

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Brandt)

**Kongenitale myasthene Syndrome:  
Patch Clamp-Analyse der Einzelkanalcharakteristika  
von vier neuen Mutationen der  $\epsilon$ -Untereinheit des  
nicotinergeren Acetylcholinrezeptorkanals**

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

vorgelegt von  
Sabine Luise Gärtner  
aus Starnberg  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. K. Jahn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. F. Heinen  
Prof. Dr. med. H. Steiner

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.Juni 2008

**Es sind die kleinen Dinge,  
welche die Welt verändern.**

## Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Zusammenfassung</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>2</b> | <b>Einleitung</b> .....  | <b>8</b>  |
| 2.1      | Der nicotinerge AChR-Kanal und die Signaltransduktion an der neuromuskulären Synapse ..... | 8         |
| 2.1.1    | Der nicotinerge ACh-Rezeptor .....   | 8         |
| 2.1.2    | Die Signalübertragung an der neuromuskulären Synapse.....                                  | 11        |
| 2.2      | CMS: Funktionsstörungen der neuromuskulären Übertragung: Klinik und Klassifikation.....    | 14        |
| 2.2.1    | Vererbungsmodus und Häufigkeit .....   | 15        |
| 2.2.2    | Klassifikation .....   | 16        |
| 2.2.2.1  | Präsynaptische CMS .....   | 17        |
| 2.2.2.2  | Synaptische CMS .....  | 17        |
| 2.2.2.3  | Postsynaptische CMS .....  | 18        |
| 2.2.2.4  | Diagnostik .....   | 21        |
| 2.2.2.5  | Therapiemöglichkeiten .....  | 24        |
| 2.3      | Patch Clamp-Technik .....  | 27        |
| 2.3.1    | Patch Clamp-Setup .....  | 29        |
| 2.3.2    | Patch Clamp-Konfigurationen .....  | 30        |
| 2.4      | Zielsetzung .....  | 33        |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden</b> .....   | <b>34</b> |
| 3.1      | Verwendete Zellen und DNA.....   | 34        |
| 3.1.1    | Zellen .....   | 34        |
| 3.1.2    | Mutationen .....   | 34        |
| 3.1.2.1  | <i>Mutation <math>\epsilon 812C&gt;T</math></i> .....                                      | 34        |
| 3.1.2.2  | <i>Mutation <math>\epsilon 1304del3</math></i> .....                                       | 34        |
| 3.1.2.3  | <i>Mutation <math>\epsilon 392del3</math></i> .....  | 35        |
| 3.1.2.4  | <i>Mutation <math>\epsilon 652C&gt;T</math></i> .....                                      | 35        |
| 3.2      | Transfektion der Zellen.....   | 36        |
| 3.3      | Patch Clamp-Messungen .....  | 37        |
| 3.4      | Auswertung .....   | 38        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>40</b> |
| 4.1      | Wildtyp .....  | 40        |
| 4.1.1    | Burst duration.....  | 41        |
| 4.1.2    | Mean open time .....   | 42        |
| 4.1.3    | Amplitude .....  | 43        |
| 4.1.4    | Beurteilung .....  | 43        |
| 4.2      | Mutation $\epsilon 812C>T$ .....   | 44        |
| 4.2.1    | Burst duration.....  | 44        |
| 4.2.2    | Mean open time .....   | 45        |
| 4.2.3    | Amplitude .....  | 46        |
| 4.2.4    | Beurteilung .....  | 46        |
| 4.3      | Mutation $\epsilon 1304del3$ .....   | 47        |
| 4.3.1    | Burst duration.....  | 47        |
| 4.3.2    | Mean open time .....   | 48        |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.3.3    | Amplitude .....   | 49        |
| 4.3.4    | Beurteilung .....   | 49        |
| 4.4      | Mutation $\epsilon 392\text{del}3$ .....                          | 50        |
| 4.4.1    | Burst duration .....  | 50        |
| 4.4.2    | Mean open time .....  | 51        |
| 4.4.3    | Amplitude .....   | 52        |
| 4.4.4    | Beurteilung .....   | 52        |
| 4.5      | Mutation $\epsilon 652\text{C}>\text{T}$ .....                    | 53        |
| 4.5.1    | Burst duration .....  | 53        |
| 4.5.2    | Mean open time .....  | 54        |
| 4.5.3    | Amplitude .....   | 55        |
| 4.5.4    | Beurteilung .....   | 55        |
| 4.6      | Zusammenfassung der Ergebnisse .....                              | 56        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion .....</b>   | <b>57</b> |
| 5.1      | Patch Clamp-Messungen an HEK 293-Zellen .....                     | 57        |
| 5.2      | Untersuchte Mutationen .....                                      | 59        |
| 5.2.1    | $\epsilon 812\text{C}>\text{T}$ .....                             | 60        |
| 5.2.2    | $\epsilon 1304\text{del}3$ .....                                  | 61        |
| 5.2.3    | $\epsilon 392\text{del}3$ .....                                   | 62        |
| 5.2.4    | $\epsilon 652\text{C}>\text{T}$ .....                             | 62        |
| 5.3      | Relevanz der Ergebnisse für Diagnostik und Therapie von CMS ..... | 64        |
| <b>6</b> | <b>Literaturnachweise .....</b>                                   | <b>67</b> |
| <b>7</b> | <b>Anhang .....</b>   | <b>76</b> |
| 7.1      | Klassifikation der CMS nach der Konferenz der ENMC 1995 .....     | 76        |
| 7.2      | Einzelkanalmessungen $\epsilon 812\text{C}>\text{T}$ .....        | 78        |
| 7.3      | Einzelkanalmessungen $\epsilon 1304\text{del}3$ .....             | 80        |
| 7.4      | Einzelkanalmessungen $\epsilon 392\text{del}3$ .....              | 82        |
| 7.5      | Einzelkanalmessungen $\epsilon 652\text{C}>\text{T}$ .....        | 84        |
| <b>8</b> | <b>Danksagung .....</b>   | <b>86</b> |
| <b>9</b> | <b>Lebenslauf .....</b>   | <b>87</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                        |   |
|------------------------|---|
| 3,4-DAP.....           | 3,4-Diaminopyridin  |
| Å.....                 | Angström  |
| ACh.....               | Acetylcholin  |
| AChE.....              | Acetylcholinesterase  |
| AD(-Wandler).....      | Analog-Digital(-Wandler)  |
| AP.....                | Aktionspotential  |
| BD.....                | Burst Duration  |
| Ca <sup>2+</sup> ..... | Calcium   |
| ChAT.....              | Cholinacetyltransferase   |
| CHRNE.....             | Cholinergic Receptor Nicotinic Epsilon Polypeptide                  |
| CMAP.....              | Compound muscle action potential                                    |
| CMS.....               | Congenital myasthenic syndromes<br>= kongenitale myasthene Syndrome |
| CMS-EA.....            | Congenital myasthenic syndrome with<br>episodic apnea               |
| ColQ.....              | Collagenic-like tail subunit  |
| DNA.....               | Desoxyribonucleinsäure  |
| DMEM.....              | Dulbecco's modified Eagle's medium                                  |
| EA.....                | Episodic apnea  |
| EDTA.....              | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| EMG.....               | Elektromyographie   |
| ENMC.....              | European Neuromuscular Center                                       |
| EPC.....               | Endplattenstrom   |
| EPP.....               | Endplattenpotential   |
| EPSP.....              | Exzitatorisches postsynaptisches Potential                          |
| FCCMS.....             | Fast channel-CMS  |
| GFP.....               | Grün fluoreszierendes Peptid  |
| HEK.....               | Human embryonic kidney (cells)                                      |
| K <sup>+</sup> .....   | Kalium  |
| MEPC.....              | Miniatur-Endplatten-Strom   |
| MEPP.....              | Miniatur-Endplattenpotential  |
| MOT.....               | Mean open time = mittlere Öffnungsdauer                             |
| mRNA.....              | Messenger Ribonucleinsäure  |
| n.....                 | Anzahl  |
| nAChR.....             | Nicotinerges Acetylcholinrezeptor                                   |
| Na <sup>+</sup> .....  | Natrium   |
| NMJ.....               | Neuromuscular junction<br>= motorische Endplatte                    |
| OPA.....               | Operationsverstärker  |
| Opti-MEM.....          | Opti-modified Eagle's medium  |
| PCR.....               | Polymerase chain reaction   |

|            |  |
|------------|--|
| RNA.....   | Ribonucleinsäure                       |
| SCCMS..... | Slow channel-CMS                       |
| SD.....    | Standardabweichung                     |
| SFEMG..... | Single fiber electromyography          |
| SSRI.....  | Selective Serotonin reuptake inhibitor |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1: Struktur des nAChR-Kanals in Seit- und Aufsicht .....   | 9  |
| Abb. 2: Öffnung des nAChR-Kanals nach Bindung von zwei Molekülen ACh .....  | 10 |
| Abb. 3: Konformationszustände des AChR .....  | 11 |
| Abb. 4: Erregungweiterleitung an der NMJ .....  | 13 |
| Abb. 5: Kindlicher Patient mit CMS-EA.....  | 14 |
| Abb. 6: Repetitive CMAPs nach Stimulation bei SCCMS und AChE-Defizienz .....  | 23 |
| Abb. 7: Funktionsweisen von medikamentösen Therapieformen .....   | 27 |
| Abb. 8: Unterschiedliche Konfigurationen bei der Patch Clamp-Technik.....   | 30 |
| Abb. 9: Aufbau des elektrischen Schaltkreises eines Patch Clamp-Setups .....  | 32 |
| Abb. 10: Loci der Mutationen $\epsilon 812C>T$ , $\epsilon 1304del3$ , $\epsilon 392del3$ und $\epsilon 652C>T$<br>im Bereich der Domänen der $\epsilon$ -Untereinheit..... | 35 |
| Abb. 11: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs beim Wildtyp .....   | 40 |
| Abb. 12: Burst duration des Wildtyps.....   | 41 |
| Abb. 13: Mean Open Time des Wildtyps .....  | 42 |
| Abb. 14: Slope conductance des Wildtyps .....   | 43 |
| Abb. 15: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs bei der Mutation $\epsilon 812C>T$ .....   | 44 |
| Abb. 16: Burst duration der Mutation $\epsilon 812C>T$ .....  | 44 |
| Abb. 17: Mean open time der Mutation $\epsilon 812C>T$ .....  | 45 |
| Abb. 18: Slope conductance der Mutation $\epsilon 812C>T$ .....   | 46 |
| Abb. 19: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs bei der Mutation $\epsilon 1304del3$ .....   | 47 |
| Abb. 20: Burst duration der Mutation $\epsilon 1304del3$ .....  | 47 |
| Abb. 21: Mean open time der Mutation $\epsilon 1304del3$ .....  | 48 |
| Abb. 22: Slope conductance der Mutation $\epsilon 1304del3$ .....   | 49 |
| Abb. 23: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs bei der Mutation $\epsilon 392del3$ .....  | 50 |
| Abb. 24: Burst duration der Mutation $\epsilon 392del3$ .....   | 50 |
| Abb. 25: Mean open time der Mutation $\epsilon 392del3$ .....   | 51 |
| Abb. 26: Slope conductance der Mutation $\epsilon 392del3$ .....  | 52 |
| Abb. 27: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs bei der Mutation $\epsilon 652C>T$ .....   | 53 |
| Abb. 28: Burst duration der Mutation $\epsilon 652C>T$ .....  | 53 |
| Abb. 29: Mean open time der Mutation $\epsilon 652C>T$ .....  | 54 |
| Abb. 30: Slope conductance der Mutation $\epsilon 652C>T$ .....   | 55 |



## 1 Zusammenfassung

Bei kongenitalen myasthenen Syndromen (*Congenital Myasthenic Syndromes* = CMS) handelt es sich um angeborene Erkrankungen mit belastungsabhängiger Muskelschwäche, deren Ursache eine Funktionsstörung im Bereich der neuromuskulären Signaltransduktion ist. Präsynaptische, synaptische oder postsynaptische Defekte führen zu einer abnorm gesteigerten oder abgeschwächten Antwort an der motorischen Endplatte<sup>28,32,39</sup>.

Mutationen der Untereinheiten des postsynaptischen nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors (*nAChR-Kanal*), hier vor allem im Bereich der  $\epsilon$ -Untereinheit<sup>7,28,29</sup>, führen zu einer strukturellen oder kinetischen Veränderung dieses ligandengesteuerten Ionenkanals und dadurch zu einer Veränderung des Endplattenpotentials (*EPP*).

In dieser Arbeit wurden die vier neu entdeckten Mutationen der  $\epsilon$ -Untereinheit  $\epsilon 812C>T$ ,  $\epsilon 1304del3$ ,  $\epsilon 392del3$  und  $\epsilon 652C>T$  mittels Patch Clamp-Methodik untersucht. Ziel war es, Veränderungen im Öffnungsverhalten der Kanäle zu erforschen und damit die pathophysiologische Bedeutung der Mutationen zu beschreiben.

Dabei zeigte sich gegenüber dem Wildtyp (mittlere Öffnungsdauer bei 100 mV: 0,0143 ms, mittlere Burstdauer 1,29 ms, slope conductance 21 pS) für die Mutationen  $\epsilon 812C>T$  (mittlere Öffnungsdauer bei 100 mV: 0,0170 ms, mittlere Burstdauer 4,15 ms, slope conductance 18 pS),  $\epsilon 392del3$  (mittlere Öffnungsdauer bei 100 mV: 0,0164 ms, mittlere Burstdauer 6,67 ms, slope conductance 27 pS) und  $\epsilon 652C>T$  (mittlere Öffnungsdauer bei 100 mV: 0,0147 ms, mittlere Burstdauer 7,61 ms, slope conductance 4 pS) ein Slow channel-Charakter, der eine abnorme Verlängerung der Kanalöffnungszeit impliziert. Bei den untersuchten Mutationen kann dies am ehesten auf eine Strukturveränderung des porenbildenden Kanalanteils ( $\epsilon 812C>T$ ) oder der Transmitterbindungsstellen ( $\epsilon 652C>T$ ,  $\epsilon 392del3$ ) zurückgeführt werden. Durch die elongierte Durchtrittsdauer für Ionen durch den nAChR kommt es zu einer postsynaptischen Anhäufung von  $Ca^{2+}$ , was einen Depolarisationsblock mit klinisch myasthener Symptomatik hervorruft. Langfristig kommt es durch den erhöhten  $Ca^{2+}$ -Anteil zudem zu einer Degeneration der postsynaptischen Region.

Für die Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$  konnte ein Fast channel-Verhalten ermittelt werden (mittlere Öffnungsdauer bei 100 mV: 0,0081 ms, mittlere Burstdauer 4,11 ms, slope conductance 20 pS), das mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der herabgesetzten Stabilität des nAChRs aufgrund von strukturellen Veränderungen im extracellulären Kanalanteil M3/M4 beruht. Die hierdurch deutlich herabgesetzte Öffnungsdauer der Kanalpore bewirkt einen verminderten Ioneneinstrom, so dass der Aufbau eines postsynaptischen Potentials und damit die Reizweiterleitung beeinträchtigt sind.

## 2 Einleitung

Kongenitale myasthene Syndrome sind seltene Erkrankungen mit belastungsabhängiger Muskelschwäche. Ursache aller Unterformen der CMS ist dabei die gestörte Informationsweiterleitung von Nerven- zu Muskelzelle an der motorischen Endplatte. Eine zentrale Rolle spielt hierbei der nAChR-Kanal als Empfänger und Übersetzer der an der neuromuskulären Schnittstelle (*neuromuscular junction* = NMJ) ankommenden Reize.

Im Folgenden soll nun näher auf die grundlegenden Mechanismen der neuromuskulären Transmission eingegangen und der Bezug zu den unterschiedlichen Subtypen der CMS hergestellt werden.

### 2.1 *Der nicotinerge AChR-Kanal und die Signaltransduktion an der neuromuskulären Synapse*

#### 2.1.1 Der nicotinerge ACh-Rezeptor

Der nicotinerge ACh-Rezeptor (nAChR-Kanal) ist ein aus fünf homologen Untereinheiten gebildeter, ligandengesteuerter Ionenkanal. In der peripheren adulten Form besteht er aus zwei  $\alpha$ - und je einer  $\beta$ -,  $\delta$ -, und  $\epsilon$ -Untereinheit ( $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ ), der embryonale Rezeptor weist anstelle der  $\epsilon$ - eine  $\gamma$ -Untereinheit auf ( $\alpha_2\beta\delta\gamma$ )<sup>62</sup>. Die fünf Untereinheiten bestehen jeweils aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne (Aminogruppe;  $-\text{NH}_2$ ) von ungefähr 210 Aminosäuren, auf die dann drei transmembrane Domänen (M1-M3), eine lange cytoplasmatische Schleife und eine vierte transmembrane Domäne (M4) mit einer kurzen extrazellulären C-terminalen Region folgen (Carboxylgruppe;  $-\text{COOH}$ )<sup>51</sup>. Dabei bilden die M2-Ketten aller Untereinheiten gemeinsam die eigentliche transmembranöse Pore (\* in Abb. 1), M1, M3 und M4 dagegen eine Art Ummantelung des Kanals gegen die lipidhaltige Zellmembran, die der nAChR-Kanal durchbricht.

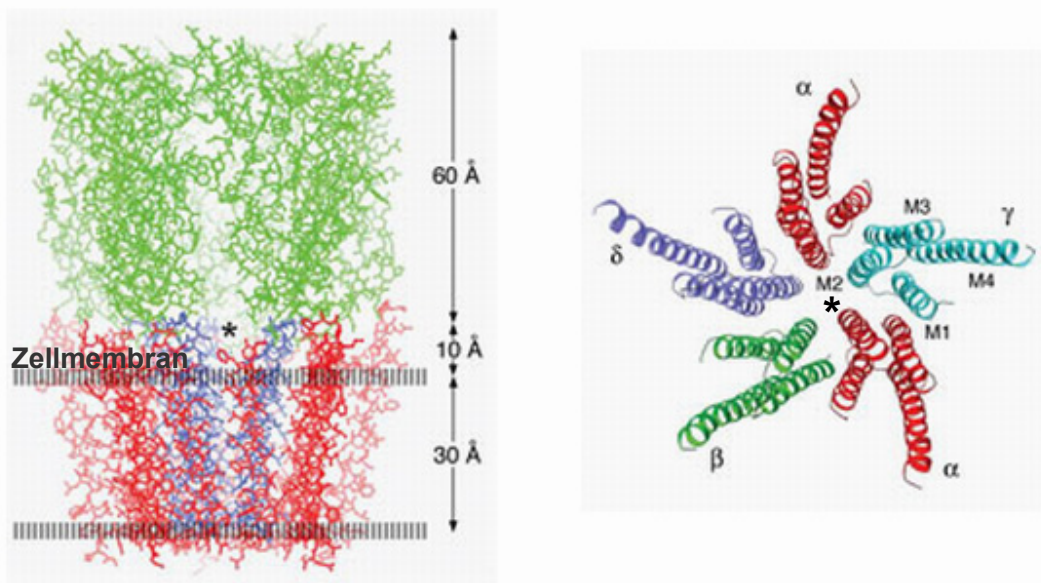


Abb. 1: Struktur des nAChR-Kanals in Seit- und Aufsicht <sup>63</sup>

Jede AChR-Untereinheit wird durch ein separates Gen, bestehend aus 10-12 Exons, kodiert. Die Gene befinden sich auf verschiedenen Loci der Chromosomen 2 und 17 (Gene für nAChR  $\beta$ - und  $\epsilon$ -Untereinheit auf Chromosom 17p12-13;  $\alpha$ - und  $\delta$ -Untereinheit auf Chromosom 2q24-32). Die eigentliche Kanalfunktion entsteht durch die symmetrische Anordnung hydrophober Aminosäureketten im mittleren Membranbereich. Hierbei spielen Leucin (leu  $\alpha$ -251) und Valin (val  $\alpha$ -255) die bedeutendste Rolle. Ist die Kanalpore geschlossen, sind die M2-Ketten über Aminosäurebrücken (leu  $\alpha$ -251/ala  $\alpha$ -252, phe  $\alpha$ -256/val  $\alpha$ -255) miteinander verbunden und die hydrophoben Seitenketten ragen in das Kanallumen hinein. Hierdurch verengt sich die perimembranöse Durchtrittsstelle auf 6 Å. Da ein Natriumion einen Durchmesser von etwa 8 Å besitzt, wird die Passage somit verhindert. Zusätzlich finden sich negativ geladene sowie nicht-polare Anordnungen, die die Ionenselektivität gewährleisten oder die Abgabe von Hydratationshüllen und damit Verkleinerung und Durchtrittsfähigkeit der  $\text{Na}^+$ -Ionen verhindern <sup>48,63</sup>.

Die beiden ACh-Bindungsstellen werden im extracellulären  $\beta$ -Faltblattanteil an der Berührungsfläche der  $\alpha$ - und  $\delta$ - bzw. der  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Untereinheit gebildet<sup>48</sup>. Bindet hier je ein Molekül ACh, dreht sich der kanalseitige Teil des transmembranösen Kanalstücks um  $15^\circ$  entlang einer imaginären Längsachse. Als Drehpunkt fungiert dabei eine Disulfidbrücke, welche innere und äußere Bereiche des extracellulären Anteils miteinander verbindet<sup>63</sup>. Da die M2-Helix der  $\alpha$ -Untereinheit mit dem lumenzugewandten Anteil der Bindungsstellen über einen sog.  $\beta_1/\beta_2$ -Loop verbunden ist, dreht sie sich infolge dieser Rotation ebenfalls um  $15^\circ$  in Richtung der äußeren Helices M1, M3 und M4, wodurch die Bindungen zwischen den M2-Helices instabil werden. Sie brechen auf und gehen alternative hydrophobe Interaktionen mit den außenstehenden Polypeptidketten ein. Dadurch weitet sich der Kanal im perimembranösen Bereich, so dass ein Durchtreten von Kationen möglich wird.

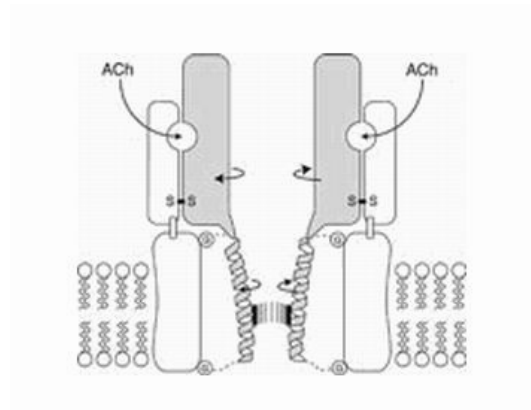
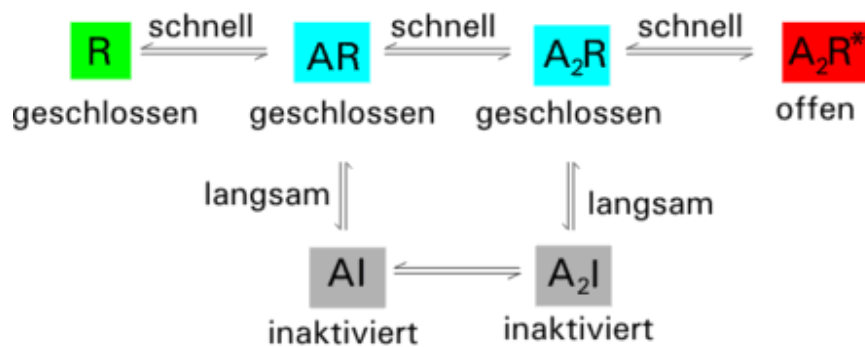


Abb. 2: Öffnung des nAChR-Kanals nach Bindung von zwei Molekülen ACh<sup>63</sup>

Der AChR tritt als allosterisches Kanalprotein (Allosterie = Veränderung der Raumstruktur eines Proteins unter Beeinflussung des aktiven Zentrums, z.B. durch Bindung von Agonisten) in verschiedenen Konformationszuständen auf (s. Abb. 3). Die Aktivität des Rezeptors wird dabei über Verschiebungen von Gleichgewichten zwischen Zuständen reguliert: im ruhenden, jedoch aktivierbaren Zustand (R) bleibt die Kanalpore geschlossen, im aktivierten Zustand nach Bindung von zwei Molekülen ACh ist sie geöffnet ( $A_2R^*$ ). Zwischen diesen beiden Endzuständen treten mehrere desensitivierte Modi auf: dabei ist die Kanalpore bei Belegung von einer (AR) bzw. beiden ( $A_2R$ ) Bindungsstellen

geschlossen, die Affinität für den Agonisten ist jedoch verändert. Hat ein Transmitter-Molekül bereits gebunden, so ist die Bindung des zweiten aufgrund einer erhöhten Affinität erleichtert.

Der geschlossene Kanal mit zwei belegten Bindungsstellen ( $A_2R$ ) geht zeitlich verzögert in die inaktive Form über ( $A_2I$ ). Werden die ACh-Moleküle nun durch die Acetylcholinesterase (AChE) wieder abgespalten (AI), geht der Rezeptor wieder in die geschlossene Form (AR) über, die nach Absinken der ACh-Konzentration unter 10 nM in die ursprüngliche, wieder erregbare, geschlossene Konformation (R) zurückgeht.



R = geschlossene, jedoch aktivierbare Form des Rezeptors; A = Acetylcholin, R\* = offener Zustand, I = inaktivierter Zustand

Abb. 3: Konformationszustände des AChR (nach <sup>96</sup>)

### 2.1.2 Die Signalübertragung an der neuromuskulären Synapse

Die ca. 30  $\mu\text{m}$  lange motorische Endplatte stellt die Schnittstelle der neuromuskulären Reizweiterleitung im menschlichen Organismus dar. Durch ankommende Aktionspotentiale (AP) öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle im Endteil des präsynaptischen Axons. Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bewirkt die Exocytose der ACh gefüllten Vesikel, wobei es zur Ausschüttung des Transmitters in den 20 bis 50 nm breiten synaptischen Spalt kommt. 6000 bis 8000 Transmittermoleküle (= 1 Quantum) werden pro 2-3  $\mu\text{m}$  Synapsenfläche ausgeschüttet <sup>12</sup>.

