch Bewegungsarmut und muskuläre Hypotonie, im Alter von 11 Monaten durch mangelnde Kopfkontrolle und ermüdungsabhängige Ptose auf. Im Alter von 16 Monaten erfolgte die erste Vorstellung in einer neuropädiatrischen Klinik. Zu dem Zeitpunkt war das Mädchen nicht in der Lage, frei zu gehen und zu stehen, sie konnte frei sitzen, gehalten stehen und an der Hand laufen. Das EMG zeigte unspezifische myopathische Veränderungen, ein pathologisches Dekrement war bei schwierigen Untersuchungsbedingungen nicht nachzuweisen. Bei dem Verdacht auf eine myasthene Erkrankung begann man eine Dauertherapie mit Mestinon®, die zu einer deutlichen Verschlechterung der Symptome führte. Bei dieser Patientin zeigte sich bis jetzt ein relativ milder Verlauf mit geringer Progredienz: im Alter von 2 Jahren lernte sie das freie Laufen, wobei sie sehr breitbasig ging, sehr schnell ermüdete und sehr häufig, besonders nachmittags stürzte. Bis jetzt ereigneten sich keine krisenhaften Episoden mit respiratorischer Insuffizienz.

1.2.2. Die Mutation R236X

Eine weitere Nonsense-Mutation in Exon 11, R236X, wurde homozygot bei einer schwer betroffenen türkischen Patientin diagnostiziert. Der Basenaustausch von C nach T an Nukleotidposition 706 im Exon 11 führt zu einem Translationsstop nach Codon 235. Diese Mutation wurde bereits bei einer CMS-Patientin aus Frankreich beschrieben (Ishigaki et al., 2003). Die gesunde Mutter der Patientin ist heterozygote Trägerin der Mutation.
Schon in der neonatalen Periode manifestierte sich die Erkrankung bei dieser Patientin mit respiratorischer Insuffizienz und Episoden mit krisenhafter Verschlechterung.

Verzögerte motorische Entwicklung mit freiem Gehen erst im Alter von 19 Monaten. Generalisierte Paresen, die einer tageszeitlichen Schwankung unterliegen mit Betonung vor allem der okulären Muskulatur und der Muskulatur der Extremitäten zeichnen das Krankheitsbild aus. Eine langfristige Mestinontherapie führte nur anfangs zur Verbesserung, später zu einer Verschlechterung der Symptome.

1.2.3. Die Mutation 950delC

Bei einer 5-jährigen deutschen Patientin wurden 2 compound heterozygote Mutationen nachgewiesen: die bereits bekannte Spleißmutation IVS1-1G>A: eine die Prolin reiche Anheftungsdomäne = PRAD betreffende Mutation (Ishigaki et al., 2003), sowie die neue Mutation 950delC, die zu einem Frameshift in Exon 13 führt.
Das zweite von 3 Kindern dieser deutschen Familie ohne Konsanguinität zeigte schon kurz nach der Geburt eine Ptose, Muskelschwäche und respiratorische Insuffizienz. Erst im Alter von 2 Wochen machte der Junge die Augen auf. Im frühen Kindesalter zeigten sich eine verzögerte motorische Entwicklung, Muskelschwäche mit Verschlechterung während fieberhaften Infektionen, myopathische Facies und eine externe Ophthalmoplegie. Im Alter von 3 Jahren starb der Junge, als er eine fulminante Sepsis und eine akute respiratorische Insuffizienz entwickelte, ohne dass man eine Diagnose seiner Grunderkrankung gestellt hatte.
Seine jüngere Schwester, mittlerweile 5 Jahre alt, bot ein ähnliches klinisches Bild: Geburt mit kongenitaler Ptose, Muskelschwäche und einer verzögerten motorischen Entwicklung. Schon im frühen Kindesalter zeigte sie wiederholt Episoden mit akuter respiratorischer Insuffizienz. Der Tensilon-Test war negativ, die Muskelbiopsie und die histologische Untersuchung ergaben unspezifische Zeichen einer Myopathie. Im EMG zeigte sich fehlende Spontanaktivität und ein myopathisches recruitment. Die repetitive Nervenstimulation bei 3 Hz ergab ein pathologisches Dekrement.
Der älteste der 3 Kinder, ein 11 jähriger Junge, die Mutter und die Großeltern mütterlicherseits hatten keine Zeichen einer neuromuskulären Erkrankung. Bei ihnen wurde die Mutation IVS1-1G>A heterozygot nachgewiesen Der Vater und die Großmutter väterlicherseits litten unter einer kongenitalen Ptosis, die sich in der Kindheit verbesserte, aber im Erwachsenenalter immer noch zu sehen war. Bei ihnen wurde die Mutation 950delC heterozygot nachgewiesen.

2. Analyse des *MUSK*-Gens

Auf der Suche nach einer Mutation im *MUSK* Gen untersuchten wir 10 Patienten, bei denen Mutationen im *CHRNE* ausgeschlossen wurden und deren Erkrankung sich durch einen schweren Verlauf auszeichnete. Aufgrund der Rolle von MuSK bei der Ausbildung postsynaptsicher Strukturen (Valenzuela et al., 1995) galt das *MUSK*-Gen auf Chromosom 9q31.3 seit vielen Jahren schon als potentielles CMS-Kandidatengen. Eine Mutation im *MUSK* Gen erwarteten wir bei Patienten mit einem frühen Beginn der Symptomatik, schwer ausgeprägter Klinik wie z.B. mit Episoden der respiratorischen Insuffizienz und progredientem Verlauf (Tab.2). Eine Behandlung mit Acetylcholinesterase Inhibitoren bzw. 3,4-Diaminopyridin sollte zu einer Verbesserung der Symptomatik führen. Wir konnten bei diesen Patienten einige Polymorphismen feststellen, eine pathogene Mutation im *MUSK*-Gen ließ sich nicht nachweisen. (Abb.8).

Im Exon 3 wurden 2 Polymorphismen bei einem der Patienten und seinem Vater festgestellt: T100M, bei dem der Ersatz von Cytosin durch Thymin zum Austausch der Aminosäure Threonin durch Methionin und G107E, bei dem der Ersatz von Guanin durch Adenosin zum Austausch der Aminosäure Glycin durch Glutamat führt.

Im Exon 4 konnten wir 2 unterschiedliche Polymorphismen bei 4 unserer Patienten nachweisen. Bei dem ersten Polymorphismus E134E des *MUSK*-Gens wird Guanin durch Adenosin ersetzt, es findet kein Aminosäurenaustausch statt. Dieser wurde bei einer deutschen Patientin und einem italienischen Patienten aus Kanada identifiziert.

Auch im Exon 4 des *MUSK*-Gens fanden wir bei 2 weiteren Patienten einen heterozygoten Polymorphismus S159G, bei dem Adenosin durch Guanin ersetzt wird. Bei der einen Patientin konnten im nachhinein Antikörper gegen den Acetylcholinrezeptor nachgewiesen werden, so dass die Verdachtsdiagnose der angebornen Myasthenie widerlegt wurde. Diese 2 Patienten wiesen einen zweiten Polymorphismus N179N auf, der sich im Exon 5 befindet und einen Basenpaaraustausch (C zu T) darstellt, die zu kodierende Aminosäure Asparagin verändert sich dabei nicht.

