

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

**Gestörte Cluster-Bildung des Acetylcholinrezeptors
als pathogener Mechanismus bei kongenitalen
myasthenen Syndromen**

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

vorgelegt von
Sarah Kristina Baumeister
aus
Düsseldorf
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hanns Lochmüller
2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Steinlein
Mitberichterstatter: Prof. Dr. J.-U. Walther M.Sc.
Prof. Dr. B. Sutor
Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiterinnen: Dr. biol. hum. Juliane Müller
Priv.-Doz. Dr. med. Angela Abicht
Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Datum der mündlichen Prüfung: 13.12.2007

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Müller JS*, **Baumeister SK***, Rasic VM, Krause S, Todorovic S, Kugler K, Müller-Felber W, Abicht A, Lochmüller H. Impaired receptor clustering in congenital myasthenic syndrome with novel RAPSN mutations. *Neurology* 2006; **67**: 1159-1164

Müller JS*, **Baumeister SK***, Schara U, Cossins J, Krause S, von der Hagen M, Huebner A, Webster R, Beeson D, Lochmüller H, Abicht A. CHRND mutation causes a congenital myasthenic syndrome by impairing co-clustering of the acetylcholine receptor with rapsyn. *Brain* 2006; **129**: 2784-2793.

Müller JS, Abicht A, Burke G, Cossins J, Richard P, **Baumeister SK**, Stucka R, Eymard B, Hantai D, Beeson D and Lochmüller H. The congenital myasthenic syndrome mutation RAPSN N88K derives from an ancient Indo-European founder. *Journal of Medical Genetics* 2004; **41**: e104

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

* equal contribution

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	4
II.	Einleitung	6
1.	Krankheitsbild der kongenitalen myasthenen Syndrome	6
2.	Geschichte der Myasthenie	7
3.	Molekulargenetische Klassifikation der kongenitalen myasthenen Syndrome	8
3.1	Postsynaptische Formen der kongenitalen myasthenen Syndrome	9
3.2	Synaptische Formen der kongenitalen myasthenen Syndrome	12
3.3	Präsynaptische Formen der kongenitalen myasthenen Syndrome	12
4.	Therapeutische Optionen	13
III.	Zielsetzung	14
IV.	Material und Methoden	15
1.	Patienten	15
2.	Chemikalien	15
3.	DNA-Extraktion	15
4.	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	15
5.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	16
5.1.	Prinzip der PCR	16
5.2.	PCR-Primer	16
5.3.	Reaktionsbedingungen	16
5.4.	Reinigung der PCR-Produkte	17
6.	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse	17
7.	Sequenzanalyse	18
8.	Genotypenanalyse	18
9.	Klonierungen	19
9.1	Einführen der Mutation <i>CHRND</i> E381K in den Vektor δ AChR-pRC/CMV2	19
9.2	Einführen der Mutation <i>RAPSN</i> R164C in den Vektor <i>RAPSN</i> -pEGFP-N1	19
10.	Ligation	20
11.	Transformation von <i>E.coli</i>	20
12.	Bakterienkultur	20

13.	Extraktion der Plasmid-DNA aus Bakterien	20
14.	Transfektion in HEK 293-Zellen	21
15.	Färbung mit α -Bungarotoxin	21
16.	Mikroskopie	22
V. Ergebnisse		23
1.	Analyse des <i>CHRND</i> -Gens	23
1.1	Klinische und molekulargenetische Analyse	23
1.2	Funktionelle Analyse der Mutation <i>CHRND</i> E381K	26
2.	Analyse des <i>RAPSN</i> -Gens	30
2.1	Klinische und molekulargenetische Analyse	30
2.1.1	Die Mutation <i>RAPSN</i> N88K	31
2.1.2	Die Mutation <i>RAPSN</i> A246V	32
2.1.3	Die Mutation <i>RAPSN</i> 1177delAA	33
2.1.4	Die Mutation <i>RAPSN</i> R164C	33
2.2	Funktionelle Analyse der Mutation <i>RAPSN</i> R164C	34
VI. Diskussion		36
1.	Häufigkeiten von Mutationen in den Genen <i>RAPSN</i> und <i>CHRND</i>	36
2.	Phänotypischer Vergleich der CMS-Patienten	37
3.	Mutationen in der Genen <i>RAPSN</i> und <i>CHRND</i>	40
3.1	Die Mutation <i>RAPSN</i> N88K	40
3.2	Die Mutation <i>RAPSN</i> A246V	41
3.3	Die Mutation <i>RAPSN</i> 1177delAA	41
3.4	Die Mutation <i>RAPSN</i> R164C	41
3.5	Die Mutation <i>CHRND</i> E381K	43
3.6	Die Deletion <i>CHRND</i> del2,2kb	47
4.	Bedeutung der genetischen Diagnostik	48
VII. Literaturverzeichnis		50
VIII. Anhang		56
1.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	56
2.	Primersequenzen	58

3.	Genbank Zugangsnummern	59
4.	Fragebogen zur klinischen Erfassung von CMS-Patienten	60
5.	Danksagung	62
6.	Lebenslauf	63
	Ehrenwörtliche Erklärung	64

I. Zusammenfassung

Unter dem Begriff der kongenitalen myasthenen Syndrome (CMS) fasst man eine Gruppe hereditärer Erkrankungen zusammen, deren Ursache in genetischen Veränderungen unterschiedlicher Proteine an der neuromuskulären Endplatte liegt. Diese Gen-Mutationen führen dazu, dass die Erregungsübertragung vom Nerv auf den Muskel beeinträchtigt wird. Die Einteilung der CMS in ihre Unterformen basiert auf der molekulargenetischen Identifikation der Defekte.

Ziel dieser Arbeit war es, bei CMS-Patienten die Kandidatengene *RAPSN* und *CHRND* auf krankheitsrelevante Mutationen hin zu überprüfen und anhand der identifizierten Mutationen den Mechanismus der neuromuskulären Übertragungsstörung zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei zwölf Patienten aus unserem CMS-Patientenkollektiv die ursächlichen genetischen Veränderungen identifiziert und charakterisiert. Elf Patienten trugen unterschiedliche Mutationen im *RAPSN*-Gen, das für das Protein Rapsyn (Receptor associated protein of the synapse) kodiert. Eine der Funktionen von Rapsyn ist es, die lokale Dichte der Acetylcholinrezeptoren (AChR) an der postsynaptischen Membran durch die Bildung von Clustern zu erhöhen. Durch molekularbiologische und zellbiologische Studien einer bisher noch nicht beschriebenen Mutation im *RAPSN*-Gen (R164C) konnte gezeigt werden, dass die pathogene Wirkung dieser Mutation auf der verminderten Fähigkeit von Rapsyn beruht, Clusterbildung mit AChR zu induzieren. Bei einem Patienten aus unserem CMS-Kollektiv wurden eine neue Missense-Mutation (E381K) und eine Mikrodeletion im *CHRND*-Gen identifiziert, das für die δ -Untereinheit des AChR kodiert. Die bisher in der Literatur beschriebenen Mutationen des AChR verringerten entweder die Expression des Proteins oder veränderten die kinetischen Eigenschaften des Rezeptors. Der Pathomechanismus, den wir für die Missense-Mutation E381K *in vitro* zeigen, ist neuartig für Mutationen von AChR-Genen: offenbar wird die Interaktion mit Rapsyn, und damit, wie bei *RAPSN*-Mutationen, die Clusterbildung der Rezeptoren gestört. Bei der Untersuchung des entsprechenden Aminosäureaustauschs in der ϵ -Untereinheit des AChR *in vitro* war das Clustern der beiden Moleküle nicht beeinträchtigt. Daher postulieren wir, dass die δ -Untereinheit beim Clustern des AChR mit Rapsyn eine wichtigere Rolle spielt als die ϵ -Untereinheit.

Die genetische Diagnostik spielt im Falle der CMS für den einzelnen Patienten hinsichtlich Prognose, Vererbbarkeit und Therapie eine wichtige Rolle. Zusätzlich kann die biochemische und zellbiologische Charakterisierung neuer Mutationen das Verständnis des

Pathomechanismus von CMS erweitern und Grundlage für neue Therapieansätze bilden. Der nikotinische AChR und die angrenzenden Strukturen stellen aber auch ein für die Grundlagenforschung wichtiges molekulares Modell dar. Untersuchungen des AChR und seiner molekularen Interaktionen können wesentlich zu einem besseren Verständnis der Mechanismen synaptischer Signalübertragung im Allgemeinen beitragen.

II. Einleitung

Das Krankheitsbild der Myasthenie ist charakterisiert durch eine belastungsabhängige Muskelschwäche. Ursache hierfür ist eine gestörte Erregungsübertragung vom Nerv auf den Muskel im Bereich der neuromuskulären Endplatte. Es gibt sowohl autoimmune Formen der Myasthenie, wie die Myasthenia gravis und das Lambert-Eaton-Syndrom, als auch erbliche Formen, die unter dem Begriff „kongenitale myasthene Syndrome“ (CMS) zusammengefasst werden. Man schätzt, dass letztere etwa 10% aller Myasthenien ausmachen (Anlar et al., 1996). Die kongenitalen myasthenen Syndrome sind Gegenstand der Untersuchungen, die in dieser Arbeit beschrieben werden.

1. Krankheitsbild der kongenitalen myasthenen Syndrome (CMS)

Das klinische Bild der CMS weist Ähnlichkeiten mit der autoimmunen Myasthenia gravis auf, ist aber sehr heterogen. Zu den von der Muskelschwäche betroffenen Muskelgruppen gehören im Regelfall okuläre, bulbäre und mimische Muskulatur, sowie die proximale Extremitätenmuskulatur. Die belastungsabhängige, und damit oft tageszeitabhängige, Schwäche dieser Muskelgruppen wird in den meisten Fällen schon kurz nach der Geburt oder im frühen Kindesalter auffällig. Bei repetitiver Nervenstimulation kann typischerweise ein Dekrement nachgewiesen werden.

Die Heterogenität des Krankheitsbildes zeigt sich jedoch in der sehr unterschiedlichen Schwere der Symptomatik. Das Spektrum reicht vom sogenannten „floppy infant“ bei Geburt, bis zu Fällen, bei denen erst im Erwachsenenalter Ptose und eine leichte muskuläre Schwäche auffällt.

Schwer betroffene Säuglinge zeigen kurz nach der Geburt eine generalisierte muskuläre Hypotonie, Trinkschwierigkeiten, kraftloses Schreien, Ptose und Ateminsuffizienz. Im Rahmen von respiratorischen Infekten kann sich dies krisenhaft verschlechtern und maschinelle Beatmung erforderlich machen und zum plötzlichen Kindstod (SIDS; Sudden Infant Death Syndrome) führen.

Im Erwachsenenalter steht die abnorme Ermüdbarkeit vor allem der proximalen Muskulatur der Extremitäten im Vordergrund der Symptomatik, des Weiteren die tageszeitabhängige Ptose und eventuell eine Ophthalmoplegie.

Im Gegensatz zu autoimmunen Formen der Myasthenie lassen sich bei CMS-Patienten keine Autoantikörper gegen AChR (Aarli et al., 1975) oder MuSK (Hoch et al., 2001) nachweisen.

2. Geschichte der Myasthenie

Der geschichtliche Hintergrund zur Myasthenie ist von Trevor Hughes ausführlich referiert worden (Hughes, 2005). Bereits im 17. Jahrhundert wurden von Thomas Willis, einem Arzt aus Oxford, Fälle von Patienten beschrieben, deren „Lähmungen“ sich im Laufe des Tages verstärkten. Erst über 200 Jahre später erschien die nächste Veröffentlichung zur Myasthenie, diesmal von Sir Samuel Wilks aus London. Er berichtete über eine Patientin mit Bulbärparalyse, deren Verlauf fluktuierte. Wilks führte nach dem Tod der Patientin eine Autopsie durch. Im Gegensatz zu Fällen von Bulbärparalyse im Rahmen von Motoneuron-Erkrankungen, bei denen man damals schon mikroskopisch den Verlust von Neuronen und Gliazellen dokumentiert hatte, fand er in diesem Fall kein morphologisches Korrelat zur Erkrankung der Patientin. Der deutsche Neurologe Wilhelm Erb beschrieb 1879 unter dem Titel „Ueber einen eigentümlichen bulbären Symptomenkomplex“ drei Fälle von Myasthenie, bei denen er, neben der Bulbärparalyse, besonders auf die Symptome Ptose, Diplopie, Dysphagie und Schwäche der mimischen und Nackenmuskulatur einging. Die Bezeichnung der Erkrankung als „Myasthenis gravis pseudo-paralytica“ erfolgte 1895 durch Friedrich Jolly.

Erst in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts, nachdem die immunologische Pathogenese der Myasthenia gravis charakterisiert worden war (Aarli et al., 1975; Toyka et al., 1975; Hohlfeld et al., 1984), wurde der Begriff „kongenitale myasthene Syndrome“ zur Abgrenzung von familiär gehäuften Fällen von Myasthenie ohne Nachweis von Antikörpern eingeführt.

Erste Differenzierungen von CMS-Unterformen wurden durch elektrophysiologische sowie morphologische Untersuchungen mittels Licht- und Elektronenmikroskopie von Nerv-Muskelpräparaten ermöglicht (Übersicht in Engel, 1994).

Vor dem Hintergrund der in den 90er Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die an CMS beteiligten Proteine und über deren Primärstruktur war es dann jedoch möglich, den pathogenetischen Hintergrund der CMS mit molekulargenetischen Methoden zu analysieren. Diese molekulargenetischen Daten sind Grundlage für die heute gültige Klassifizierung der CMS (Engel and Sine, 2005).

3. Molekulargenetische Klassifikation der kongenitalen myasthenen Syndrome

Eine Vielzahl hereditärer Defekte im Bereich der neuromuskulären Endplatte ist mittlerweile als Ursache für die CMS beschrieben worden. Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie die Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte stören. Die neuromuskuläre Endplatte stellt das Verbindungselement zwischen Nerv und Muskel dar. Über die Nervenendigungen einlaufende elektrische Signale werden hier, über den synaptischen Spalt hinweg, in chemische Signale umgewandelt und weitergeleitet. Am Ende dieser Kaskade steht die Depolarisation der Muskelfaser, und damit die Kontraktion des Muskels.

Die verschiedenen Formen der CMS unterscheiden sich in Vererbungsmuster, klinischem Phänotyp, in dem von einem Defekt betroffenen Protein und damit auch im Mechanismus der Übertragungsstörung. Die heute gängige Einteilung basiert auf der Lokalisation des veränderten Proteins im Bezug auf die neuromuskuläre Endplatte. Es werden so präsynaptische, synaptische und postsynaptische Formen der CMS unterschieden, über die im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben werden soll (Engel and Sine, 2005). Diese Einteilung ist jedoch noch nicht endgültig, da die molekulare Basis bei einigen klinisch gesicherten CMS-Fällen bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte. Es gibt also wohl noch weitere, bisher noch nicht als solche erkannte Gene/Proteine, die in CMS involviert sein können.

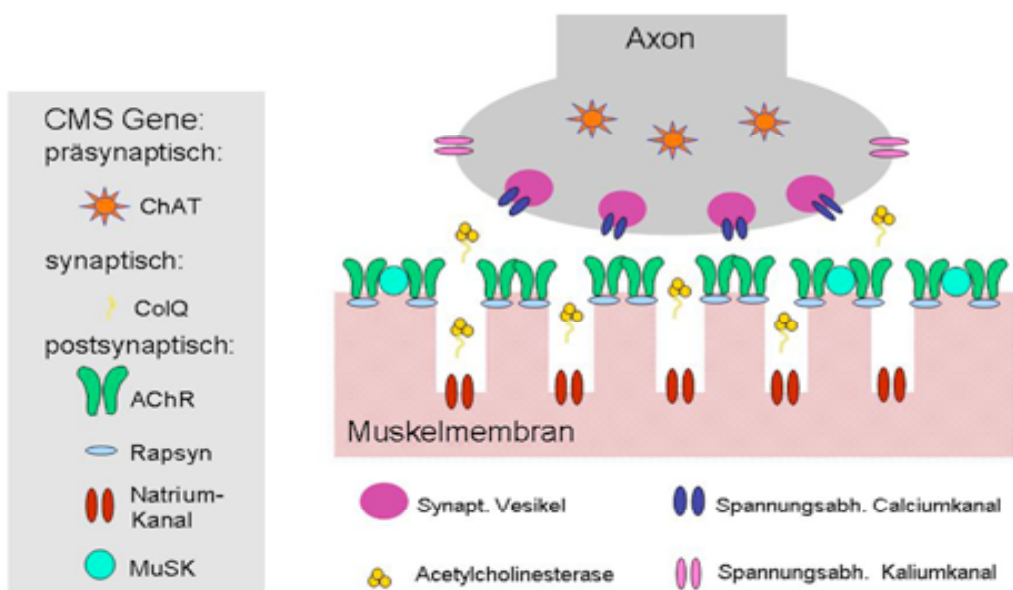


Abb. 1 Bisher bekannte CMS-Gene und die Lokalisation ihrer Proteinprodukte an der neuromuskulären Endplatte. Abbildung modifiziert aus (McConville and Vincent, 2002)

3.1 Postsynaptische Formen der Kongenitalen Myasthenen Syndrome

Die postsynaptischen Formen der CMS machen etwa 80% aller CMS-Fälle aus. Am häufigsten sind Mutationen in den Genen, die für die Untereinheiten des Acetylcholin Rezeptors (AChR) kodieren (*CHRNA1* auf Chromosom 2q31.1, *CHRNB1* auf Chromosom 17p13, *CHRND* auf Chromosom 2q37.1 und *CHRNE* auf Chromosom 17p13) (Engel et al., 1996b; Gomez and Gammack, 1995; Ohno et al., 1995; Sine et al., 1995).

Während der Ausbildung der Synapse kommt es zu einer starken Einfältelung der postsynaptischen Membran im Bereich der neuromuskulären Endplatte. An den oberen Spitzen sind die AChR lokalisiert, während spannungsabhängige Na⁺-Kanäle in der Tiefe der Einfältelungen liegen. Der nikotinsche AChR ist der Prototyp der Familie der sogenannten Cys-Loop-Rezeptoren, zu denen auch Glycin-, GABA_A- und Serotonin(5HT₃)-Rezeptoren gehören. Aufgrund der starken Anreicherung im Gewebe bestimmter Fische (z.B. *Torpedo californica*) ist der AChR der am besten untersuchte Ionenkanal.

Der AChR ist ein membranständiges Glykoprotein, das aus fünf Untereinheiten besteht. Während der embryonalen Entwicklung des menschlichen Muskels sind dies zwei α -, und je eine β -, γ - und δ -Polypeptidkette. Während der weiteren Entwicklung wird die γ - durch die ϵ -Untereinheit ersetzt. Zur Öffnung des Ionenkanals müssen zwei Moleküle Acetylcholin an den Rezeptor binden; die Bindungsstellen liegen auf der α -Untereinheit. Die Rezeptorstruktur konnte mittlerweile mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und Röntgenstrukturanalyse weitestgehend aufgeklärt werden (Unwin, 2005). Die Polypeptidkette jeder Untereinheit durchspannt die Membran mit vier α -Helices. Zusammen bilden diese Transmembranregionen eine wässrige Pore, durch die positiv geladene Ionen einströmen können. Insgesamt hat der Rezeptor eine Länge von etwa 120 Å, wobei der extrazelluläre Teil etwa 60 Å aus der Membran herausragt (Unwin, 2005).