---

Das postsynaptische Areal der motorischen Endplatte bildet eine durch starke Fältelung vergrößerte Oberfläche. Auf den Erhebungen befinden sich vor allem nAChR-Kanäle, in den Faltentälern spannungsabhängige Natriumkanäle in hoher Anzahl. Durch diese räumliche Trennung von liganden- und spannungsabhängigen Kanälen wird trotz der geringen Menge an ausgeschüttetem ACh eine große Effizienz bei der Reizweiterleitung erreicht.

Die Bindung von jeweils zwei Molekülen ACh an einen ACh-Rezeptor ist notwendig, um die Öffnungswahrscheinlichkeit des ligandengesteuerten Ionenkanals für einige Millisekunden deutlich zu erhöhen, so dass ein depolarisierender Kationeneinstrom in die Muskelzelle möglich wird. Ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) entsteht, das sich passiv über die postsynaptische Zellmembran ausbreitet. Wird dabei ein Schwellenwert von  $\geq -55$  mV erreicht, öffnen sich die spannungsgesteuerten Na<sup>+</sup>-Kanäle in den Faltentälern. Der nun hier folgende Ioneneinstrom führt zur Ausbildung eines neuen APs, das eine Kontraktion der Muskelfasern einleitet.

Am nAChR-Kanal selbst kommt es nach dem Natriumeinstrom zu einer Konfigurationsänderung (Desensibilisierung, s. Abb. 3), die zur temporären Undurchlässigkeit für weitere Ionen führt. Erst durch die Abspaltung der gebundenen Acetylcholinmoleküle wird die Desensibilisierung beendet und eine neue synaptische Erregungsweiterleitung möglich.

Die hydrolytische Spaltung von ACh in Cholin und Essigsäure wird durch die in der muskulären Basallamina über eine kollagenartige Struktur (collagen tail = ColQ) verankerte AChE katalysiert, wodurch eine Unterbrechung der Reizweiterleitung erzielt wird. Cholin wird erneut in das präsynaptische Neuronenende aufgenommen und durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) zu ACh resynthetisiert. Der Acetatrest stammt dabei aus dem Acetylcoenzym A. Durch Öffnung spannungsabhängiger Kaliumkanäle wird schließlich das ursprüngliche Membranpotential an der präsynaptischen Endigung wieder hergestellt.

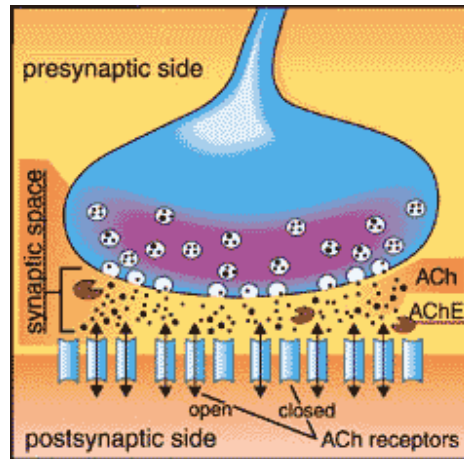


Abb. 4: Erregungsweiterleitung an der NMJ<sup>3</sup>

Bei myasthenen Syndromen führen unterschiedliche Defekte in der synaptischen Kaskade zu einer Beeinträchtigung der neuromuskulären Erregungsweiterleitung und somit zu einer Herabsetzung der Muskelkraft.<sup>52,80</sup>



## **2.2 CMS: Funktionsstörungen der neuromuskulären Übertragung: Klinik und Klassifikation**

Kongenitale myasthene Syndrome stellen eine heterogene Gruppe von belastungsabhängigen Muskelschwächen dar, die durch genetische Defekte in unterschiedlichen Bereichen der motorischen Endplatte hervorgerufen werden<sup>19,39,66</sup> und klinisch variable Bilder von Myasthenien erzeugen. Dabei reicht die phenotypische Ausprägung von dezenten Kraftminderungen einzelner Muskelpartien nach Belastung bis hin zu schwersten generalisierten Muskelschwächen mit infektgetriggelter respiratorischer Insuffizienz und Beatmungspflichtigkeit<sup>39</sup>. Neben Schweregrad und Verlauf variiert das Alter der Patienten bei Erstmanifestation erheblich<sup>5</sup>, so dass das Bild des floppy infants oder des Säuglings mit Trinkschwäche ebenso als Ausprägung eines CMS erscheinen kann wie eine im Erwachsenenalter aufgetretene Ptosis (sog. Late Onset-Phänotyp)<sup>26,74</sup>.

CMS-Fälle machen ca. 10% aller Myasthenien aus, zur generellen Prävalenz von CMS gibt es keine genaueren Daten. In der Mehrzahl aller Fälle kommt es jedoch zu einer klinischen Manifestation innerhalb der ersten beiden Lebensjahre, weshalb das Vorkommen von kongenitalen Myasthenien im Kindesalter häufiger sein dürfte<sup>10</sup>.



Abb. 5: Kindlicher Patient mit CMS-EA<sup>3</sup>

Ursächlich ist bei den verschiedenen Formen der CMS eine durch unterschiedliche Mutationen hervorgerufene Störung an der NMJ. Die genaue Art und Lokalisation des Übertragungsfehlers kann durch molekulargenetische Diagnostik<sup>12,69,70</sup> und experimentelle Untersuchungen festgestellt werden. Postsynaptische Mutationen, und hier insbesondere solche der  $\epsilon$ -Kanaluntereinheit, kommen am häufigsten vor. Mutationen in den Kanaluntereinheiten haben einen veränderten Aufbau des Kanals zur Folge. Je nachdem, welcher Anteil der Pore betroffen ist, wirkt sich die strukturelle Modifikation unterschiedlich auf die Kinetik des Kanals aus. Es kommt zu verringerten oder verlängerten Kanalöffnungszeiten, zur Zu- oder Abnahme der Öffnungsereignisse. Dementsprechend spricht man von Fast- oder Slow channel-Ereignissen bzw. -Mutationen. Das veränderte Öffnungsverhalten führt zu einer unkoordinierten Erregungsübertragung an der NMJ, was einen erhöhten oder verminderten Ioneneinstrom an der postsynaptischen Membran nach sich zieht. Folglich ergibt sich hier ein veränderter Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, der durch mangelhafte Reizung der Muskelfaser eine verringerte Muskelantwort hervorruft oder aus dem durch übermäßige Stimulation ein Depolarisationsblock mit ebenfalls reduzierter Faseraktivität resultiert. Klinisch ergibt sich hieraus das Bild einer Muskelschwäche.

### **2.2.1 Vererbungsmodus und Häufigkeit**

Die Vererbung der CMS ist, wie diese Krankheitsgruppe selbst, inhomogen. Die meisten Unterformen werden autosomal-rezessiv vererbt oder treten sporadisch auf<sup>23,30,32</sup>. Eine autosomal-dominante Vererbung ist deutlich seltener, kommt dann jedoch vor allem bei den so genannten Slow channel-Syndromen (SCCMS) vor<sup>85</sup>.

### 2.2.2 Klassifikation

Die Übermittlung synaptischer Signale stellt eine komplexe Transduktionskaskade dar (siehe Kapitel 2.1). Je nach betroffenem Abschnitt werden präsynaptische, synaptische und postsynaptische CMS unterschieden<sup>28,32,50,70</sup>, wobei die postsynaptischen Formen am häufigsten, die präsynaptischen am seltensten bei Patienten gefunden wurden<sup>12</sup>. Mittels elektrophysiologischer und morphologischer Untersuchungen wurden Defekte in Enzymen, Proteinen und Rezeptoruntereinheiten erkannt, die an diesem Übertragungsvorgang beteiligt sind<sup>31</sup>:

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <u>Präsynaptische CMS</u>  | Cholinacetyltransferase-Mangel            |
|                            | Mangel an Vesikeln oder freigesetztem ACh |
|                            | Lambert-Eaton-like-Syndromes              |
| <u>Synaptische CMS</u>     | ColQ-Mutation der ACh-Esterase            |
| <u>Postsynaptische CMS</u> | nAChR-Kanal-Mangel oder -Mutationen       |
|                            | Veränderungen der Natriumkanäle           |
|                            | Rapsyn-, MUSK-, oder Plektin-Mangel       |

#### *Einteilung der CMS nach Lokalisation der Defekte in der NMJ*

Gemäß der Konferenzen des ENMCs (= *European Neuromuscular Center*) gibt es eine weitere Einteilung, die durch das Beinhalt von Symptomen, diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten für die klinische Praxis von Bedeutung ist<sup>58</sup>. Sie bezieht sich auf den Vererbungsmodus: Typ I: autosomal-rezessiv, Typ II: autosomal-dominant und Typ III: sporadisch auftretend. Die einzelnen Typ-Gruppen werden weiter unterschieden (siehe Anhang: Tabelle 7.1).

### 2.2.2.1 Präsynaptische CMS

Präsynaptische kongenitale myasthene Syndrome sind durch die gestörte Bereitstellung von ACh und die dadurch mangelnde transmitter-vermittelte Stimulation der postsynaptischen Rezeptoren charakterisiert<sup>64,92</sup>.

Durch Mutationen des *CHAT* genannten Gens, welches für die Cholinacetyltransferase (*ChAT*) kodiert, kommt es zur verminderten Expression oder zur Herabsetzung der katalytischen Aktivität dieses Enzyms und somit zur ineffizienten Resynthese und Verpackung<sup>45,54,56,70,76</sup> des Transmitters. Die daraus resultierende Muskelschwäche ist in der extremen Ausprägung durch das infektgetriggerte Versagen der respiratorischen Muskulatur geprägt, welches rezidivierend zu Phasen ausgeprägter Apnoe-Anfälle führt. Diese Form der akuten Exazerbation der Myasthenie wird CMS-EA (*EA = episodic apnea*) genannt und kann bis zur respiratorischen Insuffizienz mit Beatmungspflichtigkeit des Patienten führen.

Des Weiteren sind auch Formen der CMS bekannt, die präsynaptisch durch Vesikelarmut oder eine reduzierte Quantenfreisetzung<sup>34,92,95</sup> entstehen und eine typische Symptomatik mit zyanotischen Anfällen bieten.

### 2.2.2.2 Synaptische CMS

Der partielle oder vollständige Verlust der ACh-Esterase an der motorischen Endplatte ist verantwortlich für die synaptische Form der CMS<sup>30,49,68,71</sup>.

Dieser Enzymmangel entsteht durch Defekte im Bereich der katalytischen Untereinheiten oder durch Mutationen des ColQ (= *collagenic-like tail subunit*)<sup>9,30,49,68</sup>. ColQ kodiert für eine Kollagen-ähnliche Tripelhelix, welche die katalytischen Untereinheiten der AChE in der postsynaptischen Basallamina verankert und so die Voraussetzung für die Funktionstüchtigkeit des asymmetrischen Enzyms bildet.

Bereits 1977 entdeckte Andrew G. Engel diese Mutation und ihre bedeutende Rolle in der Pathogenese der myasthenen Erkrankungen<sup>25</sup>.

### 2.2.2.3 Postsynaptische CMS

Den größten Anteil der CMS stellen die postsynaptischen Störungen dar, die auf Veränderungen des nAChR-Kanals basieren und in zwei Kategorien aufgeteilt werden:

Man unterscheidet die strukturell-kinetischen Mutationen des nAChR-Kanals vom postsynaptischen Rezeptormangel<sup>12,90</sup>. Dabei wird die Gruppe der strukturell-kinetischen Mutationen wiederum je nach Wirkweise in *Slow-* oder *Fast channel*-Syndrome eingeteilt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Der Nachweis dieser pathogenen Rezeptormutationen war der entscheidende Schritt in der molekularen Charakterisierung kongenitaler myasthener Syndrome<sup>87</sup>.

Bei den postsynaptischen strukturellen Störungen überwiegen Mutationen in der  $\epsilon$ -Untereinheit<sup>69</sup>, was wohl auf zwei unterschiedliche Gründe zurückzuführen ist: einerseits kann durch eine kompensatorische Expression von embryonalen nAChR mit  $\gamma$ -Untereinheiten ( $\alpha_2\beta\delta\gamma$ ) eine Abschwächung der pathologischen Ausprägung mit guter Überlebensfähigkeit erreicht werden<sup>33</sup>. Außerdem weist das für die  $\epsilon$ -Untereinheit kodierende CHRNE-Gen vor allem im Bereich der Exons, die für den cytoplasmatischen Loop kodieren, einen hohen Guain-Cytosin-Gehalt auf, was akzidentielle DNA-Umlagerungen begünstigt und somit vermehrt zu Nukleotid-Deletionen und -Insertionen führen kann<sup>12</sup>.

#### Slow channel CMS

Die durch einen autosomal dominant vererbten *gain of function*, einen pathogenetischen Funktionszugewinn, entstehenden Slow channel-Syndrome stellen den größten Anteil kinetischer Anomalien im Bereich des nAChR-Kanals dar<sup>19,37,39,61</sup>.

Ihre klinische Ausprägung zeigt sich vor allem in Form von belastungsabhängiger Muskelschwäche und Atrophien im Bereich der Fingerextensoren sowie der cervikalen und skapularen Muskulatur. Des Weiteren findet sich häufig eine milde Parese der Augenmuskeln oder eine belastungsabhängige Ermüdung anderer Muskelpartien<sup>31,39</sup>.

Häufiger als bei anderen CMS-Unterformen kommt es beim SCCMS zu einem Late Onset-Phänotyp mit Erstmanifestation der typischen Symptome im Erwachsenenalter, was am ehesten durch die langsame progrediente Zerstörung der Endplatten-Morphologie durch stetig erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu erklären ist (s.u.).

Die Pathogenese des SCCMS ergibt sich durch die bis auf das 20fache<sup>31</sup> verlängerte Einstromphase von Kationen, darunter auch große Mengen an  $\text{Ca}^{2+}$ , die eine Verlängerung des Endplatten-Potentials (*EPP*) zur Folge hat. Ursache sind in den meisten Fällen Mutationen im Bereich der porenbildenden Untereinheiten des nAChR-Kanals, durch welche die Stabilität des Kanals herabgesetzt wird und die Öffnungsphase nach Stimulation durch ACh deutlich verlängert ist. Das ausgedehnte EPP überdauert die Refraktärzeit der Muskelfaser-Potentiale (*CMAPs* = *compound muscle action potentials*), was zu wiederholten Erregungen und Kontraktionen nach einer einzelnen Erregung führt. Die repetitiven CMAPs weisen dabei eine niedrigere Amplitude und einen schnelleren Amplitudenabfall auf als ein singuläres Potential<sup>28</sup>.

Durch den vermehrten Einstrom von Kationen und die dadurch hervorgerufene postsynaptische Anhäufung von  $\text{Ca}^{2+}$ , verschiebt sich das an der Synapse herrschende Spannungspotential, so dass es zu einem Depolarisationsblock und somit zur weiteren Einschränkung der Reizübertragung an der NMJ kommen kann. Ferner induziert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung auf Dauer eine morphologische Schädigung der postsynaptischen Region. Es kommt zur Degeneration von Zellorganellen, zur Kernapoptose und Vakuolenbildung, was letztendlich den Verlust der gefalteten Membranstruktur und dadurch die Verminderung der Rezeptorenzahl in diesem Bereich nach sich zieht<sup>12,28,31,39</sup>. Ebenso können Veränderungen der Kanaleigenschaften auftreten, durch die sich der ligandengesteuerte Ionenkanal auch in Abwesenheit oder bei niedrigen Konzentrationen des Agonisten ACh öffnet<sup>28</sup>.

Durch andere Mutationen im extracellulären Anteil des nAChR-Kanals kann es zu Veränderungen im Bereich der Transmitter-Bindungsstellen kommen, die zu einer erhöhten Affinität des Rezeptors für ACh führen. Die festere Transmitterbindung induziert wiederum eine Verlängerung der Kanalöffnung mit konsekutiv erhöhtem Kationeneinstrom<sup>27</sup>.

Allen bei SCCMS nachgewiesenen Mutationen gemeinsam ist der verlängerte Einstrom von Kationen in die Muskelzelle. Hierdurch kommt es zu einer exzessiven postsynaptischen Stimulation mit nachfolgender Verminderung der neuromuskulären Erregbarkeit. Dies zeigt sich klinisch in der schnellen Ermüdung der Muskelfasern bei Belastung.

### **Fast channel CMS**

Wesentlich seltener als die SCCMS treten Fast channel-CMS (*FCCMS*) auf. Sie bilden pathogenetisch den Gegensatz zu den SCCMS und basieren auf einer pathologisch herabgesetzten Erregung der postsynaptischen Rezeptoren. Hierbei kommt es zu einer stark verminderten postsynaptischen Reizantwort, die durch verschiedene Mutationen im extra- oder transmembranösen Teil der Kanaluntereinheiten entsteht <sup>13,28,33,87</sup>.

Unterschiedliche Mechanismen führen zu einer stark verkürzten Öffnungsdauer des nAChR-Kanals, die einen verminderten Einstrom von Kationen durch den ligandengesteuerten Ionenkanal mit sich bringt. Das aus dieser reduzierten Reizweiterleitung resultierende EPP zeigt im Vergleich zum EPP eines gesunden Probanden eine bis um 80 % erniedrigte Amplitude <sup>79</sup>.

Die ACh-Bindungsstellen bilden eine besonders empfindliche Struktur, die durch Mutationen in ihrer Funktion stark beeinträchtigt werden kann. Die Veränderungen in diesen extracellulären Arealen, und hier vor allem in den mit den ACh-Bindungsstellen direkt verbundenen Cystein-Loops, können zu einer Neutralisierung der negativ geladenen Andockstellen führen und somit die Verbindung zwischen positiv geladenem Transmitter und Rezeptor erschweren oder ganz verhindern <sup>31,84,98</sup>.

Die auf die transmembranösen Anteile wirkenden Mutationen verändern die Form und Flexibilität der Porenstruktur, so dass es zu einer nicht mehr synchronen oder nur noch unvollständigen Öffnungsbewegung der Kanaluntereinheiten kommt. In Folge überwiegt der geschlossene Zustand der Kanalpore deutlich <sup>31</sup>.

---

FCCMS werden typischerweise autosomal rezessiv vererbt und meist von einer Mutation kombiniert mit einer Nullmutation am entsprechenden Locus auf dem zweiten Allel kodiert. Nur vereinzelte Fälle sind bekannt, in denen zwei heterogene Mutationen gemeinsam auftreten<sup>83</sup> oder ein autosomal dominanter Vererbungsweg vorliegt<sup>39,94</sup>.

Des Weiteren werden Fälle von *Arthrogryposis multiplex congenita* beschrieben, einer Erkrankung, die auf einer, durch bereits intrauterin bestehenden Myasthenie bedingten, fetalen Hypokinese beruht und mit dadurch entstehenden ausgeprägten kongenitalen Gelenkkontrakturen einhergeht<sup>13,88</sup>.

Die Symptomatik der FCCMS zeigt abhängig von der aufgetretenen Mutation eine unterschiedlich schwere Ausprägung und reicht von dezenter Augenmuskelparesen bis hin zu schweren belastungsabhängigen Muskelschwächen<sup>28</sup>.

#### **2.2.2.4 Diagnostik**

Zur genauen Diagnostik und der exakten Zuordnung eines CMS gehören umfassende genetische, morphologische und elektrophysiologische Untersuchungen, die Verdachtsdiagnose wird allerdings durch Anamnese und klinische Symptomatik gestellt.

Dabei ist es wichtig, differentialdiagnostische Möglichkeiten auszuschließen, um im Anschluss den Patienten mit einer individuellen, wirksamen Therapie versorgen zu können.

Vor allem der Ausschluss einer Myasthenia gravis durch den fehlenden Nachweis von Antikörpern gegen nAChR-Kanäle oder die rezeptorspezifische Tyrosinkinase ist wichtig, um eine unnötige und ineffektive immunsuppressive Therapie zu vermeiden<sup>47,89</sup>.

Des Weiteren sollten andere Ursachen wie Motoneuronenerkrankungen oder muskuläre Dystrophien ausgeschlossen werden<sup>22</sup>.



Seit ca. 1994 steht die Analyse von Mutationen durch molekulargenetische Untersuchungen an erster Stelle <sup>12,69,70</sup>.

Weist ein klinisches Merkmal auf eine bestimmte CMS-Form hin, so wird primär nach den dafür am häufigsten kodierenden genetischen Mutationen gesucht. Ergibt sich symptomatisch kein Hinweis auf einen bestimmten Subtyp, so werden die Genloci für CHRNE und RAPSN (kodiert für Rapsyn) gescreent, die bei 50 % der betroffenen Patienten eine Mutation aufweisen.

Das Untersuchungsmaterial für die DNA-Analyse kann aus einer mit EDTA versetzten Blutprobe gewonnen und mittels Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) aufgearbeitet werden. Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber der Untersuchung mittels Biopsie dar, bei der das vollständige Präparat eines Intercostalmuskels von Insertion bis zum Ansatz vom Patienten entnommen werden muss <sup>12,94</sup>.

Die Ermüdung der Muskulatur nach Belastung ist ein Kardinalsymptom der CMS. Dies macht man sich im Rahmen der Diagnostik mittels Elektromyographie (*EMG*) in Form von repetitiven Stimulationen eines einzelnen Muskels zu Nutzen.

Jeweils zwei distale und proximale Muskeln des Patienten werden mit 2-3 Hz wiederholt gereizt und die dabei als Reizantwort auftretenden Muskelaktionspotentiale aufgezeichnet. Typischerweise findet sich bei Patienten mit CMS nach Muskelanspannung eine Abnahme der AP-Amplitude als Hinweis für eine gestörte Reizverarbeitung <sup>22</sup>. Diese pathognomonische Veränderung, *Decrément* genannt, spiegelt die verringerte Muskelreaktion wider und findet sich zum Beispiel typischerweise beim FCCMS oder beim nAChR-Kanal-Mangel. Bei manchen Unterformen der CMS, so bei Defekten der Transmitter-Resynthese und Vesikelbildung, wird zur Auslösung eines *Decréments* eine stärkere Stimulation benötigt, etwa durch einen verlängerten Reiz mit 10 Hz oder die aktive Muskelbewegung über mehrere Minuten hinweg. Trotzdem gelingt es nicht immer, die veränderte Reizantwort in allen Muskeln abzuleiten <sup>24,41</sup>.

Kann ein *Decrément* trotz dringenden Verdachts auf CMS nicht im EMG ausgelöst werden, wird die Stimulation mittels Nadelelektrode auf einzelne Muskelfasern übertragen.

Dieses Einzelfaser-EMG (*SFEMG= single fiber electromyography*) leitet die elektrische Aktivität der singulären Muskelfasern extracellulär ab und gibt gleichzeitig Auskunft über die vorhandene Muskelfaserdichte in der motorischen Einheit. Für SCCMS und AChE-Defizienz<sup>22,39,58</sup> pathognomonisch sind die im SFEMG nach singulärer Reizung auftretenden repetitiven Muskelsummenaktionspotentiale (*CMAPs*) mit niedriger Amplitude als Hinweise für die pathologisch verlängerte Transmitterwirkung, die schließlich im Depolarisationsblock endet<sup>28</sup>.

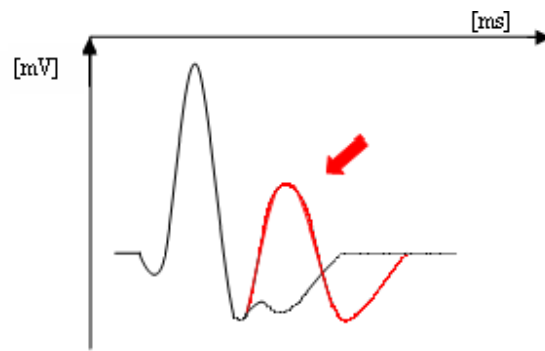


Abb. 6: Repetitive CMAPs nach Stimulation bei SCCMS und AChE-Defizienz (nach<sup>39</sup>)

Zur weiteren Differenzierung des CMS kann neben den bereits erwähnten diagnostischen Mitteln die in-vitro-Untersuchung am Muskelpräparat genutzt werden<sup>22</sup>. Das hierzu benötigte Nerv-Muskel-Präparat wird aus der Intercostalmuskulatur gewonnen und muss vom Ansatz bis zur Insertion intakt sein.

Durch einen Stromimpuls wird an der präsynaptischen NMJ des isolierten Muskels ACh aus Vesikeln freigesetzt und der Vorgang der Reizübertragung ausgelöst. Die Potentiale und Ströme, die dadurch an der postsynaptischen Membran ausgelöst werden, können unter experimentellen Bedingungen gemessen werden. Dabei erhält man Informationen über das Miniatur-Endplattenpotential (*MEPP*), den Miniatur-Endplatten-Strom (*MEPC*) sowie das Endplattenpotential (*EPP*) und den Endplattenstrom (*EPC*). Die Dauer von MEPP, EPP und MEPC geben Hinweise auf die Dauer der Kanalöffnungszeit, die etwa beim SCCMS verlängert und beim FCCMS verkürzt ist<sup>28,31,32</sup>. Ist wie beim SCCMS eine

Verlängerung der Potentiale und Ströme vorhanden, können daraus repetitive Muskelfaser-Aktionspotentiale entstehen, die ebenfalls messbar sind.

Exakte Untersuchungen der Kanaleigenschaften erfolgen, wie in dieser Arbeit durchgeführt, mittels Patch Clamp-Messungen (siehe Kap. 2.3), wobei durch die Verwendung von humanen Zellstämmen und im Labor hergestellten mutierten nAChR-Kanal-Untereinheiten die invasive Entnahme eines Muskelpräparats umgangen werden kann.