Patient		1	2	3	4
Geschlecht		M	W	M	M
Herkunft		Deutsch	Deutsch	Italienisch	Arabisch
Beginn der Erkrankung		Geburt	Geburt	Geburt	Geburt
Verzögerte motorische Entwicklung		+	+	-	+
Respiratorische Krisen		+	-	-	+
Ptose Ophthalmoparese faziale Schwäche Dysphagie		+ + + +	+ - + -	- - - -	+ - + -
Progredienz der Erkrankung		-	+	+	+
Ausprägung der Erkrankung		schwer	mild	mild	schwer
Elektrophysiologie	RNS Dekrement	+	-	+	+
	Doppeltes SMAP	+	-	-	-
	Myopathische Muster	+	+	+	+
Ansprechen auf AChE-Hemmern		+	+/-	+	+/-
Polymorphismus		Exon 3 T100M G107E	Exon 4 E134E	Exon 4 E134E	Exon 4 S159G

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Patienten mit Polymorphismen im *MUSK*-Gen
+ ja; - nein; ± erstmal positive Wirkung, danach Wirkungsverlust oder Verschlechterung

Im Exon 9 wurde bei der Patientin mit den nachgewiesenen AK gegen den AChR noch einen weiteren Polymorphismus M413I identifiziert, bei dem Methionin durch Isoleucin ersetzt wird.

Es wurden weitere 5 Patienten auf Mutationen im *MUSK* Gen untersucht. Bei ihnen ließ sich weder eine Mutation noch weitere Polymorphismen in diesem Gen nachweisen.

Insgesamt konnten wir bei 3 aller auf Mutationen im *MUSK*-Gen untersuchten Patienten zu einem späteren Zeitpunkt Mutationen in anderen für CMS

verantwortlichen Genen identifizieren. Bei 4 dieser Patienten gelang uns die genaue molekulargentische Charakterisierung des CMS auch durch die Untersuchung weiterer bekannter CMS Gene nicht. Zu 3 der Patienten erhielten wir im Krankheitsverlauf zusätzliche klinische Daten, die die Diagnose eines CMS eher unwahrscheinlich erscheinen ließen.

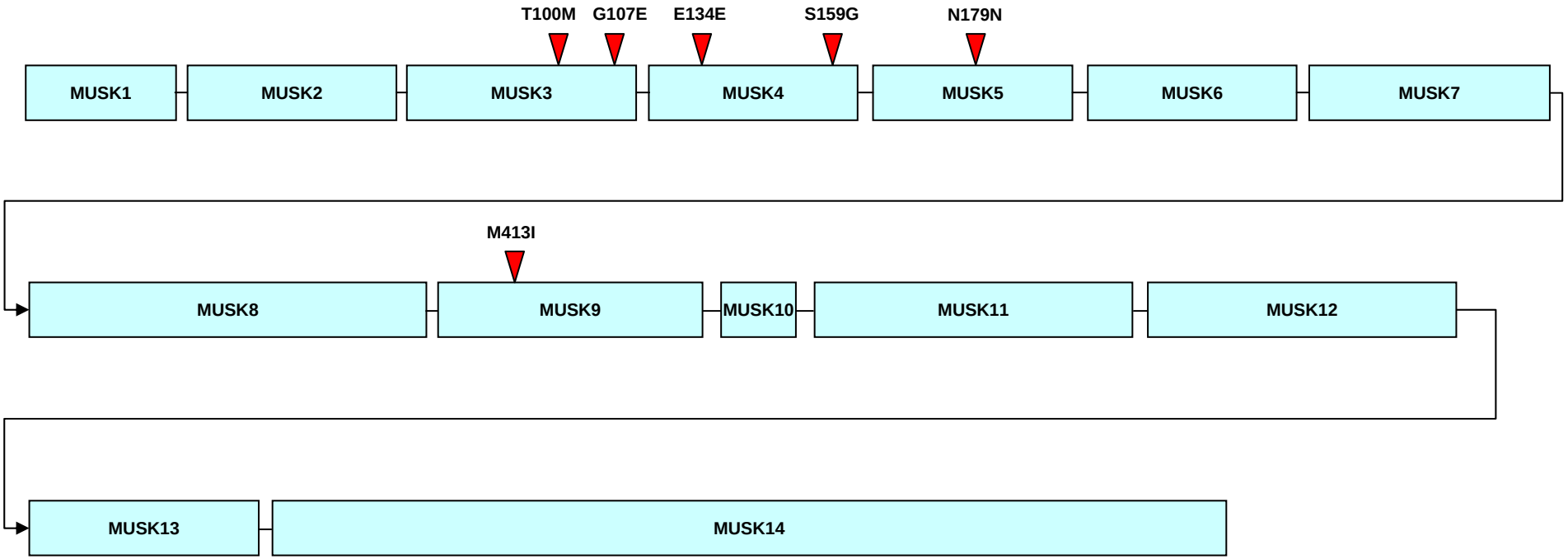

Abb. 8: Schematische Darstellung der Struktur des *MUSK*-Gens mit Positionen der identifizierten Polymorphismen

F. Diskussion

1. Gendefekte bei CMS

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

Bisher sind zehn verschiedene Gene bekannt, deren Defekte CMS verursachen können. Dazu gehören die Gene, die die AChR-Untereinheiten kodieren, das *CHAT*-Gen, welches die Cholin-Azetylcholin-Transferase kodiert, das *RAPSN*-Gen, das *SCN4A*-Gen, das *DOK7*-Gen, sowie das *COLQ*-Gen und das *MUSK*-Gen. Am häufigsten sind Mutationen in den Genen, die für den AChR, insbesondere für die epsilon- Untereinheit kodieren. *RAPSN*-Mutationen stellen die zweithäufigste Ursache für CMS dar. Im Bereich des Natriumkanals wurden bis jetzt nur bei einer Patientin mit CMS zwei compound heterozygote Mutationen identifiziert (Tsujino et al., 2003). Erst vor ein paar Jahren konnten Mutationen im Gen kodierend für die Cholin-Acetyltransferase (*CHAT*) auf Chromosom 10q11.23 als erste molekulare Ursache für ein präsynaptisches CMS identifiziert werden (Ohno et al., 2001).

Mutationen im *COLQ*-Gen sind eine relativ häufige Ursache von CMS. Seit der Erstbeschreibung von *COLQ*-Mutationen als Ursache synaptischer CMS wurden etwa 30 unterschiedliche Mutationen (missense-, frameshifting-, und nonsense-Mutationen) identifiziert (Donger et al., 1998; Engel et al., 2003a; Ohno et al., 1998b). Wir konnten bei 8 Patienten aus 7 Familien 7 verschiedene Mutationen identifizieren, 4 davon waren noch nicht beschrieben worden.

Aufgrund der Rolle von MuSK bei der Ausbildung postsynaptsicher Strukturen (Valenzuela et al., 1995) galt das *MUSK*-Gen auf Chromosom 9q31.3 seit vielen

Jahren schon als potentielles CMS-Kandidatengen, deswegen untersuchten wir alle 14 Exons des Gens bei Patienten, bei denen Mutationen im *CHRNE*-Gen ausgeschlossen wurden und deren Erkrankung die vermutlich zu erwartenden klinischen Besonderheiten aufwies.

2. Das *COLQ*-Gen

Das *COLQ*-Gen kodiert für das synaptisch exprimierte Verankerungsprotein ColQ, dessen Rolle die Befestigung des Enzyms AChE an der Basalmembran ist. Die CMS-Form, die durch Mutationen im *COLQ*-Gen verursacht wird, ist durch die Abwesenheit von AChE im synaptischen Spalt charakterisiert. AChE ist ein Enzym, das für die rasche Hydrolyse von freigesetztem ACh im synaptischen Spalt verantwortlich ist und dadurch die Dauer der Signalübertragung begrenzt. Der Mangel an diesem Enzym führt zur verlängerten Wirkung von ACh auf den AChR, zu prolongierten EPPs (Endplattenpotentialen), Desensibilisierung des AChRs und zu einer Depolarisationsblockade bei physiologischer Stimulation. Es resultiert eine Myopathie der Endplatte mit Verlust von AChR durch eine kationische Überladung der postsynaptischen Region.