Die verschiedenen Mutationen in den Genen, die für die Untereinheiten des AChR kodieren, haben unterschiedliche Effekte. Unter anderem sind solche Mutationen beschrieben, die die Expression des Rezeptors reduzieren; andere verändern die Kinetik der Erregungsübertragung. So bewirkt zum Beispiel die zuerst beschriebene CMS-verursachende Mutation, die Missense Mutation T264P im *CHRNE*-Gen, eine Verlängerung der Kanalöffnungszeit (Ohno et al., 1995). CMS-Formen, die auf diesem Effekt am AChR beruhen, werden zum Großteil autosomal-dominant vererbt und als „slow-channel-syndromes“ bezeichnet. Die sogenannten „fast-channel-syndromes“, bei denen eine verkürzte Kanalöffnungszeit beobachtet wird, werden autosomal-rezessiv vererbt. Die häufigste

postsynaptische Form der CMS beruht jedoch auf Mutationen, die eine herabgesetzte Expression des adulten AChRs zur Folge haben und morphologisch einen AChR-Mangel bewirken (Engel et al., 2003b; Hantai et al., 2004). Diese Mutationen kommen vor allem in der ϵ -Untereinheit des AChR vor. Der Grund für die Konzentration der Mutationen in dieser Untereinheit liegt wohl darin, dass die fetale γ -Untereinheit das Fehlen der ϵ -Untereinheit teilweise ausgleichen kann (Croxen et al., 2001). Rezessive Mutationen in den Genen der anderen Untereinheiten des AChRs, die ebenfalls die Expression des jeweiligen Proteins reduzieren, sind wesentlich seltener (Engel et al., 2003a; Ohno and Engel, 2004).

Die Konzentration von AChR an der postsynaptischen Membran liegt bei bis zu $10000/\mu\text{m}^2$, außerhalb dieser Region nur bei $10/\mu\text{m}^2$ (Fertuck and Salpeter, 1974). Damit die Konzentration in diesem Bereich derart hoch werden kann, clustern die Rezeptoren im Laufe der Entwicklung. Dieser Prozess erfolgt über die Agrin-MuSK-Rapsyn-Kaskade. Agrin, ein Heparansulfat-Proteoglykan, wird präsynaptisch freigesetzt (Hoch, 1999) und aktiviert die postsynaptische Rezeptor Tyrosinkinase MuSK (Glass et al., 1996). MuSK wiederum aktiviert eine second-messenger-Kaskade, die zum Clustern der AChR führt (DeChiara et al., 1996; Apel et al., 1997). Auch Laminin, ein Bestandteil der Basallamina, clustert AChR, jedoch nicht mit Hilfe von MuSK, sondern von α -Dystroglykan (Sugiyama et al., 1997; Montanaro et al., 1998). Beide Signalwege, ob über Agrin oder Laminin, benötigen jedoch weiter stromabwärts der Cluster-Kaskade Rapsyn (Receptor Associated Protein of the Synapse), ein 43 kD großes Protein (Frail et al., 1988; Gautam et al., 1995; Marangi et al., 2002). Die Bedeutung von Rapsyn für das Clustern der AChR konnte durch Experimente mit Rapsyn knock-out Mäusen bestätigt werden (Gautam et al., 1995).

Neben Mutationen in den Genen der Untereinheiten des AChR verursachen Mutationen im Gen *RAPSN* auf Chromosom 11p11.2, das für das postsynaptische Protein Rapsyn kodiert, eine weitere Form des postsynaptischen CMS (Ohno et al., 2002). Rapsyn ist neben dem Clustern von AChR an der postsynaptischen Membran auch für die Verankerung an das subsynaptische Zytoskelett verantwortlich. Patienten mit Rapsyn-Mutationen zeigen klinisch das Bild einer AChR-Defizienz, die wohl auf einer verringerten Rezeptordichte durch vermindertes Ko-Clustern von Rapsyn mit AChR beruht. Bisher sind 21 rezessiv-vererbte Mutationen im *RAPSN*-Gen beschrieben worden (Ohno et al., 2002; Burke et al., 2003; Dunne and Maselli, 2003; Müller et al., 2003; Richard et al., 2003).

Erst kürzlich wurden zwei compound heterozygote Mutationen im *MUSK*-Gen auf Chromosom 11p11.2 beschrieben (Chevessier et al., 2004). MuSK, eine muskelspezifische Rezeptor Tyrosinkinase, ist mitverantwortlich für die Organisation der postsynaptischen

Membran. Die Missense Mutation V789M führt dabei zu einem verminderten Agrin-induzierten Clustern der AChR.

Nur eine Patientin ist bislang mit einer CMS-verursachenden Mutationen in *SCN4A*, dem Gen kodierend für den spannungsabhängigen Natriumkanal ($Na_v1.4$) auf Chromosom 17q23.3 beschrieben worden (Tsujino et al., 2003).

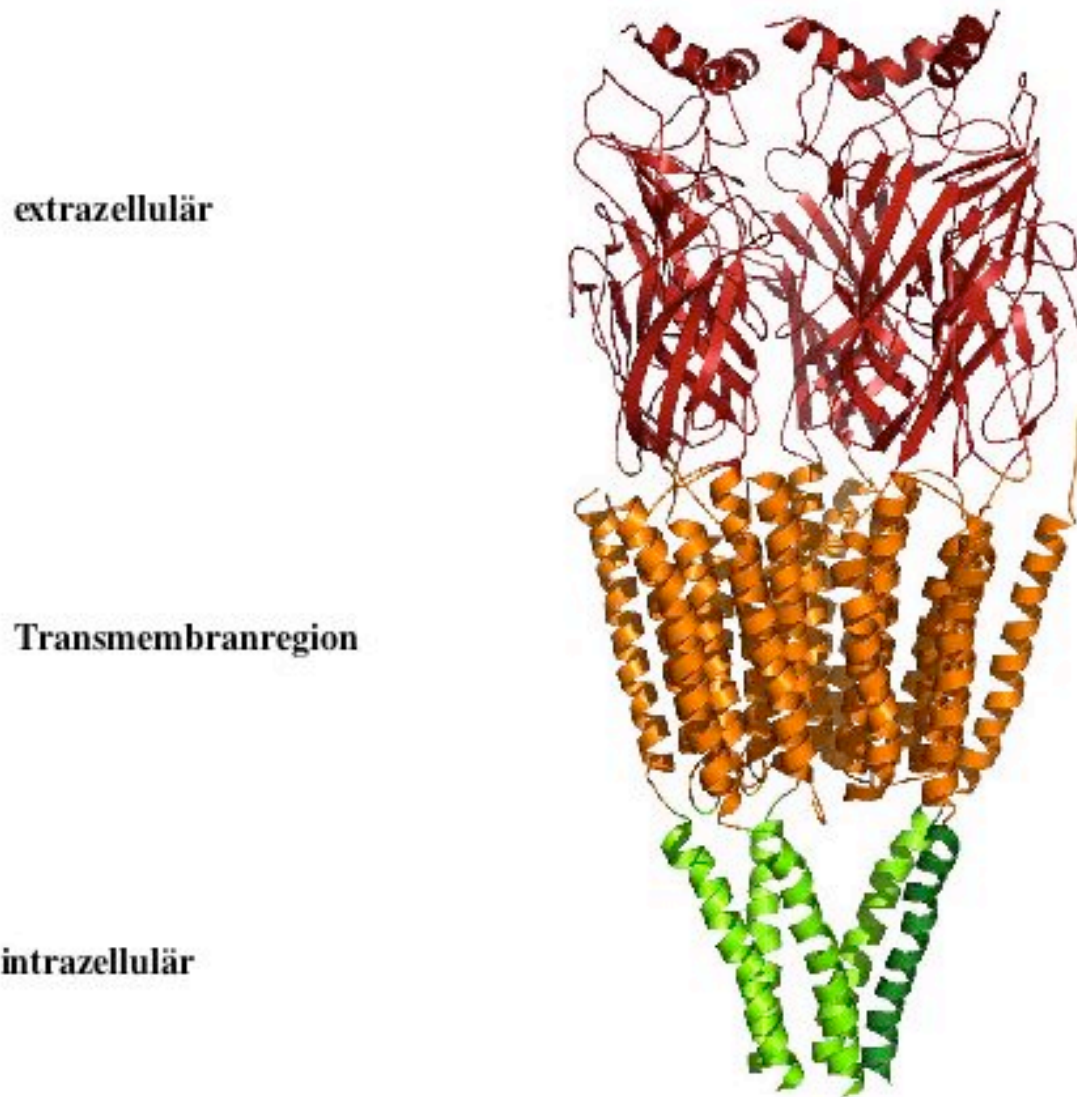


Abb. 2 Struktur des Acetylcholinrezeptors

Die Struktur wurde mittels Elektronenkristallographie mit einer Auflösung von 4 Å bestimmt und ist als Ribbondiagramm dargestellt. Rot dargestellt ist der extrazelluläre Anteil, orange der die Membran durchspannende Bereich, grün der intrazelluläre/zytoplasmatische Anteil (dunkelgrün dargestellt ist hier der zytoplasmatische Loop der δ -Untereinheit)

(nach Unwin, 2005)

3.2 Synaptische Formen der kongenitalen myasthenen Syndrome

Die synaptischen CMS-Formen, basierend auf einer lichtmikroskopisch nachweisbaren Defizienz der Acetylcholinesterase (AChE) im synaptischen Spalt, sind nach den postsynaptischen Formen am zweithäufigsten (Donger et al., 1998; Engel et al., 2003a; Ohno et al., 1998b). Das aus der präsynaptischen Nervenendigung freigesetzte Acetylcholin bindet an die AChR in der postsynaptischen Plasmamembran der Muskelzelle und führt über verschiedene Zwischenschritte zur Depolarisation der Membran, was die Kontraktion der Myofibrillen in der Muskelzelle zur Folge hat. Im synaptischen Spalt ist die AChE für die rasche Hydrolyse des Acetylcholins, und dadurch für die zeitliche Begrenzung der Signalübertragung verantwortlich. AChE spaltet Acetylcholin in einen Acetylrest und Cholin. An der neuromuskulären Endplatte setzt sich die AChE aus den globulär exprimierten, katalytischen Untereinheiten und einem muskel-spezifisch exprimierten kollagenartigen Schwanzteil (ColQ) zusammen, der das Molekül verankert (Sussman et al., 1993). Dieser Teil wird durch ein eigenes Gen (*COLQ*) auf Chromosom 3p25.1 kodiert. In diesem Gen sind bisher etwa 30 verschiedene CMS-verursachende Mutationen gefunden worden (Ohno and Engel, 2004).

3.3 Präsynaptische Formen der kongenitalen myasthenen Syndrome

Im Zytoplasma präsynaptischer, unmyelinisierter Neuronen wird aus Acetyl-CoA und Cholin der Transmitter Acetylcholin synthetisiert. Katalysiert wird dieser Schritt durch das Enzym Cholin-Acetyl-Transferase. In der Nervenendigung wird Acetylcholin dann in Vesikeln gespeichert. Kommen elektrische Impulse an der Nervenendigung an, wird die Plasmamembran depolarisiert und spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle werden geöffnet. Durch den Konzentrationsanstieg von Ca^{2+} im Zytosol kommt es zur Exozytose von Acetylcholin in den synaptischen Spalt.

Im Gen, das für die Cholin-Acetyl-Transferase (*CHAT*, Chromosom 10q11.23) kodiert, wurden Mutationen charakterisiert, die die katalytische Aktivität dieses Enzyms reduzieren und so ein präsynaptisches CMS hervorrufen. Es sind insgesamt 14 Mutationen im Gen *CHAT* beschrieben worden (Ohno and Engel, 2004).

4. Therapeutische Optionen

Die molekulargenetische Analyse und die Einteilung der CMS-Formen hat auch therapeutische Konsequenzen (Engel and Sine, 2005). Je nach Lokalisation des Defektes an der neuromuskulären Endplatte gibt es unterschiedliche medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten der CMS. Im Allgemeinen werden solche Formen, die die Wirkung von Acetylcholin an der Endplatte reduzieren, mit Cholinesterasehemmern und, in einigen Fällen, mit 3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP) behandelt. Dazu gehören vor allem Patienten mit „fast-channel-syndrome“, Patienten mit Mutationen der AChR-Untereinheiten, die die Expression des Rezeptors reduzieren und Patienten mit Rapsyn-Mutationen. Ebenso werden präsynaptische CMS-Formen mit Mutationen im *CHAT*-Gen mit Cholinesterasehemmern behandelt. Im Gegensatz dazu kann sich bei den CMS-Formen, die die postsynaptische Antwort auf Acetylcholin verstärken, die Symptomatik bei Einnahme von Cholinesterasehemmern deutlich verschlechtern. Dazu gehören die synaptischen CMS-Formen mit AChE-Defizienz und die „slow-channel-syndromes“. Eine Möglichkeit für die Behandlung der AChE-Defizienz scheint Ephedrin zu sein (Bestue-Cardiel et al., 2005), „slow-channel-syndromes“ werden mittlerweile mit Fluoxetin erfolgreich therapiert (Harper et al., 2003).

III. Zielsetzung

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, in unserem Patientengut die für postsynaptische CMS bekannten Kandidatengene *RAPSN* und *CHRND* mittels PCR und direkter Sequenzierung auf krankheitsrelevante Mutationen zu untersuchen. Bisher noch nicht beschriebene und charakterisierte Mutationen sollten anschließend durch funktionelle Studien hinsichtlich ihres Pathomechanismus analysiert werden.

Molekulargenetische Methoden spielen in der Diagnostik der CMS eine wichtige Rolle. Ein Mutationsscreening der bekannten CMS-Gene hat die aufwändigen *in vitro* Untersuchungen an Nerv-Muskelpräparaten aus *M.intercostalis*-Biopsien abgelöst. Aus der Lokalisation des identifizierten genetischen Defekts im Bezug auf die neuromuskuläre Endplatte leitet sich die derzeit übliche Einteilung in verschiedene CMS-Formen ab, die auch die Grundlage der Therapieschemata darstellt (Engel and Sine, 2005). So führt der genetische Nachweis der CMS nicht nur zu einer eindeutigen Diagnosestellung, sondern hat für den einzelnen Patienten eine direkte Auswirkung hinsichtlich Prognose, Verlauf und Therapie der Erkrankung.

Die postsynaptische Unterform ist die weitaus häufigste Form der CMS; Ursache sind dabei meistens Mutationen in den verschiedenen Untereinheiten des AChR. *RAPSN*-Mutationen spielen besonders bei CMS-Patienten aus dem mitteleuropäischen Raum aufgrund ihrer Häufigkeit eine wichtige Rolle. Eine Missense-Mutation im *RAPSN*-Gen, die Mutation N88K, ist bei allen bisher in der Literatur beschriebenen Patienten mit *RAPSN*-Mutationen im translatierten Bereich des Gens auf mindestens einem Allel zu finden.

Funktionelle *in vitro* Experimente zur Untersuchung von Expression des betroffenen Proteins, kinetischer Eigenschaften des AChR und der Interaktion zwischen den Molekülen an der neuromuskulären Endplatte können eine Erklärung liefern für die Pathogenität der Mutation. Darüber hinaus bringen solche experimentellen Studien aber auch einen detaillierteren Einblick in die komplexen Mechanismen der synaptischen Signalübertragung vom Nerv auf den Muskel. Der nikotinische AChR kann dabei auch als ein Modell gesehen werden für Rezeptoren im weitaus schwieriger zugänglichen Zentralnervensystem.

IV. Material und Methoden

1. Patienten

Patientenmaterial (EDTA-Vollblut und genomische DNA) stammt aus dem Friedrich-Baur-Institut der Medizinischen Fakultät an der Neurologischen Klinik und Poliklinik der LMU München und wurde von Kliniken aus dem In- und Ausland zur molekulargenetischen Analyse eingesandt. Anhand eines eigens dafür konzipierten Fragebogens (siehe Anhang) wurden die klinischen Daten der Patienten erfasst. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde auch Material (EDTA-Vollblut, genomische DNA) von Angehörigen der jeweiligen Patienten und von Normalkontrollen analysiert.

Alle Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung der Patienten bzw. der Erziehungsberechtigten. Ein positives Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität liegt vor (Projektnummer: 084/00).

2. Chemikalien

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

3. DNA-Extraktion

Genomische DNA wurde aus EDTA-Vollblut extrahiert unter Verwendung des Promega Wizard Genomic DNA Purification Kits (Promega). Die Extraktion erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

4. Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Der Nullabgleich wurde mit dem Lösungsmittel der Nukleinsäure-Probe durchgeführt. Die photometrische Messung der DNA-Probe (1:50 oder 1:100 verdünnt) erfolgte bei den Wellenlängen 260 und 280 nm, wobei der Wert 260 nm dem Absorptionsmaximum von DNA und RNA, 280 nm dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht. Mit Hilfe des

Quotienten OD_{260}/OD_{280} ließ sich aus den Ergebnissen die Reinheit der Nukleinsäurelösung berechnen.

Zur Berechnung wurden folgende Faktoren verwendet:

1 OD_{260} entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngige DNA oder RNA

1 OD_{260} entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA

1 OD_{260} entspricht 33 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotide

5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

5.1 Prinzip der PCR

Mittels der von Mullis entwickelten Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction = PCR) ist es möglich, *in vitro* definierte Abschnitte von DNA exponentiell zu vermehren (Mullis, 1990). Dieses Verfahren wurde genutzt, um in entsprechenden Genen kodierende Regionen, flankierende intronische Regionen oder Promotorregionen zu amplifizieren, aber auch um mit Hilfe von mismatch-Primern modifizierte Sequenzabschnitte zu generieren.

5.2 PCR-Primer

Auf der Basis der in der Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) veröffentlichten Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden die PCR-Primer entworfen. Die Synthese erfolgte durch die Abteilung von Herrn Dr. G Arnold, Genzentrum, LMU München. Eine Liste der verwendeten Primer findet sich im Anhang.

5.3 Reaktionsbedingungen

Standard-PCR-Protokoll

50 μl Reaktionsansatz enthielten typischerweise:

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

50 pmol sense Primer

50 pmol antisense Primer

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

100-500 ng genomische DNA

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

Die PCR-Bedingungen wurden in manchen Fällen durch Zugabe von Mg^{2+} und/oder 10% Dimethylsulfoxid und Änderung des pH-Wertes optimiert.