### **2.2.2.5 Therapiemöglichkeiten**

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an neuen, CMS auslösenden Mutationen durchgeführt, wodurch die Pathogenese dieser molekularen Veränderungen genauer analysiert wurde. Mit fortschreitender Erforschung der CMS und der Funktionalität der einzelnen Kaskadenanteile verbessern sich die Therapieoptionen für die betroffenen Patienten deutlich, da die pharmakologische Therapie immer genauer auf die jeweilige Ursache der Myasthenie abgestimmt werden kann.

Das interindividuell unterschiedliche Ansprechen der Patienten auf die Medikamente erschwert dabei das Aufstellen von Therapieschemata. Oft bringt erst die Kombination verschiedener Wirkstoffe den gewünschten Effekt.

Die Möglichkeit einer kausalen Therapieoption ist zum momentanen Zeitpunkt noch nicht gegeben. Das angewandte Therapieprinzip basiert immer auf der bloßen Kompensation des Defekts, zum Beispiel auf dem Erzielen einer verlängerten Transmitterwirkung an den Rezeptoren durch Hemmung der AChE wie bei der Behandlung des FCCMS oder dem nAChR-Kanal-Mangel.

Die Wirkweisen der Therapeutika zur Behandlung von FCCMS und SCCMS seien im Folgenden kurz erläutert.

| <u>CMS</u>                        | <u>Therapie</u>                 |       |
|-----------------------------------|---------------------------------|-------|
| Cholinacetyltransferase-Mangel    | AChE-Blocker                    | 14    |
| AChE-Mangel                       | Ephedrin                        | 12    |
| nAChR-Kanal-Mangel                | AChE-Blocker, 3,4-DAP *         | 43    |
| SCCMS                             | Chinidin, Fluoxetin             | 42,44 |
| FCCMS                             | AChE-Blocker, 3,4-DAP           | 43    |
| Rapsyn-Mangel                     | AChE-Blocker                    | 11    |
| Na <sup>+</sup> -Kanal-Myasthenie | AChE-Blocker, Acetazolamid      | 12    |
| Limb-girdle-Myasthenie            | AChE-Blocker                    | 12    |
| Präsynaptische CMS                | AChE-Blocker, 3,4-DAP, Ephedrin | 12    |

\* 3,4-DAP = 3,4-Diaminopyridin

#### *Überblick über medikamentöse Therapieoptionen bei verschiedenen CMS-Subtypen*

### **AChE-Inhibitoren**

AChE-Inhibitoren gelten als breit einsetzbare Standardtherapeutika bei myasthenen Syndromen einschließlich der CMS, mit Ausnahme der SCCMS und des AChE-Mangels<sup>22</sup>. Der Prototyp der AChE-Hemmer ist das Pyridostigmin (*Mestinon*®)<sup>86</sup>. Es hat eine Wirkdauer von drei bis sechs Stunden und kann oral verabreicht werden. Des Weiteren ist Neostigmin als Medikament derselben Wirkstoffklasse zu erwähnen.

Die Steigerung der Transmitter-Effektivität wird hier durch die Hemmung des ACh-Abbaus durch die AChE erreicht. Das Pharmazeutikum bindet an das postsynaptische Enzym, das durch Carbamylierung temporär blockiert wird. So wird eine Konzentrationszunahme des Agonisten am Rezeptor durch verringerten Abbau erreicht<sup>86</sup>.

AChE-Inhibitoren kommen bei den meisten CMS-Formen in Kombination oder alleine zur Anwendung. Besonders wichtig ist diese Therapie jedoch bei der präsynaptischen

---

CMS-EA, bei der im Rahmen einer infektgetriggerten respiratorischen Insuffizienz die parenterale Gabe von Parasympathomimetika (Neostigminmethylsulfat, Pyridostigminbromid<sup>32</sup>) lebensrettend sein kann<sup>8</sup>.

### **3,4-Diaminopyridin**

3,4-Diaminopyridin (*3,4-DAP*) ist ein präsynaptisch ansetzender K<sup>+</sup>-Kanalblocker, der die Anzahl der freigesetzten Transmitterquanten erhöht<sup>32,39,42,75</sup>. Durch die Blockade von Kaliumkanälen wird die Repolarisation des präsynaptischen Axons nach einem ankommenden Aktionspotential verzögert und die Phase des Calcium-Einstroms verlängert<sup>53</sup>. Der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom induziert die Exocytose, es folgt eine vermehrte Ausschüttung des Transmitters ACh in den synaptischen Spalt. 3,4-DAP kann zusammen mit AChE-Inhibitoren verordnet und die therapeutische Wirkung dadurch erhöht werden<sup>75</sup>.

### **Chinidin und Fluoxetin**

Als Antiarrhythmika der Klasse IA entfaltet Chinidin seine Wirkung durch die mittellange Blockade von Na<sup>+</sup>-Kanälen<sup>77</sup>. Im Rahmen der Therapie des SCCMS wendet man sie jedoch bei den mutierten nAChR-Kanälen der postsynaptischen Membran an. Hier normalisiert Chinidin durch Bindung an den Rezeptor die Öffnungsdauer<sup>6,9,35,42,81</sup>. Allerdings kommt Chinidin erst zur Anwendung, wenn die Therapie mit AChE-Blockern oder 3,4-DAP nicht den gewünschten Erfolg bringt. Wird es eingesetzt, führt es in vielen Fällen zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptomatik und zu einer partiellen Rückbildung der abgeflachten repetitiven CMAPs<sup>31</sup>.

Ein weiteres Medikament ist der selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitor (*SSRI*) Fluoxetin, der in der Psychiatrie als Antidepressivum zur Anwendung kommt<sup>38</sup>. Zur Behandlung des SCCMS tritt es, ähnlich wie Chinidin, als lang anhaltender Inhibitor der nAChR-Kanäle auf, der die Öffnungsdauer ebenfalls effizient senkt<sup>9,44</sup>.

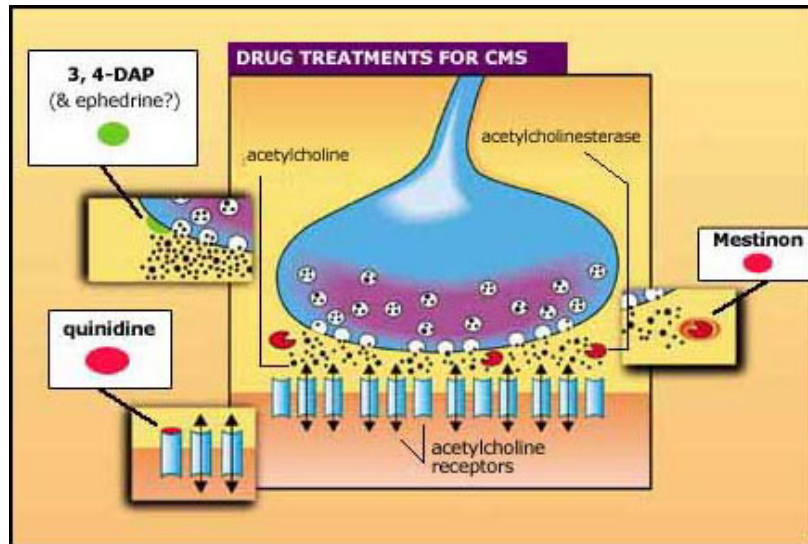


Abb. 7: Funktionsweisen von medikamentösen Therapieformen<sup>3</sup>

### 2.3 Patch Clamp-Technik

In dieser Arbeit haben wir die bei CMS veränderten Vorgänge an der NMJ mit Hilfe der Patch Clamp-Technik untersucht. Dabei handelt es sich um ein besonderes Voltage Clamp-Verfahren, das 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt wurde. 1991 wurden die beiden Wissenschaftler hierfür mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet.

Bei Ionenbewegungen durch einen Kanal kommt es durch die Umverteilung der Ladungen zu einer Veränderung der Spannung über der Zellmembran. Mittels Patch Clamp kann durch die Erfassung dieser extrem verstärkten Spannungsdifferenzen über der Zellmembran die Bioelektrizität von Zellen dargestellt werden. Hierbei bedient sich diese Methode des *Voltage Clamps*, des Festlegens einer dem Membranpotential entsprechenden Spannung, durch die elektrische Veränderungen durch Spannungsdifferenzen erfasst und somit das Öffnungsverhalten von Kanälen an lebenden Zellen beobachtet werden kann<sup>67</sup>. Die Messung des Stroms, der zur Aufrechterhaltung des festgelegten Potentials notwendig ist, wird dabei registriert. Somit können auch kleinste Ionenflüsse

nach Kanalöffnungen erfasst und Schlüsse auf das Verhalten der untersuchten Kanäle gezogen werden.

Die Möglichkeit, Messungen an Zellen durchzuführen, die je nach zu untersuchender Mutation entsprechend aufgebaute Kanäle enthalten, erlaubt es, differenzierte Aussagen über die Veränderung der Kinetik zu treffen. Durch Markierung der mutierten Kanal-DNA mittels Fluoreszenz können spezifisch jene Zellen getestet werden, in welchen mutierte Kanaluntereinheiten in die Poren eingebaut wurden. Die unterschiedlichen Arten von Patch Clamp-Konfigurationen (cell-attached, whole-cell, inside-out, outside-out) bieten dem Untersucher zudem unterschiedliche Möglichkeiten, Kanäle zu untersuchen und dabei spezifisch auf verschiedene Fragestellungen einzugehen.

Durch Patch Clamp-Messungen können kleinste Potentialdifferenzen untersucht werden; es handelt sich jedoch um eine äußerst empfindliche und störungsanfällige Methode. Um die Beeinträchtigungen der Messungen durch elektrische Störfaktoren aus der Umgebung zu minimieren, wird der Messstand deshalb durch einen Faraday'schen Käfig abgeschirmt.

Aber nicht nur aus der Setup-Umgebung, auch innerhalb des Versuchsaufbaus kann es zu Störungen kommen, die eine exakte Darstellung des untersuchten Kanals erschweren: alleine durch das Anlegen von höheren Spannungen kann es zu Ungenauigkeiten kommen. Durch die Grundaktivität der Kanäle entsteht ein hochfrequentes Rauschen, das es notwendig macht, die über einem Kanal gemessenen Ereignisse nachträglich zu filtern, um eine brauchbare Aussage über die Messergebnisse machen zu können.

Eine weitere Schwierigkeit besteht zudem in der exakten Platzierung der Messpipette über dem gewünschten Kanal. Idealerweise sollte ein einzelner Kanal vollständig getroffen und so dessen Ströme untersucht werden. Wird ein Kanal nicht vollständig von der Pipettenöffnung umschlossen, kann durch den angelegten Sog kein abdichtender Giga-seal erreicht werden, wodurch die Messungen an Genauigkeit einbüßen. Das Gleiche ist der Fall, wenn mehrere Kanäle umschlossen werden, die sich in ihrer Öffnungsweise unterscheiden oder nur partiell unter der Pipettenöffnung liegen.

Zusammenfassend stellt die Patch Clamp-Methodik eine ausgezeichnete Verfahrensweise dar, um das Öffnungsverhalten von Kanälen an Zellen zu erforschen. Durch die Störanfälligkeit des Messverfahrens sollten jedoch besonders im höher angelegten Spannungsbereich die erzielten Ergebnisse einer erneuten kritischen Betrachtung unterzogen werden.

### **2.3.1 Patch Clamp-Setup**

Als Setup wird der für die Versuche verwendete Messaufbau bezeichnet. Er besteht aus einem schwingungsfreien Tisch in einem Faraday'schen Käfig, auf dem ein Lichtmikroskop mit 200- bis 600-facher Vergrößerung sowie der eigentliche Messapparat installiert sind. Dieser besteht aus der Messkammer, einer mittels z.B. hydraulischem Mikromanipulator bewegten Patchpipette mit Messdraht, einem Unterdruck-Erzeuger sowie Vor- und Hauptverstärker. Für Beobachtung und Aufzeichnung der gemessenen Signale wird der Aufbau durch ein Oszilloskop und einen PC mit geeigneter Software ergänzt.

Eigens für jede einzelne Messung wird im Pipettenzieher eine Glaspipette hergestellt. Durch unterschiedliche Wandstärken von 0,15 mm bis 0,5 mm werden Durchmesser der Öffnungen der Pipettenspitze und damit der Übergangswiderstand zur Zellmembran bestimmt. Um wie im vorliegenden Fall bei Einzelkanalmessungen ein optimales Ergebnis zu erzielen, werden relativ dickwandige Pipetten mit einer Stärke von 0,3 bis 0,5 mm verwendet.

Die Pipette ist mit einer Lösung gefüllt, die der die Zellen umgebenden Badlösung entsprechen kann, oder auch wie bei dieser Arbeit Kanal-aktivierende Substanzen wie z.B. ACh enthält. In diese Lösung eingebettet ist der Messdraht aus Silber, über den die gemessenen elektrischen Signale an den Vorverstärker (= Pre-Amplifier) weitergeleitet werden. Außerhalb des Faraday'schen Käfigs befindet sich ein Oszilloskop, an dem die Messungen in Echtzeit vom Experimentator verfolgt werden.



Mittels AD-Wandler werden die Messergebnisse von analogen in digitale Zeichen umgewandelt, so dass die Daten auf einem mit der entsprechenden Software ausgestatteten Computer gespeichert und weiterverarbeitet werden können. Die den Kanalöffnungen entsprechenden digitalen Rohdaten werden graphisch dargestellt und können bezüglich Parametern wie z.B. Öffnungsdauer, Amplitude oder Burstlängen beurteilt werden<sup>1</sup>.

### 2.3.2 Patch Clamp-Konfigurationen

Das Patch Clamp-Verfahren kann auf unterschiedliche Arten eingesetzt werden. Je nach Fragestellung bieten sich unterschiedliche Konfigurationen an<sup>67</sup>

- a: *Cell-attached*
- b: *Whole-Cell*
- c: *Inside-out*
- d: *Outside-out*

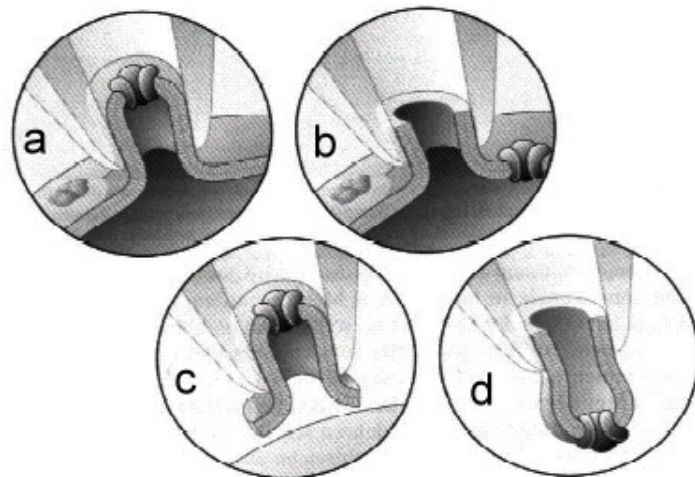


Abb. 8: Unterschiedliche Konfigurationen bei der Patch Clamp-Technik<sup>67</sup>

In der vorliegenden Messreihe wurde ausschließlich mit der *Cell-attached*-Konfiguration gearbeitet. Hierbei wird die Glaspipette mit der Öffnung auf die Oberfläche einer Zelle in der Badlösung aufgesetzt ohne sie zu beschädigen. Um ein optimales Anliegen der Pipettenöffnung an der Zellmembran zu erreichen, wird über einen mit einem Mundstück

oder einer Spritze verbundenen Schlauch ein Unterdruck erzeugt. Durch das Erhöhen des Abdichtungswiderstands verbessert sich die Qualität der Messung deutlich.

Dies entdeckte Erwin Neher erst 1980 und nannte den Effekt „*Gigaseal*“, da er so einen Widerstand von 100 Giga $\Omega$  erreichte (*seal* = Dichtung). Idealerweise umschließt die Pipettenöffnung vollständig einen einzelnen Kanal, in diesem Fall einen nAChR-Kanal. Öffnet er sich unter dem Einfluss eines sich in der Pipettenlösung befindlichen Transmitters, kann die durch den Ionenfluss entstehende Spannungsänderung über den Messdraht erfasst werden.

Diese elektrischen Signale werden nun im Pre-Amplifier verstärkt, der im Wesentlichen aus einem Operationsverstärker (OPA) und einem Rückkopplungswiderstand  $R_f$  (= *feedback resistance*) besteht.

Der OPA hat die Aufgabe, eine kleine Spannung an seinem Eingang um ein Vielfaches zu verstärken. Dabei ist der Eingangswiderstand so hoch, dass praktisch kein Strom in den OPA hineinfließen kann. Daher fließt effektiv der gesamte Strom, der durch die Spannungsdifferenz zwischen Ein- und Ausgang des OPA bewirkt wird, durch den Rückkopplungswiderstand  $R_f$ . Dort erzeugt er eine Spannung, die sich proportional zu diesem Strom verhält. Da es sich, wie bereits erwähnt, bei der Patch Clamp-Technik um ein Voltage Clamp-Verfahren handelt, wird das Ruhepotential der Zellmembran durch eine vom Experimentator vorgegebene Kommandospannung  $U_{\text{soll}}$  konstant gehalten.

Kommt es nun im Bereich des Patches zu einer Kanalöffnung mit anschließendem Ionenfluss, entsteht am Eingang des OPAs eine Spannungsdifferenz  $\Delta U$  zwischen  $U_{\text{soll}}$  und gemessener Pipettenspannung  $U_{\text{pip}}$ . Dies bewirkt einen Stromfluss durch  $R_f$ , bis diese Spannungsdifferenz ausgeglichen ist. Die Spannung, die dabei über dem Widerstand entsteht, ist direkt proportional zum Strom, der durch die Ladungsverschiebung über dem Kanal entsteht und durch den Messdraht in der Pipette erfasst wird.

Der OPA fungiert also als Strom-Spannungs-Wandler. Die so zu messende Spannung muss allerdings noch durch den Differenzverstärker D um den Offset von  $U_{\text{soll}}$  korrigiert werden, bevor das verstärkte Signal an den Hauptverstärker weitergeleitet wird.

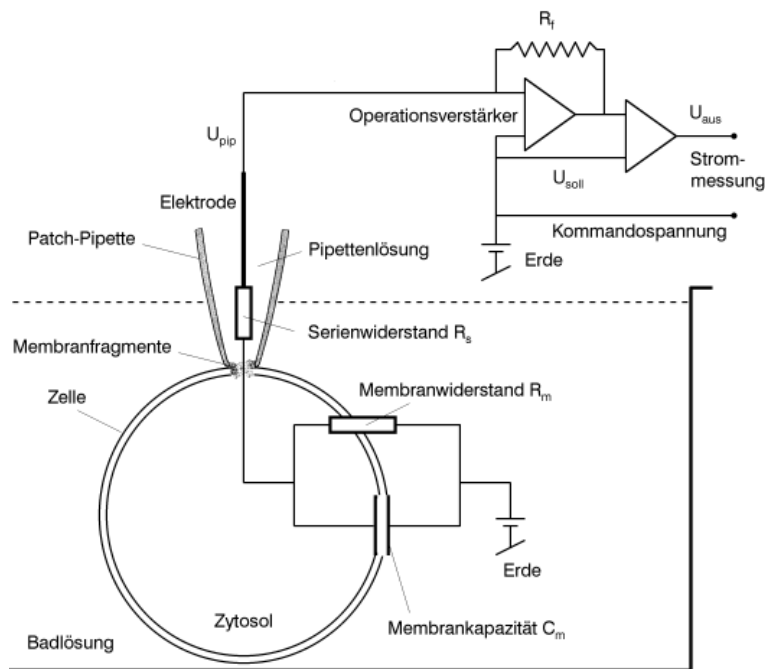


Abb. 9: Aufbau des elektrischen Schaltkreises eines Patch Clamp-Setups<sup>57</sup>

Die Kanal-Bioelektrizität folgt dem *Alles oder Nichts*-Gesetz. Die Ionenkanäle öffnen und schließen sich nach dem Zufallsgesetz mit einer bestimmten Zeitkonstanten, wobei die Stromamplitude um einen Mittelwert schwankt. Öffnet sich ein Kanal, sind die daraus resultierenden Stromimpulse im Oszilloskop als rechteckige Ausschläge zu sehen. Existiert ein weiterer, nur teilweise unter der Pipettenöffnung liegender Kanal (= Randkanal), tritt ein zusätzliches Signal auf, welches in Form von sog. *Rauschen* die Messung erschweren kann. Liegen zwei Kanäle vollständig unter der Pipettenspitze und öffnen sich zeitgleich, so summieren sich die im Oszilloskop zu sehenden Ausschläge der Stromimpulse.

Um die aufgezeichneten Signale adäquat darstellen zu können, ist es notwendig sie zu filtern, um hochfrequentes Rauschen zu reduzieren. Die Digitalisierung erfolgt anschließend in einer Frequenz, die mehr als doppelt so hoch wie die höchste in der Messung vorkommende sein muss (sog. *Nyquist-Kriterium*)<sup>67</sup>.

## **2.4 Zielsetzung**

Mutationen in strategisch wichtigen Abschnitten der nAChR-Kanal-Untereinheiten führen zu strukturellen und kinetischen Veränderungen vor allem im Bereich der postsynaptischen Membran der NMJ. Hierdurch wird der Ablauf der Reizübertragung gestört, was sich klinisch in einer Beeinträchtigung der Muskelarbeit niederschlägt. Der Schweregrad und der Zeitpunkt der Erstmanifestation der Myasthenie unterscheiden sich dabei abhängig von Locus und Art der Mutation.

Neben den zahlreichen bereits erforschten Genveränderungen wurden nun vier neue Mutationen entdeckt, deren Einfluss auf die klinische Ausprägung noch nicht bekannt ist. Zur genaueren Betrachtung und exakten Beurteilung des Einflusses dieser Mutationen auf die Kanalfunktion wurden unter experimentellen Bedingungen die Untereinheiten von nAChR-Kanälen hergestellt (*Labor Prof. H. Lochmüller, Genzentrum, München*), wobei jeweils eine subunit durch das Einfügen einer neuen pathogenen Mutation in die DNA verändert wurde. Es war zu erwarten, dass die so entstehenden veränderten nAChR-Kanäle ein vom Wildtyp abweichendes Öffnungsmuster zeigen würden. Diese veränderten Abläufe der Reizübertragung wurden mittels Patch Clamp-Messungen untersucht, um die Charakteristik der Kanalöffnungen bei der jeweiligen Mutation genau zu erfassen. Die Zuordnung zu Slow- oder Fast channel-Verhalten nach Einbau jeweils einer neuen Mutation in die Kanäle war primäres Ziel dieser Arbeit.

Die Analyse des veränderten Verhaltens der nAChR-Kanäle kann die Pathophysiologie der jeweiligen entstehenden Form der Myasthenie erklären. Die weitere Erforschung des Zusammenhangs zwischen einer bestimmten Mutation und der daraus resultierenden klinischen Symptomatik stellt eine interessante und bedeutsame wissenschaftliche Arbeit dar, zu der die hier vorliegende Arbeit die Basis bilden kann.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Verwendete Zellen und DNA**

##### **3.1.1 Zellen**

Für alle Transfektionen und Messungen wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) kultiviert, welches mit 10 % Kälberserum, 1 % Na<sup>+</sup>-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin versetzt und für mindestens 36 Stunden bei 37,0 °C unter 5 % CO<sub>2</sub>- / 95 % Luft-Gehalt im Inkubator bebrütet wurde<sup>50</sup>.

Die Messung erfolgte an diesen Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm.

##### **3.1.2 Mutationen**

###### **3.1.2.1 Mutation $\epsilon 812C>T$**

Die Mutation  $\epsilon 812C>T$  führt zu einem Aminosäureaustausch im Bereich der zweiten kanalbildenden Transmembranregion (M2) der  $\epsilon$ -Untereinheit. Betroffen hiervon ist die letzte Aminosäure A271, Alanin, die durch Valin ersetzt wird (A271V).

Im Patienten wurde ein compound heterozygotes Vorkommen mit der Frameshift-Mutation 1267delG gefunden.

###### **3.1.2.2 Mutation $\epsilon 1304del3$**

$\epsilon 1304del3$  beschreibt eine heterozygote In-Frame-Mutation im Bereich der kodierenden Sequenz der  $\epsilon$ -Untereinheit. Durch die Deletion von drei Basenpaaren in Exon 12 (N436del) entfällt die Aminosäure Asparagin im Bereich der cytoplasmatischen Schleife an der Grenze von der dritten zur vierten transmembranösen Kanaldomäne (M3/M4).

Die dadurch entstehende Verkürzung führt zu einer erhöhten Instabilität des nAChR-Kanals. Es kommt zur verminderten Expression der adulten und kompensatorisch zur vermehrten Ausbildung der fetalen  $\gamma$ -nAChR-Kanäle<sup>78</sup>.

Diese Mutation kann compound-heterozygot mit der Mutation  $\epsilon 652C>T$  auftreten.

### 3.1.2.3 Mutation $\epsilon 392del3$

Auf Exon 5 findet sich die In-Frame-Mutation  $\epsilon 392del3$ . Hier führt das Fehlen des Basentriplets CCA an Position 392 zur Deletion der Glutaminsäure im Bereich der Disulfidbrücke in der extracellulären Domäne der  $\epsilon$ -Untereinheit (p.Glu131\_Val132delinsAsp).

### 3.1.2.4 Mutation $\epsilon 652C>T$

Die ebenfalls heterozygote Missense-Mutation  $\epsilon 652C>T$  findet sich auf Exon 7 und betrifft die extracelluläre Domäne der  $\epsilon$ -Untereinheit. Hier kommt es zum Ersatz eines Arginins durch die Aminosäure Tryptophan (R218W).