In der Literatur wurde häufig darüber berichtet, dass die Patienten mit AChE Defizienz ein schweres Krankheitsbild zeigen, das in der neonatalen Periode beginnt und zu schweren Behinderungen führt. Bei manchen Patienten kann die Erkrankung erst in der Kindheit anfangen und in der zweiten Dekade oder noch später zur Behinderung führen. Typisch ist, dass die Symptome auf eine Therapie mit AChE-Hemmern nicht ansprechen. (Engel and Sine, 2005) Die Patienten, bei denen in unserem Labor Mutationen im *COLQ*-Gen nachgewiesen wurden, zeigen sehr unterschiedliche klinische Verläufe: von ganz milden Formen, bei denen nur die Muskulatur des Gliedergürtels und der Extremitäten betroffen sind, bis zu schwer beeinträchtigenden Formen, im Rahmen derer die Patienten nach einigen Jahren rollstuhlpflichtig werden (Tab.1). Bemerkenswert ist, dass eine mäßig ausgeprägte myasthene Symptomatik im Kindesalter teilweise nicht erkannt und die Diagnose eines CMS erst im Erwachsenenalter gestellt wurde.

Bei vielen der CMS-Patienten mit *COLQ*-Mutationen sind okuläre und faziale Muskeln nicht betroffen, die Muskelschwäche ist nur auf die Muskulatur des

Gliedergürtels und der Extremitäten verteilt. Aus diesem Grund sollten bei CMS-Patienten mit diesem Verteilungsmuster und einer nicht eindeutig positiven Reaktion auf Tensilon/Mestinon *COLQ*-Mutationen in Betracht gezogen werden.
Interessant ist es, dass sogar Patienten mit identischem *COLQ*-Genotyp ganz unterschiedliche phänotypische Ausprägungen zeigten, was auf unbekannte modifizierende Faktoren hinweisen könnte, beispielsweise bei den 4 Patienten, bei denen die Mutation T441A identifiziert wurde: Während die 2 Patienten, die aus einer Familie stammen, eher leicht betroffen sind, zeigen die anderen 2 Patientinnen einen schweren Verlauf der Erkrankung. Insbesondere beeinträchtigt ist die momentan 64-jährige Patientin, die schon seit dem Alter von 14 Jahren rollstuhlpflichtig ist und seit über einer Dekade unter einer respiratorischen Insuffizienz leidet.

2.1. Mutationen im *COLQ*-Gen

2.1.1. Die Mutation *COLQ* T441A

Bei insgesamt 4 CMS-Patienten aus 3 unabhängigen Familien konnte diese Mutation nachgewiesen werden. Zwei der Patienten bieten keine positive Familienanmnese bezüglich CMS und zwei von ihnen sind Geschwister. Alle Patienten wiesen ein rezessives Vererbungsmuster auf, sie alle waren homozygot für die Mutation, während nicht betroffene Familienmitglieder entweder heterozygot waren oder die Mutation gar nicht trugen. Mutationen in anderen bekannten Genen wurden entweder durch direktes Sequenzieren oder durch Haplotypanalyse der korrespondierenden chromosomalen Loci ausgeschlossen. In über 100 untersuchten Normalkontrollen war die Mutation nicht nachweisbar. Im Gegensatz zu der schon beschriebenen Mutation E415G, die den Spleißprozess und somit das ColQ Protein beeinträchtigt, beeinflusst die Mutation T441A den Spleißprozess nicht, nur intakte Spleißprodukte wurden in den Muskelextrakten einer Patientin gefunden.
Bei der Mutation T441A führt ein homozygoter Austausch (1321 A/G) an der Nukleotidposition 1321 im Exon 17 dazu, dass an der Position 441 Threonin durch Alanin ersetzt wird. Threonin an dieser Position ist eine über viele Speziesgrenzen konservierte Aminosäure innerhalb der C-terminalen Region des ColQ-Proteins.

Diese Region ist essentiell für die Trimerisierung von ColQ sowie die Insertion der AChE/ColQ-Komplexe in die Basallamina (Kimbell et al., 2004). Die Folgen einer Mutation im *COLQ*-Gen können mittels Sucrosegradienten-Zentrifugation von Muskelextrakten analysiert werden. In diesem Zentrifugationsschritt werden AChE-Monomere von AChE/ColQ-Komplexen getrennt; ihre Aktivität kann danach getrennt bestimmt werden. Diese Untersuchung wurde von anderen Mitarbeitern unseres Labors durchgeführt. Es zeigte sich das vollständige Fehlen von AChE/ColQ-Komplexen im Patientenmuskel (Müller et al., 2004). Die Arbeit von Kimbell und Kollegen bestätigte, dass die C-terminale Domäne von ColQ essentiell für die Trimerisierung von ColQ sowie die Insertion der AChE/ColQ-Komplexe in die Basallamina ist (Kimbell et al., 2004). Wurden ColQ-Moleküle mit Mutationen in der C-terminalen Domäne zusammen mit AChE in Zellkultur exprimiert, wurden AChE/ColQ-Komplexe gebildet; an den Endplatten der jeweiligen Patienten konnten diese Komplexe nicht nachgewiesen werden, da sie vermutlich nicht in die Basallamina inserieren konnten (Kimbell et al., 2004). 4 andere Missense Mutationen Y430S, D342E, R410Q und C444Y in der C-terminalen Region, die zu ähnlichen Folgen geführt haben, wurden von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Ohno et al., 2000). Drei der Mutationen (D342E, R410Q und C444Y) wurden durch Studien an COS Zellen weiter charakterisiert. Die Sedimentation von AChE, die aus den COS Zellen extrahiert wurde, demonstrierte, dass eine gewisse Menge von der asymmetrischen Form der AChE gebildet wurde. Im Gegensatz dazu zeigte die Dichtegradient Analyse der AChE, die vom Interkostalmuskel eines Patienten mit Mutation D342E extrahiert wurde, dass die asymmetrische Form der AChE komplett fehlte, ähnlich wie es in unseren Untersuchungen der Fall war.

Interessant ist es, dass die Haplotypanalyse des *COLQ* Locus bei der Patientin 3 viele Ähnlichkeiten mit dem die Mutation tragenden Allel der 2 Geschwister aus Familie 1 aufwies. Dies könnte bedeuten, dass die Mutation einen gemeinsamen Ursprung hat, was zu der Tatsache passen würde, dass alle 3 Patienten aus derselben deutschen Region stammen. Zum Beweis dieser Hypothese ist die Zahl der mutierten Allele in unserer Studie zu klein.

2.1.2. Andere COLQ Mutationen

Bei 4 weiteren Patienten konnten wir insgesamt 6 Mutationen im *COLQ*-Gen nachweisen, 3 davon waren noch nicht beschrieben worden. Die bislang noch nicht beschriebene Mutation C386S betrifft ein hoch konserviertes Cystein der C-terminalen Region, das als essentiell für Proteininsertion und -assemblierung angesehen wird (Ohno et al., 1998b). Der Basenaustausch vom G nach C an Nukleotidposition 1157 (Exon 15) führt zu einem Aminosäureaustausch, Cystein wird durch Serin ersetzt. Bei einer Patientin pakistanischer Herkunft wurde ein homozygoter Basenaustausch von C nach T an Nukleotidposition 706 in Exon 11 identifiziert. Diese Punktmutation führt zu einem Translationsstop nach Codon 226 (COLQ R227X) und wurde bislang noch nicht als Ursache einer AChE-Defizienz beschrieben. Die Eltern der Patientin sind jeweils heterozygote Träger der Mutation. Bei der Nonsense-Mutation in Exon 11 R236X, die wir bei einer schwer betroffenen Patientin türkischer Herkunft nachwiesen, kommt es zu einem Basenaustausch von C nach T an Nukleotidposition 706, der zu einem Translationsstop nach Codon 235 führt und die Trimerisierung von ColQ verhindert. Diese Mutation wurde bereits bei einer CMS-Patientin aus Frankreich beschrieben (Ishigaki et al., 2003). Die gesunde Mutter der Patientin ist heterozygote Trägerin der Mutation. Die Mutation 950delC, die zu einem Frameshift in Exon 13 führt, wurde bei einer 5-jährigen deutschen Patientin heterozygot nachgewiesen. Die zweite Mutation bei diesem Kind ist die bereits bekannte Spleißmutation IVS1-1G>A (Ishigaki et al., 2003), eine die Prolin reiche Anheftungsdomäne = PRAD betreffende Mutation.