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

Beispiel für ein PCR-Programm:

1. 95°C : 2min	Denaturierung der DNA
2. 40 Zyklen: (1) 95°C : 15 sec (2) 56°C : 1 min (3) 72°C : 2 min	Aufschmelzen der DNA Doppelstränge Anlagern der Primer (Annealing) Synthese des DNA Doppelstranges (Extension)
3. 72°C : 7 min	Abschließende Extension

Modifikationen des Standard-PCR-Protokolls

Sollten DNA Fragmente amplifiziert werden, die größer waren als 2 kb, wurde eine Expand Long Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche) anstelle der *Taq* Polymerase verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden anhand des Protokolls des Herstellers verändert.

Bei geringer Konzentration der Ausgangs-DNA wurde eine sogenannte Nested-PCR-Analyse durchgeführt, um ausreichende Mengen an PCR-Produkten zu erhalten. Dabei folgt einer ersten PCR eine weitere PCR mit Primern, die innerhalb des ersten Produkts liegen.

5.4 Reinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden auf Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Konzentration der Agarosegele lag dabei zwischen 1 und 4 %, abhängig von der Fragmentgröße. Nach dem Ausschneiden der Bereiche mit den gewünschten PCR-Produkten, wurden diese mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) oder High Pure PCR Purification Kit (Roche) entsprechend den Angaben des Herstellers gereinigt.

6. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse (RFLP)

Restriktionsenzyme schneiden DNA an spezifischen Stellen. Ist die Sequenz jedoch verändert, sei es durch eine Mutation oder einen Polymorphismus, kann diese Schnittstelle

wegfallen oder eine neue Schnittstelle entstehen. Man macht sich dies bei der RFLP zunutze, und kann so mithilfe von Restriktionsenzymen spezifisch auf bestimmte Mutationen oder Polymorphismen testen.

Das zu testende PCR-Produkt wurde dazu mit 3 µl 10x Puffer und 1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym (10-20 Units; verwendet wurden Enzyme der Firmen MBI Fermentas oder New England Biolabs) versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 30 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde dann bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur für 3-12 Stunden inkubiert.

In der Gel-Elektrophorese konnten anschließend das Wildtyp-Allel und das veränderte Allel anhand der Länge der Restriktionsfragmente unterschieden werden.

7. Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der PCR-Produkte und Plasmide wurde teilweise durch die Abteilung von Herrn Dr. H. Blum, Genzentrum, LMU-München, durchgeführt, teilweise durch die Firma Medigenomix, Martinsried/München. Dabei wurden DNA-Sequenziergeräte der Firma Applied Biosystems (ABI Prism 377) und fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Terminatoren verwendet.

Um die Sequenzen auf potentielle Mutationen hin zu untersuchen, wurden sie computergestützt online über den Server des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) mit der entsprechenden Wildtypsequenz verglichen.

8. Genotypenanalyse

Die Genotypenanalyse des *CHRND*-Gens erfolgte mit Hilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker: D2S172 (Position des Markers auf Chromosom 2: 230,998 Mbp), D2S2193 (232,063 Mbp), *CHRND* (233,216-233,226 Mbp), *CHRND*-1 (intragenischer Marker), D2S2344 (233,270 Mbp), D2S206 (233,533 Mbp), D2S2176 (233,573 Mbp). Diese wurden online, basierend auf Informationen des University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, Sequenzversion Mai 2004) ausgewählt. Die Bestimmung der Fragmentlängen wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. A. Huebner, Klinik und Poliklinik für Kinder-und Jugendmedizin, TU Dresden durchgeführt.

9. Klonierungen

9.1 Einführen der Mutation *CHRND* E381K in den Vektor δ AChR-pRC/CMV2

Das Plasmid pBlueskript SK mit dem Gen für die delta Untereinheit des AChR (Maus-cDNA; Aminosäure E381 entspricht E384 der Maus-Sequenz) wurde als Matrize für eine mismatch PCR verwendet. Mit Hilfe des sense Primers Dks (Sequenz siehe Anhang) wurde so die Mutation E381K (G>A) eingeführt. Sowohl das Plasmid, als auch das entstandene PCR-Fragment, enthalten die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Afl* II und *Nde* I nur einmal in ihrer Sequenz. Nach Restriktionsverdau des Plasmids und des PCR-Fragments mit diesen Enzymen wurde das PCR-Fragment mit der Mutation E381K durch Ligation (Beschreibung siehe unten) in das Plasmid pBlueskript SK eingesetzt. Um sicherzustellen, dass die Mutation E381K in das Plasmid eingebaut worden war und keine Fehler in der Sequenz entstanden waren, wurde das Teilstück sequenziert.

Anschließend wurde die veränderte *CHRND*-cDNA mit den Enzymen *Hind* III und *Not* I in das Plasmid pRc/CMV2 (Invitrogen) umklontiert.

9.2 Einführen der Mutation *RAPSN* R164C in den Vektor *RAPSN*-pEGFP-N1

Das Plasmid *RAPSN*-pEGFP-N1, das für die Klonierung der Mutation R164C und für die Kolokalisationsstudien verwendet wurde, wurde von Dr. David Beeson (Oxford, UK) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid enthält die cDNA für Rapsyn und EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein).

Um die Mutation R164C einzuführen, wurde an *RAPSN*-pEGFP-N1 eine mismatch PCR durchgeführt, durch die mit Hilfe des sense Primers Rks (Sequenz siehe Anhang) die Mutation (C>T) erzeugt wird. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Esp* I verdaut. Da das Plasmid zwei Schnittstellen für *Xho* I enthält, musste hier eine Drei-Fragmenten-Ligation durchgeführt werden.

Um zu kontrollieren, ob die Mutation richtig eingefügt worden war und um Fehler in der Sequenz auszuschließen, wurde bei den erhaltenen Klonen das eingesetzte Teilstück sequenziert.

10. Ligation

Die Ligationen für die Klonierungen wurden mit der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) anhand der Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden bei 16°C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Wurde das Produkt anschließend in *E.coli* transformiert, musste die Ligase vorher für 20 min bei 65°C inaktiviert werden.

Die folgenden Methoden zur Behandlung und Kultivierung von prokaryontischen und eukaryontischen Zellen und die Zusammensetzung der verwendeten Medien sind angelehnt an die Protokolle aus Sambrook und Russel *Molecular Cloning - a laboratory manual*.

11. Transformation von *E.coli*

Die Aufnahme der Plasmid-DNA in den kompetenten Bakterienstamm *E.coli* DH5 α (Invitrogen) erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. 1 μ l des Ligationsansatzes wurde zusammen mit den Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert, dann für 45 sec in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt, bevor er für 2 min auf Eis abgekühlt wurde.

12. Bakterienkultur

Der Bakterienstamm *E.coli* DH5 α (Invitrogen) wurde entweder in Luria-Bertani(LB)-Flüssigmedium oder auf LB-Platten kultiviert. Je nach Resistenzen des Plasmids wurden die Antibiotika Ampicillin (bei δ AChR-pRc/CMV2; Endkonzentration 100 μ g/ml) bzw. Kanamycin (bei RAPS N -pEGFP-N1; Endkonzentration 50 μ g/ml) zugegeben.

13. Extraktion der Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Extraktion der Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde für kleinere Mengen mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen, 3 ml Bakterienkultur) anhand der Protokolle des Herstellers durchgeführt, für größere Mengen mit Hilfe des Genopure Plasmid Maxi Kits (Roche, 200 ml Bakterienkultur).

14. Transfektion in HEK 293-Zellen

Um die Expressionsprodukte der veränderten Gene in eukaryonten Zellen analysieren zu können, wurde die Plasmid-DNA in Zellen der humanen embryonalen Nierenepithel-Zelllinie HEK 293 transfiziert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM kultiviert (Dulbecco's Modified Eagle Medium wurde supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, Glutamin, und den Antibiotika Penicillin und Streptomycin; Medien und Reagenzien der Firmen Gibco/Invitrogen und PAA Laboratories GmbH).

Für die Transfektion wurde die Calcium-Phosphat-Methode angewandt.

Am Tag vor der Transfektion wurden die HEK 293 Zellen auf unbeschichtete Glasdeckplättchen in 6-well-Platten mit DMEM ausgesät (Zelldichte 10⁵ bis 3x10⁵ pro well). Eine Stunde vor Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt (2ml pro well). Die Zellen wurden mit folgenden Plasmidmengen transfiziert: cDNA jeder Untereinheit des AChR im Verhältnis $\alpha : \beta : \delta : \epsilon = 2 : 1 : 1 : 1$ (wobei ein Teil 2,5µg cDNA entsprach) und/oder 2,5 µg cDNA des Rapsyn Wildtyps/Rapsyn Mutante. Zur Kontrolle wurden auch Zellen nur mit cDNA der AChR-Untereinheiten α , β und ϵ transfiziert, um die AChR-Expression bei Fehlen der δ -Untereinheit zu überprüfen. Plasmidmengen entsprachen hier dem Verhältnis $\alpha : \beta : \epsilon = 2 : 1 : 1$ (ein Teil wieder 2,5 µg cDNA).

Für die Transfektion wurde die cDNA mit 10 µl Calciumchloridlösung (2,5M CaCl₂, sterilfiltriert) gemischt und die Lösung mit Tris-EDTA (1 mM Tris-Cl pH 7,6; 0,1 mM EDTA; sterilfiltriert) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Dann wurden 100 µl 2x HEPES/Saline (140 mM NaCl; 1,5 mM Na₂ HPO₄ x 2 H₂O; 50 mM HEPES; pH 7,05; sterilfiltriert) zugegeben, die Mischung 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen getropft. 12 bis 16 Stunden nach der Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt.

15. Färbung mit α -Bungarotoxin

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS (Phosphate Buffered Saline) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Markierung der AChR wurde das mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehene AlexaFluor®594-konjugierte α -Bungarotoxin (Molecular Probes/Invitrogen) verwendet. Die Zellen wurden vor der Färbung nicht permeabilisiert, um ausschließlich die Rezeptoren an der

Zellmembran zu markieren und nicht diejenigen im Zytoplasma der Zelle. Die Glasdeckplättchen mit den Zellen wurden mit 2 µg/ml AlexaFluor®594-αBungarotoxin für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vier Mal mit PBS gewaschen, mit Dako® Fluorescent Mounting Medium (Dako) auf Objektträgern eingedeckt und nach dem Trocknen mit Nagellack versiegelt.

16. Mikroskopie

Zur Visualisierung der Zellen und zur Lokalisation der Genprodukte, wurde Fluoreszenz- und konfokale Laser-Scanning Mikroskopie angewandt. Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Leica DM RBD Mikroskop mit einer Zeiss AxioCam HR Kamera verwendet, für die konfokale Mikroskopie ein Leica DM IRB/E Fluoreszenzmikroskop mit einem Krypton-Argon Laser (Leica TCS NT System, Leica Microsystems).

Fluoreszenzmikroskopisch wurden insgesamt 100 Zellen pro Mutation aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten ausgewertet, die sowohl Rapsyn, als auch den AChR exprimierten. Diese wurden eingeteilt in Zellen mit Ko-Clusterbildung der beiden Moleküle und Zellen ohne Ko-Cluster.

V. Ergebnisse

Es ist mittlerweile bekannt, dass Mutationen im postsynaptischen Bereich der neuromuskulären Endplatte die häufigsten Ursachen für CMS darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden CMS-Patienten analysiert und molekulargenetisch auf Mutationen insbesondere in den Genen *CHRND* und *RAPSN* untersucht. Zwei der neu identifizierten Mutationen wurden anschließend funktionell charakterisiert, um Hinweise auf den zugrunde liegenden Pathomechanismus zu erlangen.

1. Analyse des *CHRND*-Gens (Müller et al, 2006b)

1.1 Klinische und molekulargenetische Analyse

Im *CHRND*-Gen, das für die δ -Untereinheit des AChR kodiert, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei bisher noch nicht in der Literatur beschriebene, compound heterozygote Mutationen bei einem deutschen CMS-Patienten gefunden. Bislang sind für dieses Gen weltweit erst sieben weitere Mutationen, die als Ursache für CMS gelten, beschrieben worden (Engel and Sine, 2005).

Bei unserem Patienten handelt es sich um einen heute 7-jährigen Jungen. Es ist das dritte Kind deutscher, nicht-konsanguiner Eltern; beide Geschwister und die Eltern zeigen keine Symptome einer neuromuskulären Erkrankung. Der Patient wurde nach unauffälliger Schwangerschaft in der 38. SSW durch Kaiserschnitt geboren und zeigte bei Geburt außer einem hohen Gaumen keine weiteren Auffälligkeiten. In der Neugeborenenperiode fielen bei dem Säugling jedoch neben einer tageszeitabhängigen, generalisierten muskulären Hypotonie, häufiges Verschlucken und Trinkschwierigkeiten, eine linksseitige Ptose und eine Schwäche der mimischen Muskulatur auf. Die allgemeine motorische Entwicklung war etwas verzögert. Leichte virale Infektionen führten zur krisenhaften Verschlechterung des klinischen Bildes; im Alter von 7 Monaten musste der Patient im Rahmen eines solchen Infektes wegen wiederholter Apnoen für drei Tage maschinell beatmet werden. Die Diagnose CMS wurde im Alter von 18 Monaten gestellt. Es hatte sich im EMG bei repetitiver Stimulation mit 3 Hz ein Dekrement gezeigt, außerdem war der intravenöse Test mit Edrophonium (Camsilon®) positiv ausgefallen. Die daraufhin begonnene Therapie mit Pyridostigminbromid (Mestinon®; momentane Dosis 8mg/kg/Tag) verbesserte die klinische Symptomatik zufriedenstellend. Der

Patient zeigte bei der zuletzt durchgeführten neurologischen Untersuchung eine altersbezogen normale mentale und motorische Entwicklung. Nach körperlicher Anstrengung besteht weiterhin eine leichte muskuläre Schwäche, vor allem in der proximalen Muskulatur der Extremitäten, sowie eine leichte bilaterale Ptose.

Aufgrund der klinischen Symptomatik, die am ehesten auf eine postsynaptische Form der kongenitalen Myasthenie hinweist, wurden zuerst die Gene *CHRNE* und *RAPSN* direkt sequenziert. Dabei ergab sich keine Mutation. Eine Mutation im Gen *COLQ*, die zu einem AChE-Mangel führen würde, war aufgrund der eindeutigen klinischen Verbesserung auf die Therapie mit Cholinesterasehemmern unwahrscheinlich. Durch Analyse der Haplotypen in der Familie des Patienten (Patient, Eltern und zwei gesunde Geschwister) wurde eine Kopplung zum *CHAT*-Gen ausgeschlossen. Eine Kopplung zum *CHRND*-Gen konnte durch die Haplotypenanalyse nicht sicher ausgeschlossen werden, woraufhin dieses Gen direkt sequenziert wurde.

Durch die Sequenzanalyse der kodierenden Regionen, angrenzender intronischer Bereiche, sowie des Promotors des *CHRND* Gens, konnte in Exon 10 ein heterozygoter Basenaustausch (1141G>A) identifiziert werden. Diese Veränderung der Sequenz führt zu dem Aminosäureaustausch E381K.

Mithilfe der RFLP (verwendetes Restriktionsenzym *TaqI*) wurden die Angehörigen des Patienten und 100 Normalkontrollen auf diese Sequenzvariation hin untersucht. Die gesunde Mutter des Patienten trägt die Mutation auf einem ihrer Allele, nicht jedoch der Vater und die beiden Geschwister. Diese Beobachtung bestätigte die Annahme eines rezessiven Erbganges. Auf keinem der 200 Kontrollallele konnte die Mutation E381K nachgewiesen werden.

Da aber die Sequenzanalyse der untersuchten Genabschnitte von *CHRND* bei unserem Patienten keine weitere Mutation ergab, wurde eine Mikrodeletion oder Rekombination auf dem paternalen Allel vermutet. Eine solche Mikrodeletion war von unserer Arbeitsgruppe zuvor schon für die Gene *CHRNE* und *RAPSN* beschrieben worden (Abicht et al., 2002; Müller et al., 2004). Long-range-PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen wurden durchgeführt, um die genomische DNA des Patienten auf eine Deletion hin zu analysieren. Sowohl bei dem Patienten, als auch bei seinem gesunden Vater und Bruder, konnte bei der PCR mit den Primern D4s (in Intron 5) und D8as (am Ende von Exon 12) eine zusätzliche Bande nachgewiesen werden. Diese Bande hatte eine Länge von etwa 4500 bp, die erwartete Bande eine Länge von 6746 bp. Durch Sequenzierung mit dem Primer D6s (in Intron 7) konnte gezeigt werden, dass der Beginn der Deletion in Exon 8 liegt (79 Basen entfernt vom Beginn des Exons) und sich bis in Intron 9 erstreckt (Ende der Deletion 282 Basen vor dem

Beginn von Exon 10; 49 bp in ein *AluSc*-Element in Intron 9 hineinreichend). Durch die Deletion von 2218 bp fehlen demnach die Hälfte von Exon 8 und das gesamte Exon 9 des Gens *CHRND*.

Damit war bei dem Patienten neben der missense Mutation E381K auf dem maternal vererbten Allel, auf dem paternal vererbten Allel eine Mikrodeletion der Länge 2,2 kb nachgewiesen.

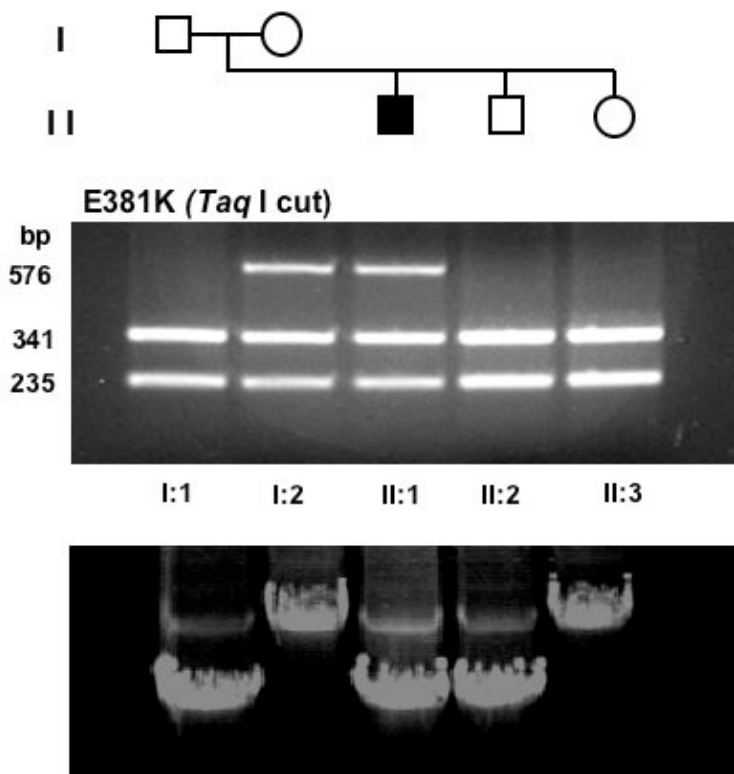


Abb. 3 Oberes Gelbild: RFLP-Analyse auf die Mutation E381K in Exon 10 des *CHRND*-Gens. Die Mutation beseitigt eine *TaqI*-Schnittstelle. Der Patient (II:1) und seine Mutter sind heterozygote Träger der Mutation, der Vater und die zwei Geschwister tragen die Mutation nicht.