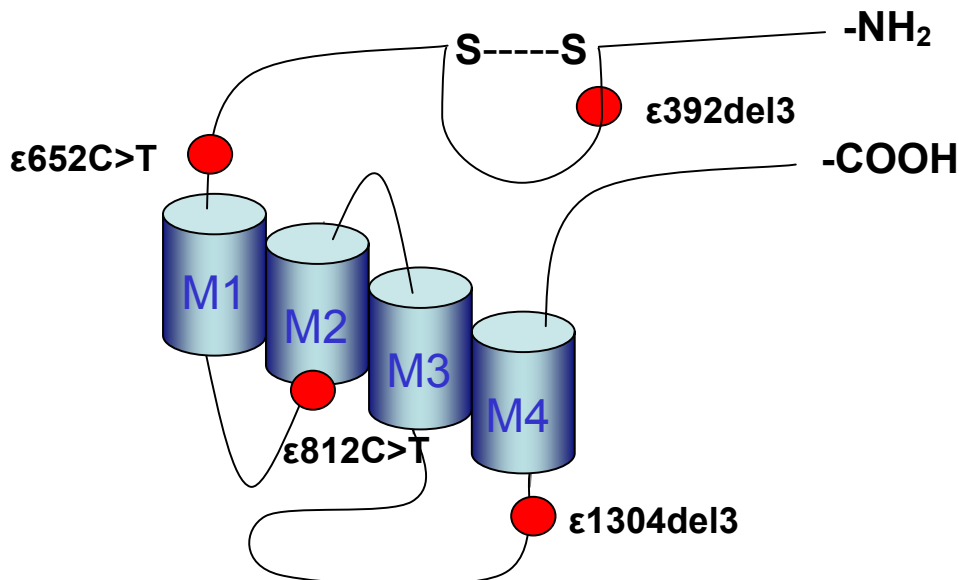


Abb. 10: Loci der Mutationen  $\epsilon 812C>T$ ,  $\epsilon 1304del3$ ,  $\epsilon 392del3$  und  $\epsilon 652C>T$  im Bereich der Domänen der  $\epsilon$ -Untereinheit

---

### **3.2 Transfektion der Zellen**

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eine lebende Zelle bezeichnet. Transfiziert werden Plasmide, die den kodierenden Bereich des gewünschten Gens (z.B. einer nAChR-Kanaluntereinheit) enthalten sowie eine Promotorsequenz, die für die Transkription des Gens nötig ist. Den Plasmiden, die die zu untersuchende Mutation enthalten, wird grün fluoreszierendes Protein (GFP) hinzugefügt, was die Erkennung erfolgreich transfizierter Zellen unter dem Mikroskop ermöglicht.

Die Transfektion wurde in Petrischalen mit jeweils  $0,5 - 2 \times 10^5$  Zellen mittels Lipofectamin 2000 (Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurde das DMEM-Medium abgesaugt und gegen Opti-modified Eagle's medium (Opti-MEM) ausgetauscht. 95  $\mu$ l Opti-MEM pro Schale und jeweils insgesamt 2  $\mu$ g DNA der Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und der mutierten  $\epsilon$ -Untereinheit wurde nach Zugabe von je 1  $\mu$ l GFP für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Inkubation der DNA-Suspension wurden jeweils 9  $\mu$ l Lipofectamin 2000 mit 95  $\mu$ l Opti-MEM gemischt und hinzugefügt. Nach diesem Schritt erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Im Folgenden wurden pro Petrischale 200  $\mu$ l der gefertigten Suspension zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C unter 5% CO<sub>2</sub>- / 95% - Luft-Gehalt im Inkubator bebrütet. Nach 4 Stunden konnte das Opti-MEM-Medium durch DMEM-Medium ersetzt werden. Die Messungen erfolgten durchschnittlich 24 Stunden nach Transfektion, bis dahin verblieben die Zellen unter stabilen Umgebungsbedingungen im Inkubator.

### **3.3 Patch Clamp-Messungen**

Bei 400facher Vergrößerung wurden die transfizierten Zellen unter einem invertierten Mikroskop (Axiovert, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (20°C) durchgeführt, wobei die Zellen während der experimentellen Phase kontinuierlich von einer extrazellulären Badlösung umgeben waren, die aus 162 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 0,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM HEPES und 5,6 mM Glucose besteht, und deren pH mittels NaOH auf 7,4 eingestellt wurde.

Die für die Patch Clamp-Messungen benötigten Glaspipetten wurden aus dünnwandigen Glasröhrchen (Clark, Pangbourne, UK) mittels eines DMZ-Universal-Pullers (Zeitz, Augsburg, Deutschland) hergestellt und mit einer niedrig konzentrierten ACh-Lösung (3 µM) befüllt.

Die Einzelkanalmessungen erfolgten unter Benutzung der oben beschriebenen herkömmlichen Patch Clamp-Technik. Die Kanalöffnungen wurden mit einem Axopatch 200 B -Pre-Amplifier aufgenommen, mittels Digidata 1200 Interface (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) digitalisiert und auf Festplatte gespeichert.

Für die Analyse wurden die Daten mit 5 kHz gefiltert und anschließend mit der pCLAMP 8 Software-Suite (Axon Instruments) analysiert.

Die Messungen erfolgten in der cell-attached-Konfiguration bei Anlage extracellulärer positiver Klemmspannungen (+40 bis +180 mV), wodurch ein Spannungsgefälle zum negativen intracellulären Ruhepotential hergestellt wurde.



### 3.4 Auswertung

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels der Software-Programme fetchan, Version 6.0.6.01 (Axon Instruments, Inc., 1984 – 1999) und pSTAT, Version 6.0.5.07 (Axon Instruments, Inc., 1984 – 1997).

Fetchan ist ein Programm zur Analyse elektrophysiologischer Signale einzelner Ionenkanäle. Die Änderung der mittels Patch Clamp gemessenen Spannungen über einer Zellmembran bei Öffnung eines Kanals wird als Ereignis markiert und graphisch umgesetzt. Das Kanalöffnungsverhalten wird als Eventspur („Events List“) über den gesamten Zeitraum einer Messung dargestellt. Öffnungsdauer, Amplitude und Bursts können somit erfasst werden.

Die so verarbeiteten Daten können anschließend im Programm pSTAT statistisch ausgewertet werden. Die Öffnungswahrscheinlichkeit und -häufigkeit kann hier berechnet und Burst-Analysen durchgeführt werden. Die zusammenfassende Auswertung mehrerer Messungen und somit auch die Beurteilung der veränderten Kinetik durch eine bestimmte Mutation kann numerisch oder in Form von Histogrammen erfolgen<sup>2</sup>.

Die Auswertung der Einzeldaten kann den im Anhang beigefügten Listen entnommen werden. Berücksichtigt wurden alle Files, die aufgrund der Messqualität eine exakte Bestimmung der Kanalöffnungen zuließen. In der Dauer der Aufnahmezeit können sie variieren.

Für alle Mutationen wurden anhand der Einzelkanalcharakteristika burst duration, mean open time, Amplitude und Leitfähigkeit (slope conductance) bestimmt.

Bursts werden nach Colquhoun und Sakmann als Gruppen von Öffnungsintervallen definiert, die nur durch Schlussphasen unterbrochen werden, die kürzer sind als eine bestimmte Länge ( $t_c$ )<sup>18</sup>. Die zwischen zwei Burst-Ereignissen liegende Zeit wird Interburst-Intervall genannt. In den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde ein kritisches Interburst-Intervall von 2 ms verwendet.

---

Als Kanalöffnung oder offenes Intervall wird jedes gemessene Ereignis gezählt, das von nicht-offenen eingerahmt wird <sup>59</sup>. Die mittlere Kanalöffnungszeit MOT ist die durchschnittliche gemittelte Länge dieser Ereignisse.

Die Stärke des durch den Ionenstrom erzeugten Stromimpulses wird durch die Höhe der Amplitude eines Öffnungsereignisses wiedergegeben. Der Stromimpuls leitet sich, wie in 2.3.2 beschrieben, aus der anfallenden Spannungsdifferenz ab und entsteht durch den Einstrom von Ionen bei einer Kanalöffnung.

Die Leitfähigkeit C (= slope conductance) eines Kanals wird durch das Verhältnis von fließendem Strom zur angelegten Spannung während einer Kanalöffnung definiert:

$$R=U:I \rightarrow C=I:U \text{ [pS]}$$

Sie wird in Pico-Siemens [pS] gemessen.

## 4 Ergebnisse

Für die untersuchten Mutationen wurden nach Angabe der statistischen Daten zu den analysierten Ereignissen die Analysen für Burst duration, mittlere Kanalöffnungsdauer und Amplitude dargestellt. Die abschließende Beurteilung fasst die Resultate zusammen, um den Vergleich zu erleichtern.

### 4.1 Wildtyp

Ausgewertet wurden die Messungen von 13 Zellen mit insgesamt 39.124 Kanalöffnungen, die zu 2301 Bursts gruppiert waren.

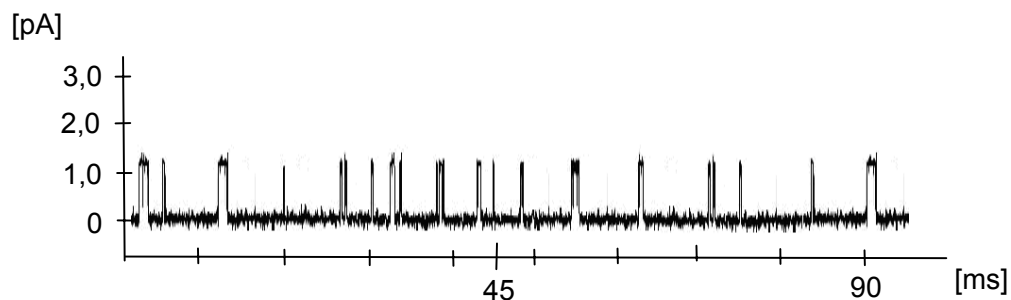
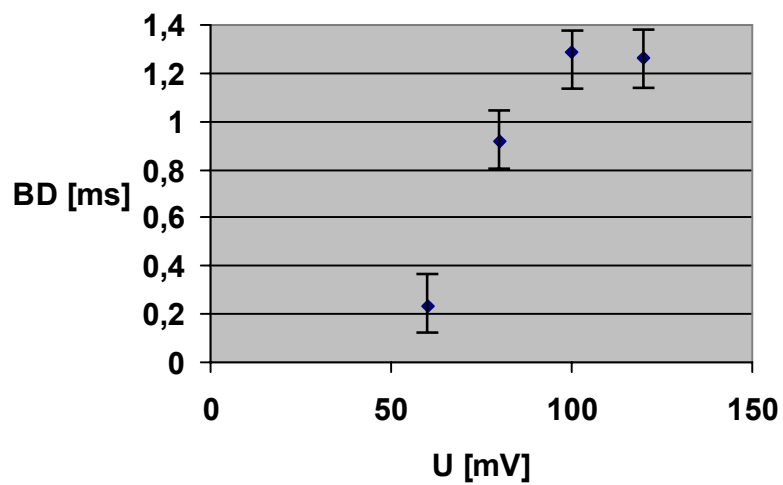


Abb. 11: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs beim Wildtyp

#### 4.1.1 Burst duration

Die Messungen (n) der Burst-Öffnungszeiten des Wildtyps erbrachten bei Spannungen zwischen +60 mV und +120 mV folgende Mittelwerte für die Burst duration:

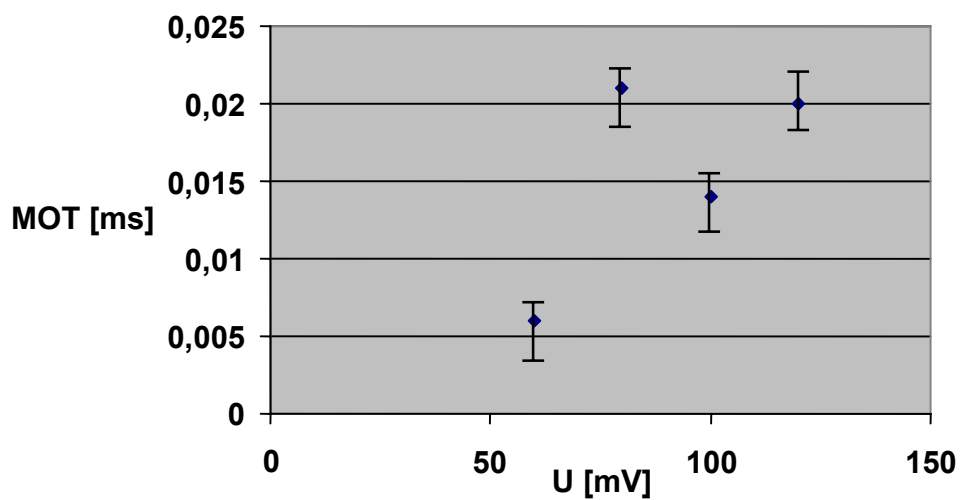


| U [mV]  | 60   | 80   | 100  | 120  |
|---------|------|------|------|------|
| n       | 4    | 10   | 12   | 9    |
| BD [ms] | 0,23 | 0,92 | 1,29 | 1,26 |
| SD +/-  | 0,30 | 0,63 | 0,89 | 1,03 |

Abb. 12 Burst duration des Wildtyps

#### 4.1.2 Mean open time

Die Messungen (n) der mittleren Kanalöffnungszeit des Wildtyps erbrachten bei Spannungen zwischen +60 mV und +120 mV folgende Mittelwerte für die Mean Open Time (MOT):

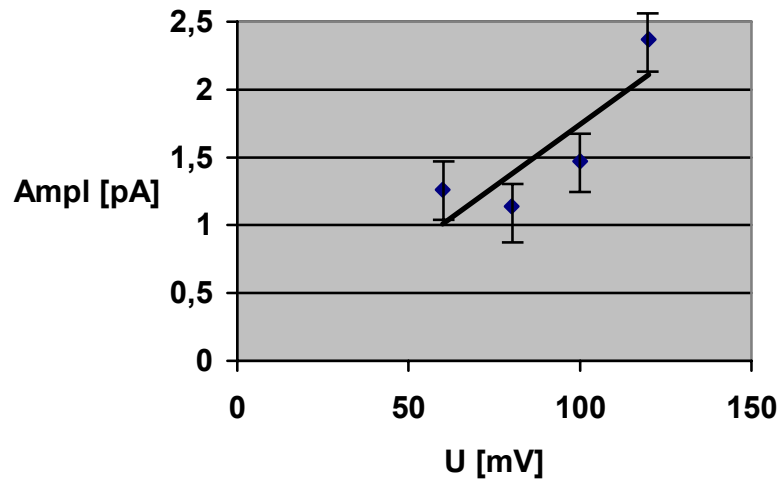


| U [mV]   | 60    | 80    | 100   | 120   |
|----------|-------|-------|-------|-------|
| n        | 4     | 10    | 12    | 9     |
| MOT [ms] | 0,006 | 0,021 | 0,014 | 0,020 |
| SD +/-   | 0,018 | 0,053 | 0,023 | 0,042 |

Abb. 13: Mean Open Time des Wildtyps

### 4.1.3 Amplitude

Die Messungen (n) der Amplituden des Wildtyps erbrachten bei Spannungen zwischen +60 mV und +120 mV folgende Mittelwerte:



| U [mV]    | 60   | 80   | 100  | 120  |
|-----------|------|------|------|------|
| n         | 4    | 10   | 12   | 9    |
| Ampl [pA] | 1,26 | 1,14 | 1,47 | 2,37 |
| SD +/-    | 1,56 | 1,08 | 2,35 | 1,29 |

Abb. 14: Slope conductance des Wildtyps

Die slope conductance des Wildtyps beträgt 21 pS.

### 4.1.4 Beurteilung

Bei 100 mV ergab sich bei den durchgeführten Messungen des Wildtyps eine Burst duration von 1,29 ms ( $\pm 0,89$  ms) und eine mittlere Kanalöffnungsdauer von 0,0143 ms ( $\pm 0,023$  ms). Die Amplitudenauswertung der Einzelkanalmessungen erbrachte eine slope conductance von 21 pS.

## 4.2 Mutation $\epsilon 812C>T$

Ausgewertet wurden die Messungen von 34 Zellen mit insgesamt 105.308 Kanalöffnungen, die zu 6946 Bursts gruppiert waren.

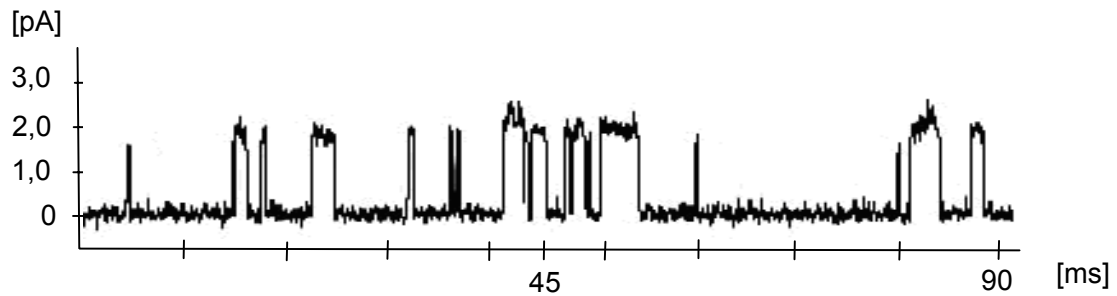
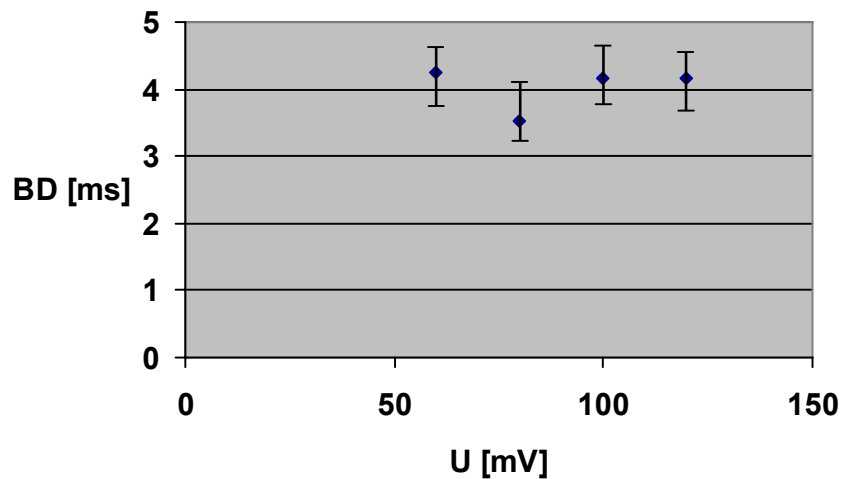


Abb. 15: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs bei der Mutation  $\epsilon 812C>T$

### 4.2.1 Burst duration

Die Messungen (n) der Burst-Öffnungszeiten der Mutation  $\epsilon 812C>T$  erbrachten bei Spannungen zwischen +60 mV und +120 mV folgende Mittelwerte für die Burst duration:

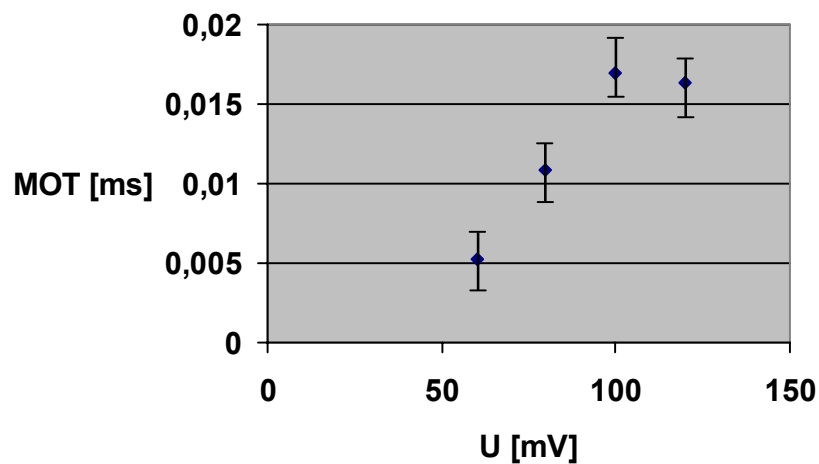


| U [mV]  | 60   | 80   | 100  | 120  |
|---------|------|------|------|------|
| n       | 2    | 4    | 13   | 13   |
| BD [ms] | 4,26 | 3,53 | 4,15 | 4,17 |
| SD +/-  | 5,56 | 3,26 | 5,45 | 9,02 |

Abb. 16: Burst duration der Mutation  $\epsilon 812C>T$

#### 4.2.2 Mean open time

Die Messungen (n) der mittleren Kanalöffnungszeit der Mutation  $\epsilon 812C>T$  erbrachten bei Spannungen zwischen +60 mV und +120 mV folgende Mittelwerte:



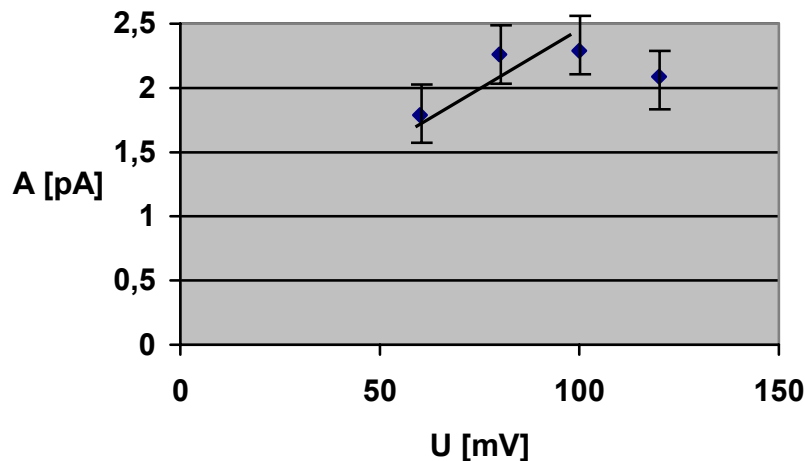
| U [mV]   | 60     | 80     | 100    | 120    |
|----------|--------|--------|--------|--------|
| n        | 2      | 4      | 13     | 13     |
| MOT [ms] | 0,0052 | 0,0109 | 0,0170 | 0,0163 |
| SD +/-   | 0,0291 | 0,0405 | 0,0540 | 0,0564 |

Abb. 17: Mean open time der Mutation  $\epsilon 812C>T$



### 4.2.3 Amplitude

Die Messungen (n) der Kanalleitfähigkeit der Mutation  $\epsilon 812C>T$  erbrachte bei Spannungen zwischen +60 mV und +120 mV die folgende slope conductance:



| U [mV]    | 60   | 80   | 100  | 120  |
|-----------|------|------|------|------|
| n         | 2    | 4    | 13   | 13   |
| Ampl [pA] | 1,79 | 2,26 | 2,29 | 2,09 |
| SD +/-    | 1,19 | 1,34 | 1,38 | 1,26 |

Abb. 18: Slope conductance der Mutation  $\epsilon 812C>T$

Die Slope conductance der Mutation  $\epsilon 812C>T$  beträgt 18 pS.

### 4.2.4 Beurteilung

Im Vergleich zum Wildtyp besteht bei der Mutation  $\epsilon 812C>T$  eine verlängerte Burst duration von 4,15 ms ( $\pm 5,45$  ms) bei 100 mV und eine deutlich verlängerte mittlere Kanalöffnungsdauer von 0,170 ms ( $\pm 0,054$  ms), so dass bei dieser Konstellation von einem Slow channel-Charakter ausgegangen werden kann. Die Amplitudenauswertung der Einzelkanalmessungen erbrachte eine slope conductance von 18 pS.

### 4.3 Mutation $\epsilon 1304\text{del}3$

Ausgewertet wurden die Messungen (n) von 54 Zellen mit insgesamt 169.733 Kanalöffnungen, die zu 8597 Bursts gruppiert waren.