3 der 4 Patienten zeigten einen schweren Verlauf mit Episoden respiratorischer Insuffizienz und starker Beeinträchtigung, ein Geschwisterkind ist mit ähnlichen Symptomen im Kleinkindesalter verstorben. Die Patientin mit einer eher milderen Ausprägung der Erkrankung ist erst 4 Jahre alt, so dass man über die Progredienz der Erkrankung keine endgültigen Feststellungen treffen kann. Bei allen 4 Patienten war mindestens eine trunkierende Mutation als Ursache für die Erkrankung identifiziert. Bei diesen und noch weiteren Patienten aus unserem Patientengut scheint es einen Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf und der Art der Mutation zu bestehen: Patienten mit mindestens einer trunkierenden *COLQ*-Mutation (Nonsense-, Frameshift- oder Spleißmutation) sind tendenziell schwerer betroffen sind als Patienten mit Missense-Mutationen in beiden Allelen.

Interessanterweise wurde bei einigen unserer Patienten mit *COLQ*-Mutationen eine Besserung der Symptome mit geringen Mestinondosen am Anfang der Therapie geschildert, bevor eine deutliche Verschlechterung einsetzte.

3. Das *MUSK*-Gen

Die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) gilt als Agrin-Rezeptor auf der postsynaptischen Membran der neuromuskulären Endplatte. So weisen MuSK-defiziente Mäuse erhebliche Defekte der postsynaptischen Spezialisierung auf, die den der Agrin-defizienten Mäusen ähneln (DeChiara et al., 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Agrin die Phosphorylierung von MuSK und der beta-Untereinheit des AChR in Myotuben induzieren kann (Glass et al., 1996). Allerdings konnte bislang noch keine direkte Interaktion zwischen Agrin und MuSK nachgewiesen werden. Daher geht man von weiteren, noch unbekannten signaltransduzierenden Faktoren aus (Colledge und Froehner, 1998).
Die Phosphorylierung von MuSK ist essentiell für die Aggregation des AChR (Watty et al., 2000; Burden, 2000), bei der die extrazelluläre Region von MuSK eine wichtige Rolle spielt (Apel et al., 1997). Das intrazelluläre Substrat von MuSK ist eine Src-Kinase (Fuhrer und Hall, 1996; Glass et al., 1997; Fuhrer et al., 1997), die an den AChR bindet und diesen phosphoryliert. Dies ist offensichtlich weniger für die Verankerung des Rezeptors an der Synapse, als für die Stabilisierung der Rezeptoraggregate notwendig (Mayer et al., 1998; Mohamad und Swope, 1999; Smith et al., 2001).
Bis 2004 gelang es keiner Arbeitsgruppe, eine pathogene Mutation im *MUSK* Gen zu entdecken. Im Jahr 2004 wurden bei einer französischen Patientin zwei compound heterozygote *MUSK*-Mutationen nachgeweisen (Chevessier et al., 2004), die Frameshift-Mutation 220insC und die Missense-Mutation V790M. Die Erkrankung manifestierte sich direkt nach Geburt durch Ptose, respiratorische Probleme und Ermüdbarkeit bei körperlicher Betätigung. Im Kindes- und Jugendalter verbesserte sich die Symptomatik; dann kam es im Alter von 22 Jahren während einer Schwangerschaft zu einer akuten Verschlechterung der Muskelschwäche. Eine Behandlung mit Esteraseinhibitoren und 3,4-Diaminopyridin verlief erfolgreich.

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

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir das *MUSK* Gen von 10 Patienten, bei denen Mutationen im *CHRNE*- und *RAPSN*-Gen ausgeschlossen worden waren und deren Erkrankung der zu erwartenden Klinik entsprach.

Diesbezüglich orientierten wir uns an der Funktion von MuSK an der neuromuskulären Endplatte. Bei einem verminderten Clustern des AChR an der postsynaptischen Membran erwarteten wir einen frühen Beginn der Erkrankung mit einem schweren Verlauf.

Bei einigen der untersuchten Patienten ließen sich Sequenzveränderungen nachweisen, die sich allerdings alle als Polymorphismen erwiesen; pathogene Mutationen konnten nicht identifiziert werden.

Bei einem schwer betroffenen Patienten geling es uns 2 heterozygote Sequnzveränderungen im Exon 3 des *MUSK*-Gens zu entdecken. In der Datenbank waren diese nicht als Polymorphismen beschrieben worden. Die molekulargenetische Untersuchung der weiteren Familienmitglieder ergab, dass zwei gesunde Geschwister und die gesunde Mutter keine Abweichung in diesem Bereich des *MUSK*-Gens zeigten, der gesunde Vater des Patienten aber die gleichen Veränderungen wie der Patient aufwies. Bei weiteren 4 von 7 getesteten Normalkontrollen wurden die gleichen Sequenzveränderungen nachgewiesen, so dass man ausschließen konnte, dass diese die Ursache für die Erkrankung sind. Bei diesem Patienten wurden später in unserem Labor die Mutation E381K in der delta-Untereinheit des Acetylcholinrezeptors und die Deletion im *CHRND*-Gen compound heterozygot identifiziert. *CHRND*-Mutationen sind eine sehr seltene Ursache für CMS, bisher sind nur sieben andere *CHRND*-Mutationen publiziert (Müller et al. 2006).

Im Exon 4 wurden bei 2 Patienten den Aminosäurenaustausch S159G heterozygot nachgewiesen. Bei weiteren getesteten Normalkontrollen wurden die gleichen Sequenzveränderungen nachgewiesen, so dass man ausschließen konnte, dass diese die Ursache für die Erkrankung sind. Zusätzlich wurden bei einer der Patienten im

Nachhinein Antikörper gegen den AChR gemessen, was für eine autoimmune Form der Myasthenie spricht.
Bei dieser Patientin wurde im Exon 9 einen weiteren Polymorphismus M413I nachgewiesen. Die Untersuchung von gesunden Probanden auf diese Sequenzveränderung zeigte, dass dies eine Abweichung ist, die häufig in der Normalbevölkerung auftritt und nicht die molekulargenetische Ursache für die Erkrankung ist.
Bei zwei der sechs nachgewiesenen Sequenzveränderungen im *MUSK* Gen (E134E im Exon 4 und N179N im Exon 5) kam es zu einem Basenpaaraustausch, nicht aber zu einer Veränderung der zu kodierenden Aminosäure, so dass diese ohne weitere Untersuchungen als Polymorphismen zu betrachten sind.

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

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Mutationen im *COLQ*-Gen identifiziert, die Veränderungen im *MUSK*-Gen erwiesen sich als Polymorphismen.

Bei den Patienten, die eine *COLQ* Mutation tragen, beobachteten wir sowohl schwere klinische Verläufe mit starker Beeinträchtigung als auch relativ milde Krankheitsbilder, die eine Konsultation eines Neurologen erst im Erwachsenenalter notwendig machten. Trotzdem konnten wir ein repetitives SMAP als Antwort auf einen Einzelreiz, sowie ein fehlendes Ansprechen oder sogar eine Verschlechterung der Symptome auf Therapie mit Esteraseinhibitoren als typische Hinweise auf eine Esterasedefizienz erheben. Die externen Augenmuskeln waren bei den meisten Patienten mit *COLQ* Mutationen nicht beteiligt im Gegensatz zu Patienten mit Mutationen anderer CMS Gene. So kann man bei Vorliegen dieser typischen Symptomkonstellation eine gezielte genetische Diagnostik per PCR und Sequenzierung durchführen und die Diagnose sichern. Dadurch können den Patienten beeinträchtigende langwierige Untersuchungen, gefährdende Therapien und eine unsichere Beratung erspart werden.
Im Bereich des *MUSK*-Gens gelang es uns nicht Sequenzveränderungen nachzuweisen, die die Erkrankung verursachen. Bis jetzt wurden weltweit nur bei

einer Patientin mit CMS Mutationen im *MUSK*-Gen identifiziert. Dass weist darauf hin, dass Mutationen im *MUSK*-Gen nur sehr selten ein CMS verursachen. Eine sehr wahrscheinliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass die Tyrosinkinase MuSK eine sehr wichtige Rolle für die richtige Funktion des AChR spielt. Möglicherweise sind viele genetische Veränderungen in diesem Gen daher vorgeburtlich letal.