Unteres Gelbild: Long-range-PCR im *CHRND*-Gen mit dem Primerpaar D4s und D8a. Beim Patienten, seinem Vater und seinem Bruder wurde zusätzlich zu der berechneten Bande von 6,75 kb eine kürzere Bande von 4,5 kb erhalten

1.2 Funktionelle Analyse der Mutation *CHRND* E381K

Die Untereinheiten des AChR weisen eine signifikante Sequenzähnlichkeit auf und hochauflösende Strukturanalysen haben gezeigt, dass sie eine ähnliche Topologie besitzen: Sie bestehen aus vier Transmembran-Regionen (M1-M4), einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne und - zwischen M3 und M4 - einer zytoplasmatischen Schleife (Unwin, 2005). Die Mutation E381K liegt innerhalb der zytoplasmatischen Schleife der δ -Untereinheit. Die Aminosäure Glutamat ist an Position 381 der δ -Untereinheit innerhalb verschiedener Spezies und ebenso in der menschlichen ϵ -Untereinheit (hier entspricht sie der Position 376) hochkonserviert (siehe Abbildung).

δ -subunit		E381K ▼	
human	AEEYFLLKSRSDLMF	E	KQSERHGLARRLTTA
bovine	AEEYF SL KSRSDLMF	E	KQSERHGLARRLTTA
mouse	AEEYF SL KSRSDLMF	E	KQSERHGLARRLTTA
rat	AEEYF SL KSRSDLMF	E	KQSERHGLARRLTTA
frog	AEEY YS VKSRSELMF	E	KQSERHGL TSRATPA
chicken	AEEY YS VKSRSELMF	E	KQSERHGLAS RVTPA
danio rerio	AEEY YS VKSRSELMF	E	KQSERHGLA ARPTPK
electric ray	A QEYFN IKSRSELMF	E	KQSERHGL VPRVTPR
takifugu rubripes	AEEY DS VKSRSELMF	E	KQ GRHG -----
ϵ -subunit			
human	AEE LILKK PRSELVF	E	GQRHRQGTWTA AFCQ
γ -subunit			
human	GEE VALCL PRSELLF	Q	QQRQGLVA AALEKL

Abb. 4 Alignment der Aminosäuresequenzen der δ -, ϵ - und γ -Untereinheiten verschiedener Spezies

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

Um die Mutation E381K funktionell zu charakterisieren, wurde sie kloniert (Vektor δ -AChR-pRC/CMV2) und das mutierte Konstrukt in HEK293 Zellen exprimiert. Mit Hilfe von α -Bungarotoxin war es dann möglich, die AChR (Untereinheiten transfiziert mit den Vektoren

α -AChR-pRC/CMV2, β -AChR-pRC/CMV2 und ϵ -AChR-pRC/CMV2) *in vitro* an der Oberfläche der Zellembrenn zu markieren und so eine quantitative und qualitative Aussage bezüglich der Expression der AChR mit der veränderten δ -Untereinheit zu treffen. Da die Zellen vor der Färbung mit α -Bungarotoxin nicht permeabilisiert worden waren, wurden nur die AChR an der Zelloberfläche markiert.

Der direkte Vergleich zwischen den transfizierten Wildtyp-Untereinheiten und den Rezeptoren mit der veränderten δ -Untereinheit zeigte unter dem Mikroskop eine ähnliche Dichte und räumliche Verteilung der Rezeptoren, die als Punkte entlang der Membran sichtbar wurden. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit den α -, β -, und ϵ -Untereinheiten transfiziert, woraufhin keine Rezeptor-Komplexe an der Membran zu sehen waren (Färbung gleichmäßig blassrot). Im Labor von David Beeson an der Universität Oxford wurde darüber hinaus ein ähnlicher Versuch mit radioaktiv markiertem Bungarotoxin (^{125}I - α -Bungarotoxin) durchgeführt, um die Oberflächenexpression von Rezeptoren mit Wildtyp- Untereinheiten und mit veränderter δ -Untereinheit quantitativ vergleichen zu können. Hier zeigte sich, dass sich in Zellen, die mit der veränderten δ -Untereinheit transfiziert waren, die Expressionsrate auf 70% im Vergleich zum Wildtyp verringerte.

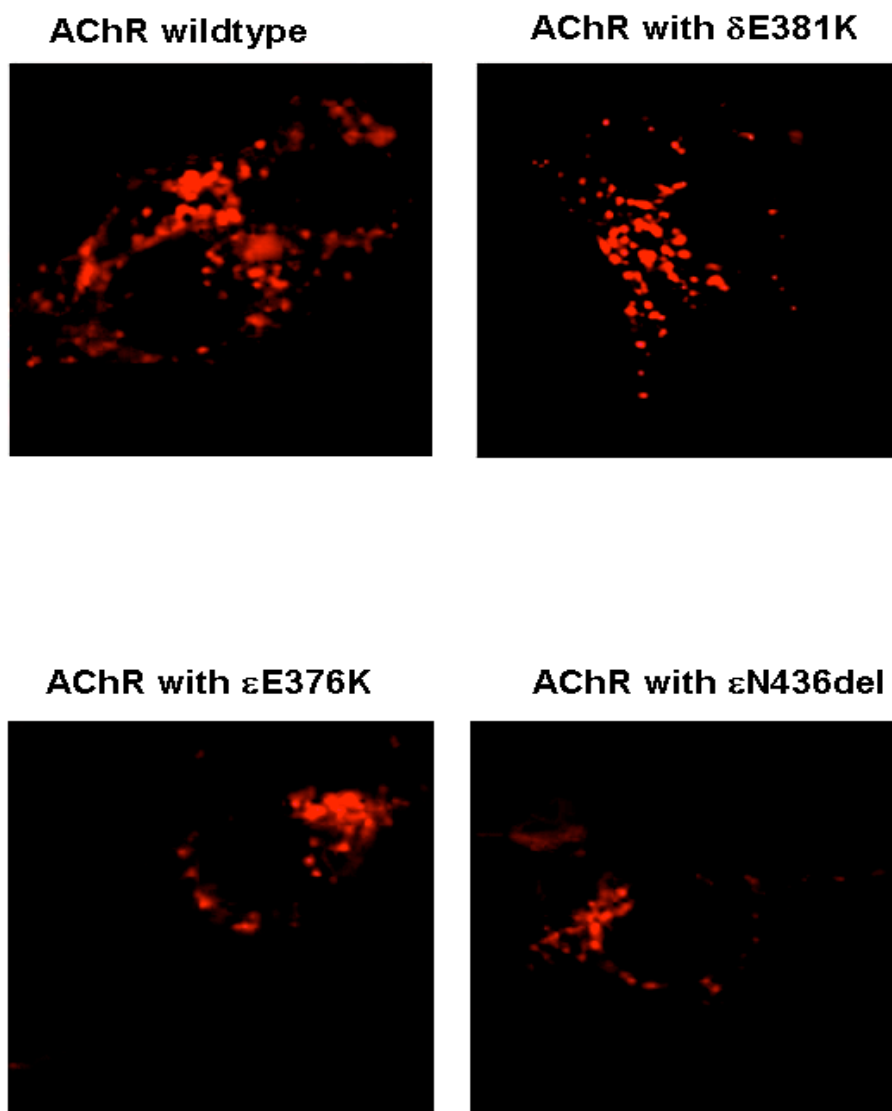
Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der Mutation E381K wurde eine Kolokalisationsstudie mit dem Protein Rapsyn durchgeführt. Es ist in der Literatur beschrieben, dass bei Kotransfektion von Rapsyn- und Wildtyp- AChR- cDNA die Moleküle Cluster an der Zellmembran bilden (Froehner et al., 1990) und dass für die Interaktion der Moleküle die zytoplasmatischen Schleifen der AChR-Untereinheiten eine zentrale Rolle spielen (Huebsch and Maimone, 2003). Um zu untersuchen, ob die Mutation E381K im zytoplasmatischen Loop der δ -Untereinheit einen Effekt auf diese Interaktion hat, wurde neben AChR mit der veränderten δ -Untereinheit auch Rapsyn-EGFP (im Vektor pEGFP-N1) in HEK293-Zellen transfiziert. Durch Markierung der AChR mit α -Bungarotoxin konnte nun die Kolokalisation der Moleküle bzw. die Clusterbildung analysiert werden.

Wie schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, kommt es *in vitro* in den mit Wildtyp-AChR und Rapsyn transfizierten Zellen nicht zu einem vollständigen Ko-Clustering der Moleküle (Ohno et al., 2002). In unserem Experiment waren bei 67 von 100 im Fluoreszenzmikroskop untersuchten, kotransfizierten Zellen Cluster aus Wildtyp-AChR und Rapsyn zu finden. Wurden die Zellen jedoch mit Rapsyn- und AChR-cDNA mit der Mutation E381K transfiziert, waren nur noch 33% der Zellen positiv für Ko-Cluster der beiden Moleküle. Auffällig war hier außerdem, dass in den positiven Zellen nur jeweils zwei bis drei

Cluster pro Zelle zu finden waren, während in Zellen mit Wildtyp-AChR und Rapsyn an der gesamten Membran Ko-Cluster nachgewiesen werden konnten.

Um den Mechanismus der Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Schleife der AChR-Untereinheiten und Rapsyn noch weiter zu untersuchen, wurde die korrespondierende Mutation E nach K der δ -Untereinheit in die ϵ -Untereinheit (*CHRNE* E376K) eingeführt und ebenso in HEK293 Zellen exprimiert. Das Bild, das sich bei Analyse des Clusterverhaltens von AChR mit dieser Mutation und Rapsyn ergab, unterschied sich jedoch nicht vom Clusterverhalten des Wildtyp-AChR und Rapsyn. Auch nach Kotransfektion der Mutation N436del der ϵ -Untereinheit mit Rapsyn veränderte sich das Clusterverhalten der Moleküle nicht.

A



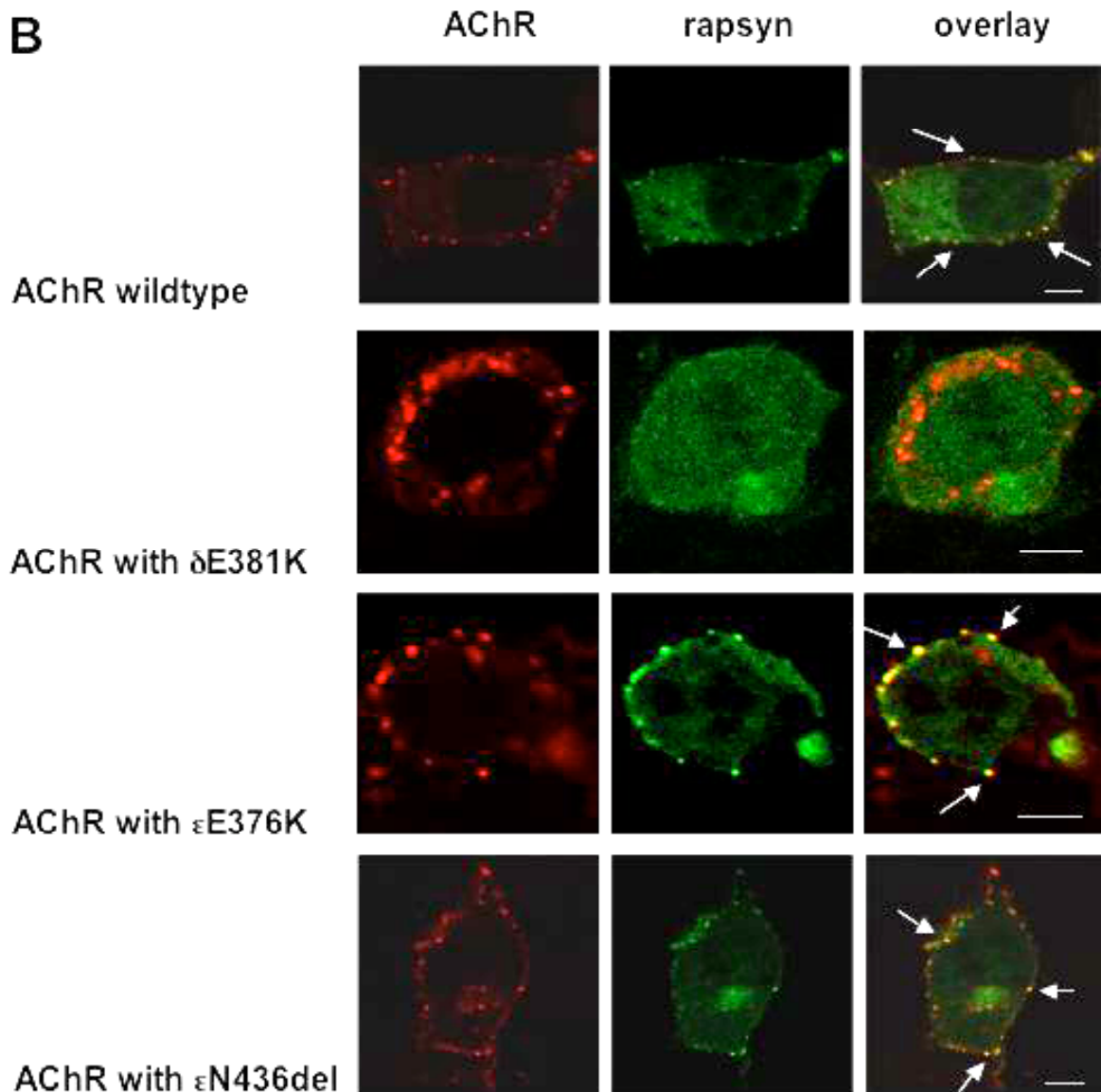


Abb. 5 A und B Konfokalmikroskopische Analyse von HEK 293 Zellen

Abb A: Expression von Wildtyp, $\delta E381K$ -, $\epsilon E376K$ - und $\epsilon N436del$ - AChR in HEK 293 Zellen. Zellen unpermeabilisiert; AChR mit Alexa Fluor^R 594 konjugiertem α -Bungarotoxin markiert. In allen vier Fällen wird AChR an der Zelloberfläche exprimiert.

Abb B: Verteilung von AChR an der Zellmembran (rot markiert; linke Spalte) und Rapsyn-EGFP (grün markiert; mittlere Spalte) in HEK 293 Zellen. Die rechte Spalte zeigt jeweils die beiden Bilder überlagert; gelb erscheinen die Bereiche, in denen AChR und Rapsyn kolokalisieren, typische Cluster sind mit Pfeilen markiert. Die Zellen waren jeweils kotransfiziert mit Rapsyn-EGFP und entweder Wildtyp AChR (erste Zeile), AChR mit $\delta E381K$ (zweite Zeile), AChR mit $\epsilon E376K$ (dritte Zeile) oder AChR mit $\epsilon N436del$ (vierte Zeile). Bei Transfektion von AChR mit $\epsilon E376K$ und $\epsilon N436del$ zeigten sich ebenso viele Cluster wie bei Wildtyp AChR; bei Transfektion von AChR mit $\delta E381K$ bildeten sich nur in etwa einem Drittel der Zellen Cluster. Zeile zwei zeigt das typische Bild einer Zelle, in der keine Kolokalisation von Rapsyn und AChR nachgewiesen werden konnte.

Der Maßstab entspricht 10 μ m.

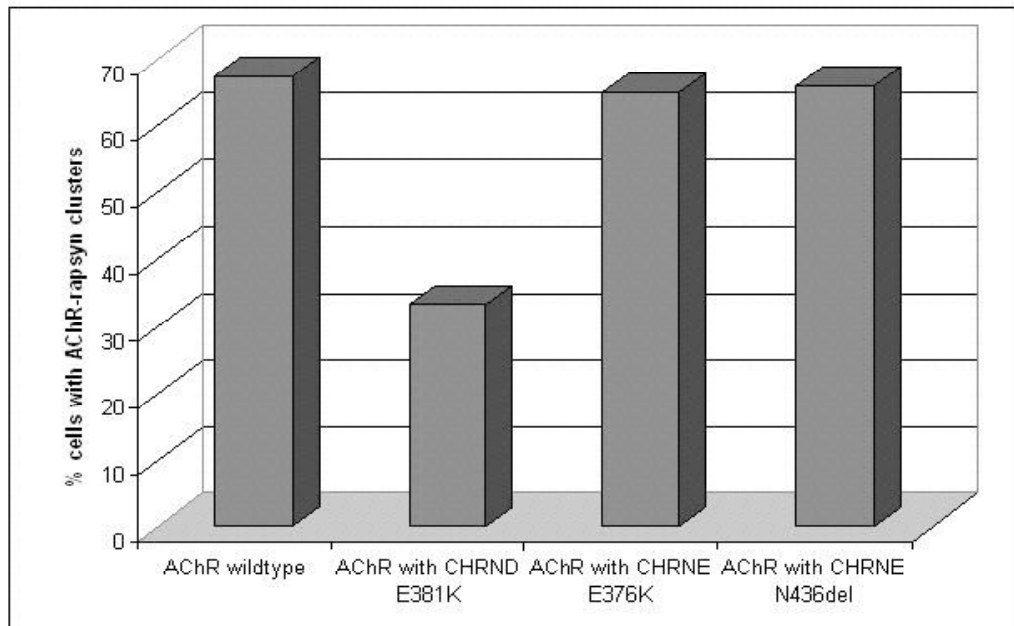


Abb. 6 Balkendiagramm

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der kotransfizierten Zellen, in denen Wildtyp- bzw. mutierter AChR mit Rapsyn ko-clustert

2. Analyse des *RAPSN*-Gens

2.1 Klinische und molekulargenetische Analyse

Mutationen im *RAPSN*-Gen, das für das postsynaptische Protein Rapsyn (Receptor Associated Protein of the Synapse) kodiert, sind eine relativ häufige Ursache für CMS (Ohno et al., 2002; Burke et al., 2003; Dunne and Maselli, 2003; Müller et al., 2003; Richard et al., 2003).

Aus unserem Patientenkollektiv wurde bei 38 Patienten das gesamte Gen *RAPSN* sequenziert, bei 73 weiteren nur Exon 2, da dort die häufigste Mutation in diesem Gen, N88K, liegt.

Bei 11 Patienten aus sieben unabhängigen Familien konnten Rapsyn-Mutationen nachgewiesen werden. Sieben dieser Patienten trugen die Mutation N88K homozygot, bei drei Patienten lag N88K compound heterozygot mit einer weiteren Rapsyn-Mutation vor (bei einem Patienten die missense-Mutation A246V, bei einem Geschwisterpaar die Frameshift-Mutation 1177delAA). Nur ein Patient trug die Mutation N88K auf keinem der beiden Allele:

dieser Patient trug homozygot eine andere Mutation (R164C), worauf in einem eigenen Abschnitt dieser Arbeit genauer eingegangen wird (s.u.).