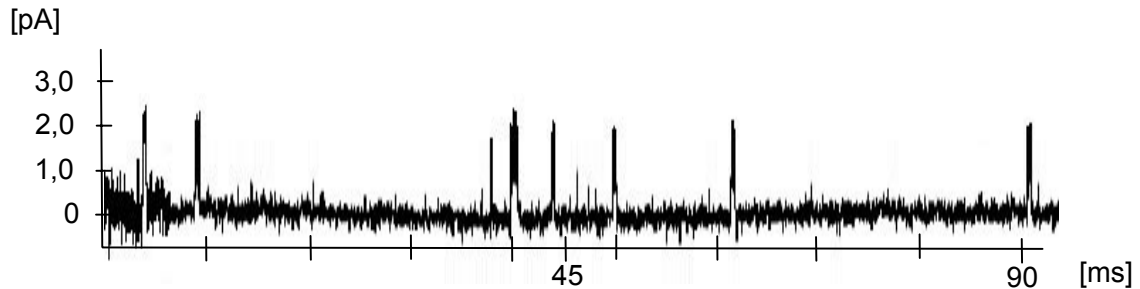
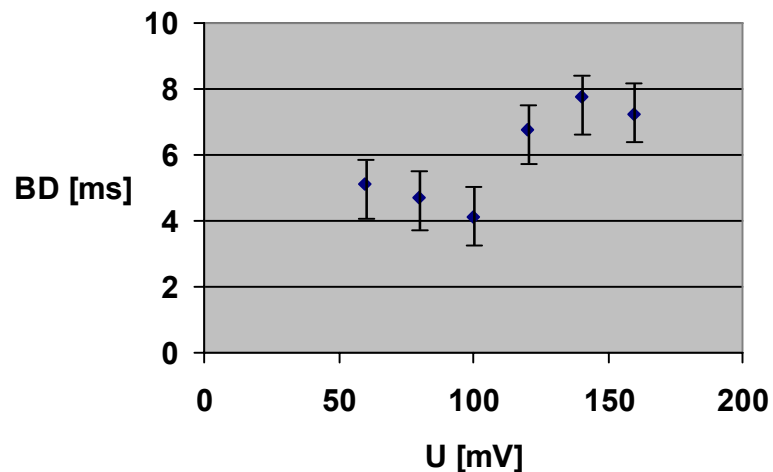


Abb. 19: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs bei der Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$

#### 4.3.1 Burst duration

Die Messungen der Burst-Öffnungszeiten der Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$  erbrachten bei Spannungen zwischen +60 mV und +160 mV folgende Mittelwerte für die Burst duration:

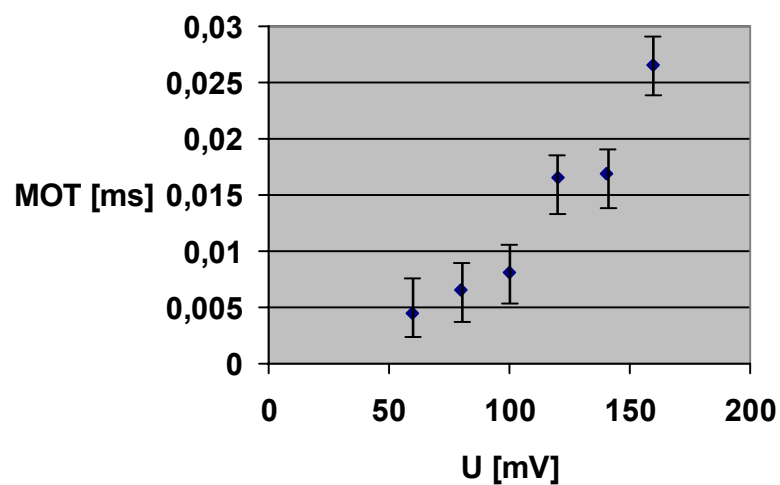


| U [mV]  | 60    | 80    | 100   | 120    | 140    | 160   |
|---------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|
| n       | 9     | 13    | 12    | 18     | 9      | 2     |
| BD [ms] | 5,10  | 4,71  | 4,11  | 6,78   | 7,78   | 7,23  |
| SD +/-  | 7,544 | 5,361 | 5,140 | 10,879 | 19,721 | 6,231 |

Abb. 20: Burst duration der Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$

### 4.3.2 Mean open time

Die Messungen (n) der mittleren Kanalöffnungszeit der Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$  erbrachten bei Spannungen zwischen +60 mV und +160 mV folgende Mittelwerte:

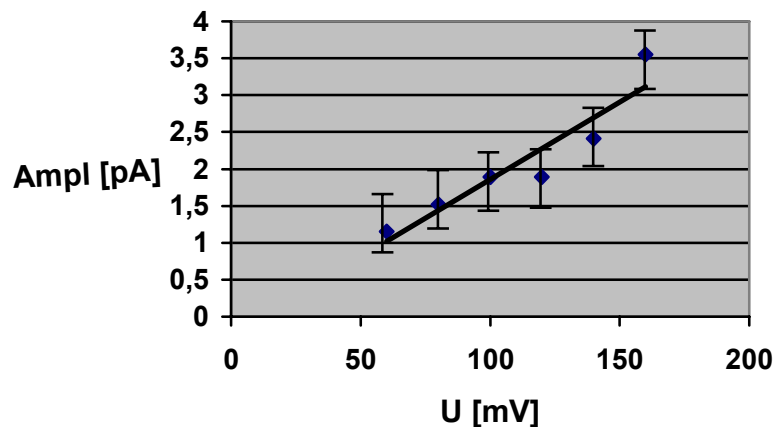


| U [mV]   | 60     | 80     | 100    | 120    | 140    | 160    |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| n        | 9      | 13     | 12     | 18     | 9      | 2      |
| MOT [ms] | 0,0044 | 0,0066 | 0,0081 | 0,0165 | 0,0169 | 0,0266 |
| SD +/-   | 0,0240 | 0,0573 | 0,0294 | 0,0617 | 0,0684 | 0,0774 |

Abb. 21: Mean open time der Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$

### 4.3.3 Amplitude

Die Messungen (n) der mittleren Kanalleitfähigkeit der Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$  erbrachten bei Spannungen zwischen +60 mV und +160 mV die folgende slope conductance:



| U [mV]    | 60   | 80   | 100  | 120  | 140  | 160  |
|-----------|------|------|------|------|------|------|
| n         | 9    | 13   | 12   | 18   | 9    | 2    |
| Ampl [pA] | 1,15 | 1,52 | 1,89 | 1,89 | 2,41 | 3,55 |
| SD +/-    | 0,86 | 0,81 | 1,02 | 0,94 | 1,19 | 1,85 |

Abb. 22: Slope conductance der Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$

Die slope conductance der Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$  beträgt 20 pS.

### 4.3.4 Beurteilung

Im Vergleich zum Wildtyp besteht bei der Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$  eine verkürzte mittlere Kanalöffnungsdauer von 0,0081 ms ( $\pm 0,0294$  ms) bei 100 mV und eine Burst duration von 4,11 ms ( $\pm 5,14$  ms), so dass bei dieser Konstellation von einem Fast channel-Charakter ausgegangen werden kann. Die Amplitudenauswertung der Einzelkanalmessungen erbrachte eine slope conductance von 20 pS.

#### 4.4 Mutation $\epsilon 392\text{del}3$

Ausgewertet wurden Messungen (n) von 48 Zellen mit insgesamt 200.718 Kanalöffnungen, die zu 7902 Bursts gruppiert waren.

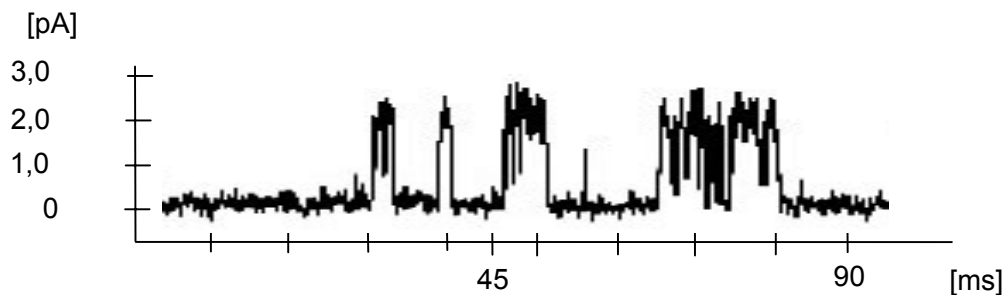
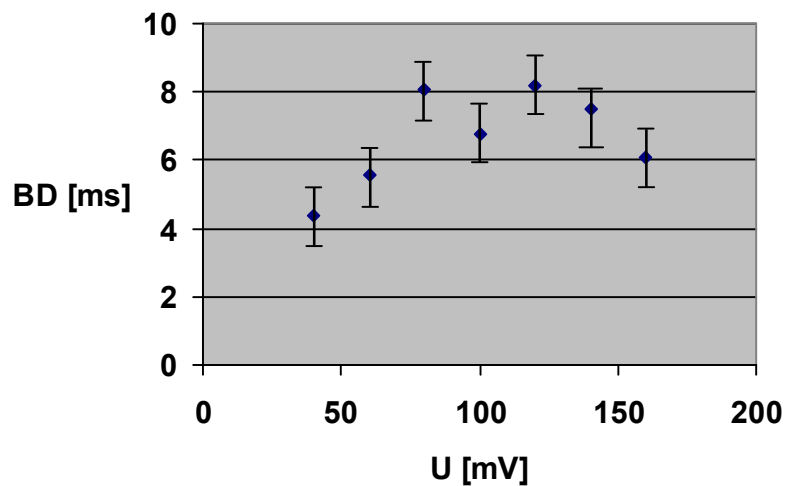


Abb. 23: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs bei der Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$

##### 4.4.1 Burst duration

Die Messungen der Burst-Öffnungszeiten der Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$  erbrachten bei Spannungen zwischen +40 mV und +160 mV folgende Mittelwerte für die Burst duration:

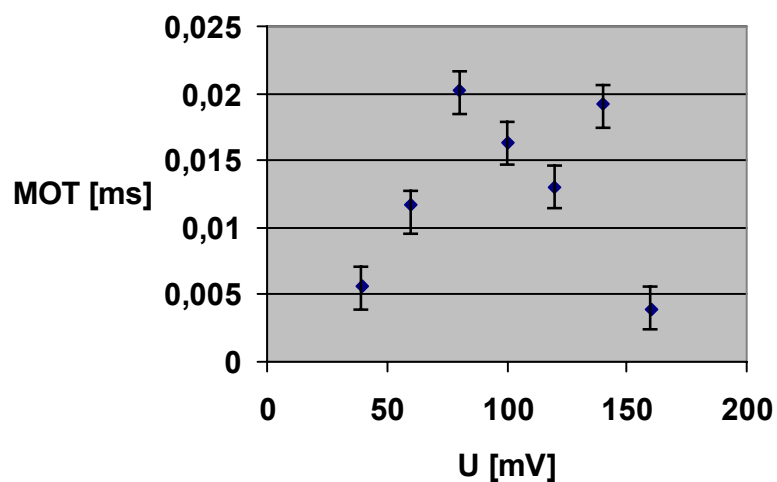


| U [mV]  | 40   | 60   | 80    | 100   | 120   | 140   | 160  |
|---------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|
| n       | 2    | 13   | 23    | 13    | 11    | 7     | 3    |
| BD [ms] | 4,4  | 5,59 | 8,04  | 6,76  | 8,18  | 7,52  | 6,08 |
| SD +/-  | 5,97 | 7,91 | 11,35 | 11,90 | 13,44 | 11,70 | 6,40 |

Abb. 24: Burst duration der Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$

#### 4.4.2 Mean open time

Die Messungen (n) der mittleren Kanalöffnungszeit der Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$  erbrachten bei Spannungen zwischen +40 mV und +160 mV folgende Mittelwerte:

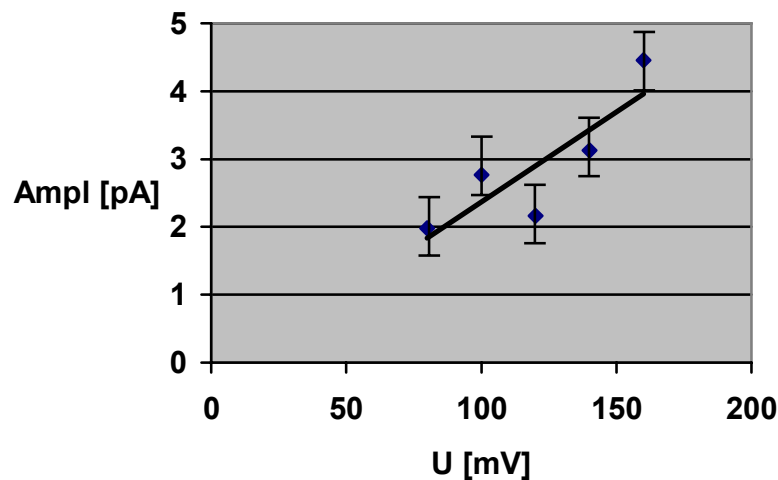


| U [mV]   | 40     | 60     | 80     | 100    | 120    | 140    | 160    |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| n        | 2      | 13     | 23     | 13     | 11     | 7      | 3      |
| MOT [ms] | 0,0057 | 0,0117 | 0,0203 | 0,0164 | 0,0130 | 0,0192 | 0,0039 |
| SD +/-   | 0,0291 | 0,0458 | 0,0759 | 0,0592 | 0,0547 | 0,0826 | 0,0472 |

Abb. 25: Mean open time der Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$

### 4.4.3 Amplitude

Die Messungen (n) der mittleren Kanalleitfähigkeit der Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$  erbrachten bei Spannungen zwischen +40 mV und +160 mV die folgende slope conductance:



| U [mV]    | 80   | 100  | 120  | 140  | 160  |
|-----------|------|------|------|------|------|
| n         | 23   | 13   | 11   | 7    | 3    |
| Ampl [pA] | 1,98 | 2,77 | 2,16 | 3,13 | 4,46 |
| SD +/-    | 1,35 | 1,47 | 3,00 | 1,93 | 1,98 |

Abb. 26: Slope conductance der Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$

Die slope conductance der Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$  beträgt 27 pS.

### 4.4.4 Beurteilung

Im Vergleich zum Wildtyp besteht bei der Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$  eine deutlich verlängerte Burst duration auf 6,67 ms bei 100 mV und einer mittleren Kanalöffnungsdauer von 0,0164 ms, so dass dieser Konstellation ein Slow channel-Charakter zugesprochen werden kann. Die Leitfähigkeit liegt bei 27 pS.

#### 4.5 Mutation $\epsilon 652C>T$

Ausgewertet wurden Messungen (n) von 34 Zellen mit insgesamt 145.694 Kanalöffnungen, die zu 5669 Bursts gruppiert waren.

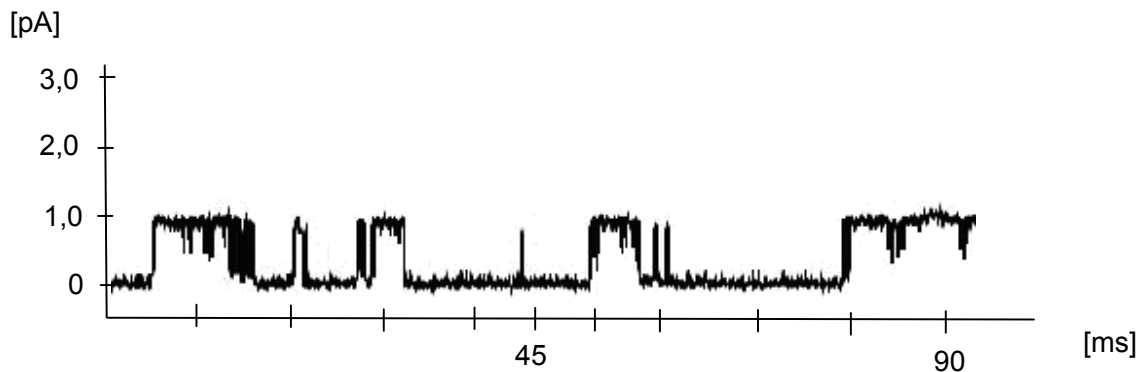
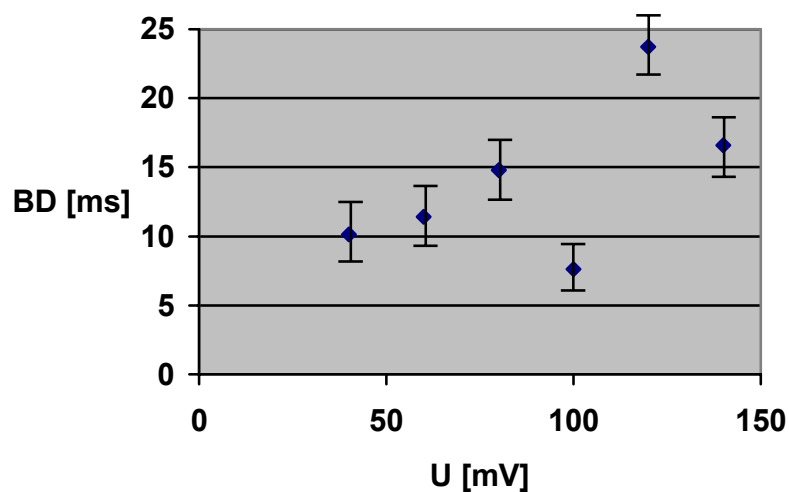


Abb. 27: Kanalöffnungsverhalten des nAChRs bei der Mutation  $\epsilon 652C>T$

##### 4.5.1 Burst duration

Die Messungen der Burst-Öffnungszeiten der Mutation  $\epsilon 652C>T$  erbrachten bei Spannungen zwischen +40 mV und +140 mV folgende Mittelwerte für die Burst duration:



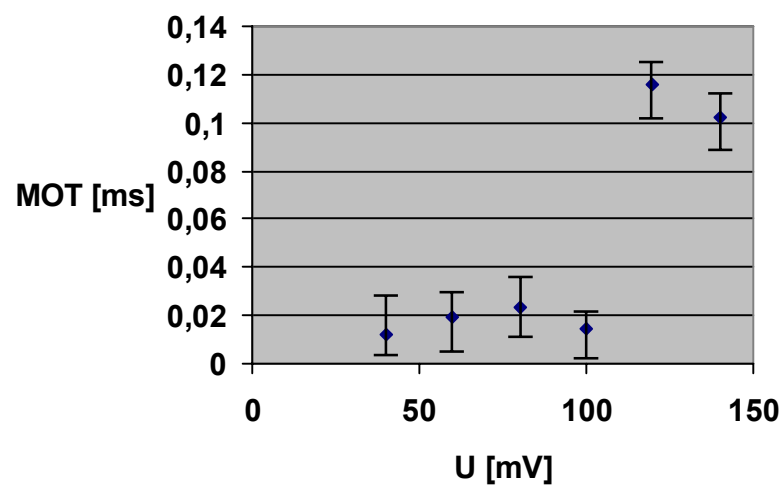
| U [mV]  | 40    | 60    | 80    | 100   | 120   | 140   |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| n       | 2     | 9     | 10    | 6     | 9     | 5     |
| BD [ms] | 10,15 | 11,41 | 14,78 | 7,61  | 23,71 | 16,6  |
| SD +/-  | 9,56  | 27,21 | 20,50 | 10,75 | 40,78 | 38,09 |

Abb. 28: Burst duration der Mutation  $\epsilon 652C>T$



#### 4.5.2 Mean open time

Die Messungen (n) der mittleren Kanalöffnungszeit der Mutation  $\epsilon 652C>T$  erbrachten bei Spannungen zwischen +40 mV und +140 mV folgende Mittelwerte:

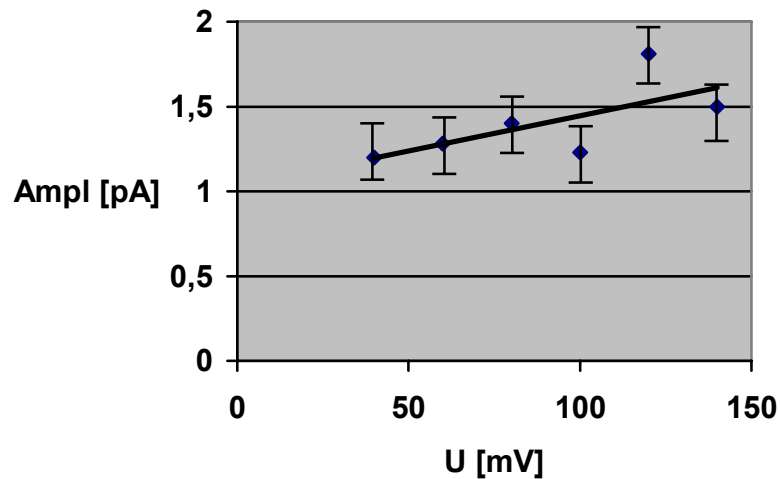


| U [mV]   | 40     | 60     | 80     | 100    | 120    | 140    |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| n        | 2      | 9      | 10     | 6      | 9      | 5      |
| MOT [ms] | 0,0118 | 0,0197 | 0,0236 | 0,0147 | 0,1161 | 0,1023 |
| SD +/-   | 0,0479 | 0,1024 | 0,0763 | 0,0694 | 0,1866 | 0,1594 |

Abb. 29: Mean open time der Mutation  $\epsilon 652C>T$

### 4.5.3 Amplitude

Die Messungen (n) der mittleren Kanalleitfähigkeit der Mutation  $\epsilon 652C>T$  erbrachten bei Spannungen zwischen +40 mV und +140 mV die folgende slope conductance:



| U [mV]    | 40   | 60   | 80   | 100  | 120  | 140  |
|-----------|------|------|------|------|------|------|
| n         | 2    | 9    | 10   | 6    | 9    | 5    |
| Ampl [pA] | 1,20 | 1,28 | 1,40 | 1,23 | 1,81 | 1,50 |
| SD +/-    | 0,70 | 0,70 | 0,63 | 0,64 | 0,78 | 0,84 |

Abb. 30: Slope conductance der Mutation  $\epsilon 652C>T$

Die slope conductance der Mutation  $\epsilon 652C>T$  beträgt 4 pS.

### 4.5.4 Beurteilung

Im Vergleich zum Wildtyp besteht bei der Mutation  $\epsilon 652C>T$  eine deutlich verlängerte Burst duration auf 7,61 ms bei 100 mV und einer mittleren Kanalöffnungsdauer von 0,0147 ms, so dass dieser Konstellation ein Slow channel-Charakter zugesprochen werden kann. Die Leitfähigkeit liegt bei 4 pS.

#### **4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Bei den Patch Clamp-Messungen der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen konnten zusammenfassend folgende Ergebnisse erarbeitet werden:

Die Mutationen  $\epsilon$  812C>T,  $\epsilon$ 392del3 und  $\epsilon$ 652C>T sind aufgrund ihrer verlängerten Öffnungszeiten und Burst duration den SCCMS-Mutationen zuzuordnen. Ihre Genloci befinden sich auf den Abschnitten, die für die ACh-Bindungsstellen oder den transmembranösen porenbildenden Anteil kodieren. Sie führen zu strukturellen Abweichungen, die eine veränderte Kinetik mit einer verlängerten MOT zur Folge haben.

Die Mutation  $\epsilon$ 1304del3 weist eine deutlich verkürzte mittlere Kanalöffnungsdauer als der Wildtyp-Kanal auf. Durch das Auftreten dieser Mutation kommt es zu Veränderungen im extracellulären Anteil des nAChRs, der eine verkürzte Öffnung mit geringerem Ionendurchfluss zur Folge hat.

## 5 Diskussion

Kongenitale myasthene Syndrome stellen in ihrer klinischen Ausprägung und ihrem Manifestationszeitpunkt eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar<sup>12,19,39</sup>. Das Auftreten von belastungsabhängigen Symptomen wie Ptosis, Extensorenchwäche der Hände oder infektgetriggerte Dyspnoe kann bereits im frühen Kindesalter erfolgen oder, meist in abgeschwächter Form, beim adulten Patienten als *Late Onset*-Erkrankung manifest werden<sup>22,26,39,74</sup>. Gemeinsam ist allen Formen der myasthenen Syndrome eine Störung der Reizweiterleitung an der NMJ, die durch eine veränderte Kinetik des nAChR entstehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Patch Clamp-Technik auf Einzelkanalniveau die kinetische Charakterisierung von vier neuen Mutationen der  $\epsilon$ -Untereinheit des nAChR dargestellt werden. Dabei fanden sich Veränderungen des Kanalöffnungsverhaltens im Sinne von Slow- und Fast channel-Verhalten.

Im Folgenden sollen die erarbeiteten Ergebnisse im Kontext mit der vorliegenden Literatur besprochen werden.

### 5.1 Patch Clamp-Messungen an HEK 293-Zellen

Bei den in dieser wie auch in vielen anderen Arbeiten dieser Art verwendeten Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (HEK 293). Die mittels des menschlichen Adenovirus 5 künstlich transformierte Epithelzellreihe wächst adhärent unter Serumzugabe und eignet sich besonders gut zur Untersuchung von Zelleigenschaften wie z.B. der Kanalkinetik. Der besondere Vorteil dieser Zellreihe ist neben der schnellen Teilungsrate die einfache DNA-Transfektion mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe oder unter Verwendung spezieller Plasmide<sup>40,46</sup>. Die Markierung erfolgreich transfizierter Zellen mittels grün fluoreszierendem Protein (GFP) ermöglicht im vorliegenden Fall die gesonderte Untersuchung von Kanälen mit mutierten Untereinheiten.

---

Bei der Beurteilung der Ergebnisse sollte beachtet werden, dass die Fluoreszenz nur die erfolgreiche Transfektion einer Zelle mit mutierter DNA anzeigt, die korrekte Kanalzusammensetzung ( $\alpha_2\beta\delta\varepsilon$ ) aber nicht immer gegeben sein muss, wodurch Kanäle mit grundsätzlich veränderter Struktur und Kinetik entstehen können.

Wie bereits ausführlich in Kapitel 2.3 erörtert, handelt es sich bei der Patch Clamp-Methodik um ein sehr gutes, jedoch auch stör anfälliges System. Bereits geringe Änderungen können deutliche Messungenauigkeiten ergeben. Gerade im Bereich höherer Spannungen ( $> 120$  mV) zeigten sich Schwankungen, die durch die unphysiologisch hohe Erregung der Zellen zu veränderten Ergebnissen führen können. Die zu erwartende lineare Strom-Spannungs-Beziehung war in diesen Fällen nicht mehr exakt nachzuweisen.

Auch bei starkem Rauschen durch hohe Grundaktivität der Zellen ist eine genaue Auswertung der Einzelkanalströme erschwert. Niederamplitudige Kanalöffnungen sind dann oft trotz Filter nicht mehr eindeutig zu erkennen.

Durch das Durchführen der Messungen in einer störungsarmen Umgebung unter Benutzung eines Faraday'schen Käfigs wurden äußere Beeinflussungen minimiert. Trotzdem waren externe elektrische Störungen, wie z.B. durch elektrische Geräte oder Leitungen, zum Teil nicht vollständig abzuschirmen.

---

## 5.2 *Untersuchte Mutationen*

Die durch Mutationen hervorgerufenen Veränderungen von Genen auf der Desoxyribonucleinsäure (DNA) beeinflussen die Transkription zu Ribonucleinsäure (RNA) oder behindern die weitere Zusammensetzung der kodierenden Exons zu messenger RNA (mRNA). Die im Anschluss erfolgende Proteinbildung (Translation) ist dann in vielen Fällen gestört. Im Falle von CMS resultiert hieraus eine gestörte Struktur und Kinetik des nAChR-Kanals.