5. Weitere CMS Gene

Heutzutage sind 10 Gene bekannt, deren Defekte CMS verursachen können. Während der letzten Jahre hat sich gezeigt, dass die postsynaptischen Störungen bei weitem überwiegen, vor allem solche, bei denen die Mutationen in den Genen der Untereinheiten des Azetylcholinrezeptor (AChR) liegen. Der Großteil aller rezessiven und sporadischen CMS beruht auf Mutationen der AChR ε-Untereinheit, wesentlich seltener sind Mutationen der α-, β- und δ-Untereinheiten des AChRs. Dafür gibt es zwei Gründe:

1. Durch den hohen CG Gehalt des *CHRNE*-Gens werden die DNA-Umlagerungen und die Entstehung von Nukleotid-Deletionen und Insertionen begünstigt (Beeson et al., 2005).

2. Die persistierende Expression der fetalen γ-Untereinheit kann in geringen Mengen auch im adulten Muskel teilweise den Ausfall der ε-Untereinheit kompensieren (Engel et al., 2003b). Der komplette Ausfall der anderen Untereinheiten ist zu schwerwiegend, da hier kein solches Kompensationssystem existiert; solche Kinder wären vermutlich gar nicht lebensfähig. Diese Zusammenhänge spiegeln sich in der Tatsache, dass Patienten mit „Low-Expressor"-Mutationen (Mutationen, die zu einer weit unter dem Wildtyp-Niveau liegenden Expression dieser Untereinheiten führen) oder sogar Patienten mit homozygoten Nullmutationen in der ε-Untereinheit sehr milde Symptome aufweisen können, dagegen aber Patienten mit „Low-expressor"-Mutationen in einer anderen Untereinheit sehr schwer betroffen sein können. Patienten mit Nullmutationen in beiden Allelen einer nicht-ε-Untereinheit wurden bis jetzt nicht beobachtet.

Als zweithäufigste Ursache für ein CMS wurden Mutationen im Gen kodierend für das postsynaptische Protein Rapsyn auf Chromosom 11p11.2 beschrieben (Ohno et al., 2002). Für das RAPSN-Gen sind in etwa gleich viele trunkierende wie nicht-trunkierende Mutationen veröffentlicht (Ohno and Engel, 2004a). Dahingegen sind für

das *CHAT*-Gen und für die Gene der α-, β- und δ- Untereinheiten fast ausschließlich Missense-Mutationen identifiziert worden. Allerdings sollte man für das *RAPSN*-Gen den großen Anteil von CMS-Patienten mit der Missense-Mutation N88K berücksichtigen. Aus den bisherigen Daten kann man schlussfolgern, dass ein vollständiges Fehlen der genannten Proteine entweder (embryonal) letal ist oder zu einer weitaus schwerwiegenderen Erkrankung als CMS führt.

Zu den selteneren Ursachen für ein CMS zählen die präsynaptischen Defekte, als Kandidaten wurden sowohl ChAT, die die Biosynthese von Acetylcholin katalysiert als auch die präsynaptische Protonenpumpe und die vesikuläre Acetyltransferase VAChT, die das Acetylcholin in die präsynaptische Vesikel transportiert, betrachtet. Obwohl alle drei Strukturen ähnliche phänotypische Konsequenzen verursachen könnten, wurden bis jetzt nur Mutationen im *CHAT*-Gen identifiziert. Zu den seltensten CMS-Mutationen gehören zusammen mit den Mutationen im *MUSK*-Gen die Mutationen im *SCN4A*-Gen. Bis jetzt wurden 2 heterozygote Mutationen im *SCN4A*-Gen bei einer schwer betroffenen Patientin identifiziert.

Sowohl pathogenetisch als auch klinisch sind die CMS eine sehr heterogene Gruppe und zeigen unterschiedliche Verläufe und Ausprägung der Erkrankung. Einige charakteristische Symptome haben sich jedoch als richtungsweisend für die genetische Analyse herausgestellt.

Während Patienten mit Mutation der ε-Untereinheit sehr häufig eine Ptose, eine fixierte Opthalmoparese und manchmal eine faziale Schwäche aufweisen, fällt eine Ptose bei Patienten mit der *RAPSN*-Mutation N88K selten auf. Insbesondere die Ophthalmoparese der externen Augenmuskulatur scheint ein sehr spezifisches Symptom zu sein und wird bei Patienten mit Mutationen in anderen Genen sehr selten berichtet. Patienten mit *CHAT*-Mutationen haben typischerweise nur eine Ptose, während bei *COLQ*-Mutationen die okuläre Muskulatur in einigen Fällen gar nicht beteiligt ist. Häufig beginnt die Erkrankung bei den Patienten mit *CHRNE*-Mutationen sehr früh, der Verlauf ist jedoch eher mild. Schwer betroffene „floppy-infants“ mit genereller Muskelhypotonie, Ateminsuffizienzen und Gelenkkontrakturen bei Geburt kommen kaum vor. Im Gegensatz dazu können sich Erkrankungen verursacht durch Mutationen im *COLQ*-Gen durch einen schweren und progredienten Verlauf auszeichnen. Eine relativ schwere Ausprägung der Erkrankung kann man auch bei Early-Onset-Patienten mit *RAPSN*-Mutationen beobachten. Typisch für sie ist ein Beginn vor dem 5. Lebensjahr (meistens schon neonatal), und eine schwere

myasthene Symptomatik (Burke et al., 2003). Bei den meisten „Early-Onset"-Patienten wird von Krisen mit respiratorischen Insuffizienzen in der Kindheit berichtet (Burke et al., 2004). Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal sind die Gelenkkontrakturen und/oder Dysmorphien des Gesichtsschädels (langer Gesichtsschädel, tiefliegende Ohren, hoher Gaumen, zeltförmiger Mund (Burke et al., 2004)), die durch unzureichende Fetusbewegungen im Mutterleib zustande kommen. Diese treten bei Patienten mit *COLQ*-, *CHRNE*- oder *CHAT*-Mutationen fast nie auf.

Einige Ähnlichkeiten sowohl im Krankheitsverlauf als auch bei den elektrophysiologischen Untersuchungen bestehen zwischen der ColQ-Myasthenie und dem SCCMS, was durch die Pathophysiologie der Erkrankung gut zu erklären ist. Bei beiden CMS Formen ist die Dauer der Signalübertragung verlängert, eine Überlastung der postsynaptischen Seite mit Kationen führt dadurch zu einer Degeneration der Endplatten. Ein repetitives CMAP auf einen Einzelreiz erhält man nur bei Mutationen im *COLQ*-Gen und bei dem SCCMS. Auf repetitive Stimulationen bei niedriger Frequenz erhält man im EMG ein deutliches Dekrement des ausgelösten CMAPs, das bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz zunimmt. Das repetitive CMAP weist eine niedrigere Amplitude auf und verringert sich schneller als das erste CMAP. Diese pathophysiologischen Zusammenhänge erklären die Tatsache, dass die Therapie mit AChE-Inhibitoren bei beiden CMS Formen nicht zur Verbesserung der Symptome führt. Viele Patienten mit einem SCCMS werden erfolglos mit AChE-Hemmern behandelt, diese Therapie verursacht möglicherweise sogar eine schnellere Degeneration der Endplatten. Bei den Patienten mit *COLQ*-Mutationen können AChE-Inhibitoren sogar zu einer deutlichen Verschlechterung der Symptome bis zu einer myasthenen Krise führen.