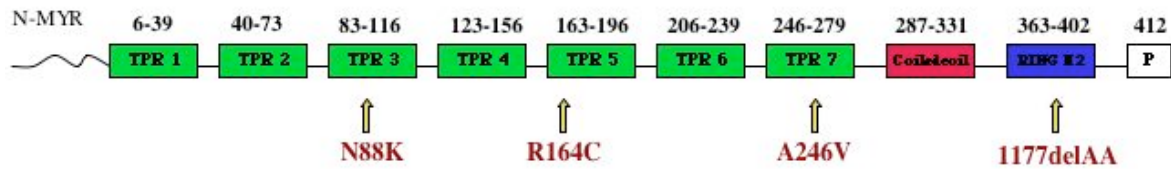


Abb. 7 Lokalisation der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten RAPSIN-Mutationen.

TPR = Tetratricopeptide repeat

N-Myr = Myristinsäureanker am N-Terminus

P = Phosphorylierungsstelle

Klinisch war allen Rapsyn-Patienten das Auftreten einer Ptose, der Nachweis eines Dekrements bei repetitiver Nervenstimulation und das gute Ansprechen auf Cholinesterasehemmer gemeinsam. Ophthalmoparesen traten bei keinem der Patienten auf. Bei einigen Patienten kam es zu krisenhaften Verschlechterungen der Symptomatik im Rahmen von Infekten, die sie beatmungspflichtig machten. Die meisten unserer Patienten hatten eine proximal betonte muskuläre Schwäche, die durch körperliche Anstrengung verstärkt wurde; auch Schwäche der bulbären Muskulatur wurde bei einigen Patienten dokumentiert. Der Beginn der Myasthenie-Symptomatik lag meist im ersten Lebensjahr. Bei einigen Patienten fielen bei Geburt Dysmorphien des Gesichts und/oder Gelenkontrakturen auf.

2.1.1 Die Mutation *RAPSIN* N88K

Die Mutation N88K (264C>A) liegt in Exon 2 des *RAPSIN*-Gens im Bereich des dritten Tetratricopeptid Repeats. Die Aminosäure Asparagin an Position 88 ist innerhalb verschiedener Spezies hochkonserviert. Es konnte von einer Arbeitsgruppe in den USA gezeigt werden, dass die Mutation N88K die Ko-Clusterbildung zwischen Rapsyn und AChR vermindert (Ohno et al., 2002).

Klinisch zeigten alle Patienten unseres Kollektivs mit homozygoter Mutation N88K eine Ptose der Augenlider. Die Ausprägung anderer typischer Myasthenie-Symptome variierte jedoch recht stark. Selbst unter Geschwisterpaaren, die die Mutation beide homozygot tragen, waren sowohl das Alter, in dem die Symptomatik erstmals auftrat, als auch der Schweregrad der Erkrankung unterschiedlich. Die ersten Symptome wurden bei vier der Patienten bereits im Laufe des ersten Lebensjahres bemerkt, bei einem Patienten im 3. Lebensjahr, bei einem anderen erst im 10. Lebensjahr. Im Falle eines weiteren Patienten konnte das Auftreten der ersten Symptome aufgrund der sehr leichten Ausprägung im Nachhinein nicht mehr angegeben werden. Bei vier Patienten traten im Verlauf der Erkrankung respiratorische Krisen im Rahmen von Infekten auf. Weitere häufige Symptome waren eine proximale Schwäche der Extremitätenmuskulatur und eine Schwäche der bulbären Muskulatur. Bei sechs der sieben Patienten wurde ein Test mit intravenösen Cholinesterasehemmern durchgeführt, der bei allen positiv ausfiel; auch konnte bei all diesen Patienten ein Dekrement nachgewiesen werden.

Schon bei der Erstbeschreibung von Mutationen des *RAPSN*-Gens als einer Ursache von CMS (Ohno et al., 2002) fiel den Autoren auf, dass alle vier vorgestellten Patienten die Mutation N88K auf mindestens einem ihrer Allele trugen. Diese Beobachtung wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt (Burke et al., 2003; Dunne and Maselli, 2003; Richard et al., 2003; Müller et al., 2003). Die Frage drängte sich somit auf, ob die Mutation N88K auf einen sogenannten Founder-Effekt zurückgeht, also einen gemeinsamen Ursprung hat, oder ob die Mutation mehrfach unabhängig voneinander entstanden war. Um die Hypothese eines Founder-Effekts zu prüfen, wurden in unserer Arbeitsgruppe insgesamt 21 SNPs (single nucleotide polymorphisms) bei homozygoten Trägern von N88K analysiert, vier davon liegen im *RAPSN*-Gen, der Rest in verschieden großer Entfernung um das Gen verteilt. Dabei wurde bei diesen Patienten ein gemeinsamer Abschnitt von 360 kb auf Chromosom 11 nachgewiesen, der somit einen Kern-Founder-Haplotyp darstellt. Lässt man die Ergebnisse der Analyse eines indischen Patienten unberücksichtigt, so ergibt sich ein erweiterter Founder-Haplotyp mit einer Länge von 1,4 Mb. Im Vergleich mit 40 Kontrollallelen konnte die Hypothese eines Founder-Effekts signifikant bestätigt werden (Müller et al., 2004a).

2.1.2 Die Mutation *RAPSN* A246V

Die Mutation A246V (737C>T; Exon 4 des *RAPSN*-Gens) wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits bei einem anderen Patienten beschrieben (Müller et al., 2003). Die Aminosäure A246

ist hochkonserviert in verschiedenen Spezies und liegt an erster Stelle des Tetratricopeptid Repeats 7. Bei der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Patientin lag diese Missense Mutation compound heterozygot mit N88K vor, wobei die Mutation N88K mit dem paternalen, die Mutation A246V mit dem maternalen Allel vererbt wurde. Der Krankheitsverlauf der heute 16-jährigen Patientin war relativ schwer; bei Geburt fielen Arthrogrypose und allgemeine muskuläre Hypotonie auf, im Säuglingsalter kam es im Rahmen von Infekten zu respiratorischen Krisen, die maschinelle Beatmung notwendig machten.

2.1.3 Die Mutation *RAPSN* 1177delAA

Bei einem Geschwisterpaar lag neben N88K die Mutation 1177delAA compound heterozygot vor. Die Mutation N88K wurde in diesem Fall vom Vater der Patienten vererbt, die Mutation 1177delAA von der Mutter. Die Mutation 1177delAA wurde ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (Burke et al., 2003); sie liegt in Exon 8 des *RAPSN*-Gens und führt durch den Verlust von zwei Basen zu einem Frameshift. Interessanterweise unterscheiden sich die beiden Geschwister unseres Patientenkollektivs bezüglich ihrer klinischen Symptomatik relativ stark voneinander. Beide Patienten, die heute 9 und 12 Jahre alt sind, waren von Geburt an betroffen und entwickelten eine Ptose; nur einer der beiden zeigte jedoch eine generalisierte Muskelschwäche und es kam bei diesem im Kindesalter auch zu respiratorischen Krisen. Die Symptomatik des älteren Bruders blieb weiterhin sehr mild, es war bis zum genetischen Nachweis der Mutationen im Alter von 11 Jahren unklar, ob er überhaupt von CMS betroffen war. Kontrakturen, wie von der Arbeitsgruppe von Dr. Burke für ihre Patienten mit der Mutation 1177delAA beschrieben (Burke et al., 2003), liegen bei beiden Geschwistern nicht vor.

2.1.4 Die Mutation *RAPSN* R164C (Müller et al., 2006a)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei einem Patienten eine in der Literatur bisher noch nicht beschriebene Mutation im *RAPSN*-Gen gefunden. Dieser Patient ist, neben einer weiteren Patientin aus unserem Patientenkollektiv (Mutationen L283P und IVS1-15C>A), der einzige CMS-Patient mit exonischen Rapsyn-Mutationen, der auf keinem seiner Allele die Mutation N88K trägt.

Es handelt sich bei dem Patienten um einen heute 12-jährigen Jungen. Er ist das einzige Kind nicht-konsanguiner, serbischer Eltern. Bei Geburt (APGAR Wert 6 nach 1 min) fielen eine Arthrogryposis multiplex congenita und allgemeine muskuläre Hypotonie auf. Durch Physiotherapie besserten sich die Kontrakturen und die motorische Entwicklung verlief weitgehend normal. Den Eltern fiel jedoch auf, dass ihr Sohn sich langsamer bewegte und früher ermüdete als seine Altersgenossen. Atembeschwerden oder wiederkehrende Apnoen traten nicht auf. Im Alter von acht Jahren wurde bei dem Patienten eine Muskel- und Nervenbiopsie durchgeführt, wobei die Nervenbiopsie ein normales Ergebnis lieferte; in der Muskelbiopsie zeigten sich unspezifische Veränderungen (Vorherrschen von Typ 1 Muskelfasern). Bei einer genauen neurologischen Untersuchung im Alter von zehn Jahren erkannte man Fehlbildungen im Bereich des Gesichts (verlängerter Gesichtsschädel, hoher Gaumen, vorstehende Mandibula), eine leichte Skoliose, mäßige Kontrakturen aller Extremitätengelenke, eine leichte Ptose (ohne Ophthalmoparese), nasale Stimme und mäßige Ermüdbarkeit nach Anstrengung, vor allem in der proximalen Muskulatur. Außerdem zeigte sich ein Dekrement bei repetitiver Stimulation eines distalen Nerven. Durch die Behandlung mit Pyridostigmin (Mestinon^R) in niedriger Dosierung (1-1,5 mg/kg/Tag) verbesserte sich die klinische Symptomatik.

Durch die Sequenzierung des *RAPSN*-Gens konnte bei dem Patienten ein homozygoter Basenaustausch in Exon 2 (490C>T) identifiziert werden. Diese Veränderung der Sequenz führt zum Aminosäureaustausch R164C. Die betroffene Aminosäure Arginin liegt im fünften Tetratricopeptid Repeat des Proteins. Die gesunden Eltern des Patienten sind heterozygote Träger des Aminosäureaustausches; auf keinem der 200 Allele von Normalkontrollen wurde der Aminosäureaustausch R164C nachgewiesen.

2.2 Funktionelle Analyse der Mutation *RAPSN* R164C (Müller et al., 2006a)

Um die Auswirkungen der Mutation R164C des *RAPSN*-Gens auf Proteinebene untersuchen zu können, wurde die Mutation in einen Rapsyn-EGFP-Vektor (pEGFP-N1) kloniert und dieses Konstrukt in HEK293 Zellen exprimiert. Im Fluoreszenzmikroskop wurde dann der Grad der Expression von Wildtyp- und mutiertem Rapsyn verglichen. Soweit beurteilbar, war hier kein Unterschied in Verteilung und Intensität der markierten Moleküle zu erkennen; in beiden Fällen bildete Rapsyn Cluster und größere Aggregate im Zytoplasma der Zellen.

Ähnlich wie bei der funktionellen Analyse der Mutation E381K des *CHRND*-Gens sollte dann überprüft werden, ob die Missense Mutation im *RAPSN*-Gen die Interaktion, im Sinne von

Clusterbildung, zwischen Rapsyn und den Untereinheiten des AChR beeinflusst. Es wurden wieder pro Experiment 100 Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Wurden die Zellen mit Wildtyp-Rapsyn und Wildtyp-AChR transfiziert und mit α -Bungarotoxin gefärbt, war bei etwa zwei Dritteln der kotransfizierten Zellen Ko-Clusterbildung der beiden Moleküle zu beobachten. Waren die Zellen jedoch mit dem Rapsyn-R164C-Konstrukt und Wildtyp-AChR transfiziert, lag der Anteil der Zellen mit Ko-Clustern nur bei 53%.

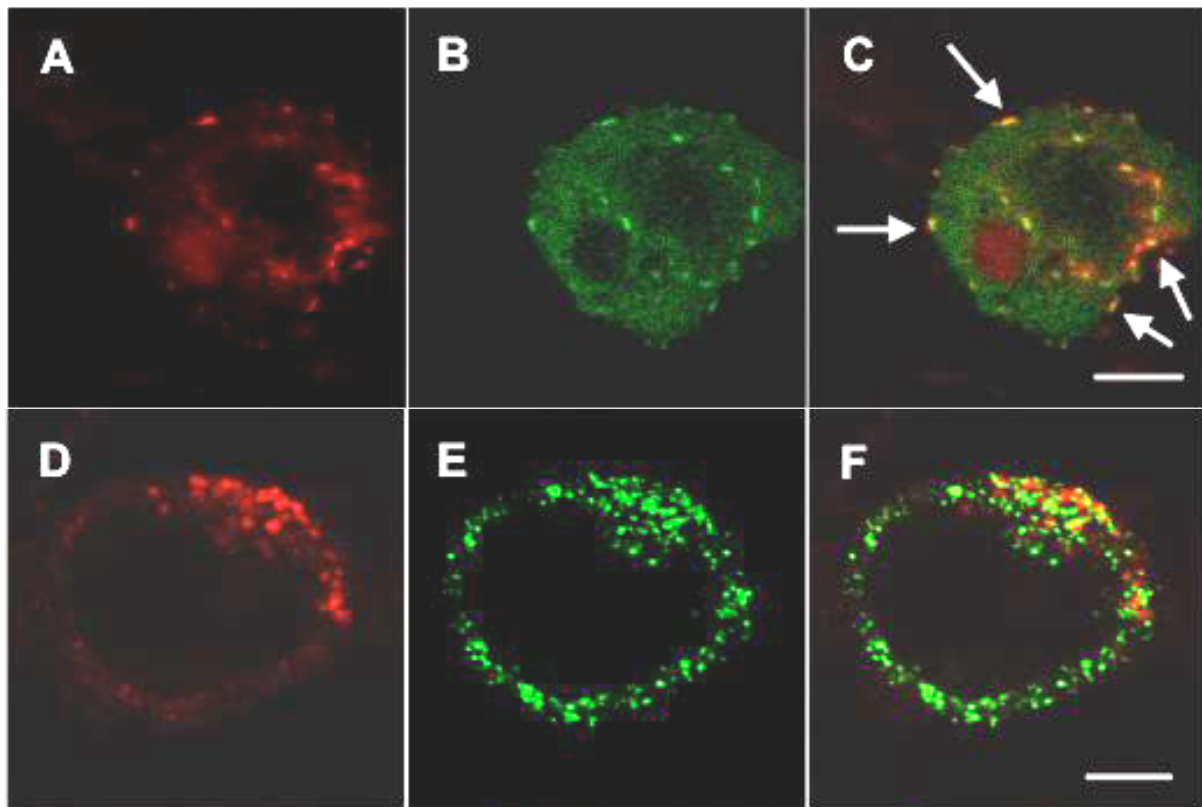


Abb. 8 Konfokalmikroskopische Analyse von HEK 293 Zellen

Verteilung von AChR an der Zellmembran (rot markiert; Bilder A und D) und Rapsyn-EGFP (grün markiert; Bilder B und E) in HEK 293 Zellen. Die rechte Spalte (Bilder C und F) zeigt jeweils die beiden Bilder überlagert; gelb erscheinen die Bereiche, in denen AChR und Rapsyn kolokalisieren, typische Cluster sind mit Pfeilen markiert. Die Zellen waren jeweils kotransfiziert mit Wildtyp Rapsyn-EGFP und Wildtyp AChR (Bilder A, B und C) oder Rapsyn-EGFP mit R164C und Wildtyp AChR (Bilder D, E und F). Bei 70% der Zellen, die mit Wildtyp Rapsyn und Wildtyp AChR transfiziert waren, fanden sich Co-Cluster der beiden Moleküle; bei Zellen mit der Mutation RAPSN R164C war dies nur für 53% der Fall.

VI. Diskussion

Im Folgenden soll zunächst ein Überblick über die Häufigkeiten von Mutationen gegeben werden, die bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Genen festgestellt wurden. Anschließend wird die klinische und molekulargenetische Bedeutung der gefundenen Mutationen dargestellt, sowie die Ergebnisse und der Stellenwert der funktionellen Studien diskutiert.

1. Häufigkeiten von Mutationen in den Genen *RAPSN* und *CHRND*

Postsynaptische Defekte machen mit einem Anteil von etwa 80% den weitaus größten Teil aller CMS-Fälle aus (Beeson et al., 2005). Am häufigsten treten dabei Mutationen in der ϵ -Untereinheit des AChR auf, an zweiter Stelle liegen Mutationen im *RAPSN*-Gen. Beobachtungen aus der Analyse unseres Patientenkollektivs zeigen, dass *RAPSN*-Mutationen unter deutschen Patienten mit 48% sogar die häufigste CMS-Ursache darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei elf Patienten Mutationen im *RAPSN*-Gen nachgewiesen. Sieben Patienten trugen die Mutation N88K in Exon 2 homozygot, nur ein Patient trug die Mutation N88K auf keinem der beiden Allele. Die Beobachtung der besonderen Häufigkeit der Missense-Mutation N88K, besonders bei Patienten mit europäisch-kaukasischer Herkunft, deckt sich mit Ergebnissen aus anderen Arbeitsgruppen (Ohno et al., 2002; Burke et al., 2003; Dunne and Maselli, 2003; Müller et al., 2003; Richard et al., 2003). Ein indo-europäischer Founder-Effekt für diese Mutation konnte von unserer Arbeitsgruppe bewiesen werden (Müller et al., 2004a). Die Häufigkeit von *RAPSN*-Mutationen, und insbesondere der Mutation N88K, hat vor allem für Patienten aus dem mitteleuropäischen Raum diagnostische Konsequenzen. Durch frühzeitige molekulargenetische Tests auf diese Mutation bei Verdacht auf CMS könnte man den betroffenen Patienten, vor allem Säuglingen und Kleinkindern, aufwändige und zeitraubende Diagnostik möglicherweise ersparen.

Weltweit sind bisher erst sieben Mutationen im *CHRND*-Gen beschrieben worden. Der in dieser Arbeit charakterisierte Patient ist der erste CMS-Fall aus unserem Patientenkollektiv mit Mutationen in diesem Gen. Durch die geringe Häufigkeit wird die Analyse dieses Gens bei der molekulargenetischen Diagnostik sicherlich nicht an vorderer Stelle stehen. Durch die phänotypische und pathogenetische Ähnlichkeit mit Mutationen im *RAPSN*-Gen, sollte jedoch

bei negativen Mutationsscreening insbesondere des *RAPSN*-Gens, diese Möglichkeit bedacht werden.