Man unterscheidet die auftretenden Mutationen nach deren ursächlicher Wirkungsweise. Verschiebt sich beispielsweise das normale Triplet-Basenleseraster durch Deletion (= Auslassen einer Base) oder Insertion (= Hinzufügen einer Base), so spricht man von einer *Frameshift-Mutation*. Frameshift-Mutationen werden wiederum in *Out of frame*- und *In frame*-Mutationen, wie zum Beispiel die im Experiment verwendeten Mutationen  $\epsilon 1304\text{del}3$  oder  $\epsilon 392\text{del}3$ , unterteilt. Die Besonderheit der In-frame-Mutationen besteht in dem weiterhin korrekt ablaufenden Leseraster, da nicht nur eine, sondern drei Basen oder ein Vielfaches davon ausfallen und somit die Triplet-Form der DNA gewahrt bleibt. Dadurch kann ein Protein kodiert werden, dem eine Restfunktion des ursprünglichen Eiweißes erhalten geblieben ist. Bei Out of frame-Veränderungen hingegen entsteht kein funktionstüchtiges Endprodukt.

Wird eine Base nicht ausgelassen, sondern bei der Translation durch eine andere Base ersetzt, kann dies eine *stille*, eine *Nonsense*- oder eine *Missense*-Mutation zur Folge haben. Bei der stillen oder auch stummen Mutation besteht trotz neu eingesetzter Base die regelhafte Codierung für ein Protein. Dies ist aufgrund der teils mehrfach bestehenden unterschiedlichen Codierungen für eine einzigen Aminosäure möglich.

Nonsense-Mutationen zeichnen sich durch die Entstehung von *Stoppcodons* durch den Basenaustausch aus. Dies führt zu einem Abbruch der Translation oder bei Mutationen im Bereich der Introns zu Fehlern beim Splicing und somit bei der Entstehung der mRNA. Eine Missense-Mutation verursacht durch den Einbau einer neuen Base anstelle der ursprünglichen Base ein funktionsuntüchtiges Protein. Dies ist zum Beispiel bei den in dieser Arbeit untersuchten Mutationen  $\epsilon 812>T$  und  $\epsilon 652C>T$  durch den Ersatz von Alanin durch Valin, bzw. von Arginin durch Tryptophan, der Fall.

---

Im Folgenden sollen die Auswirkungen der in dieser Arbeit untersuchten neuen Mutationen auf das Kanalöffnungsverhalten des nAChRs erörtert werden. Bereits erforschte Mutationen können dabei einen Anhalt für die mögliche Pathophysiologie auf der molekularen Ebene geben.

### 5.2.1 $\epsilon 812C>T$

Bei dieser Mutation wurden Einzelkanalcharakteristika im Sinne eines SCCMS gemessen. Die Mutation  $\epsilon 812C>T$  wirkt sich auf den transmembranösen Anteil des nAChR aus. Durch ihren Locus auf der porenbildenden Domäne M2 führt sie durch das Ersetzen eines Alanins durch Valin im abschließenden transmembranösen Anteil der Domäne wohl zu einer Veränderung der strukturellen Porenbeschaffenheit. Wie bereits von anderen Mutationen bekannt, kann der Austausch von Aminosäuren zu einer Änderung des transmembranösen Kanalanteils führen, so dass eine veränderte Permeabilität für unterschiedliche Ionen entsteht.<sup>16,20,36,55,73</sup> Dies beruht vermutlich darauf, dass durch eine neu eingebrachte Aminosäure der hydrophobe Charakter der Kanalpore abgeschwächt werden kann. Durch das Auseinanderweichen der hydrophoben, in das Porenolumen hineinragenden Seitenketten der Aminosäuren wird der Durchmesser der Öffnung erweitert und so der Durchtritt für Ionen erleichtert. Zudem verlangsamen Mutationen in der M2-Region zu einem verlangsamt Porenschluss<sup>27,61,73</sup>. Ebenfalls beschrieben wurden Mutationen der M2-Domäne, die zu einer erhöhten Affinität des nAChRs zu ACh führten<sup>20</sup>.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse lassen die Ergebnisse unserer experimentellen Untersuchungen der Mutation  $\epsilon 812C>T$  in dieser Arbeit vermuten, dass solche Mechanismen auch in diesem Fall eine tragende Rolle spielen könnten. Der Slow channel Charakter der Mutation wäre somit zu erklären.

### 5.2.2 $\epsilon 1304\text{del}3$

Bei dieser In Frame-Mutation ergaben die Messungen Einzelkanalcharakteristika im Sinne eines FCCMS. Die Kanalöffnungen sind deutlich verkürzt durch das schnelle Abdissoziieren der Transmitter-Moleküle und die verringerte Stabilität des AChR<sup>78</sup>.

Das durch die Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$  ausgelöste Fehlen von drei Basenpaaren auf dem Exon 12 verursacht eine Deletion der Aminosäure Asparagin im Bereich der Domänengrenze M3/M4 im extracellulären Anteil des nAChRs. An dieser cytoplasmatischen Schleife führt die Veränderung zu einer verringerten Stabilität des Kanalaufbaus<sup>78,93</sup>.

Bereits in anderen Arbeiten wurde beschrieben, dass Mutationen im Bereich der langen cytoplasmatischen Schleife zwischen M3 und M4 sowohl zu einer verminderten Expression von AChR an der motorischen Endplatte (sog. Low-Expressor-Mutation) als auch zu kinetischen Veränderungen im Sinne eines Fast-Channel-Syndroms führt<sup>60</sup>.

Dies beruht einerseits auf der entstehenden Instabilität zwischen den Domänen M3 und M4, andererseits auch auf der dadurch beeinträchtigten Verbindung der benachbarten Untereinheiten  $\alpha$  und  $\epsilon$ , wodurch eine abnorme Kinetik entsteht<sup>21</sup>. Neben der mangelnden Stabilität des mutierten Kanals kommt es zu einer verminderten Expression des nAChRs auf der Zelloberfläche, was zu einem kompensatorischen Auftreten der fetalen Rezeptorform  $\alpha_2\beta\delta\gamma$  führt<sup>21,78</sup>.

Bei der untersuchten Mutation  $\epsilon 1304\text{del}3$  ist ein Fast channel-Charakter festzustellen. Nachdem sich die aufgetretene Deletion an dem für die Kanalstabilität äußerst wichtigen M3-M4 Loop auswirkt, kann gemutmaßt werden, dass die deutlich verkürzten Öffnungszeiten der mutierten AChR ebenfalls auf eine bestehende Instabilität der Rezeptorstruktur zurückzuführen sind.



### 5.2.3 $\epsilon 392\text{del}3$

Bei dieser Mutation haben wir Einzelkanalcharakteristika im Sinne eines SCCMS gemessen.

Im Bereich des durch eine Disulfidbrücke (welche von zwei Cysteinen gebildet wird) gebildeten Loops im extracellulären,  $\text{NH}_2$ -nahen Abschnitt der  $\epsilon$ -Untereinheit liegt die In Frame-Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$ . Es wurden bereits vielfach Mutationen in diesem Bereich beschrieben, die ein SCCMS auslösen <sup>29</sup>. Durch die Deletion eines Basentriplets kommt es bei der hier untersuchten Mutation zum Ausfall der Glutaminsäure.

Ebenso wie die Mutation  $\epsilon 652\text{C}>\text{T}$  befindet sich die Mutation  $\epsilon 392\text{del}3$  in der Region der  $\epsilon$ -Untereinheit, die zusammen mit der  $\alpha$ -Untereinheit die ACh-Bindungsstelle bildet. Auch bei dieser Mutation liegt ein Slow channel-Verhalten vor, so dass die Hypothese naheliegend ist, dass die Deletion des Glutamats ebenfalls eine strukturelle Veränderung in der Bindungsregion erzeugt, die eine erhöhte Affinität des Rezeptors für seinen Transmitter zur Folge hat.

### 5.2.4 $\epsilon 652\text{C}>\text{T}$

Die Mutation  $\epsilon 652\text{C}>\text{T}$  ergab bei den Einzelkanalmessungen Charakteristika im Sinne eines SCCMS.

Die Aktivierung des AChRs an der postsynaptischen Membran der NMJ wird durch Bindung von zwei Molekülen ACh ausgelöst. Die Bindungsstellen im Rezeptor werden von den extracellulär gelegenen Anteilen der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\delta$ , bzw.  $\alpha$  und  $\epsilon$  gebildet. Umgestaltungen in der Struktur dieser Areale führen zu Veränderungen der ACh-Bindungsstellen und dadurch zu einer Verminderung oder Verstärkung der Affinität zu einem Transmitter <sup>15,72,97</sup>. Die bei einer erhöhten Transmitter-Affinität auftretenden wiederholten Öffnungen des Kanals während der ACh-Bindung ermöglichen den vermehrten Durchtritt von Ionen, die zu einem Depolarisationsblock führen können <sup>82</sup>.

---

Durch die Mutation  $\epsilon 652C>T$  kommt es zum Austausch eines Arginins gegen Tryptophan im extracellulären Anteil zwischen der transmembranösen M1-Domäne und dem  $NH_2$ -Ende der  $\epsilon$ -Untereinheit. Die ACh-Bindungsstelle kann dadurch strukturell und in ihrer Affinität verändert sein. Die untersuchten Kanäle mit dieser Mutation weisen einen Slow channel-Charakter auf, was durch eine erhöhte Affinität des Rezeptors zu ACh und eine daraus resultierende längere Kanalöffnungszeit erklärbar wäre.

---

### **5.3 Relevanz der Ergebnisse für Diagnostik und Therapie von CMS**

Die große Variabilität der Symptome und das relativ seltene Auftreten der verschiedenen Unterformen der CMS machen diese Krankheitsbilder zu einer großen diagnostischen und therapeutischen Herausforderung. Der Leidensdruck der Patienten, die oft sehr lange Zeit auf eine sichere Diagnose verbunden mit einer adäquaten Therapie warten müssen, kann erheblich sein, vor allem wenn schwerwiegende klinische Symptome auftreten. Hinzu kommt die Bedeutung der Diagnose für bislang asymptomatische Geschwister des Betroffenen: da die Möglichkeit einer Late Onset-Symptomatik besteht, ist hier eine molekulargenetische Testung auch bei unauffälliger Klinik angeraten.

Je nach Lokalisation des Defektes im Bereich der neuromuskulären Endplatte unterscheiden sich die einzelnen Unterformen der CMS hinsichtlich Verlauf, Prognose, Vererbbarkeit und Behandlungsmöglichkeiten, so dass eine exakte Zuordnung zu einer molekulargenetischen Abnormität von großem diagnostischen und therapeutischen Nutzen ist.

Verschiedene elektrophysiologische Untersuchungen geben einen Einblick in die Pathophysiologie der kongenitalen myasthenen Syndrome und ihrer klinischen Ausprägung. Mittels Patch Clamp-Analyse können jedoch auf Zellebene die Auswirkungen von Mutationen im Bereich der nAChR-Untereinheiten auf das Kanalöffnungsverhalten exakt untersucht werden. Die Zuordnung der von neuen Mutationen hervorgerufenen Erkrankungen zu einer definierten Fast- oder Slow channel-CMS-Subgruppe wird somit möglich und erleichtert im klinischen Alltag die Entscheidung der Medikamentenauswahl zur Behandlung des betroffenen Patienten. Auch werden durch die pathophysiologischen Zusammenhänge neue Ansatzpunkte für pharmakologische Therapieoptionen offensichtlich.

Im Gegensatz zu der früher notwendigen Intercostalmuskel-Biopsie ist heute die Diagnostik mittels molekulargenetischer Tests aus Blutproben deutlich erleichtert. Besteht aufgrund klinischer Symptome der dringende Verdacht auf eine angeborene Muskelschwäche des CMS-Formenkreises, kann durch Untersuchungen der am häufigsten von Mutationen betroffenen Genloci oftmals eine gesicherte Diagnose gestellt werden.

---

Durch die Erforschung neuer Mutationen können diese Analysen ausgeweitet und somit sukzessive der Katalog der potentiellen veränderten DNA-Abschnitte vervollständigt werden.

In mehreren Studien wurde bereits der Zusammenhang zwischen vorliegendem Phänotyp und molekulargenetisch festgestelltem Genotyp untersucht<sup>4,7,17,65,91</sup>. Die Problematik bei diesen klinischen Studien ergibt sich zu allererst durch das relativ seltene Auftreten der CMS. Isolierte Mutationen finden sich zudem häufig nur in einem einzelnen untersuchten Individuum oder einer Familie. Zeigt sich eine Mutation in mehreren Patienten, so tritt sie häufig in heterozygoten Formen oder kombiniert mit einer zweiten compound-heterozygoten Mutation auf. Sogar bei betroffenen Geschwistern mit demselben Genotyp kann die Ausprägung der klinischen Symptomatik erheblich in ihrem Schweregrad variieren. Nur bei vereinzelt Mutationen konnte bislang eine ethnisch erhöhte Prävalenz festgestellt werden, so dass aufgrund der erhöhten Anzahl untersuchter Patienten eine aussagekräftige Geno-Phänotyp-Korrelation möglich ist<sup>4</sup>. In vielen Fällen kann jedoch trotz einer bestehenden klinischen Symptomatik keine Mutation auf den bisher bekannten Genloci gefunden werden, was dafür spricht, dass es noch zahlreiche weitere, bisher unerforschte Mutationen geben muss.

Molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Mehrzahl der postsynaptischen Mutationen, welche die Majorität der CMS verursachenden Mutationen bilden, die  $\epsilon$ -Untereinheit des nAChRs betreffen<sup>69</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier neue Mutationen auf dem für  $\epsilon$  kodierenden Gen CHRNE erforscht. Durch die mittels Patch Clamp untersuchten Veränderungen des Öffnungsverhaltens des mutierten nAChRs konnte eine Zuordnung der neuen Mutationen zu Slow- oder Fast channel-Subgruppen erfolgen. Bei nun bekanntem Genlocus und daraus resultierenden Veränderungen des Kanalöffnungsverhaltens kann in weiteren klinischen Studien die Zuordnung zu einem pathognomonischen Phänotypen versucht werden.

Aufgrund der Vielzahl der bisher entdeckten Mutationen, deren zum Teil gemeinsames Auftreten in einem Individuum und nicht zuletzt der großen Variabilität der resultierenden Klinik scheint eine spezifische Phänotyp-Genotyp-Korrelation als wenig wahrscheinlich.

Durch die Erweiterung des Katalogs bekannter Mutationen und ihrer Auswirkungen verbessern sich jedoch die Chancen, durch molekulargenetische Untersuchungen einen klinisch an CMS erkrankten Patienten einer exakten Untergruppe zuzuordnen und dadurch seine Therapieaussichten wesentlich zu verbessern.

## 6 Literaturnachweise

1. Fetchan Introduction. In: Axon Instruments I, editor. pCLAMP 8: User's Guide for Fetchan and pSTAT. USA: 1999: 57-70.
2. pCLAMP 8: User's Guide for Fetchan and pSTAT. USA: 1999.
3. Congenital myasthenic syndromes. MDA Quest 2001; 8(3).
4. Abicht A, Stucka R, Song IH, Kugler K, Baumgarten-Walczak A, Stier C, Pongratz D, Mortier W, Müller-Felber W, Rudel R, Lochmüller H. Genetic analysis of the entire AChR  $\epsilon$ -subunit gene in 52 congenital myasthenic families. *Acta Myologica* 2000; 19:23-28.
5. Abicht A, Lochmüller H. Kongenitale myasthene Syndrome. In: Rieß O SL, editor. *Neurogenetik*. Stuttgart: 2002: 512-516.
6. Abicht A, Müller-Felber W, Fischer P, Jakob I, Kurz L, Rudel R et al. Congenital myasthenic syndromes: clinical and genetic analysis of 18 patients. *Eur J Med Res* 1997; 2(12):515-522.
7. Abicht A, Stucka R, Schmidt C, Briguet A, Hopfner S, Song IH et al. A newly identified chromosomal microdeletion and an N-box mutation of the AChR epsilon gene cause a congenital myasthenic syndrome. *Brain* 2002; 125(Pt 5):1005-1013.
8. Abicht A, Stucka R, Song IH, Karcagi V, Kugler K, Baumgarten-Walczak A et al. Genetic analysis of the entire AChR epsilon-subunit gene in 52 congenital myasthenic families. *Acta Myol* 2000; 19:23-28.
9. Andreux F, Hantai D, Eymard B. Congenital myasthenic syndromes: phenotypic expression and pathophysiological characterisation. *Rev Neurol (Paris)* 2004; 160(2):163-176.
10. Anlar B, Ozdirim E, Renda Y, Yalaz K, Aysun S, Topcu M et al. Myasthenia gravis in childhood. *Acta Paediatr* 1996; 85:838-842.
11. Banwell BL, Ohno K, Sieb JP, Engel AG. Novel truncating RAPSN mutation causing congenital myasthenic syndrome responsive to 3,4-diaminopyridine. *Neuromuscul Disord* 2004; 14:202-207.
12. Beeson D, Hantai D, Lochmüller H, Engel AG. 126th International Workshop: Congenital Myasthenic Syndromes, 24-26 September 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2005; 15:498-512.

13. Brownlow S, Webster R, Croxen R, et al. Acetylcholine receptor delta subunit mutations underlie a fast-channel myasthenic syndrome and arthrogryposis multiplex congenita. *J Clin Invest* 2001; 108:125-130.
14. Byring RF, Pihko H, Shen XM. Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. *Neuromuscul Disord* 2002; 12:548-535.
15. Chen J, Arbach A., Akk G. Activation kinetics of recombinant mouse nicotinic acetylcholine receptors: mutations of alpha-subunit tyrosine 190 affect both binding and gating. *Biophys J* 1995; 69(3):849-859.
16. Cohen BN, Labarca C, Davidson N, Lester HA. Mutations in M2 alter the selectivity of the mouse nicotinic acetylcholine receptor for organic and alkali metal cations. *J Gen Physiol* 1992; 100(3):373-400.
17. Colomer J, Müller J, Vernet A, Nacimeinto A, Pons M, Gonzalez V, Abicht A, Lochmüller H. Dramatic, long-term improvement of a slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine. *Neuromuscul Disord* 2006; 16:329-333.
18. Colquhoun D SB. Fast events in single channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J Physiol (Lond)* 1985; 369:501-557.
19. Croxen R, Newland C, Beeson D, Oosterhuis H, Chauplannaz G, Vincent A et al. Mutation in different functional domains of the human muscle acetylcholine receptor alpha subunit in patients with slow-channel myasthenic syndrome. *Human Molecular Genetics* 1997; 6(5):767-774.
20. De Bertrand J, Galzi A, Devillers-Thiéry S, Bertrand S, Changeux JC. Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:6971-6975.
21. Ealing J, Webster R, Brownlow S, Abdelgany A, Oosterhuis H, Muntoni F et al. Mutations in congenital myasthenic syndromes reveal an subunit C-terminal cysteine, C470, crucial for maturation and surface expression of adult AChR . *Human Molecular Genetics* 2002; 11(24):3087-3096.
22. Engel AG. Myasthenic Syndromes. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology: Basic and Clinical*. New York: 1994: 1798-1835.
23. Engel AG, Franzini-Armstrong C. Myasthenic Syndromes. *Myology: Basic and Clinical* 1994; 2. Auflage:1798-1835.
24. Engel AG, Lambert EH. Congenital myasthenic syndromes. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1987; 39:91-102.

25. Engel AG, Lambert EH, Gomez MR. A new myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency, small nerve terminals, and reduced acetylcholine release. *Ann Neurol* 1977; 1(4):315-330.
26. Engel AG, Lambert EH, Mulder DM, Torres CF, Sahashi K, Bertorini TE et al. A newly recognized congenital myasthenic syndrome attributed to a prolonged open time of the acetylcholine-induced ion channel. *Ann Neurol* 1982; 11(6):553-569.
27. Engel AG, Ohno K, Milone M, Wang HL, Nakano S, Bouzat C et al. New mutations in acetylcholine receptor subunit genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 1996; 5(9):1217-1227.
28. Engel AG, Ohno K, Shen XM, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: multiple molecular targets at the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 998:138-160.
29. Engel AG, Ohno K, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: recent advances. *Arch Neurol* 1999; 56(2):163-167.
30. Engel AG, Ohno K, Sine SM. The spectrum of congenital myasthenic syndromes. *Mol Neurobiol* 2002; 26(2-3):347-367.
31. Engel AG, Ohno K, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: A diverse array of molecular targets. *J Neurocytol* 2003; 32(5-8):1017-1037.
32. Engel AG, Ohno K, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade. *Muscle Nerve* 2003; 27(1):4-25.
33. Engel AG, Ohno K, Sine SM. Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4:339-352.
34. Engel AG, Walls TJ, Nagel A, Uchitel O. Newly recognized congenital myasthenic syndromes: I. Congenital paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release. II. High-conductance fast-channel syndrome. III. Abnormal acetylcholine receptor (AChR) interaction with acetylcholine. IV. AChR deficiency and short channel-open time. *Prog Brain Res* 1990; 84:125-137.
35. Fukudome T, Ohno K, Brengman JM, Engel AG. Quinidine normalizes the open duration of slow-channel mutants of the acetylcholine receptor. *Neuroreport* 1998; 9(8):1907-1911.
36. Gomez CM, Gammack J. A leucine-to-phenylalanine substitution in the acetylcholine receptor ion channel in a family with the slow-channel syndrome. *Neurology* 1995; 45(5):982-985.



37. Gomez CM, Maselli R, Gammack J, Lasalde JA, Tamamizu S, Cornblath DR et al. A beta-subunit mutation in the acetylcholine receptor gate causes severe slow-channel syndrome. *Ann Neurol* 1996; 39:712-723.
38. Göthert M, Bönisch H, Schlicker E, Helmchen H. Psychopharmaka. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K, editors. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Jena: Urban & Fischer Verlag München, 2001: 335-374.
39. Hantai D, Richard P, Koenig J, Eymard B. Congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Neurol* 2004; 17(5):539-551.
40. Harald zur Hausen. Induction of specific chromosomal aberrations by Adenovirus Typ 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol* 1967; 1(6):1174-1185.
41. Harper CM. Electrodiagnosis of endplate disease. In: Engel AG, editor. *Myasthenia gravis and myasthenic disorders*. New York: Oxford University Press, 2002: 65-84.
42. Harper CM, Engel AG. Quinidine sulfate therapy for the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 1998; 43(4):480-484.
43. Harper CM, Engel AG. Treatment of 31 congenital myasthenic syndrome patients with 3,4-diaminopyridine. *Neurology* 2000; 58(3):A395.
44. Harper CM, Fukudome T, Engel AG. Treatment of slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine. *Neurology* 2003; 60(10):1710-1713.
45. Hart ZH, Lambert EH, Engel AG, Lindstrom JM. A congenital familial myasthenic syndrome caused by a presynaptic defect of transmitter resynthesis or mobilisation. *Neurology* 1979; 29:556-557.
46. Harvey M.Schein et al. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. Morphology and growth characteristics. *PNAS* 1962; 48:1164-1172.
47. Hoch W, McConville J, Helms S, et al. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001; 7:365-368.
48. Hucho F, Tsetlin VI, Machold J. The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 1996; 239:539-557.
49. Hutchinson DO, Walls TJ, Nakano S, Camp S, Taylor P, Harper CM et al. Congenital endplate acetylcholinesterase deficiency. *Brain* 1993; 116 ( Pt 3):633-653.

- 
50. Jahn K, Mohammadi B, Krampfl K, Abicht A, Lochmüller H, Bufler J. Deactivation and desensitization of mouse embryonic- and adult-type nicotinic receptor channel currents. *Neuroscience Letters* 2001; 307:89-92.
  51. Karlin A, Akabas MH. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 1995; 15:1231-1244.
  52. Klinke R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie*. 2nd ed. 2000.
  53. Koch HJ. 3-Aminopyridin und 3,4-Diaminopyridin. *Österreichische Apotheker Zeitung* 2004; 12/04.
  54. Kraner S, Laufenberg I, Strassburg HM, Sieb JP, Steinlein OK. Congenital myasthenic syndrome with episodic apnea in patients homozygous for a CHAT missense mutation. *Arch Neurol* 2003; 60(5):761-763.
  55. Meaton J, Labarca C, Eterovi VA: M2 mutations of the nicotinic acetylcholine receptor increase the potency of the non-competitive inhibitor phencyclidine. *Journal of Neuroscience Research* 2000; 61(1):44-51.
  56. Maselli R, Chen D, Mo D, Bowe C, Fenton G, Wollmann RL. Choline acetyltransferase mutations in myasthenic syndrome due to deficient acetylcholine resynthesis. *Muscle Nerve* 2003; 27:180-187.
  57. Mergler S. *Patch Clamp Technik*. 2006.  
Ref Type: Internet Communication
  58. Middleton LT. 34th ENMC International Workshop: Congenital myasthenic syndromes, 10-11 June 1995. *Neuromuscul Disord* 1996; 6(2):133-136.
  59. Milone M, Hutchinson DO, Engel AG. Patch-clamp analysis of the properties of acetylcholine receptor channels at the normal human endplate. *Muscle Nerve* 1994; 17(12):1364-1369.
  60. Milone M, Ohno K, Fukudome T, Shen XM, Brengman J, Griggs RC et al. Congenital myasthenic syndrome caused by novel loss-of-function mutations in the human AChR epsilon subunit gene. *Ann N Y Aca Sci* 1998; 841:184-188.
  61. Milone M, Wang HL, Ohno K, Fukudome T, Pruitt JN, Bren N et al. Slow-channel syndrome caused by enhanced activation, desensitization and agonist binding affinity due to mutation in the M2 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit. *J Neurosci* 1997; 17:5651-5665.
  62. Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S et al. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 1986; 321:406-411.