Einen weiteren sehr wichtigen Aspekt für die Diagnostik des CMS liefert die ethnische Herkunft des Patienten, da zahlreiche Mutationen besonders häufig in bestimmten Bevölkerungsgruppen gefunden wurden. Im *COLQ*-Gen sind bis jetzt keine solchen Mutationen bekannt. Die meisten genetischen Veränderungen waren als „private" Mutationen jeweils nur in einzelnen Patienten bzw. Familien nachweisbar. Die Mutation des *COLQ*-Gens (T441A) fand sich dagegen interessanterweise homozygot in drei unabhängigen deutschen CMS-Familien mit insgesamt vier betroffenen Personen. Für die Mutation N88K im *RAPSYN*-Gen konnte ein Founder-Effekt nachgewiesen werden: diese Mutation lässt sich auf ein einziges ursprüngliches Mutationsereignis zurückführen. Aufgrund der Verbreitung der Mutation kann man

von einer indoeuropäischen Mutation ausgehen. In Übereinstimmung mit dieser Theorie wurde N88K nicht bei Ost-Asiaten oder Schwarzafrikanern nachgewiesen. Die Tatsache, dass N88K eine in Europa weit verbreitete Mutation ist, hat wichtige Konsequenzen für das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf ein CMS. Ein Vorab-Test auf N88K aus Lymphozyten-DNA erspart weitere aufwendige und teilweise invasive Diagnostik, wie z.B. ausführliche elektrophysiologische Messungen oder eine Muskelbiopsie. Diese Untersuchungen sind vor allem bei Kleinkindern und Säuglingen schwierig durchzuführen und oft nur eingeschränkt aussagekräftig.
Bei der Mutation 1267delG der epsilon-Untereinehit handelt es sich um eine Founder-Mutation in der Population der Roma (Morar et al., 2004), sie stellt in der Volksgruppe der Roma die häufigste Ursache für CMS dar (Abicht et al., 1999, Abicht et al., 2000). Interessanterweise konnte sie auch bei Patienten aus Indien auf dem gleichen chromosomalen Hintergrund wie in der Roma-Population festgestellt werden, ein genetischer Beweis für die Herkunft der Roma aus Indien. Die relativ große Anzahl von Patienten mit dieser Mutation ermöglichte eine detaillierte Genotyp- Phänotyp-Korrelation. Zukünftig wird eine direkte Testung auf die Mutation ε1267delG die Diagnosestellung bei Patienten dieser Volksgruppe deutlich vereinfachen und beschleunigen. Bei frühzeitiger Diagnosestellung können rechtzeitig Therapie- und Präventionsmaßnahmen eingeleitet werden, und bei entsprechender Medikation mit Acetylcholinesterase-Hemmern mögliche Komplikationen vermieden werden.

6. Ausblick

Bei annähernd 55% der CMS-Patienten aus unserem Patientenkollektiv konnte die der Erkrankung zu Grunde liegende Mutation festgestellt werden. Bei den restlichen 45% der Patienten konnte jedoch mit oben beschriebenen Strategien die genetische Ursache ihres CMS bislang noch nicht ermittelt werden. Dies liegt zum einen daran, dass die CMS sowohl genetisch als auch klinisch eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe bilden und dass auch bei CMS-Patienten mit identischen Mutationen der Phänotyp sehr stark variieren kann. Zum anderen ist eine genaue klinische Abgrenzung eines CMS gegenüber anderen Muskelerkrankungen – vor allem im Säuglings- und Kleinkindalter - oftmals schwierig. Des Weiteren gibt es Patienten mit klinisch und elektrophysiologisch gesichertem CMS, deren Erkrankung

wahrscheinlich auf Mutationen in bislang nicht identifizierten Genen beruht. Insbesondere Gene, deren Proteinprodukte spezifisch an der neuromuskulären Endplatte exprimiert werden, bieten sich als neue Kandidatengene für CMS an. Dabei könnte es sich sowohl um postsynaptsich lokalisierte Proteine (z.B. aus der Agrin-Rapsyn-MuSK Signalkaskade), als auch um Proteine aus dem synaptischen Spalt oder um präsynaptische Proteine (z.B. Proteine des Vesikelfreisetzungsapparates) handeln. Einige CMS-Patienten mit bislang unbekannter molekularer Ursache bei denen die Untersuchung der Endplatte auf einen präsynaptischen Defekt deutet und klinisch gut charakterisierte Patienten, bei denen durch vorangegangene Untersuchungen die derzeit bekannten Ursachen von CMS ausgeschlossen werden konnten, bieten eine einzigartige Möglichkeit, mittels weiterer genetischer Untersuchungen neue Kandidaten CMS-Gene zu identifizieren und die jeweiligen Mutationen biochemisch zu charakterisieren.

G. Literaturverzeichnis

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

Abicht, A., Stucka, R., Schmidt, C., Briguet, A., Hopfner, S., Song, I. H., Pongratz, D., Muller-Felber, W., Ruegg, M. A. and Lochmuller, H. (2002) A newly identified chromosomal microdeletion and an N-box mutation of the AChR epsilon gene cause a congenital myasthenic syndrome. *Brain* **125,** 1005-1013.

Apel, E.D., Glass, D.J., Moscoso, L.M., Yancopoulos, G.D., Sanes, J.R. (1997). Rapsyn is required for MuSK signalling and recruits synaptic components to a MuSK containing scaffold. *Neuron* 18:623-635.

David Beeson, Osamu Higuchi, Jackie Palace, Judy Cossins, Hayley Spearman, Susan Maxwell, John Newsom-Davis, Georgina Burke, Peter Fawcett, Masakatsu Motomura, Juliane S. Müller, Hanns Lochmüller, Clarke Slater, Angela Vincent, Yuji Yamanashi (2006) Dok-7 Mutations Underlie a Neuromuscular Junction Synaptopathy. Science, **313,** 1975-78

Bezakova, G. Bloch, R.J. (1998). The zink finger domaine of the 43kDa receptor associated protein, Rapsyn – role in acetylcholine receptor clustering. *Moll. Cell. Neurosci*. 11:274-278.

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

Byring, R. F., Pihko, H., Tsujino, A., Shen, X. M., Gustafsson, B., Hackman, P., Ohno, K., Engel, A. G. and Udd, B. (2002) Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. *Neuromuscul Disord* **12,** 548-53.

Chevessier, F., Faraut, B., Ravel-Chapuis, A., Richard, P., Gaudon, K., Bauche, S., Prioleau, C., Herbst, R., Goillot, E., Ioos, C., Azulay, J. P., Attarian, S., Leroy, J. P., Fournier, E., Legay, C., Schaeffer, L., Koenig, J., Fardeau, M., Eymard, B., Pouget, J. and Hantai, D. (2004) MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* **13,** 3229-40.

Colomer J, Müller JS, Vernet A, Nascimento A, Pons M, Gonzalez V, Abicht A, Lochmüller H. (2006) Long-term improvement of slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine. Neuromuscul Disord.., **16**(5):329-33.

DeChiara, T. M., Bowen, D. C., Valenzuela, D. M., Simmons, M. V., Poueymirou, W. T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D. L., Rojas, E., Park, J. S., Smith, C., DiStefano, Yancopoulos, G. D. (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* **85,** 501-12.

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

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

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

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

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

Froehner, S.C., Luetje, C.W., Scotland, P.B., Patrick, J. (1990). The postsynaptic 43 K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in Xenopus oocytes. *Neuron* **5**:403-410.

Fuhrer C. Sugiyama JE. Taylor RG. Hall ZW. (1997). Association of the muscle-specific kinase MuSK with the acetylcholine receptor in mammalian muscle. *EMBO J*. **16**:4910-4960.