2. Phänotypischer Vergleich der CMS-Patienten

Bei Patienten mit Mutationen im *RAPSN*-Gen konnten durch Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwei unterschiedliche Phänotypen herausgearbeitet werden. Beginnt die Symptomatik im Jugendlichen- oder Erwachsenenalter, spricht man vom „Late-Onset“-Phänotyp; bei Beginn vor dem 5. Lebensjahr vom „Early-Onset“-Phänotyp (Burke et al., 2003). Patienten mit „Late-Onset“-Phänotyp sind im Allgemeinen relativ mild betroffen und bislang nur im Zusammenhang mit der homozygoten Mutation N88K beschrieben. „Early-Onset“-Patienten zeigen dagegen meist eine frühere Manifestation und allgemein schwerere Symptomatik. Oft kommt es bei ihnen zu respiratorischen Krisen in der Kindheit; bei Geburt zeigen manche Dysmorphien des Gesichtsschädels, wie tiefliegende Ohren und einen hohen Gaumen und/oder Gelenkkontrakturen (Burke et al., 2004). Diese Kontrakturen kommen wohl durch unzureichende Bewegungen des Fetus im Mutterleib zustande und wurden in einer Studie aus England besonders häufig bei Patienten mit einer trunkierenden Mutation auf einem Allel beobachtet (Beeson et al., 2005). Kontrakturen wurden bei Patienten mit Mutationen im *RAPSN*- und *CHRND*-Gen beschrieben; sie kommen nicht bei Mutationen in der ϵ -Untereinheit des AChR vor, da diese Untereinheit erst kurz nach der Geburt exprimiert wird und daher keinen Einfluss auf die Entwicklung des Feten hat.

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten entsprach ein Patient dem „Late-Onset“-Phänotyp. Die Symptomatik begann bei diesem Patienten im 10. Lebensjahr. Er zeigte eine Ptose der Augenlider, Schwäche der mimischen Muskulatur und, nach Belastung, proximale Muskelschwäche. Der Nachweis eines Dekrements, sowie der Tensilon^R-Test fielen positiv aus. Der Patient trug die Mutation N88K in homozygoter Konstellation.

Die restlichen Patienten (sechs Patienten mit homozygoter Mutation N88K, drei Patienten mit compound heterozygoter Mutation N88K in Kombination mit den Mutationen A246V bzw. 1177delAA, sowie ein Patient mit homozygoter Mutation R164C) konnten dem „Early-Onset“-Phänotyp zugeordnet werden. Jedoch gab es auch in der Gruppe der „Early-Onset“-Patienten Unterschiede in der Schwere der Symptomatik; selbst Geschwister mit der gleichen Konstellation der Mutationen unterschieden sich klinisch deutlich von einander (siehe Abbildung: Patienten 2 A/B und 4A/B). Keiner der homozygoten Träger der Mutation N88K zeigte bei Geburt Kontrakturen oder Dysmorphien. Respiratorische Krisen und

Schwäche der bulbären Muskulatur traten jeweils bei vier der sechs Patienten mit homozygoter Mutation N88K auf. Die Patientin mit der Mutationskonstellation N88K/A246V war klinisch vergleichsweise schwer betroffen; sie zeigte, neben respiratorischen Krisen in der Kindheit, auch kongenitale Gelenkkontrakturen. Auch der Patient mit der homozygoten Mutation R164C fiel bei Geburt mit Kontrakturen auf. Er zeigte zusätzlich Dysmorphien des Gesichtsschädels, jedoch keine respiratorischen Krisen. Das Geschwisterpaar mit der Konstellation N88K/1177delAA war zwar in der Schwere der Symptomatik unterschiedlich betroffen, keiner der beiden hatte jedoch Gelenkkontrakturen. Die Tatsache, dass die Patienten aus unserem Kollektiv mit trunkierenden Mutationen (1177delAA) keine Kontrakturen hatten, zwei Patienten mit Missense-Mutationen (A246V und R164C) hingegen schon, entspricht nicht den Beobachtungen von Beeson et al (Beeson et al., 2005).

Auch Dysmorphien des Gesichtsschädels, wie bei dem Patienten mit homozygoter Mutation R164C dokumentiert, sind in der Literatur schon mehrfach bei CMS-Patienten mit Mutationen im *RAPSN*-Gen beschrieben worden. Unter anderem war dies bei Patienten mit der Mutation N88K, homozygot und auch compound heterozygot mit einer anderen Rapsyn-Mutation, der Fall (Müller et al., 2003). Auch Betroffene einer jüdischen Bevölkerungsgruppe aus dem Nahen Osten, bei denen eine häufige Mutation in der E-box des Rapsyn-Promoters auf einen gemeinsamen Founder-Effekt zurückzuführen war, zeigten solch charakteristische Dysmorphien des Gesichtsschädels (Ohno et al., 2003).

Es konnte bisher jedoch noch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp bei Patienten mit der Mutation N88K gefunden werden (Beeson et al., 2005). Noch unbekannte, modifizierende Faktoren scheinen hier eine Rolle zu spielen.

Die klinischen Daten zu dem Patienten mit Mutationen im *CHRND*-Gen ähneln interessanterweise denen von Patienten mit Rapsyn-Mutation und „Early-Onset“-Phänotyp. Die Symptomatik begann innerhalb des ersten Lebensjahres mit allgemeiner muskulärer Hypotonie und Ptose; es kam zu respiratorischen Krisen. Er sprach gut auf Cholinesterasehemmer an und es konnte ein Dekrement nachgewiesen werden.

Patient	1	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5	6A	6B	7	8
Ptose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ophthalmoparese	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Schwäche bulbäre Muskulatur	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
Schwäche prox. Extremitäten	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Respiratorische Krisen	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Beginn	10.Lj	1.Lj	1.Lj	1.Lj	1.Lj	3.Lj	k.A.	1.Lj	1.Lj	1.Lj	1.Lj	1.Lj
Phänotyp	LO	EO	EO	EO	EO	EO	k.A.	EO	EO	EO	EO	-
Sonstiges								K			D,K	

Abb. 9 Überblick über phänotypische Charakteristika der untersuchten CMS-Patienten

K = Kontrakturen

D = Dysmorphien

k.A. = keine Angabe

LO = „Late-Onset“

EO = „Early-Onset“

Patienten A und B sind Geschwister

Patienten 1-7 tragen Mutationen im RAPSN-Gen:

Patienten 1-4 sind N88K homozygot,

Patienten 5, 6A und 6B compound heterozygot (Pat.5: N88K/A246V, Pat.6A und B: N88K/1177delAA)

Patient 7 homozygot R164C

Patient 8 trägt zwei compound heterozygote Mutationen im CHRND-Gen

3. Mutationen in den Genen *RAPSN* und *CHRND*

3.1 Die Mutation *RAPSN* N88K

Die häufige Rapsyn-Mutation N88K (264C>A) wurde von einer Arbeitsgruppe in den USA ausführlich charakterisiert (Ohno et al., 2002). Die Mutation führt demnach zu einer AChR-Defizienz ohne die kinetischen Eigenschaften des Rezeptors zu verändern. Der Aminosäureaustausch liegt in Exon 2 des *RAPSN*-Gens, dies entspricht dem Tetratricopeptide Repeat (TPR) 3. Tetratricopeptide Repeats spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Proteinen (Lamb et al., 1995; Blatch et al., 1999). Die TPRs von Rapsyn sind für die Selbst-Assoziation des Moleküls verantwortlich, wobei aber wohl nur zwei der sieben TPRs für eine ausreichende Selbst-Assoziation notwendig sind (Ramarao et al., 2001). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Mutation N88K nicht etwa die Selbst-Assoziation von Rapsyn, sondern das Cluster-Verhalten zwischen Rapsyn und den AChR beeinflusst (Ohno et al., 2002). In einer Transfektionsstudie betrug nach Transfektion von Wildtyp-AChR und mutiertem Rapsyn die Ko-Clusterrate nur 30%. Durch Transfektionsstudien einer anderen Arbeitsgruppe mit Rapsyn-Konstrukten, bei denen verschiedene Sequenzabschnitte deletiert waren, konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion mit AChR die C-terminale coiled-coil Domäne (Aminosäuren 298 bis 331) des Proteins Rapsyn die entscheidende Rolle spielt (Ramarao et al., 2001). Rapsyn-Konstrukte ohne die coiled-coil Domäne bildeten zwar Aggregate an der Membran, konnten aber nicht mit AChR kolokalisiert werden. Besondere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang wohl Strukturen an der hydrophoben Seite des coiled-coil Motifs (Ramarao et al., 2001). Die Beobachtung, dass die Mutation N88K im TPR 3 nicht die Selbst-Assoziation von Rapsyn, wohl aber das Ko-Clustern mit AChR stört, ist auf der Basis der Analyse der Rapsyn-Domänen und deren Funktionen überraschend. Jedoch handelt es sich bei der Mutation nicht um eine trunkierende, sondern um eine Missense-Mutation. Man führt daher das Ergebnis der Transfektionsstudien darauf zurück, dass möglicherweise die Faltung des Proteins Rapsyn verändert wird und dies die Assoziation mit anderen Molekülen stört oder die Konformation der coiled-coil oder RING-H2 Domäne verändert (Ohno et al., 2002). In Ermangelung einer hochauflösenden Struktur ist dies allerdings reine Spekulation. Eine diffusere Verteilung der AChR an der postsynaptischen Membran durch reduziertes Ko-Clustern mit Rapsyn verringert dann wahrscheinlich die Effizienz der Signalübertragung.

3.2 Die Mutation *RAPSN* A246V

Wie die Mutation N88K liegt die Missense-Mutation A246V (737C>T; Exon 4) in einem Tetratricopeptide Repeat (TPR 7) des Proteins Rapsyn. Es sind für diese Mutation zwar keine funktionellen Studien durchgeführt worden, es ist jedoch aufgrund der ähnlichen Lokalisation innerhalb des Gens wahrscheinlich, dass sie auch über einen ähnlichen Mechanismus wie die Mutation N88K das Ko-Clustern von Rapsyn und AChR vermindert.

3.3 Die Mutation *RAPSN* 1177delAA

Die Mutation 1177delAA führt zur Deletion von zwei Nukleotiden in Exon 8 des *RAPSN*-Gens und damit zu einer Verschiebung des Leserasters („Frameshift“). Die Position entspricht auf Proteinebene dem Bereich der C-terminalen RING-H2 Domäne, die an die zytoplasmatische Domäne des β -Dystroglykans und an S-NRAP bindet und die Verbindung zum Zytoskelett vermittelt (Bartoli et al., 2001; Tseng et al., 2001). Durch den Frameshift entsteht ein vorzeitiges Terminationscodon in Exon 8, dem letzten Exon des *RAPSN*-Gens, 14 Missense-Aminosäuren hinter der Mutation. Formal handelt es sich also um eine trunkierende Mutation. Möglicherweise werden aber in manchen Fällen trotzdem Transkripte dieses Allels exprimiert; das so entstandene Protein wäre dann nur 6 Aminosäuren kürzer als die Wildtyp-Variante. Dies könnte erklären, weshalb das Geschwisterpaar mit der Mutation 1177delAA aus unserem Patientenkollektiv, im Gegensatz zu Beobachtungen von Beeson et al. (Beeson et al., 2005), trotz trunkierender Mutation keine Kontrakturen aufwiesen und sich die Geschwister auch untereinander in der Schwere der Symptomatik unterschieden.

3.4 Die Mutation *RAPSN* R164C

Der Aminosäureaustausch R164C, der dem Basenaustausch 490C>T entspricht, liegt in Exon 2 des *RAPSN*-Gens. Auf Proteinebene handelt es sich bei der Region um den Tetratricopeptide Repeat 5, die betroffene Aminosäure Arginin liegt an zweiter Stelle des TPR 5.

Bei dem Patienten mit homozygoter Mutation R164C handelt es sich, neben einer weiteren Patientin aus unserem Patientenkollektiv (Mutationen L283P und IVS1-15C>A), um den einzigen CMS-Patienten mit Mutation in der translatierten Region des *RAPSN*-Gens, der auf keinem der beiden Allele die Mutation N88K trägt. Phänotypisch zeigte dieser Patient keine

gravierenden Unterschiede zu Patienten, die N88K homozygot oder compound heterozygot tragen. Die klinischen Beobachtungen, sowie die Lokalisation der Missense-Mutation in einem der Tetratricopeptide Repeats des Proteins, legten die Vermutung nahe, dass der Mechanismus der Krankheitsentstehung ähnlich sein könnte, wie bei anderen Missense-Mutationen des *RAPSN*-Gens, allen voran der am besten charakterisierten Mutation N88K.

Zur genaueren Charakterisierung der Mutation wurden Transfektionsstudien in HEK 293 Zellen mit einem Konstrukt durchgeführt, das die Mutation R164C enthielt. In der Expression des veränderten Rapsyn-Proteins waren keine Unterschiede zu beobachten. Rapsyn, gekoppelt an EGFP, bildete in der Zelle Cluster und Aggregate, deren Gesamtbild sich, fluoreszenzmikroskopisch betrachtet, nicht von dem der Zellen unterschied, die die Wildtyp-Variante exprimierten. Die Mutation R164C verändert demnach wohl weder die Expression von Rapsyn, noch die Fähigkeit des Moleküls zur Selbst-Assoziation. Dies ist zwar aufgrund der Lokalisation der Mutation in einem der TPRs, deren Aufgabe eben die Selbst-Assoziation ist (Ramarao et al., 2001) überraschend, eine ähnliche Beobachtung war jedoch auch schon im Fall der Mutation N88K gemacht worden (Ohno et al., 2002).

Eine der Hauptaufgaben des Proteins Rapsyn ist das Clustern der AChR an der postsynaptischen Membran. Die Moleküle interagieren dabei über die coiled-coil Domäne des Rapsyns (Ramarao et al., 2001) und den zytoplasmatischen Loop der Untereinheiten des AChR (Huebsch and Maimone, 2003). In einer weiteren Transfektionsstudie wurden HEK 293 Zellen deshalb zusätzlich zu Konstrukten mit der Mutation *RAPSN* R164C auch mit der cDNA aller AChR-Untereinheiten transfiziert. Der Anteil der Zellen mit Ko-Clustern lag dabei nur noch bei 53%, verglichen mit fast 70% positiven Zellen bei Transfektion von Wildtyp-Rapsyn- und AChR-cDNA. Der Mechanismus, der im Falle der Mutation R164C zur Entstehung von CMS führt, scheint also die verminderte Interaktion zwischen Rapsyn und den AChR zu sein. Zu diesem Ergebnis kamen auch Ohno et al., als sie ähnliche Studien für die Mutation N88K durchgeführt hatten. N88K verringerte in ihrem Experiment die Ko-Clusterrate von 87% auf 30% (Ohno et al., 2002). Die Ursache für die verminderte Interaktion der Moleküle Rapsyn und AChR vermuteten sie in einem veränderten Faltungszustand des Proteins Rapsyn (s.o.).

Es ist allerdings schwierig, aus diesen experimentellen Daten Rückschlüsse auf die Auswirkung des verminderten Clusters auf die klinische Symptomatik zu ziehen, da bisher nur ein Patient mit der Mutation R164C bekannt ist. Ein Vergleich zwischen der Mutation N88K und R164C hinsichtlich der Schwere der Symptomatik wäre erst bei einer größeren Anzahl von Patienten aussagekräftig.

3.5 Die Mutation *CHRND* E381K

Der untersuchte Patient ist der erste CMS-Fall aus unserem Patientenkollektiv, der Mutationen im *CHRND*-Gen trägt. Erst sieben Mutationen im *CHRND*-Gen sind bisher als Ursache für CMS beschrieben worden: drei Fast-Channel-Mutationen (E59K (Brownlow et al., 2001), P250Q (Shen et al., 2002), L42P (Shen et al., 2003)), zwei Slow-Channel-Mutationen (S268F (Gomez et al., 2002), V93L (Shen et al., 2003)) und zwei Mutationen, die die Expression vermindern oder ganz verhindern (756del2 (Brownlow et al., 2001), I58K (Shen et al., 2003)).

Die hier beschriebene, neue Mutation E381K in Exon 10 des *CHRND*-Gens (1141G>A) ist die erste Mutation im zytoplasmatischen Loop der δ -Untereinheit. Sowohl in der α -, β -, als auch in der ϵ -Untereinheit des AChR sind Mutationen in diesem Proteinabschnitt beschrieben worden (Engel and Sine, 2005). Zwei der Mutationen in der ϵ -Untereinheit (R311W und P331L) vermindern die Expression der Untereinheit, die restlichen Mutationen in dieser Untereinheit (ϵ N436del, ϵ A441P, ϵ 1254ins18) sind kombinierte Fast-Channel/Low-Expressor-Mutationen. Keine der Mutationen in den zytoplasmatischen Loops der verschiedenen Untereinheiten führt zu einem vorzeitigen Translationsabbruch.

Dass die Mutation E381K bei diesem Patienten zu einer verminderten oder fehlenden Expression der δ -Untereinheit führen könnte, war sehr unwahrscheinlich, da er auf seinem zweiten Allel eine Nullmutation (del 2,2kb; s.u.) trug. Ein vollständiges Fehlen der δ -Untereinheit des AChR würde wohl zu einem funktionslosen AChR führen, was höchstwahrscheinlich für den Fetus letal wäre. Nullmutationen auf beiden Allelen sind bisher nur für CMS-Patienten mit Mutationen in der ϵ -Untereinheit des AChR beschrieben worden, da diese Untereinheit bis zu einem gewissen Grade durch die fetale γ -Untereinheit ersetzt werden kann (Engel et al, 1996a). Ebenso unwahrscheinlich war ein Slow-Channel-Syndrom, da der Patient gut auf Cholinesterasehemmer ansprach. Klinisch entsprach der Patient eher dem Bild eines CMS mit Mutation im *RAPSN*- oder *CHAT*-Gen; Mutationen in diesen Genen waren jedoch ausgeschlossen worden.

Die zytoplasmatische Schleife der Untereinheiten des AChR ist verantwortlich für die Interaktion mit Rapsyn an der postsynaptischen Membran (Huebsch and Maimone, 2003). Es ist jedoch nicht bekannt, welche Bereiche bzw. welche Aminosäuren in diesem Loop genau mit Rapsyn interagieren. Die hochauflösende Struktur des AChR aus *Torpedo* konnte kürzlich mittels Elektronenkristallographie bestimmt werden (Unwin, 2005). Die Mutation E381K liegt entsprechend dieser Struktur in einem zytoplasmatischen Loop, der die

Transmembranhelix M3 mit der Helix MA verbindet. Dieser Loop, der im Falle der δ -Untereinheit von den Aminosäuren 317 bis 421 gebildet wird, zeigt keine definierte Elektronendichte, d.h. er liegt in einer ungeordneten Konformation vor. Es ist aus der Struktur allerdings offensichtlich, dass die Aminosäure 381 vom Zytoplasma her frei zugänglich ist. Interessanterweise ist der zytoplasmatische Loop bei den δ - und ϵ -Untereinheiten deutlich länger (102 bzw. 101 AS) als bei den anderen Untereinheiten des AChR (α -Untereinheit: 69 AS; β -Untereinheit: 92 AS); ein längerer, unstrukturierter Loop kann sich intrazellulär stärker exponieren und bietet daher mehr Möglichkeiten für bimolekulare Interaktionen mit Rapsyn.