- 
63. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 2003; 423:949-955.
  64. Mora M, Lambert EG, Engel AG. Synaptic vesicle abnormality in familial infantile myasthenia. *J Neurol* 1987; 37:206-214.
  65. Müller JS, Stucka R, Neudecker S, Zierz S, Schmidt C, Huebner A, Lochmüller H, Abicht A. Characterization of a novel splicing mutation leading to a congenital myasthenic syndrome. *Neurology* 2005; 65:463-466.
  66. Nichols P, Croxen R, Vincent A, Rutter R, Hutchinson M, Newsom-Davis J et al. Mutation of the acetylcholine receptor epsilon-subunit promoter in congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 1999; 45(4):439-443.
  67. Numberger M, Draguhn A. Patch-Clamp-Technik. 1 ed. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1996.
  68. Ohno K, Brengman JM, Felice KJ, Cornblath DR, Engel AG. Congenital end-plate acetylcholinesterase deficiency caused by a nonsense mutation and an A-->G splice-donor-site mutation at position +3 of the collagenlike-tail-subunit gene (COLQ): how does G at position +3 result in aberrant splicing? *Am J Hum Genet* 1999; 65(3):635-644.
  69. Ohno K, Engel AG. Congenital myasthenic syndromes: gene mutations. *Neuromuscul Disord* 2002; 12:807-811.
  70. Ohno K, Engel AG. Congenital myasthenic syndromes: genetic defects of the neuromuscular junction. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2002; 2(1):78-88.
  71. Ohno K, Engel AG, Brengman JM, Shen XM, Heidenreich F, Vincent A et al. The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol* 2000; 47(2):162-170.
  72. Ohno K, Wang HL, Milone M, Bren N, Brengman JM, Nakano S et al. Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron* 1996; 17(1):157-170.
  73. Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, Brengman JM, Bouzat C, Sine SM, Engel AG. Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the epsilon subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:758-762.
  74. Oosterhuis H, Newsom-Davis J, Wokke J. The slow channel syndrome. Two new cases. *Brain* 1987; 110:1061-1079.

75. Quiram PA, Ohno K, Milone M, Patterson MC, Pruitt NJ, Brengman JM et al. Mutation causing congenital myasthenia reveals acetylcholine receptor beta/delta subunit interaction essential for assembly. *J Clin Invest* 1999; 104(10):1403-1410.
76. Schmidt C, Abicht A, Krampfl K, Voss W, Stucka R, Mildner G et al. Congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation in the gene encoding choline acetyltransferase. *Neuromuscul Disord* 2003; 13(3):245-251.
77. Schütz W. Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: das Herz. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K, editors. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Jena: Urban & Fischer Verlag München, 2001: 429-478.
78. Shen XM, Ohno K, Sine SM, Engel AG. Subunit-specific contribution to agonist binding and channel gating revealed by inherited mutation in muscle acetylcholine receptor M3-M4 linker. *Brain* 2005; 128(2):345-355.
79. Shen XM, Ohno K, Tsujino A, et al. Mutations causing severe myasthenia reveals functional asymmetry of AChR signature Cys-loops in agonist binding and gating. *J Clin Invest* 2003; 111:497-505.
80. Sieb JP, Kraner S, Köhler W., Schalke B, Steinlein OK. Myasthenia gravis und myasthene Syndrome. *Deutsches Ärzteblatt* 2000; 97(51-52):3496-3500.
81. Sieb JP, Milone M, Engel AG. Effects of the quinine derivatives quinine, quinidine and chloroquine on neuromuscular transmission. *Brain Res* 1996; 712:179-189.
82. Sine SM, Ohno K, Bouzat C, Auerbach A, Milone M, Pruitt JN et al. Mutation of the acetylcholine receptor alpha subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity. *Neuron* 1995; 15(1):229-239.
83. Sine SM, Shen XM, Wang HL, et al. Naturally occurring mutations at the acetylcholine receptor binding site independently alter ACh binding and channel gating. *J Gen Physiol* 2002; 120:483-496.
84. Sine SM, Wang HL, Bren N. Lysine scanning mutagenesis delineates structure of nicotinic receptor binding domain. *J Biol Chem* 2002; 277:29210-29223.
85. Sitzmann FC. Neuromuskuläre Erkrankungen. *Pädiatrie*. Thieme, 2002: 875-876.
86. Starke K. Pharmakologie cholinergischer Systeme. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K, editors. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Jena: Urban & Fischer Verlag München, 2001: 147-174.

- 
87. Uchitel O, Engel AG, Walls TJ, Nagel A, Brill V, Trastek VF. Congenital myasthenic syndrome attributed to an abnormal interaction of acetylcholine with its receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 681:487-495.
  88. Vajsar J, Sloane A, MacGregor DL, Ronen GM, Becker LE, Jay V. Arthrogryposis multiplex congenita due to congenital myasthenic syndrome. *Pediatr Neurol* 1995; 12(3):237-241.
  89. Vincent A, McConville J, Farrugia ME, Newsom-Davis J. Seronegative myasthenia gravis. *Semin Neurol* 2004; 24:125-133.
  90. Vincent A, Newsom-Davis J, Wray D, Shillito P, Harrison J, Betty M et al. Clinical and experimental observations in patients with congenital myasthenic syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 681:451-460.
  91. von der Hagen M, Schallner J, Kaindl A, Köhler K, Mitzscherling P, Abicht A, Grieben U, Korinthenberg R, Kress W, von Moers A, Müller J, Schara U, Vorgerd M, Walter M, Müller-Reible C, Hübner C, Lochmüller H, Huebner A. Facing the genetic heterogeneity in neuromuscular disorders: Linkage analysis as an economic diagnostic approach towards the molecular diagnosis. *Neuromuscul Disord* 2006; 16:4-13.
  92. Walls TJ, Engel AG, Nagel A, Harper CK, Trastek VF. Congenital myasthenic syndrome associated with paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 681:461-468.
  93. Wang HL, Ohno K, Milone M, Brengman J, Evoli A, Batocchi AP et al. Fundamental Gating Mechanism of Nicotinic Receptor Channel Revealed by Mutation Causing a Congenital Myasthenic Syndrome . *The Journal of General Physiology* 2000; 116(3):449-462.
  94. Webster R, Brydson M, Croxson R, Newsom-Davis J, Vincent A, Beeson D. Mutation in the AChR ion channel gate underlies a fast channel congenital myasthenic syndrome. *Neurology* 2004; 62(7):1090-1096.
  95. Wokke JHJFG, Molenaar PC, Van den Oord C.J., Oen B.F., Busch H.F. Congenital paucity of secondary synaptic clefts (CPSC) syndrome in two adult sibs. *Neurology* 1989; 39:648-654.
  96. Wolber P. Konformationszustände des nicotinischen ACh-Rezeptors. Wikipedia . 20-9-2005.  
Ref Type: Internet Communication
  97. Yu XM, Hall ZW. Extracellular domains mediating epsilon subunit interactions of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 1991; 352:64-67.

98. Zhong W, Gallivan JP, Zhang Y, Li L, Lester HA, Dougherty DA. From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation- $\pi$  binding site in the nicotinic receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:12088-12093.

## 7 Anhang

### 7.1 Klassifikation der CMS nach der Konferenz der ENMC 1995

| Typ  | Vererbung              | Symptome   | Diagnostik   |
|--|------------------------|--|--|
| <b>Typ Ia:</b><br>Familiäre<br>infantile<br>Myasthenie | Autosomal-<br>rezessiv | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Auftretend in der frühen Kindheit</li> <li>- Ptosis, Ophthalmoparesen, Trinkschwäche, Atemprobleme evtl. mit infektgetriggerten Apnoen</li> <li>- Allgemein milder Verlauf</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verringerte Reizantwort im EMG bei repetitiver Stimulation mit 2–3 Hz nach Beanspruchung des Muskels</li> <li>- Normale Sehnenreflexe</li> </ul>            |
| <b>Typ Ib:</b><br>Limb-<br>Girdle-<br>Myasthenie       | Autosomal-<br>rezessiv | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Auftretend im Jugendalter</li> <li>- Symmetrische Schwäche der stammbetonten Extremitätenmuskulatur</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verringerte Reizantwort im EMG bei repetitiver Stimulation mit 2–3 Hz</li> <li>- Die Augenmuskeln sind nie betroffen</li> </ul>                             |
| <b>Typ Ic:</b><br>AChE-<br>Mangel                      | Autosomal-<br>rezessiv | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Auftretend in den ersten 2 Lebensjahren</li> <li>- Schwäche der Augen- und Gesichtsmuskulatur</li> <li>- Verspätetes Erreichen der „motorischen Meilensteine“</li> <li>- Verzögerte Lichtreagibilität der Pupillen</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verringerte Reizantwort im EMG bei repetitiver Stimulation mit 2–3</li> <li>- AChE-Mangel</li> <li>- Zweifaches CMAP nach singulärer Stimulation</li> </ul> |
| <b>Typ Id:</b><br>nAChR-<br>Kanal-<br>Mangel           | Autosomal-<br>rezessiv | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Auftretend in den ersten 2 Lebensjahren, m &gt; w</li> <li>- Ptosis, Ophthalmoparesen, Trinkschwäche, keine Exazerbationen; allgemein gutartiger Verlauf</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verringerte Reizantwort im EMG bei repetitiver Stimulation mit 2–3 Hz ohne Ermüdung des Muskels</li> </ul>  |

|                         |                        |   |   |
|-------------------------|------------------------|---|---|
| <b>Typ II:</b><br>SCCMS | Autosomal-<br>dominant | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Auftretend in jedem Lebensalter</li> <li>- Verschieden starke Ausprägung</li> <li>- Schwäche der Hals- und Schultermuskulatur sowie der Hand- und Fingerextensoren. Gelegentlich Beteiligung der bulbären Muskulatur und reduzierte Sehnenreflexe</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verringerte Reizantwort im EMG bei repetitiver Stimulation mit 2–3 Hz nach Beanspruchung des Muskels</li> <li>- Zweifaches CMAP nach singulärer Stimulation</li> </ul> |
| <b>Typ III:</b>         | sporadisch             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Auftretend vor dem 12. Lebensjahr</li> <li>- Muskelschwäche nach Belastung</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nachweis eines Defekts im Bereich der NMJ</li> </ul>   |



**7.2 Einzelkanalmessungen  $\epsilon 812C > T$** 

| <b>Patch-Clamp-Auswertung</b> |           |                                  |  |                                 |                                       |                         |                         |                       |  |
|-------------------------------|-----------|----------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|--|
| <b>File</b>                   | <b>mV</b> | <b>Mean Open Time (MOT) [ms]</b> | <b>MOT Abweichung <math>\pm</math></b> | <b>Burst Duration (BD) [ms]</b> | <b>BD Abweichung <math>\pm</math></b> | <b>Number of events</b> | <b>Numbers of burst</b> | <b>Amplitude [pA]</b> | <b>Amplitude Abweichung <math>\pm</math></b> |
| 0331705B                      | 140       | 0,00478                          | 0,03483                                | 8,153                           | 8,650                                 | 1419                    | 59                      | 3,290                 | 1,595  |
| 03317016                      | 120       | 0,02927                          | 0,09310                                | 6,614                           | 6,924                                 | 3487                    | 158                     | 3,089                 | 1,741  |
| 03317020                      | 120       | 0,00290                          | 0,01748                                | 2,911                           | 4,311                                 | 1997                    | 142                     | 2,680                 | 1,307  |
| 03317023                      | 60        | 0,00171                          | 0,00883                                | 1,379                           | 1,238                                 | 1379                    | 176                     | 2,189                 | 1,502  |
| 03317024                      | 80        | 0,00260                          | 0,01190                                | 2,134                           | 1,717                                 | 1780                    | 165                     | 2,703                 | 1,490  |
| 03317025                      | 100       | 0,00372                          | 0,00912                                | 1,947                           | 1,662                                 | 3342                    | 310                     | 3,160                 | 1,673  |
| 03317026                      | 120       | 0,00589                          | 0,02284                                | 2,485                           | 2,006                                 | 1838                    | 161                     | 2,831                 | 1,501  |
| 0331705A                      | 140       | 0,00648                          | 0,03745                                | 5,848                           | 7,913                                 | 1008                    | 57                      | 3,459                 | 1,715  |
| 0331725A                      | 100       | 0,00777                          | 0,03699                                | 3,160                           | 2,385                                 | 3126                    | 228                     | 2,228                 | 1,198  |
| 0331725B                      | 100       | 0,00661                          | 0,03294                                | 3,206                           | 2,813                                 | 9731                    | 715                     | 2,366                 | 1,276  |
| 03318001                      | 140       | 0,00120                          | 0,01196                                | 3,079                           | 4,368                                 | 95                      | 7                       | 2,521                 | 1,583  |
| 03318003                      | 100       | 0,00404                          | 0,02877                                | 5,401                           | 5,940                                 | 1206                    | 53                      | 2,126                 | 1,124  |
| 03322000                      | 140       | 0,00075                          | 0,00653                                | 1,828                           | 2,075                                 | 271                     | 29                      | 1,968                 | 1,209  |
| 03324000                      | 180       | 0,00310                          | 0,02913                                | 3,696                           | 3,132                                 | 1284                    | 80                      | 3,072                 | 1,349  |
| 03324001                      | 160       | 0,00122                          | 0,01380                                | 3,284                           | 2,759                                 | 928                     | 57                      | 2,979                 | 1,402  |
| 03326003                      | 100       | 0,01237                          | 0,06100                                | 5,643                           | 8,117                                 | 2130                    | 113                     | 2,440                 | 1,310  |
| 03326004                      | 80        | 0,01912                          | 0,07960                                | 5,889                           | 6,043                                 | 1570                    | 74                      | 2,152                 | 1,163  |
| 03326005                      | 120       | 0,00648                          | 0,04585                                | 5,020                           | 9,862                                 | 527                     | 35                      | 3,395                 | 1,637  |
| 03326007                      | 160       | 0,00387                          | 0,03132                                | 7,208                           | 19,070                                | 515                     | 18                      | 2,799                 | 1,209  |
| 0332604A                      | 80        | 0,02159                          | 0,06816                                | 5,341                           | 4,765                                 | 2148                    | 99                      | 2,157                 | 1,196  |
| 03015000                      | 100       | 0,00668                          | 0,02251                                | 1,349                           | 0,946                                 | 879                     | 173                     | 1,327                 | 1,370  |
| 03015001                      | 120       | 0,00780                          | 0,02138                                | 1,496                           | 0,943                                 | 1237                    | 168                     | 2,648                 | 1,842  |
| 03015002                      | 100       | 0,00322                          | 0,01627                                | 1,558                           | 1,214                                 | 817                     | 135                     | 1,426                 | 1,308  |
| 0301500A                      | 100       | 0,00763                          | 0,02603                                | 1,508                           | 1,094                                 | 724                     | 139                     | 1,343                 | 1,361  |
| 0301501A                      | 120       | 0,00910                          | 0,03132                                | 2,067                           | 3,312                                 | 2394                    | 269                     | 2,669                 | 1,677  |
| 03017000                      | 100       | 0,00269                          | 0,01367                                | 1,337                           | 1,304                                 | 1161                    | 205                     | 1,568                 | 1,322  |
| 03017001                      | 120       | 0,00405                          | 0,01696                                | 1,782                           | 3,199                                 | 1312                    | 175                     | 2,384                 | 1,644  |
| 03017002                      | 140       | 0,01549                          | 0,03661                                | 1,065                           | 1,399                                 | 2083                    | 491                     | 0,522                 | 0,757  |
| 0301703A                      | 100       | 0,02844                          | 0,12242                                | 6,707                           | 13,531                                | 868                     | 44                      | 3,575                 | 1,864  |
| 03017004                      | 80        | 0,00038                          | 0,00238                                | 0,780                           | 0,511                                 | 390                     | 61                      | 2,044                 | 1,500  |
| 0301702A                      | 140       | 0,01313                          | 0,03613                                | 1,612                           | 2,115                                 | 1580                    | 274                     | 1,034                 | 1,090  |
| 03019004                      | 140       | 0,00104                          | 0,00768                                | 1,450                           | 1,197                                 | 995                     | 101                     | 1,726                 | 1,113  |
| 03019005                      | 160       | 0,00299                          | 0,01435                                | 2,393                           | 4,029                                 | 2526                    | 191                     | 1,748                 | 0,986  |
| 0301905A                      | 160       | 0,00777                          | 0,04145                                | 6,635                           | 6,572                                 | 1931                    | 65                      | 1,837                 | 0,830  |
| 03023000                      | 120       | 0,01085                          | 0,04188                                | 3,640                           | 5,049                                 | 4118                    | 256                     | 0,628                 | 0,596  |
| 03023001                      | 120       | 0,01284                          | 0,05933                                | 5,212                           | 7,458                                 | 4454                    | 176                     | 1,108                 | 0,836  |
| 03023003                      | 80        | 0,04957                          | 0,20113                                | 12,666                          | 104,670                               | 336                     | 160                     | 1,289                 | 0,888  |
| 03023004                      | 100       | 0,07280                          | 0,15345                                | 7,823                           | 10,192                                | 3471                    | 117                     | 2,810                 | 1,310  |
| 0302305A                      | 120       | 0,00480                          | 0,02049                                | 2,771                           | 2,388                                 | 594                     | 45                      | 2,127                 | 1,196  |

| File     | mV  | Mean Open Time (MOT) [ms] | MOT Abweichung $\pm$ | Burst Duration (BD) [ms] | BD Abweichung $\pm$ | Number of events | Numbers of burst | Amplitude [pA] | Amplitude Abweichung $\pm$ |
|----------|-----|---------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|------------------|------------------|----------------|----------------------------|
| 03023007 | 160 | 0,00352                   | 0,02613              | 5,386                    | 7,130               | 1102             | 50               | 1,520          | 0,879                      |
| 03023008 | 180 | 0,00986                   | 0,06703              | 9,340                    | 19,300              | 1146             | 47               | 1,540          | 0,777                      |
| 0302300A | 120 | 0,01546                   | 0,05761              | 6,824                    | 8,712               | 10000            | 306              | 0,687          | 0,594                      |
| 0302302A | 60  | 0,00876                   | 0,04927              | 7,142                    | 9,882               | 4716             | 133              | 1,391          | 0,872                      |
| 0302304A | 100 | 0,02115                   | 0,06969              | 4,815                    | 6,853               | 1830             | 92               | 3,939          | 1,726                      |
| 0302304B | 100 | 0,04335                   | 0,11824              | 9,476                    | 14,847              | 8200             | 211              | 2,036          | 1,052                      |
| 03028001 | 120 | 0,03159                   | 0,09606              | 6,506                    | 7,365               | 2625             | 99               | 1,363          | 0,844                      |
| 0302801A | 120 | 0,07125                   | 0,20922              | 9,586                    | 55,689              | 4374             | 187              | 1,575          | 0,930                      |

**7.3 Einzelkanalmessungen  $\epsilon 1304del3$** 

| <b>Patch-Clamp-Auswertung</b> |     |                           |                      |                          |                     |                  |                  |                |                            |
|-------------------------------|-----|---------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|------------------|------------------|----------------|----------------------------|
| File                          | mV  | Mean Open Time (MOT) [ms] | MOT Abweichung $\pm$ | Burst Duration (BD) [ms] | BD Abweichung $\pm$ | Number of events | Numbers of burst | Amplitude [pA] | Amplitude Abweichung $\pm$ |
| 03403000                      | 180 | 0,00840                   | 0,06867              | 11,367                   | 32,773              | 1139             | 52               | 1,417          | 1,325                      |
| 03403001                      | 200 | 0,01368                   | 0,09448              | 12,691                   | 28,778              | 1104             | 41               | 2,350          | 1,178                      |
| 03403003                      | 100 | 0,00324                   | 0,01623              | 2,746                    | 4,033               | 3703             | 279              | 1,425          | 0,791                      |
| 03403004                      | 120 | 0,00857                   | 0,04196              | 5,607                    | 9,021               | 3896             | 138              | 2,113          | 0,886                      |
| 03403005                      | 80  | 0,00856                   | 0,05578              | 6,593                    | 10,208              | 2484             | 102              | 1,598          | 0,954                      |
| 03403008                      | 140 | 0,00496                   | 0,02093              | 3,663                    | 4,471               | 2480             | 139              | 1,843          | 0,974                      |
| 03405005                      | 120 | 0,02683                   | 0,09789              | 8,879                    | 9,589               | 3216             | 87               | 2,101          | 1,111                      |
| 0340505A                      | 120 | 0,00971                   | 0,05660              | 5,363                    | 7,792               | 1053             | 44               | 2,083          | 1,165                      |
| 03001001                      | 120 | 0,00027                   | 0,00438              | 6,770                    | 7,240               | 168              | 5                | 2,129          | 0,962                      |
| 03001003                      | 80  | 0,00892                   | 0,03475              | 6,436                    | 7,599               | 2757             | 96               | 2,357          | 0,896                      |
| 03001005                      | 40  | 0,00499                   | 0,03691              | 8,543                    | 10,954              | 3540             | 75               | 2,335          | 0,871                      |
| 03001006                      | 60  | 0,00225                   | 0,02647              | 8,043                    | 11,929              | 640              | 34               | 1,800          | 1,467                      |
| 03001007                      | 80  | 0,00958                   | 0,05631              | 8,324                    | 8,113               | 968              | 27               | 1,994          | 0,939                      |
| 03001008                      | 100 | 0,00034                   | 0,00544              | 2,800                    | 3,553               | 345              | 29               | 1,841          | 1,068                      |
| 0300110A                      | 100 | 0,00179                   | 0,01342              | 4,503                    | 5,686               | 385              | 19               | 2,525          | 1,291                      |
| 03001011                      | 120 | 0,01564                   | 0,08491              | 17,588                   | 16,585              | 2360             | 32               | 1,387          | 0,920                      |
| 0300106A                      | 60  | 0,00195                   | 0,01921              | 3,852                    | 8,557               | 772              | 61               | 1,724          | 1,187                      |
| 0300207A                      | 100 | 0,00602                   | 0,03358              | 5,206                    | 9,774               | 494              | 16               | 1,759          | 0,592                      |
| 03003000                      | 20  | 0,00657                   | 0,03686              | 8,588                    | 7,439               | 1283             | 26               | 1,301          | 0,621                      |
| 03003001                      | 40  | 0,00539                   | 0,03432              | 18,149                   | 18,464              | 6877             | 68               | 0,809          | 0,588                      |
| 0300303A                      | 80  | 0,00377                   | 0,03545              | 5,207                    | 10,227              | 273              | 14               | 1,547          | 0,946                      |
| 03004001                      | 60  | 0,00263                   | 0,02314              | 5,829                    | 10,416              | 1891             | 77               | 0,901          | 0,766                      |
| 03004002                      | 80  | 0,00444                   | 0,03191              | 3,761                    | 3,976               | 1473             | 131              | 0,840          | 0,868                      |
| 0300402A                      | 80  | 0,00302                   | 0,01928              | 2,022                    | 2,480               | 313              | 38               | 1,207          | 1,085                      |
| 03005001                      | 100 | 0,00924                   | 0,04966              | 14,212                   | 10,665              | 2977             | 37               | 0,827          | 0,483                      |
| 03005004                      | 120 | 0,02452                   | 0,08662              | 11,074                   | 17,699              | 1502             | 25               | 2,075          | 0,699                      |
| 03005005                      | 80  | 0,01272                   | 0,06320              | 8,248                    | 10,553              | 2041             | 48               | 1,344          | 0,576                      |
| 03005006                      | 60  | 0,00108                   | 0,01009              | 2,852                    | 3,382               | 1243             | 71               | 1,002          | 0,565                      |
| 0300500A                      | 120 | 0,00478                   | 0,03443              | 9,727                    | 9,914               | 838              | 13               | 0,822          | 0,543                      |
| 03005010                      | 160 | 0,05098                   | 0,13931              | 7,227                    | 7,189               | 835              | 28               | 5,210          | 2,819                      |
| 0300504A                      | 120 | 0,01622                   | 0,05974              | 4,469                    | 7,771               | 2468             | 118              | 1,559          | 0,779                      |
| 0300504B                      | 120 | 0,00948                   | 0,03056              | 2,824                    | 3,452               | 7604             | 505              | 1,807          | 0,910                      |
| 0300504C                      | 120 | 0,03731                   | 0,09947              | 6,201                    | 7,030               | 7461             | 250              | 1,401          | 0,706                      |
| 0300505A                      | 80  | 0,00357                   | 0,01321              | 2,402                    | 3,042               | 2010             | 150              | 1,789          | 0,870                      |
| 0300505B                      | 80  | 0,00504                   | 0,01979              | 2,365                    | 3,707               | 1279             | 91               | 1,687          | 0,818                      |
| 0300508A                      | -60 | 0,00195                   | 0,01656              | 3,079                    | 5,684               | 1037             | 68               | 0,461          | 0,466                      |
| 03006000                      | 80  | 0,01005                   | 0,04800              | 7,193                    | 8,744               | 1159             | 29               | 1,438          | 0,581                      |
| 03006002                      | 120 | 0,00502                   | 0,03536              | 5,000                    | 1,984               | 180              | 5                | 1,940          | 0,794                      |
| 03006004                      | 160 | 0,00216                   | 0,01546              | 5,379                    | 5,273               | 3726             | 123              | 1,898          | 0,877                      |

| File     | mV  | Mean Open Time (MOT) [ms] | MOT Abweichung ± | Burst Duration (BD) [ms] | BD Abweichung ± | Number of events | Numbers of burst | Amplitude [pA] | Amplitude Abweichung ± |
|----------|-----|---------------------------|------------------|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|------------------------|
| 03006005 | 180 | 0,00433                   | 0,02907          | 7,153                    | 8,695           | 3153             | 87               | 1,785          | 0,854                  |
| 03006008 | 60  | 0,00179                   | 0,01089          | 1,052                    | 1,386           | 1801             | 302              | 0,652          | 0,703                  |
| 03006009 | 80  | 0,00306                   | 0,01637          | 1,650                    | 1,987           | 3074             | 440              | 0,576          | 0,666                  |
| 03006010 | 100 | 0,00234                   | 0,00947          | 1,203                    | 1,246           | 1964             | 239              | 2,041          | 1,260                  |
| 03006011 | 120 | 0,00688                   | 0,03627          | 2,757                    | 4,298           | 2758             | 302              | 1,057          | 0,853                  |
| 03006012 | 140 | 0,01082                   | 0,04253          | 4,810                    | 18,195          | 8854             | 354              | 2,044          | 0,780                  |
| 03006013 | 100 | 0,01767                   | 0,04143          | 2,206                    | 1,920           | 1745             | 203              | 2,096          | 1,355                  |
| 03006014 | 120 | 0,01728                   | 0,03861          | 2,626                    | 4,228           | 3205             | 342              | 2,579          | 1,577                  |
| 03006015 | 100 | 0,00540                   | 0,01641          | 1,945                    | 3,449           | 2819             | 254              | 2,227          | 1,229                  |
| 03006016 | 80  | 0,00289                   | 0,01438          | 1,515                    | 1,102           | 1599             | 140              | 1,739          | 0,937                  |
| 03006017 | 140 | 0,02682                   | 0,07326          | 4,038                    | 8,499           | 2561             | 236              | 1,840          | 1,193                  |
| 0300613A | 100 | 0,01329                   | 0,03124          | 2,037                    | 1,644           | 1787             | 226              | 2,126          | 1,406                  |
| 0300614A | 120 | 0,04323                   | 0,13103          | 7,087                    | 32,188          | 8502             | 416              | 1,839          | 0,998                  |
| 0300617A | 140 | 0,02000                   | 0,05864          | 3,895                    | 5,443           | 3774             | 331              | 2,029          | 1,263                  |
| 03007002 | 60  | 0,00237                   | 0,01523          | 3,281                    | 4,691           | 2592             | 170              | 1,556          | 1,019                  |
| 03007003 | 80  | 0,01004                   | 0,04917          | 5,485                    | 6,702           | 3163             | 134              | 1,674          | 0,970                  |
| 03007004 | 100 | 0,02585                   | 0,11652          | 6,679                    | 7,954           | 361              | 14               | 1,595          | 0,968                  |
| 03008000 | 120 | 0,01892                   | 0,10394          | 10,782                   | 39,600          | 3196             | 88               | 2,638          | 0,975                  |
| 0300801B | 100 | 0,00423                   | 0,02684          | 3,835                    | 5,634           | 2272             | 115              | 1,793          | 0,902                  |
| 03008002 | 60  | 0,00387                   | 0,02202          | 2,953                    | 4,174           | 1962             | 131              | 1,071          | 0,759                  |
| 0300803B | 120 | 0,00499                   | 0,02192          | 4,198                    | 4,249           | 1089             | 45               | 2,743          | 0,989                  |
| 03008006 | 120 | 0,02387                   | 0,07245          | 6,477                    | 6,583           | 1477             | 35               | 1,930          | 0,803                  |
| 0300800A | 120 | 0,01549                   | 0,05096          | 4,947                    | 6,054           | 2522             | 100              | 2,437          | 1,010                  |
| 0300800B | 120 | 0,01312                   | 0,04503          | 3,921                    | 4,797           | 2371             | 153              | 2,198          | 1,196                  |
| 0300801A | 100 | 0,00736                   | 0,03418          | 4,539                    | 6,124           | 2190             | 98               | 1,693          | 0,839                  |
| 0300802A | 60  | 0,01784                   | 0,07490          | 12,361                   | 16,174          | 905              | 14               | 0,827          | 0,633                  |
| 0300802B | 60  | 0,00626                   | 0,03683          | 5,711                    | 7,187           | 1330             | 44               | 0,808          | 0,617                  |
| 0300808A | 140 | 0,01662                   | 0,08158          | 21,485                   | 28,526          | 9454             | 69               | 1,657          | 0,756                  |
| 0300900A | 20  | 0,00319                   | 0,03103          | 9,145                    | 11,746          | 1327             | 39               | 1,581          | 0,798                  |
| 03009002 | 140 | 0,01068                   | 0,07062          | 3,606                    | 14,175          | 1051             | 100              | 3,012          | 1,736                  |
| 03009003 | 140 | 0,01753                   | 0,07578          | 6,822                    | 10,515          | 2086             | 85               | 2,772          | 1,131                  |
| 0300902A | 140 | 0,00478                   | 0,01958          | 2,300                    | 2,164           | 405              | 37               | 3,122          | 1,747                  |
| 0300903A | 140 | 0,04005                   | 0,17264          | 19,479                   | 85,504          | 2410             | 63               | 3,326          | 1,112                  |

**7.4 Einzelkanalmessungen  $\epsilon 392del3$** 

| <b>Patch-Clamp-Auswertung</b> |     |                           |                      |                          |                     |                  |                  |                |                            |
|-------------------------------|-----|---------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|------------------|------------------|----------------|----------------------------|
| File                          | mV  | Mean Open Time (MOT) [ms] | MOT Abweichung $\pm$ | Burst Duration (BD) [ms] | BD Abweichung $\pm$ | Number of events | Numbers of burst | Amplitude [pA] | Amplitude Abweichung $\pm$ |
| 03908000                      | 120 | 0,00238                   | 0,01720              | 3,947                    | 4,711               | 214              | 15               | 1,949          | 1,255                      |
| 03908001                      | 100 | 0,02422                   | 0,08803              | 10,246                   | 25,060              | 3728             | 93               | 4,387          | 1,875                      |
| 03908002                      | 80  | 0,00546                   | 0,02731              | 3,398                    | 3,541               | 1071             | 80               | 2,892          | 1,846                      |
| 03908003                      | 60  | 0,06576                   | 0,14134              | 8,505                    | 16,334              | 9953             | 309              | 1,521          | 1,441                      |
| 03908004                      | 40  | 0,00598                   | 0,03160              | 5,036                    | 8,234               | 2060             | 107              | 2,144          | 1,408                      |
| 03908005                      | 140 | 0,01414                   | 0,05810              | 7,568                    | 9,087               | 1806             | 92               | 4,415          | 2,679                      |
| 0390802A                      | 80  | 0,02585                   | 0,09081              | 6,764                    | 6,260               | 905              | 33               | 3,287          | 1,656                      |
| 0390803A                      | 60  | 0,02524                   | 0,08023              | 5,434                    | 11,884              | 5985             | 294              | 2,326          | 1,583                      |
| 0390805A                      | 140 | 0,01625                   | 0,07007              | 7,087                    | 8,098               | 1110             | 63               | 4,423          | 2,851                      |
| 03909000                      | 60  | 0,00532                   | 0,04616              | 10,133                   | 12,757              | 478              | 21               | 4,370          | 2,512                      |
| 03909001                      | 80  | 0,00405                   | 0,02992              | 4,670                    | 5,921               | 1497             | 103              | 3,053          | 1,811                      |
| 03909003                      | 40  | 0,00541                   | 0,02664              | 3,758                    | 3,705               | 2417             | 165              | 1,966          | 1,823                      |
| 03909004                      | 60  | 0,00725                   | 0,04147              | 5,445                    | 6,055               | 2814             | 145              | 2,903          | 2,045                      |
| 03909005                      | 80  | 0,02016                   | 0,11650              | 21,315                   | 29,739              | 560              | 13               | 4,382          | 1,850                      |
| 03909006                      | 100 | 0,00114                   | 0,01710              | 3,529                    | 3,583               | 708              | 48               | 3,269          | 1,948                      |
| 03909008                      | 160 | 0,01780                   | 0,06790              | 7,442                    | 8,395               | 1820             | 103              | 4,178          | 2,159                      |
| 03909009                      | 120 | 0,05771                   | 0,17066              | 11,402                   | 28,011              | 10000            | 513              | 2,639          | 1,457                      |
| 03909010                      | 100 | 0,02441                   | 0,09101              | 6,701                    | 10,112              | 1737             | 76               | 4,288          | 1,644                      |
| 0390910A                      | 100 | 0,01932                   | 0,06781              | 5,116                    | 8,081               | 1204             | 64               | 3,465          | 1,501                      |
| 0390910B                      | 100 | 0,02053                   | 0,06108              | 4,606                    | 4,017               | 3391             | 205              | 3,295          | 1,622                      |
| 03909011                      | 80  | 0,00530                   | 0,04947              | 10,570                   | 8,083               | 223              | 10               | 2,378          | 1,437                      |
| 03912001                      | 100 | 0,00532                   | 0,03097              | 3,954                    | 4,758               | 1853             | 138              | 2,249          | 1,592                      |
| 03912002                      | 80  | 0,02897                   | 0,09671              | 6,742                    | 8,354               | 1166             | 45               | 1,257          | 1,205                      |
| 03912004                      | 60  | 0,00402                   | 0,02585              | 4,620                    | 5,464               | 1612             | 97               | 2,325          | 1,353                      |
| 03912005                      | 120 | 0,00744                   | 0,04982              | 5,817                    | 7,815               | 1251             | 72               | 1,262          | 19,396                     |
| 0391202A                      | 80  | 0,03978                   | 0,10887              | 10,393                   | 10,728              | 2155             | 56               | 1,016          | 1,128                      |
| 0391202C                      | 80  | 0,03447                   | 0,10480              | 7,397                    | 11,944              | 5031             | 200              | 1,024          | 1,125                      |
| 0391202D                      | 80  | 0,04160                   | 0,13129              | 21,141                   | 25,129              | 6497             | 101              | 0,799          | 1,079                      |
| 0391202E                      | 80  | 0,02539                   | 0,10383              | 10,561                   | 16,222              | 3549             | 109              | 1,021          | 2,200                      |
| 0391202F                      | 80  | 0,04151                   | 0,12113              | 12,350                   | 17,239              | 10000            | 216              | 2,624          | 1,247                      |
| 0391204A                      | 60  | 0,00119                   | 0,01123              | 1,909                    | 3,110               | 189              | 22               | 2,164          | 1,468                      |
| 0391205A                      | 120 | 0,00154                   | 0,01342              | 1,623                    | 1,952               | 99               | 13               | 2,159          | 1,487                      |
| 03913000                      | 80  | 0,00170                   | 0,01241              | 3,000                    | 2,978               | 253              | 22               | 2,671          | 1,615                      |
| 03913002                      | 60  | 0,00469                   | 0,02502              | 3,400                    | 4,628               | 308              | 26               | 1,729          | 1,114                      |
| 03915000                      | 60  | 0,00568                   | 0,02880              | 2,458                    | 3,709               | 769              | 83               | 1,376          | 1,577                      |
| 0391500A                      | 60  | 0,00617                   | 0,03269              | 1,289                    | 4,434               | 6512             | 1236             | 1,302          | 1,637                      |
| 03917000                      | 60  | 0,01774                   | 0,09294              | 9,132                    | 9,443               | 420              | 19               | 5,570          | 2,640                      |
| 0392006A                      | 120 | 0,00503                   | 0,04433              | 12,735                   | 23,275              | 1956             | 43               | 3,767          | 1,605                      |
| 03920007                      | 100 | 0,00380                   | 0,03738              | 9,769                    | 9,361               | 618              | 16               | 2,867          | 1,679                      |

| File     | mV  | Mean Open Time (MOT) [ms] | MOT Abweichung ± | Burst Duration (BD) [ms] | BD Abweichung ± | Number of events | Numbers of burst | Amplitude [pA] | Amplitude Abweichung ± |
|----------|-----|---------------------------|------------------|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|------------------------|
| 03920008 | 80  | 0,02920                   | 0,10372          | 9,035                    | 8,441           | 784              | 26               | 2,984          | 1,707                  |
| 03920010 | 140 | 0,01782                   | 0,09089          | 5,973                    | 14,770          | 5111             | 323              | 1,542          | 1,586                  |
| 03920011 | 120 | 0,04337                   | 0,15513          | 13,712                   | 27,128          | 3460             | 105              | 1,589          | 1,536                  |
| 03920012 | 120 | 0,00698                   | 0,04114          | 3,863                    | 6,357           | 2250             | 162              | 1,436          | 1,502                  |
| 03920013 | 100 | 0,00288                   | 0,01783          | 2,351                    | 4,135           | 1568             | 168              | 2,179          | 1,776                  |
| 03920014 | 80  | 0,00283                   | 0,02494          | 3,022                    | 7,068           | 1638             | 133              | 1,286          | 1,443                  |
| 03920015 | 60  | 0,00552                   | 0,03896          | 6,679                    | 6,375           | 543              | 24               | 2,338          | 1,609                  |
| 0392008A | 80  | 0,03743                   | 0,12959          | 11,576                   | 17,218          | 1030             | 23               | 3,121          | 1,734                  |
| 0392012A | 120 | 0,00221                   | 0,01622          | 2,384                    | 2,794           | 588              | 61               | 1,050          | 1,439                  |
| 0392013A | 100 | 0,01857                   | 0,09141          | 8,416                    | 17,051          | 4670             | 195              | 1,882          | 1,587                  |
| 0392014A | 80  | 0,00580                   | 0,04313          | 4,014                    | 7,985           | 1816             | 125              | 1,662          | 1,466                  |
| 0392014B | 80  | 0,00807                   | 0,06116          | 5,267                    | 16,457          | 1525             | 94               | 1,615          | 1,585                  |
| 03923000 | 80  | 0,00084                   | 0,09955          | 4,715                    | 4,284           | 233              | 13               | 2,334          | 1,586                  |
| 03923001 | 100 | 0,00265                   | 0,02163          | 5,837                    | 6,275           | 1285             | 63               | 2,597          | 1,476                  |
| 03923002 | 160 | 0,00316                   | 0,02656          | 4,673                    | 4,408           | 796              | 48               | 2,752          | 1,796                  |
| 03923005 | 140 | 0,02342                   | 0,08331          | 10,759                   | 21,835          | 5047             | 103              | 4,848          | 1,811                  |
| 03923006 | 160 | 0,00456                   | 0,03043          | 4,714                    | 7,671           | 415              | 22               | 4,743          | 2,108                  |
| 03923007 | 120 | 0,00832                   | 0,04409          | 10,315                   | 11,595          | 2717             | 54               | 4,458          | 1,789                  |
| 0392305A | 140 | 0,04568                   | 0,14521          | 11,762                   | 12,170          | 2666             | 71               | 1,969          | 1,696                  |
| 03928000 | 120 | 0,00501                   | 0,03293          | 19,924                   | 29,600          | 1773             | 17               | 1,979          | 0,672                  |
| 03928001 | 80  | 0,00040                   | 0,00294          | 3,521                    | 2,703           | 176              | 14               | 1,188          | 0,734                  |
| 03928002 | 100 | 0,00162                   | 0,01685          | 3,198                    | 3,586           | 466              | 31               | 1,546          | 1,024                  |
| 03928003 | 140 | 0,01100                   | 0,06213          | 4,133                    | 3,698           | 106              | 9                | 2,026          | 1,408                  |
| 03928006 | 80  | 0,00040                   | 0,00401          | 3,379                    | 3,748           | 265              | 17               | 1,346          | 0,743                  |
| 03928007 | 100 | 0,00418                   | 0,02639          | 5,550                    | 12,669          | 567              | 17               | 1,752          | 0,692                  |
| 03928008 | 120 | 0,00246                   | 0,01671          | 4,242                    | 4,647           | 2066             | 96               | 1,472          | 0,884                  |
| 03928015 | 80  | 0,05287                   | 0,13500          | 12,433                   | 23,780          | 10000            | 136              | 1,345          | 0,611                  |
| 03928016 | 100 | 0,08693                   | 0,20187          | 17,368                   | 45,965          | 10000            | 109              | 2,228          | 0,668                  |
| 0392801A | 80  | 0,00028                   | 0,00239          | 1,054                    | 0,959           | 70               | 12               | 0,962          | 0,652                  |
| 0392803A | 140 | 0,01007                   | 0,06821          | 5,357                    | 12,275          | 525              | 34               | 2,662          | 1,500                  |
| 0392814A | 60  | 0,00156                   | 0,01270          | 4,423                    | 7,558           | 2268             | 105              | 0,599          | 0,535                  |
| 0392814B | 60  | 0,00252                   | 0,01791          | 13,744                   | 11,131          | 494              | 8                | 0,354          | 0,519                  |
| 0392815A | 80  | 0,05431                   | 0,14684          | 8,712                    | 22,335          | 10000            | 204              | 1,324          | 0,620                  |

**7.5 Einzelkanalmessungen  $\epsilon 652C>T$** 

| Patch-Clamp-Auswertung |      |                           |                      |                          |                     |                  |                  |                |                            |
|------------------------|------|---------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|------------------|------------------|----------------|----------------------------|
| File                   | mV   | Mean Open Time (MOT) [ms] | MOT Abweichung $\pm$ | Burst Duration (BD) [ms] | BD Abweichung $\pm$ | Number of events | Numbers of burst | Amplitude [pA] | Amplitude Abweichung $\pm$ |
| 03N01000               | 60   | 0,00181                   | 0,01615              | 3,720                    | 8,339               | 3124             | 139              | 0,834          | 0,503                      |
| 03N01001               | 80   | 0,00209                   | 0,01482              | 3,431                    | 8,915               | 2053             | 108              | 1,051          | 0,559                      |
| 03N01002               | 100  | 0,02785                   | 0,03135              | 7,893                    | 10,311              | 10000            | 231              | 0,963          | 0,509                      |
| 03N01003               | 120  | 0,00188                   | 0,01556              | 3,863                    | 8,181               | 2011             | 99               | 1,237          | 0,625                      |
| 03N01004               | -100 | 0,00751                   | 0,03662              | 3,643                    | 4,896               | 2804             | 148              | 1,389          | 0,731                      |
| 03N0109A               | 100  | 0,00090                   | 0,00914              | 3,810                    | 6,504               | 899              | 49               | 1,470          | 0,855                      |
| 03N01010               | 120  | 0,00262                   | 0,01982              | 4,795                    | 6,596               | 1622             | 65               | 1,363          | 0,743                      |
| 03N01011               | 140  | 0,03541                   | 0,15946              | 18,768                   | 89,452              | 4144             | 113              | 1,223          | 0,762                      |
| 03N02000               | 120  | 0,00739                   | 0,03748              | 6,062                    | 7,517               | 2835             | 126              | 3,047          | 1,637                      |
| 03N02001               | 140  | 0,00641                   | 0,03258              | 5,669                    | 5,877               | 2728             | 118              | 1,838          | 1,095                      |
| 03N02004               | 60   | 0,01053                   | 0,05289              | 7,405                    | 10,487              | 1634             | 61               | 1,899          | 1,040                      |
| 03N02006               | 80   | 0,00188                   | 0,01718              | 7,300                    | 6,780               | 603              | 18               | 2,003          | 0,969                      |
| 03N02007               | 60   | 0,00163                   | 0,01653              | 7,336                    | 7,040               | 523              | 18               | 1,775          | 0,859                      |
| 03N02008               | 40   | 0,00087                   | 0,01075              | 6,208                    | 3,888               | 365              | 13               | 1,395          | 0,806                      |
| 03N02011               | 60   | 0,00362                   | 0,02398              | 5,763                    | 6,026               | 1636             | 64               | 1,279          | 0,774                      |
| 03N02012               | 80   | 0,03303                   | 0,09322              | 7,669                    | 11,741              | 5180             | 710              | 1,956          | 0,745                      |
| 03N0212A               | 80   | 0,06155                   | 0,16949              | 18,538                   | 28,486              | 5306             | 76               | 2,106          | 0,679                      |
| 03N0301A               | 100  | 0,00106                   | 0,13890              | 3,856                    | 5,147               | 1010             | 52               | 1,715          | 0,738                      |
| 03N0302A               | 120  | 0,02877                   | 0,09589              | 7,448                    | 7,812               | 3382             | 1222             | 1,954          | 0,806                      |
| 03N03003               | 140  | 0,02029                   | 0,07612              | 5,804                    | 12,322              | 4940             | 178              | 1,440          | 0,642                      |
| 03N0303A               | 140  | 0,11593                   | 0,23321              | 15,833                   | 17,567              | 5823             | 87               | 1,242          | 0,544                      |
| 03N03004               | 100  | 0,00296                   | 0,01981              | 2,527                    | 5,099               | 2503             | 173              | 1,006          | 0,601                      |
| 03N03005               | 80   | 0,00194                   | 0,01461              | 3,547                    | 5,970               | 1546             | 86               | 0,828          | 0,507                      |
| 03N0306A               | 120  | 0,00302                   | 0,02974              | 6,138                    | 9,745               | 390              | 13               | 2,029          | 0,729                      |
| 03N03007               | 120  | 0,28040                   | 0,40478              | 71,768                   | 133,348             | 3637             | 80               | 2,563          | 0,758                      |
| 03N03008               | 140  | 0,12876                   | 0,29583              | 36,933                   | 65,220              | 3449             | 89               | 1,776          | 1,171                      |
| 03N03009               | 60   | 0,01047                   | 0,06442              | 5,039                    | 11,002              | 2224             | 93               | 0,908          | 0,534                      |
| 03N03014               | 80   | 0,00127                   | 0,01607              | 5,754                    | 7,778               | 804              | 24               | 1,501          | 0,610                      |
| 03N03015               | 100  | 0,03724                   | 0,14118              | 21,194                   | 27,693              | 2402             | 39               | 0,932          | 0,516                      |
| 03N03018               | 40   | 0,02273                   | 0,08503              | 14,092                   | 15,232              | 4173             | 59               | 1,014          | 0,589                      |
| 03N04001               | 80   | 0,00804                   | 0,05896              | 62,425                   | 85,684              | 2095             | 6                | 1,056          | 0,494                      |
| 03N04003               | 60   | 0,04128                   | 0,13804              | 11,900                   | 7,501               | 945              | 19               | 1,352          | 0,752                      |
| 03N0401A               | 80   | 0,01096                   | 0,06864              | 14,604                   | 14,263              | 1142             | 14               | 0,834          | 0,668                      |
| 03N0403A               | 60   | 0,07210                   | 0,23257              | 28,155                   | 92,116              | 2113             | 43               | 1,223          | 0,698                      |
| 03N05005               | 60   | 0,01907                   | 0,12212              | 30,375                   | 96,282              | 1482             | 24               | 1,448          | 0,549                      |
| 03N05007               | 100  | 0,01839                   | 0,07581              | 6,580                    | 9,732               | 5653             | 175              | 1,291          | 0,608                      |
| 03N05008               | 120  | 0,12253                   | 0,29019              | 30,547                   | 52,318              | 6261             | 136              | 1,145          | 0,581                      |
| 03N05009               | 80   | 0,05672                   | 0,13819              | 9,628                    | 14,268              | 10000            | 194              | 1,270          | 0,547                      |
| 03N05010               | 60   | 0,01683                   | 0,05021              | 3,503                    | 6,088               | 6380             | 346              | 0,830          | 0,563                      |

---

| File     | mV  | Mean Open Time (MOT) [ms] | MOT Abweichung ± | Burst Duration (BD) [ms] | BD Abweichung ± | Number of events | Numbers of burst | Amplitude [pA] | Amplitude Abweichung ± |
|----------|-----|---------------------------|------------------|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|------------------------|
| 03N0508A | 120 | 0,32426                   | 0,40601          | 42,110                   | 73,747          | 6826             | 89               | 1,401          | 0,536                  |
| 03N0508B | 120 | 0,27377                   | 0,38000          | 40,638                   | 67,749          | 10000            | 128              | 1,556          | 0,625                  |
| 03N0509A | 80  | 0,05823                   | 0,17143          | 14,873                   | 21,151          | 9047             | 144              | 1,372          | 0,534                  |



## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Klaus Jahn, der mich als Betreuer und Doktorvater über die gesamte Zeit meiner Arbeit gefordert und gefördert hat, und mir immer mit einem offenen Ohr zur Seite gestanden ist.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Strupp, der mir die Aufnahme dieser experimentellen Dissertation ermöglichte.

Herrn Professor Dr. Hanns Lochmüller und seinem Team aus dem Genzentrum München danke ich für die gute Zusammenarbeit und das zur Verfügung stellen des genetischen Materials für den experimentellen Teil dieser Arbeit.

Bei meinen Eltern, Heidi und Richard Gärtner, möchte ich mich an dieser Stelle besonders bedanken für ihre Motivation und Konsequenz, mit der sie mir über den gesamten Zeitraum des Verfassens dieser Arbeit hinweg den Rücken gestärkt haben.

## 9 Lebenslauf

Name: Sabine Luise Gärtner  
Geburtsdatum: 28.07.1979  
Geburtsort: Starnberg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

wohnhaft: Herzog-Friedrich-Straße 6a  
D-84453 Mühldorf am Inn

### Beruf:

seit 01.04.2007 Assistenzärztin in der chirurgischen Weiterbildung  
Klinik Mühldorf, Mühldorf am Inn

01.09.2005 – 31.03.2007 Assistenzärztin in der pädiatrischen Weiterbildung  
Margaritenhospital, Schwäbisch Gmünd

### Studium:

1998 - 2005: Studium der Humanmedizin an der medizinischen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München

1999 - 2000: ERASMUS-Stipendium: Auslandssemester an der  
Universidad Miguel Hernandez, Alicante, Spanien

2005: Ärztliche Approbation  
2004: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2002: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2001: Ärztliche Vorprüfung

### Schulbildung:

1989 - 1998: Carl-Spitzweg-Gymnasium, Germering  
1998: Erlangung der allgemeinen Hochschulreife  
1985 - 1989: Grundschule München und Germering