Fuhrer, C., Gautam, M., Sugiyama, J.E., Hall, Z.W. (1999). Roles of Rapsyn and agrin in interaction of postsynaptic proteins with acetylcholine receptros. *J. Neuroscience* **19**:6405-6416.

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

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

Glass, D.J., Yancopoulos, G.D. (1997). Sequential roles of agrin, MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Curr. Opin. Neurobiol*. **7**, 379-384.

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

Hermann, A. (2002) Untersuchungen über die Bindungseigenschaften des peripheren Membranproteins Gephyrin. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

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

Ishigaki, K., Nicolle, D., Krejci, E., Leroy, J. P., Koenig, J., Fardeau, M., Eymard, B. and Hantai, D. (2003) Two novel mutations in the COLQ gene cause endplate acetylcholinesterase deficiency. *Neuromuscul Disord* **13,** 236-44.

Kimbell, L. M., Ohno, K., Engel, A. G. and Rotundo, R. L. (2004) C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse. *J Biol Chem* **279,** 10997-1005.

Mayer, G.., Wallace, B.G. (1998). Recruitment of nicotinic acetylcholine receptor mutant lacking cytoplasmic tyrosine residues in its beta subunit into agrin induced aggregates. *Mol. Cell. Neurosci*. **11**, 324-333.

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

Mohamad, A.S., Swope, S.L. (1999). Phosphorylation and cytosceletal anchoring of the acetylcholine receptor by Src class protein-tyrosine kinases – Activation by rapsyn. *J.Biol.Chem*. **274**, 20529-20539.

Montanaro, F., Gee, S.H., Jacobson, C., Lindenbaum, M.H., Froehner, S..C., Carbonetto, S. (1998). Laminin and alpha-dystroglycan mediate acetylcholine receptor aggregation via a MuSK-independent pathway. *J. Neurosci*. **18**, 1250-1260

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

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

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

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

J. S. Muller, A. Herczegfalvi, J. J. Vilchez, J. Colomer, L. L. Bachinski, V. Mihaylova, M. Santos, U. Schara, M. Deschauer, M. Shevell, C. Poulin, A. Dias, A. Soudo, M. Hietala, T. Aarimaa, R. Krahe, V. Karcagi, A. Huebner, D. Beeson, A. Abicht, and H. Lochmuller (2007) Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes. Brain **130**, 1497-1506

Müller JS, Baumeister SK, Schara U, Cossins J, Krause S, von der Hagen M, Huebner A, Webster R, Beeson D, Lochmüller H, Abicht A. (2006) CHRND mutation causes a congenital myasthenic syndrome by impairing co-clustering of the acetylcholine receptor with rapsyn. Brain, **129,** 2784-93

Müller JS, Baumeister SK, Rasic VM, Krause S, Todorovic S, Kugler K, Müller-Felber W, Abicht A, Lochmüller H. (2006) Impaired receptor clustering in congenital myasthenic syndrome with novel RAPSN mutations. Neurology. **10,** 1159-64.

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

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

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

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

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

Okada, K., Inoue, A., Okada M., Murata Y., Kakuta S., Jigami T., Kubo S., Shiraishi H., Eguchi K., Motomura M., Akiyama T., Iwakura Y., Higuchi O., Yamanashi Y., (2006) The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. Science **312,** 1802-05

J. Palace, D. Lashley, J. Newsom-Davis, J. Cossins, S. Maxwell, R. Kennett, S. Jayawant, Y. Yamanashi, and D. Beeson (2007) Clinical features of the DOK7 neuromuscular junction synaptopathy. Brain **130**, 1507-1515

Smith, C.L., Mittaud, P., Prescott, E.D., Fuhrer, C., Burden, S.J. (2001). Src, Fyn and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilisation af agrininduced clusters of acetylcholine receptors. J.Neurosci. **21**, 33151-3160.

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

Valenzuela, D. M., Stitt, T. N., DiStefano, P. S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D. L., Nunez, L., Park, J. S., Stark, J. L., Gies, D. R. and et al. (1995) Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* **15,** 573-84.

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

Watty, A., Neubauer, G., Dreger, M., Zimmer, M., Wilm, M., Burden, S.J. (2000). The in vitro and in vivo phosphotyrosine map of activated MuSK. *PNAS* **97**, 4585-4590.

H. Anhang

1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA
ACh	Acetylcholin
AChE / *ACHE*	Acetylcholinesterase / Gen
AChR	Acetylcholinrezeptor/en (nikotinerg)
αAChR	Acetylcholinrezeptor, alpha-Untereinheit
βAChR	Acetylcholinrezeptor, beta-Untereinheit
δAChR	Acetylcholinrezeptor, delta-Untereinheit
γAChR	Acetylcholinrezeptor, gamma-Untereinheit
εAChR	Acetylcholinrezeptor, epsilon-Untereinheit
bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ChAT / *CHAT*	Cholin-Acetyltransferase / Gen
CHRNA1	Gen kodierend für die alpha-Untereinheit des AChR
CHRNB1	Gen kodierend für die beta-Untereinheit des AChR
CHRND	Gen kodierend für die delta-Untereinheit des AChR
CHRNE	Gen kodierend für die epsilon-Untereinheit des AChR
ColQ / *COLQ*	Collagen tail (kollagenartige Verankerung) / Gen
CMAP	Compound muscle action potential (Summenmuskelaktionspotential)
CMS	Congenital myasthenic syndrome (Kongenitale/s myasthene/s Syndrom/e)
CMS-EA	CMS mit episodischen Apnoen
DNA	Desoxyribonuclic acid (Desoxyribonukleinsäure)

dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
FCCMS	Fast-Channel CMS
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Mb	Megabasen
Mg^{2+}	Magnesiumkationen
min	Minuten
mM	Milli Mol
mRNA	Boten (messenger)- Ribonukleinsäure
MuSK / *MUSK*	Muskelspezifische Kinase / Gen
M. intercostalis	*Musculus intercostalis*
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
Pos.	Position
Rapsyn / *RAPSN*	Receptor-associated protein of the synapse / Gen
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonuklein acid (Ribonukleinsäure)
SCCMS	Slow-Channel CMS
SCN4A	Gen kodierend für den spannungsabhängigen Natriumkanal
Taq-Polymerase	Thermus Aquaticus Polymerase
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VAChT / *VACHT*	vesikuläre Acetylcholintransferase / Gen
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

Primersequenzen

COLQ Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
Q1s	5´- TGGTTGGCATTCTTTCTTGGTA
Q1a	5´-AGACAAGCTCGGGTGACAGGAAGC
Q2s	5´- CCTATCCACATCTAACAGGCTAGA
Q2a	5´-GAATGGACACACCCCAGGAA
Q3s	5´-TACGAGGTGTCTGTAATCCAT
Q3a	5´-GAGCAGACACTAAGAGGCTCTG
Q4-5s	5´-GGAGCCCAGTGCACCAAGAGCC
Q4-5a	5´-TGGGTATCAGTGACCACTGAAGTGC
Q6s	5´- CCATGCCTAGAGAACCCACTG
Q6a	5´-GATTCCCTGACTATGTGCCA
Q7-8s	5´- CTTCCTGGTTCAGTTTCTCTAA
Q7-8a	5´- TCTGCATGTCTCTGATTCCAGA
Q9-10s	5´- TTCCCTCCCAGGATATTAACTC
Q9-10a	5´- ACCCACCATCCCTGCCTGATAG
Q11s	5´- ATGACTGGCTAGACCTGTGTAG
Q11a	5´- CCCAGAGGATGCTGGAGTCAAG
Q12s	5´- AGCTTATTAAGAGCTCGATGG
Q12a	5´- CTTGTGCCCTCTCTGGGAGGC
Q13s	5´- TGCAAAGGTCGCTCACATCTC
Q13a	5´- TACAAAGCCCCATAAGGATCAG
Q14s	5´- GAGCAGCCCAAGGATAGAGATT
Q14a	5´- TCCCATGCAGACAGACTGTAG
Q15s	5´- AACCAATGACCTCCCTGCCTGCG
Q15a	5´- CACAGCTGGTGTCCAGGGCTGGC

Q16s	5′- GGCCGCATGGTCCTTACAAGC
Q16a	5′- TGTCTAGAAGGCACCACAAAG
Q17s	5′- TTTGACCGGAAGTCACCAGCA
Q17a	5′-TGTGAGCCACCCCGAGAGAACG
Q1As	5′- GGCACTGGGAGCACTCAGAGGCG
Q1Aa	5′- GCTGCTAAAACCTCCTAGTACAG
Q11As	5′- GGTTACTGCAGGGAATGCTTC
Q11Aa	5′-TCAGAGCAGTGATCGACACTT

MUSK Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	**Sequenz**
M1s	5′- CCCAAGCCCACCATACTATAA
M1as	5′- GAGCCTGTGGAGCTGCTGACAC
M2s	5′- GGGATGGATACCCCATTCTC
M2as	5′- CTCTGGGGAAACAGAATTCTC
M3s	5′- CTCTGGGGAAACAGAATTCTC
M3as	5′- CAGAAGTCACTCAAGTTTCC
M4s	5′- GTAAGTGTGTAACTGAGTGTG
M4as	5′- CTGTCTTTGCATTTGGTGA
M5s	5′- GGGCTGCCCACATCTCTTCTC
M5as	5′- GTGGCCAATAAAGGTCAAAGCG
M6s	5′- GGTGTAGGTGAGACCAATGA
M6as	5′- CTGCACACAGGGGAACATGG
M7s	5′- CTAGGTCACCTCCGGAGTATCC
M7as	5′- GGCTATGTTTGCAGTGTACC
M8s	5′- GCACCCAGGCATTAACCTCC
M8as	5′- GAATGCCAAGAAATAGC
M9s	5′- GTATCTAAGGAAGGCAGAACT
M9as	5′- CACAGAATTTAGGCTCTGCCA

M10s	5′- GAGAGCGGCTGTACATTCTG
M10as	5′- GTGAGATATCTGGATGCTCA
M11s	5′- CATGATGGGGGTGCTTAAT
M11as	5′- TACTTACAGCATTCCCACC
M12s	5′- CCAAGCTAATAGTTTGGTAGC
M12as	5′- GGCTGCCTTAGTATAACTT
M13s	5′- ACTGAAACGTCTCACTGAT
M13as	5′- TGCGTGAGACTTAACCAGC
M14s	5′- TCTTGTTGGGCCTCTGGTGTA
M14as	5′- TCATATGTTCTGACATGGTCG

2. Genbank Zugangsnummer

MUSK	gi13162053	AF006464
COLQ	gi3378117	AF229117-AF229126

3. Fragebogen zur klinischen Erfassung von CMS-Patienten

ERFASSUNGSBOGEN
ZUR DIAGNOSTIK KONGENITALER MYASTHENER SYNDROME

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

Probenversand zur Molekulargenetischen Diagnostik:

10 ml EDTA-BLUT

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

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

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

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

☐ EDTA-Blutprobe von Patient:

Vorname:

Name:

☐ **männlich**
☐ **weiblich**

Geburtsdatum:

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

☐ EDTA-Blutproben von Familienangehörigen:

☐ Vater:
☐ Mutter:
☐ Geschwister:

Kontaktadresse des Einsenders:
Klinik:

Ansprechpartner/ uberweisender Arzt:

Telefon:
e-mail:

WICHTIGE ANGABEN ZUM PATIENTEN

1. FAMILIENANAMNESE

Aus welchem Land stammt die Familie?

Ist Blutsverwandtschaft in der Familie bekannt?

☐ **ja**
☐ **nein**
☐ **keine Information**

Sind andere Familienmitglieder erkrankt?:

☐ **ja**
☐ **nein**
☐ **keine Information**

Wieviele gesunde Geschwister hat der Patient?

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

bitte Rückseite beachten...

2. Anamnestische Angaben

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

Motorische Entwicklung:
- ☐ normal
- ☐ verzögert

Laufen erlernt mit Mon.

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

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

mit respiratorischer Insuffizienz: ☐ ja ☐ nein

☐ in früher Kindheit

3. Neurologischer Untersuchungsbefund

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

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

Gehfähigkeit

☐ voll erhalten ☐ eingeschränkt ☐ stark / völlig eingeschränkt

Gehstrecke ca.:

Muskeleigenreflexe:

☐ normal ☐ abgeschwächt

Muskuläre Trophik:

☐ normal ☐ Atrophien

Kongenitale Kontrakturen: ☐ nein ☐ ja

Dysmorphe Stigmata: ☐ nein ☐ ja:

4. Elektrophysiologie

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

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

Reaktion auf Einzelreiz:
- ☐ normal
- ☐ repetitiv
- ☐ nicht geprüft

Anmerkung:

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

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

... evtl. weitere Befunde

Einzelfaser EMG: NLG:

5. Labor / Muskelbiopsie

Muskelbiopsie durchgeführt: ☐ nein ☐ ja, Befund:

Serum Creatinkinase (CK):

5. Azetylcholin-Rezeptor-Antikörper

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

6. Ansprechen auf Azetylcholinesterase Hemmer:

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

langfristige Mestinontherapie:
- ☐ erfolgreich
- ☐ ohne Effekt
- ☐ nur anfangs erfolgreich
- ☐ nicht durchgeführt

6. Weitere Therapie:

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

...über ergänzende Krankenberichte sind wir sehr dankbar

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

4. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Sofia Petrova
Geburtsdatum	25.01.1978
Geburtsort	Varna / Bulgarien
Aktuelle Anschrift:	Isareckstr. 50, 81673 München

SCHULBILDUNG, STUDIUM

1984-1996	Grundschule und Deutsches Gymnasium in Varna Abschluss: Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
1997-1998	Studienkolleg zur LMU München Abschluss: Zeugnis über die Feststellungsprüfung
1998-2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximillian Universität München

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

03/2001 – 11/2003	Famulaturen in der Kardiologie, Chirurgie, Kinderchirurgie, Neurologie und Pädiatrie
02/2004 - 02/2005	Praktisches Jahr: Royal North Shore Hospital, Sydney, Australien (Innere Medizin) Notfallzentrum des Inselspitals Bern (Notfall Medizin, Traumatologie) Kinderchirurgische Klinik des Inselspitals Bern (Kinderchirurgie) Kinderklinik des Klinikums München Harlaching (Pädiatrie)

Seit 08/2005	Assistenzärztin in der Neuropädiatrie im Epilepsiezentrum Vogtareuth

PROMOTION

11/2001 - 10/2003	Experimenteller Teil der Dissertationsarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lochmüller, Friedrich-Baur-Institut, Ludwig- Maximillian Universität München Thema: Analyse des *MUSK*- und des *COLQ*-Gens bei Patienten mit kongenitalem myasthenen Syndrom

5. Danksagung

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

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hanns Lochmüller und bei Frau Privatdozentin Dr. Angela Abicht für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit im Bereich der Erforschung von neuromuskulären Erkrankungen tätig zu sein und für ihre fachliche Anleitung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. biol. hum. Juliane S. Müller für die stets sehr gute und intensive Betreuung im Verlauf dieser Arbeit danken.

Dr. Carolin Schmidt danke ich für die Hilfe beim Erlernen molekularbiologischer Techniken und für die Einarbeitung im Gebiet der neuromuskulären Erkrankungen.

Allen anderen Mitarbeiter aus der AG Lochmüller, insbesondere Ursula Kutzny, Dr. Sabine Krause und Dr. Rolf Stucka danke ich für die Unterstützung, für die kompetenten Hilfestellungen, für die nette Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor!
An dieser Stelle danke ich meiner Familie und auch meinem Freund, der mir immer helfend zur Seite stand.

6. Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 26. Juni 2007

.....
(Sofia Petrova)