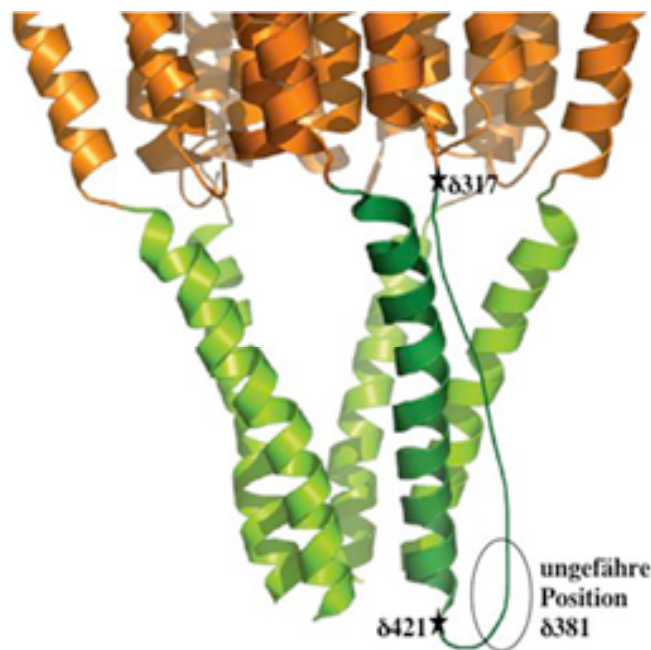


Abb. 10 Struktur des zytoplasmatischen Anteils des AChR

Grün dargestellt ist der zytoplasmatische Anteil des AChR, dunkelgrün der zytoplasmatische Bereich der δ -Untereinheit. Der zytoplasmatische Loop zwischen der Transmembraneinheit M3 (orange) und der Helix MA ist nur für die δ -Untereinheit dargestellt. Der Loop, der von den Aminosäuren 317 bis 421 gebildet wird, zeigt eine ungeordnete Konformation, für die Position der Aminosäure 381 kann deshalb nur ein ungefährender Bereich angegeben werden. (Strukturdaten aus Unwin, 2005)

Für die pathogene Wirkung verschiedener Mutationen im *RAPSN*-Gen ist eine Störung der Interaktion zwischen AChR und Rapsyn verantwortlich (s.o.). Für CMS-Formen mit Mutationen in den Untereinheiten des AChR ist dieser Mechanismus bisher noch nicht

beschrieben worden. Das klinische Bild des Patienten mit E381K, das, wie oben beschrieben, dem Bild eines postsynaptischen CMS mit Rapsyn-Mutation ähnelte, ließ die Variante einer solchen Wirkung der Mutation E381K ebenfalls möglich erscheinen. Zur funktionellen Charakterisierung dieser Mutation wurden deshalb verschiedene Transfektionsstudien durchgeführt. Die Expression von AChR mit veränderter δ -Untereinheit in HEK 293 Zellen war im Vergleich mit der Wildtyp-Untereinheit unverändert. Bei Ko-Transfektion mit Rapsyn zeigte sich aber in der Tat eine Verminderung der Ko-Clusterrate von fast 70% (Wildtyp-AChR mit Rapsyn) auf nur noch 33% (AChR mit δ E381K und Rapsyn). Außerdem fiel auf, dass die Anzahl der Ko-Cluster pro Zelle nach Transfektion der mutierten δ -Untereinheit mit Rapsyn geringer war. Diese Beobachtungen sprechen eindeutig dafür, dass die Mutation *CHRND* E381K eine Störung der Interaktion zwischen Rapsyn und AChR bewirkt. Um weitere Erkenntnisse über die Interaktion des zytoplasmatischen Loops mit Rapsyn gewinnen zu können, wurden weitere Transfektionsstudien mit veränderten ϵ -Untereinheiten des AChR durchgeführt. Die Aminosäure 381 der δ -Untereinheit ist nicht nur zwischen verschiedenen Spezies, sondern auch innerhalb der Untereinheiten des menschlichen AChR konserviert und entspricht in der ϵ -Untereinheit der Position 376. Die Aminosäure Glutamat wurde in dieser Untereinheit, korrespondierend zur Mutation E381K, durch Lysin ersetzt und dieses Konstrukt mit Rapsyn in HEK 293 Zellen kotransfiziert. Bei fluoreszenzmikroskopischer Analyse ergab sich jedoch kein Unterschied zum Ergebnis der Kotransfektion von Wildtyp AChR und Rapsyn. Der korrespondierende Aminosäureaustausch scheint in der ϵ -Untereinheit also keinen Effekt bezüglich dem Clusterverhalten zwischen AChR und Rapsyn zu haben. Eine kürzlich charakterisierte Mutation im zytoplasmatischen Loop der ϵ -Untereinheit ist N436del (Shen et al., 2005). Die Mutation führt zum Verlust der letzten Aminosäure des Loops und bewirkt ein Fast-Channel-Syndrom mit leicht verminderter Expression des Rezeptors. Bei Kotransfektion von Rapsyn und AChR mit der ϵ -Untereinheit, in die die Mutation N436del eingeführt worden war, zeigte sich ebenfalls keine Veränderung in der Interaktion zwischen den beiden Molekülen.

Die Beobachtung, dass eine Mutation in nur einer Untereinheit des AChR das Clustern mit stark vermindert, wie es sich in unserem Experiment mit der Mutation E381K gezeigt hatte, war überraschend. Studien von Huebsch und Maimone hatten darauf hingedeutet, dass nur ein intakter zytoplasmatischer Loop egal welcher Untereinheit innerhalb des AChR hinreichend wäre, um mit Rapsyn zu interagieren (Huebsch and Maimone, 2003). Sie hatten jede Untereinheit alleine mit Rapsyn in Zellen kotransfiziert, und festgestellt, dass diese mit Rapsyn ko-clustern konnten. War jedoch der zytoplasmatische Loop der jeweiligen

Untereinheit deletiert, ging diese Fähigkeit verloren. Man schloss daraus, dass ein beliebiger zytoplasmatischer Loop ausreichen würde, um mit Rapsyn zu ko-clustern. Diese Hypothese konnte jedoch nicht experimentell bewiesen werden, da bei Transfektion von vier Untereinheiten mit deletiertem zytoplasmatischen Loop und einer Untereinheit mit intaktem Loop keine AChR-Pentamere gebildet wurden. Möglicherweise zeigt Rapsyn bei Transfektion aller Untereinheiten eine Präferenz zur Interaktion mit einer spezifischen Untereinheit. Da Rapsyn nur eine coiled-coil Domäne enthält, ist es unwahrscheinlich, dass das Protein gleichzeitig mit mehr als einer Bindungsstelle des AChR, und damit mit mehr als einer Untereinheit, in Interaktion tritt.

In einer Studie von Gensler und Mitarbeitern zeigte sich, dass bei Insertion des 27 kDa großen Proteins GFP in den zytoplasmatischen Loop der ϵ -Untereinheit ein vollständig funktionsfähiger, korrekt assemblierter AChR exprimiert wird, der auch mit Rapsyn kolokalisiert werden konnte (Gensler et al., 2001). Die ϵ -Untereinheit scheint nach diesen Ergebnissen also nicht direkt mit Rapsyn zu interagieren, da GFP diese Interaktion wahrscheinlich erschweren, wenn nicht sogar verhindern würde. Sowohl unsere Studien mit veränderten Konstrukten der ϵ -Untereinheit, sowie Ergebnisse, die Gensler et al. vorstellten, weisen darauf hin, dass die ϵ -Untereinheit möglicherweise zur Interaktion mit Rapsyn nicht benötigt wird (Gensler et al., 2001). Die δ -Untereinheit könnte jedoch diesbezüglich eine zentrale Rolle spielen.

Der Austausch der sauren, negativ geladenen Aminosäure Glutamat gegen die basische, positiv geladene Aminosäure Lysin könnte im Bereich des zytoplasmatischen Loops der δ -Untereinheit durch Veränderung der Ladung die Interaktion mit Rapsyn stören. Zusätzliche Transfektionsstudien mit weiteren Missense-Mutationen und Deletionen im Bereich des zytoplasmatischen Loops einzelner Untereinheiten, insbesondere in direkter Nähe der Mutation E381K, sollten hier weitere Hinweise liefern.

In diesem Zusammenhang erscheint ein Befund von Yang et al erwähnenswert, dass Rapsyn auch die Clusterbildung des GABA_A Rezeptors, nicht aber das Clustern von Na⁺-Kanälen induzieren kann (Yang et al., 1997). Dies deutet auf eine weiterreichende, jedoch spezifische Rolle von Rapsyn bei der lateralen Organisation membranständiger Rezeptoren hin. Allerdings finden sich in der Literatur hierzu keine bestätigenden oder weiterführenden Studien und der Nachweis von Rapsyn mRNA in Gewebeproben aus dem ZNS kann nicht als gesichert gelten. Im Gegensatz zu Yang et al hatten zuvor andere Arbeitsgruppen keine Rapsyn mRNA im ZNS nachweisen können (LaRochelle und Froehner 1986; Musil et al., 1989).

3.6 Die Deletion *CHRND* del2,2 kb

Compound heterozygot zu der Mutation E381K wurde bei dem hier beschriebenen Patienten eine Mikrodeletion von 2,2 kb auf dem *CHRND*-Gen gefunden. Mikrodeletionen sind für CMS bereits für die Gene *CHRNE* und *RAPSN* von unserer Arbeitsgruppe beschrieben worden (Abicht et al., 2002; Müller et al., 2004). Für das *CHRND*-Gen ist bisher noch keine Mikrodeletion bekannt.

Die Deletion beginnt in Exon 8 und reicht bis in Intron 9 des Gens, folglich fehlt ein Teil von Exon 8 und das gesamte Exon 9. Die Deletion entspricht damit wohl einer Nullmutation; es ist anzunehmen, dass kein funktionsfähiger AChR exprimiert werden kann. Dies konnte jedoch nicht auf RNA-Ebene bestätigt werden, da kein Muskelgewebe des Patienten zur Verfügung stand. Wahrscheinlich liegt der Mikrodeletion ein nicht-homologes Rekombinationsereignis zwischen Teilen von Exon 8 und Intron 9 zugrunde. Bei Analyse der Sequenz von Intron 9, dem längsten Intron des *CHRND*-Gens, fällt auf, dass in diesem Sequenzabschnitt überproportional viele repetitive *Alu*-Elemente vorkommen. Auch das Ende der Deletion in Intron 9 liegt in einem solchen repetitiven DNA-Element; in diesem Fall handelt es sich um ein *AluSc*-Element von 298 bp Länge, das 33 bp vor Exon 10 endet. Die Deletion reicht 49 bp in dieses Element hinein.

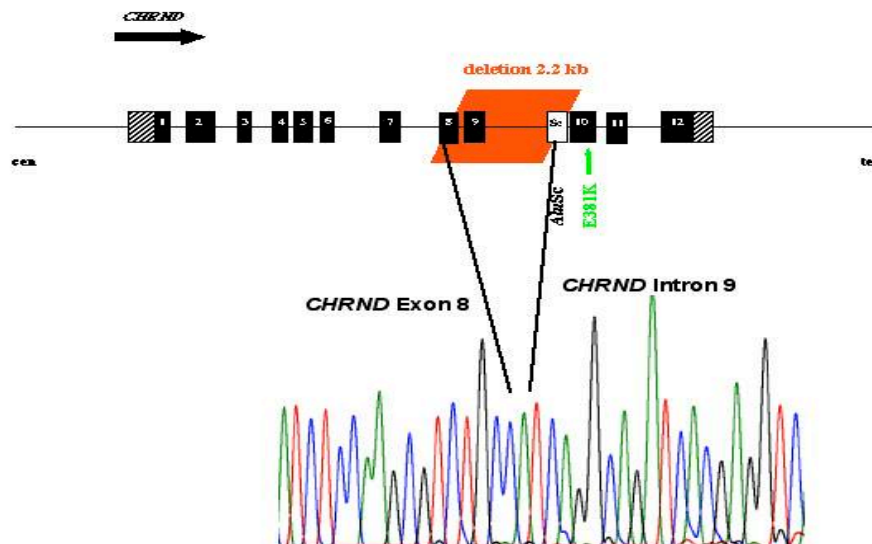


Abb. 11 Schema des *CHRND*-Gens und Lokalisation der Mikrodeletion von 2,2 kb (orange markiert)

Die Exons sind durch schwarze Rechtecke dargestellt, repetitive Elemente in den Introns durch weiße Blöcke.

Die Deletion beginnt in Exon 8 und erstreckt sich bis in ein *AluSc*-Element in Intron 9.

Unten: Flankierende Sequenzen an den Bruchpunkten der Deletion

Repetitive DNA-Elemente spielen eine wichtige Rolle bei der Evolution des menschlichen Genoms, werden aber auch für eine Vielzahl genetischer Erkrankungen verantwortlich gemacht. Mutationen kommen dabei einerseits durch die Insertion solcher Elemente zustande, aber auch durch nicht-homologe intra- und interchromosomale Rekombination. *Alu*-Elemente machen über 5% des gesamten menschlichen Genoms aus und man schätzt, dass eine homologe Rekombination zwischen *Alu*-Elementen 0,3% der menschlichen Erbkrankheiten zugrunde liegt (Deininger et al., 1999). So wie im Falle der hier beschriebenen Mikrodeletion, liegen auch bei den beiden anderen genannten CMS-Deletionen eine oder beide Bruchstellen in *Alu*-Elementen. Die Sequenzähnlichkeit der repetitiven *Alu*-Elemente könnte also auch hier die Rekombination begünstigt haben, die zu der Mikrodeletion des *CHRND*-Gens geführt hat. Besondere Bedeutung haben Mikrodeletionen deshalb, weil sie beim üblichen nicht-quantitativen Mutationsscreening, bei dem meist in erster Linie die Exons der Gene analysiert werden, leicht übersehen werden können.

4. Bedeutung der genetischen Diagnostik

Die genetische Diagnostik spielt bei Patienten mit CMS eine wichtige Rolle. Nicht nur erspart sie den Patienten - in vielen Fällen sind es Säuglinge und Kleinkinder - invasive Verfahren wie die Biopsie aus dem *M.intercostalis*; die Lokalisierung des genetischen Defektes hat auch direkte Auswirkungen auf Prognose, mögliche Komplikationen und therapeutische Optionen. Da bisher aufgrund der hohen Heterogenität der CMS keine genauere Genotyp/Phänotyp Korrelation für CMS möglich ist, erfolgt der Nachweis der Erkrankung direkt über die Identifikation der verursachenden Mutation. Wie schon in einem anderen Abschnitt dieser Arbeit beschrieben, bestimmt die Lokalisation der Mutation die Zuordnung zur jeweiligen CMS-Form. Anhand dieser Einteilung wird dann in der Regel das Therapieschema abgeleitet. Durch Vergleiche der klinischen Symptomatik, wie sie auch in dieser Arbeit anhand der Patienten mit identifizierter Mutation durchgeführt wurden, kann man den einzelnen CMS-Formen eine Häufung bestimmter Symptome zuordnen. So wurden zum Beispiel Apnoen, wie sie bei *CHAT*-Mutationen häufig auftreten, auch bei Patienten mit Mutationen des *RAPSN*- und *CHRND*-Gens beschrieben. Dieses Erkenntnis ist bei frühzeitigem genetischem Nachweis solcher Mutationen vor allem für die Prävention einer lebensbedrohlichen respiratorischen Insuffizienz wichtig, die im Extremfall zum plötzlichen Kindstod führen kann. In diesem Zusammenhang sollten auch stets klinisch asymptomatische Geschwisterkinder genetisch

untersucht werden, um im Falle eines positiven Testergebnisses Präventivmassnahmen ergreifen zu können.

Nicht zuletzt erlauben der Nachweis noch nicht charakterisierter CMS-Mutationen und deren funktionelle Analyse neue Hinweise zur Klärung des pathogenetischen Hintergrundes der CMS. Die Beobachtung, dass eine einzelne Missense-Mutation in einer Untereinheit des AChR, in diesem Fall die Mutation E381K in der δ -Untereinheit, das Clustern mit Rapsyn stört, ist ein Beispiel hierfür. Solche Erkenntnisse können zu einem tieferen Verständnis der neuromuskulären Übertragung und auch zu neuen Therapieansätzen für die CMS führen.

VII. Literaturverzeichnis

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

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

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

Apel ED, Glass DJ, Moscoso LM, Yancopoulos GD, Sanes JR (1997) Rapsyn is required for MuSK signalling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron* **18**(4): 623-35

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

Beeson D, Hantai D, Lochmuller H, Engel AG. 126th international workshop: congenital myasthenic syndromes, 24-26 September 2004, Naarden, the Netherlands (2005) *Neuromuscul Disord* **15**; 498-512.

Bestue-Cardiel M., Sáenz de Cabezón-Alvarez A, Capablo-Liesa JL, López-Pisón J, Peña-Segura JL, Martin-Martinez J and Engel AG(2005) Congenital endplate acetylcholinesterase deficiency responsive to ephedrine. *Neurology* **65**, 144-146

Blatch GL, Lassle M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**(11): 932-9

Brownlow S, Webster R, Croxson R, Brydson M, Neville B, Lin J, Vincent A, Newsom-Davis J, Beeson D (2001) Acetylcholine receptor delta subunit mutations underlie a fast-channel myasthenic syndrome and arthrogryposis multiplex congenita. *Jouranal of Clinical Investigation* **108**; 125-130

Burke G, Cossins J, Maxwell S, Owens G, Vincent A, Robb S, Nicolle M, Hilton-Jones D, Newsom-Davis J, Palace J and Beeson D (2003) Rapsyn mutations in hereditary myasthenia: distinct early- and late-onset phenotypes. *Neurology* **61**, 826-8

Burke G, Cossins J, Maxwell S, Robb S, Nicolle M, Vincent A, Newsom-Davis J, Palace J and Beeson D (2004) Distinct phenotypes of congenital acetylcholine receptor deficiency. *Neuromuscul Disord* **14**, 356-64

- Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, Richard P, Gaudon K, Bauche S, Prioleau C, Herbst R, Goillot E, Ioos C, Azulay JP, Attarian S, Leroy JP, Fournier E, Legay C, Schaeffer L, Koenig J, Fardeau M, Eymard B, Pouget J and Hantai D (2004) MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* **13**, 3229-40
- Croxen R, Young C, Slater C, Haslam S, Brydson M, Vincent A and Beeson D (2001) End-plate gamma- and epsilon-subunit mRNA levels in AChR deficiency syndrome due to epsilon-subunit null mutations. *Brain* **124**, 1362-72
- DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ and Yancopoulos GD (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* **85**, 501-12
- Deininger PL and Batzer MA (1999) Alu Repeats and Human Disease. *Molecular Genetics and Metabolism* **67**, 183-193
- Donger C, Krejci E, Serradell AP, Eymard B, Bon S, Nicole S, Chateau D, Gary F, Fardeau M, Massoulié J and Guicheney P (1998) Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet* **63**, 967-75
- Dunne V and Maselli RA (2003) Identification of pathogenic mutations in the human rapsyn gene. *J Hum Genet* **48**, 204-7
- Engel A (1994) Congenital Myasthenic Syndromes in: *Myology*, 2nd edition. New York: Mac Graw-Hill
- Engel AG, Ohno K, Bouzat C, Sine SM and Griggs RC (1996a) End-plate acetylcholine receptor deficiency due to nonsense mutations in the epsilon subunit. *Ann Neurol* **40**, 810-817
- Engel AG, Ohno K, Milone M, Wang HL, Nakano S, Bouzat C, Pruitt JN, 2nd, Hutchinson DO, Brengman JM, Bren N, Sieb JP and Sine SM (1996b) New mutations in acetylcholine receptor subunit genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* **5**, 1217-27
- Engel AG, Ohno K and Sine SM (2003a) Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade. *Muscle Nerve* **27**, 4-25
- Engel AG, Ohno K and Sine SM (2003b) Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* **4**, 339-52
- Engel A and Sine S (2005) Current understanding of congenital myasthenic syndromes *Current Opinion in Pharmacology* **5**, 308-321

- Fertuck HC and Salpeter MM (1974) Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled alphabungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**(4) 1376–1378
- Frail DE, McLaughlin LL, Mudd J, Merlie JP (1988) Identification of the mouse muscle 43,000-dalton acetylcholine receptor-associated protein (RAPsyn) by cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* **263**(30), 15602–15607
- Froehner SC, Luetje CW, Scotland PB, Patrick J (1990) The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* **5**(4), 403–410
- Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR and Merlie JP (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* **377**, 232–6
- Gensler S, Sander A, Korngreen A, Traina G, Giese G, Witzemann V (2001) Assembly and clustering of acetylcholine receptors containing GFP-tagged ϵ or γ subunits. *Eur.J.Biochem* **268**, 2209–2217
- Glass DJ, DeChiara TM, Stitt TN, DiStefano PS, Valenzuela DM and Yancopoulos GD (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation and is a functional receptor for agrin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**, 435–44
- Gomez CM and Gammack J.T (1995) A leucine-to-phenylalanine substitution in the acetylcholine receptor ion channel in a family with the slow-channel syndrome. *Neurology* **45**, 982–5
- Gomez CM, Maselli RA, Vohra BP, Navedo M, Stiles JR, Charnet P, Schott K, Rojas L, Keeseey J, Verity A, Wollman R, Lasalde-Dominicci J (2002) Novel delta subunit mutation in slow-channel syndrome causes severe weakness by novel mechanisms. *Ann Neurol* **51**: 102–12
- Hanta D, Richard P, Koenig J and Eymard B (2004) Congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Neurol* **17**, 539–51
- Harper CM, Fukudome T and Engel AG (2003) Treatment of slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine *Neurology* **60**, 1710–3.
- Hoch W. (1999) Formation of the neuromuscular junction: Agrin and its unusual receptors *Eur J Biochem* **265**, 1–10.
- Hoch W., McConville J., Helms S., Newsom-Davis J., Melms A. and Vincent A. (2001) Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* **7**, 365–8.

- Hohlfeld R, Toyka KV, Heininger K, Grosse-Wilde H, Kalies I (1984) Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor. *Nature* **310**(5974): 244-6
- Huebsch KA and Maimone MM (2003) Rapsyn-mediated clustering of acetylcholine receptor subunits requires the major cytoplasmic loop of the receptor subunits. *J Neurobiol* **54**, 486-501
- Hughes T (2005) The early history of myasthenia gravis. *Neuromuscular Disorders* **15**, 878–886
- Lamb JR, Tugendreich S and Hieter P (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends in Biochemical Science* **20**, July 2005; p 257-259
- LaRochelle WJ, and Froehner SC (1986) Determination of the tissue distributions and relative concentrations of the postsynaptic 43-kDa protein and the acetylcholine receptor in Torpedo. *J. Biol. Chem.* **261**: 5270–5274.
- Marangi PA, Wieland ST and Fuhrer C (2002) Laminin-1 redistributes postsynaptic proteins and requires rapsyn, tyrosine phosphorylation, and Src and Fyn to stably cluster acetylcholine receptors. *Journal of Cell Biology* **157**, 883–895
- McConville J and Vincent A (2002) Diseases of the neuromuscular junction. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 296-301
- Montanaro F, Gee SH, Jacobson C, Lindenbaum MH, Froehner SC, Carbonetto S. (1998) Laminin and alphadystroglycan mediate acetylcholine receptor aggregation via a MuSK-independent pathway. *Journal of Neuroscience* **18**(4), 1250–1260
- Müller JS, Mildner G, Muller-Felber W, Schara U, Krampfl K, Petersen B, Petrova S, Stucka R, Mortier W, Bufler J, Kurlemann G, Huebner A, Merlini L, Lochmüller H and Abicht A. (2003) Rapsyn N88K is a frequent cause of congenital myasthenic syndromes in European patients. *Neurology* **60**, 1805-10
- Müller JS, Abicht A, Burke G, Cossins J, Richard P, Baumeister SK, Stucka R, Eymard B, Hantai D, Beeson D and Lochmüller H. (2004a) The congenital myasthenic syndrome mutation RAPSN N88K derives from an ancient Indo-European founder. *J Med Genet* **41**, e104
- Müller JS, Abicht A, Christen HJ, Stucka R, Schara U, Mortier W, Huebner A and Lochmüller H. (2004b) A newly identified chromosomal microdeletion of the rapsyn gene causes a congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord* **14**, 744-9
- Müller JS, Petrova S, Kiefer R, Stucka R, König C, Baumeister SK, Huebner A, Lochmüller H and Abicht A (2004c) Synaptic congenital myasthenic syndrome in three patients due to a novel missense mutation (T441A) of the COLQ gene. *Neuropediatrics* **35**, 183-9

- Müller JS, Baumeister SK, Rasic VM, Krause S, Todorovic S, Kugler K, Müller-Felber W, Abicht A, Lochmüller H. (2006a) Impaired receptor clustering in congenital myasthenic syndrome with novel RAPSN mutations. *Neurology*. Oct 10; **67**(7): 1159-64.
- Müller JS, Baumeister SK, Schara U, Cossins J, Krause S, von der Hagen M, Huebner A, Webster R, Beeson D, Lochmüller H, Abicht A. (2006b) CHRND mutation causes a congenital myasthenic syndrome by impairing co-clustering of the acetylcholine receptor with rapsyn. *Brain*. Oct; **129**(Pt 10): 2784-93
- Mullis KB. (1990) Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* **48**, 579-82
- Musil LS, Frail DE, and Merlie JP (1989) The mammalian 43-kD acetylcholine receptor-associated protein (RAPsyn) is expressed in some nonmuscle cells. *J. Cell Biol.* **108**: 1833–1840.
- Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, Brengman JM, Bouzat C, Sine SM and Engel AG. (1995) Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the epsilon subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 758-62
- Ohno K, Brengman J, Tsujino A and Engel AG. (1998b) Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9654-9
- Ohno K, Engel AG, Shen XM, Selcen D, Brengman J, Harper CM, Tsujino A and Milone M. (2002) Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. *Am J Hum Genet* **70**, 875-85
- Ohno K and Engel AG. (2004) Congenital myasthenic syndromes: gene mutations. *Neuromuscul Disord* **14**, 117-22
- Ramarao M, Bianchetta M, Lanken J and Cohen J. (2001) Role of Rapsyn Tetratricopeptide Repeat and Coiled-coil Domains in Self-association and Nicotinic Acetylcholine Receptor Clustering. *Journal of Biological Chemistry* **276**; 7475–7483
- Richard P, Gaudon K, Andreux F, Yasaki E, Prioleau C, Bauche S, Barois A, Ioos C, Mayer M, Routon MC, Mokhtari M, Leroy JP, Fournier E, Hainque B, Koenig J, Fardeau M, Eymard B and Hantai D. (2003) Possible founder effect of rapsyn N88K mutation and identification of novel rapsyn mutations in congenital myasthenic syndromes. *J Med Genet* **40**, e81
- Sambrook und Russel (2001) Molecular Cloning - a laboratory manual. 3rd edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

- Shen XM, Ohno K, Fukudome T, Tsujino A, Brengman JM, De Vivo DC, Packer RJ and Engel AG (2002) Congenital myasthenic syndrome caused by low-expressor fast-channel AChR delta subunit mutation. *Neurology* **59**: 1881-8
- Shen XM, Ohno K, Brengman JM, Fukuda T, Illa I, Engel AG. (2003) Congenital myasthenic syndrome associated with three missense mutations in the extracellular domain of the AChR δ subunit. *Neurology* **60** (suppl. 1): A420
- Shen XM, Ohno K, Sine SM, Engel AG. (2005) Subunit-specific contribution to agonist binding and channel gating revealed by inherited mutation in muscle acetylcholine receptor M3-M4 linker. *Brain* **128**: 345-55
- Sine SM, Ohno K, Bouzat C, Auerbach A, Milone M, Pruitt JN and Engel AG (1995) Mutation of the acetylcholine receptor alpha subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity. *Neuron* **15**, 229-39
- Sugiyama JE, Glass DJ, Yancopoulos GD. (1997) Laminin-induced acetylcholine receptor clustering: An alternative pathway. *Journal of Cell Biology* **139**(1), 181–191
- Sussman J.L, Harel M, Silman I (1993) Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. *Chem Biol Interact* **87**(1-3): 187-97
- Toyka KV, Brachmann DB, Pestronk A, Kao I (1975) Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science* **190**(4212): 397-9
- Tseng CN, Yao Y, Wang JM, Viroonchatapan N, Rothe E, Wang ZZ (2001) A synaptic isoform of NRAP interacts with the postsynaptic 43K protein rapsyn and links it to the cytoskeleton at the neuromuscular junction. *Abstr Soc Neurosci* **27**; 694.6
- Tsujino A, Maertens C, Ohno K, Shen XM, Fukuda T, Harper CM, Cannon SC and Engel AG. (2003) Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7377-82
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J Mol Biol* **346**:967-989
- Yang SH, Armson PF, Cha J, Phillips WD (1997) Clustering of GABA_A Receptors by Rapsyn/43kD Protein *in vitro*. *Molecular and Cellular Neuroscience* **8**, 430-438

VIII. Anhang

1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholin Rezeptor (nikotinerg)
AS	Aminosäure/n
Bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	complimentary DNA
ChAT/ <i>CHAT</i>	Cholin-Acetyltransferase/Gen
<i>CHRNA1</i>	Gen kodierend für die alpha-Untereinheit des AChR
<i>CHRNB1</i>	Gen kodierend für die beta-Untereinheit des AChR
<i>CHRND</i>	Gen kodierend für die delta-Untereinheit des AChR
<i>CHRNE</i>	Gen kodierend für die epsilon-Untereinheit des AChR
CMS	Congenital Myasthenic Syndromes
ColQ/ <i>COLQ</i>	Collagen tail/Gen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid(Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EMG	Elektromyogramm
GABA _A	Gamma-Amino-Buttersäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HEK	Human embryonic kidney
kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Mb	Megabasen

Mg ²⁺	Magnesiumkationen
Min	Minuten
MuSK/ <i>MUSK</i>	Muskelspezifische Kinase/Gen
<i>M.intercostalis</i>	Musculus intercostalis
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Rapsyn/ <i>RAPSN</i>	Receptor Associated Protein of the Synapse/Gen
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse
RNA	Ribonuclein acid (Ribonukleinsäure)
<i>SCN4A</i>	Gen kodierend für den spannungsabhängigen Natriumkanal
sec	Sekunden
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TPR	Tetratricopeptide Repeat
z.B	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

2. Primersequenzen

CHRND Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
DNs	5'- CTGGAGCTTTCTTGGGATGGGA
DNa	5'- CCTCTGACTGGGACGTGCATCT
D1s	5'- CTCATTCCACAGCCCTGTAGAC
D1a	5'-TCTAGCTTCCTCCATGGCTATC
D2s	5'- AGAGTGGGTGAATGTGTGCGGA
D2a	5'- CACCGTGTGTCAGCCAAGATGGT
D3s	5'- GACCTGAATCCGCACTCTGT
D3a	5'- CAGCACTAATCCAGACAGG
D4s	5'- CCTGTCTGGATTAGTGCTGCC
D4a	5'- GGATAGCTTTGCATTCAGGAAG
D5s	5'- GTAGACAGCCCATCTGCGTCTC
D5a	5'-TGGCCACCTGGCCCTCACACC
D6s	5'-TTTCATCAGGGTATGATGGT
D6a	5'-CAGGCTCAAGTGATCCACCTC
D7s	5'-TGGTGACAGAATGAGACTCCG
D7a	5'-GGAACCCTGCCCTCTTAAGAT
D8s	5'-GCCAGCATTATCCTGCAAGCC
D8a	5'-TCGGGTGGCCCCTGTCTTGATT

RAPSN Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Name	Sequenz
RP2s	5'- TTGCCCTGGGGCAGGAAGAAGG
RP2a	5'- AGGCCTTGGGCTAGAGGTGCTC
RPs	5'- TGAGTGACCCACGGTGCTCAG
RPa	5'- CGATCTGCTGCTTGGTCTGGTC
R1s	5'- CATGAGTGCCTAGAGGCACGGA

R1a	5'- TCCGGCCCCAGCCTGACCCTCG
R2s	5'- AGGCTGGGGTCCAAGGCTCAGAGT
R2a	5'- GCCACAGGGTGTGTGCCTCA
R3s	5'- GGATGTCACAATGAATGAGCAG
R3a	5'- GGGCTTCCATGGGCTGATTTG
R4s	5'- CTCCAGTGGTGGTGGCAGAGGAGT
R4a	5'- TACTGGCCCCAAGTGGGGAGTGCT
R5s	5'- ACCCTGTGCTTCCCTGTGAGCA
R5a	5'- AGTTCCCCACTTGGGCCCCTGA
R6s	5'- AAGTGGCTGAGACCGGAGCCTA
R6a	5'- TTAAGCCAGCTGGGCCCTAGAGT
R7s	5'- GCAGGCAAGGAAGGAAGAGA
R7a	5'- AGGAGTAAATGGGCCTCTGGCGT

Primer für Klonierungs-PCRs; Mismatch ist fettgedruckt

Dks	5'-TCTCACTTAAGTCCCGCAGT GACCTCATGTTTAA
Dkas	5'-GACA ACT GGAACCAGGTGGCCCG
Rks	5'-GCCATGCTCGAGT GCTGCGTGTG
Rkas	5'-ATGCTCTCGCTCAGACAGTGCAG

3. Genbank Zugangsnummern

Gen	genom. Sequenz	mRNA-Sequenz
<i>CHRND</i>	AF307337	NM_000751
<i>RAPSN</i>	gi18577857	AF449218

ERFASSUNGSBOGEN

ZUR DIAGNOSTIK KONGENITALER MYASTHENER SYNDROME

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

Probenversand zur Molekulargenetischen Diagnostik:

10 ml EDTA-BLUT

zu senden an

**Labor für Molekulare Myologie
AG Prof. Lochmüller
Marchioninistr. 17
81377 München**

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

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

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

- EDTA-Blutprobe von Patient:

Vorname:

Name:

- männlich
 weiblich

Geburtsdatum:

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

- EDTA-Blutproben von Familienangehörigen:
- Vater:
 - Mutter:
 - Geschwister:

Kontaktadresse des Einsenders:

Klinik:

Ansprechpartner/ überweisender Arzt:

Telefon:

e-mail:

WICHTIGE ANGABEN ZUM PATIENTEN

1. FAMILIENANAMNESE

Aus welchem Land stammt die Familie?

Ist Blutsverwandtschaft in der Familie bekannt?

- ja
 nein
 keine Information

Sind andere Familienmitglieder erkrankt?:

- ja
 nein
 keine Information

Wieviele gesunde Geschwister hat der Patient?

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

bitte Rückseite beachten...

2. ANAMNESTISCHE ANGABEN

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

Motorische Entwicklung: normal
 verzögert
 Laufen erlernt mit Mon.

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

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

3. NEUROLOGISCHER UNTERSUCHUNGSBEFUND

Paresen:
 generalisiert
 selektive Muskelgruppen rein okuläre Paresen
 andere:

konstant
 deutlich belastungsabhängig
 tageszeitliche Schwankung

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

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

Muskeleigenreflexe:
 normal abgeschwächt

Muskuläre Trophik:
 normal Atrophien

Kongenitale Kontrakturen: nein ja
 Dysmorphie Stigmata: nein ja:

4. ELEKTROPHYSIOLOGIE

EMG
 nicht durchgeführt myopathisch
 unauffällig neurogen
 anderes:

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

Reaktion auf Einzelreiz:
 normal
 repetitiv
 nicht geprüft

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

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

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

5. LABOR / MUSKELBIOPSIE

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

5. AZETYLCHOLIN-REZEPTOR-ANTIKÖRPER

Azetylcholin-Rezeptor-Antikörper: nachweisbar
 nicht nachweisbar
 nicht untersucht

6. ANSPRECHEN AUF AZETYLCHOLINESTERASE HEMMER:

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

langfristige Mestinontherapie:
 erfolgreich
 ohne Effekt
 nur anfangs erfolgreich
 nicht durchgeführt

6. WEITERE THERAPIE:

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

...ÜBER ERGÄNZENDE KRANKENBERICHTE SIND WIR SEHR DANKBAR

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

5. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Oktober 2003 und Februar 2006 im Labor für Molekulare Myologie am Friedrich-Baur-Institut durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hanns Lochmüller für die interessante Themenstellung, seine fachliche Unterstützung sowie sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Privatdozentin Dr. Angela Abicht, die das Forschungsthema in der Arbeitsgruppe etabliert hat, danke ich für die gute Betreuung im Verlauf der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. Juliane Müller für die angenehme Zusammenarbeit, ihre Hilfe bei zahlreichen Experimenten und nicht zuletzt für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Ursula Klutzny, Dr. Sabine Krause und Dr. Rolf Stucka für Hilfestellungen bei diversen technischen Problemen und auch allen anderen Kollegen für das hervorragende Arbeitsklima im Laboralltag.

Diese Arbeit wurde angefertigt und gefördert im Rahmen des Promotionsstudienganges „Molekulare Medizin“ der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität.

6. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sarah Kristina Baumeister
Geburtsdatum: 6.3.1981
Geburtsort: Düsseldorf
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Hans-Fitz-Weg 35, 81476 München

Ausbildung

1987-1991 Grundschole Neuried
1991-2000 Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg
1999 Pre-medical Career Exploration Program, Brigham and Womens Hospital, Boston, MA
2000 Abitur
Okt 2000 Immatrikulation zum Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2002 Ärztliche Vorprüfung
2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002-2005 Famulaturen: Orthopädie, Bezirkskrankenhaus St.Johann in Tirol; Neurologie, Friedrich-Baur-Institut, München; Innere Medizin, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, England; Pädiatrie, Praxis Dr. Hailey, Vancouver, Kanada
2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006/07 Praktisches Jahr
Innere Medizin: St. Paul's Hospital, Vancouver, Kanada und Medizinische Klinik 3, Klinikum Großhadern
Chirurgie: Universitätsspital Basel, Schweiz
Neurologie: Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern
April 2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation
seit Mai 2007 Assistenzärztin am Friedrich-Baur-Institut an der Neurologischen Klinik der LMU München

Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den

.....

(Sarah K. Baumeister)

Dissertation eingereicht am:

