

Aus dem Friedrich-Baur-Institut  
der Medizinischen Fakultät  
an der neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München  
(Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich)

"Phänotypen, Mutationsdetektionsrate und Mutationsspektrum in einem Kollektiv von  
Patienten mit kongenitalen myasthenen Syndromen (CMS)"

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Sibylle Dorothee Allmaras  
geb. Schreiner  
aus  
Düsseldorf  
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Ingo Borggräfe

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. hum. biol. Juliane Simona Müller

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

Datum der mündlichen Prüfung: 20.11.2014

meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Abicht A., Dusl M., Gallenmüller C., Guerguelcheva V., Schara U., Della Marina A., Wibbeler E., Allmaras S., Mihaylova V., von der Hagen M., Huebner A., Chaouch A., Müller J.S., Lochmüller H. (2012), Congenital Myasthenic Syndromes: Achievements and Limitations of Phenotype-Guided Gene-After-Gene-Sequencing in Diagnostic Practice: A Study of 680 Patients; *Human Mutation*, **33**: 1474-1484

# INHALTSVERZEICHNIS

A. Zusammenfassung	8
B. Einleitung	10
1. Grundlagen der Funktion der motorischen Endplatte (neuromuskuläre Übertragung)	11
1.1 Aufbau der neuromuskulären Endplatte	11
1.2 Neuromuskuläre Erregungsübertragung	12
2. CMS und ihre molekularen Defektebenen an der Endplatte	14
2.1 Präsynapse	14
2.2 Synapse	15
2.3 Postsynapse	16
2.3.1 Acetylcholinrezeptor (AChR)	16
2.3.1.1 Das Slow-Channel Syndrom	18
2.3.1.2 Das Fast-Channel Syndrom	18
2.3.1.3 Die AChR- Defizienz	19
2.3.2 AChR Clustering	19
2.3.2.1 Agrin	19
2.3.2.2 MuSK und Dok7	20
2.3.2.3 Rapsyn	20
2.3.2.4 <i>GFAT /GFPT1</i>	21
3. CMS und ihre bekannten Genotyp /Phänotyp Korrelationen	22
C. Zielsetzung	23
D. Material und Methoden	24
1. Kollektiv	24
1.1 Einschlusskriterien	24
1.2 Ausschlusskriterien	25

1.3 Zuweisende internationale Zentren	25
2. Molekulargenetische Daten	26
3. Erfasste Patientendaten	28
3.1. Anonymisierte Patientenerfassung	28
4. Auswertung unter Zuhilfenahme des Fisher-Tests für kleine Stichproben	34
4.1. Definition des Fisher - Test	34
<b>E. Ergebnisse</b>	<b>38</b>
1. Genetische Daten	38
1.1. Mutationsdetektionsrate und -verteilung	38
2. Erfasste Merkmale im Gesamtkollektiv	43
2.1 Herkunft	43
2.2 Familienanamnese	45
2.3 Klinische Daten	49
2.3.1 Erkrankungsbeginn	49
2.3.2 Infektexazerbation	51
2.3.3 Klinische Symptome	53
2.3.4 Elektrophysiologie	59
2.3.5. Muskelbiopsie	61
2.3.6 Laborparameter	62
2.3.7 Medikamentöse Therapie	62
3. Genotyp-Phänotyp Korrelation für einzelne Gene	64
3.1 Gen CHRNE	64
3.2 Gen RAPSN	66
3.3 Gen ColQ	67
3.4 Gen DOK7	68
3.5 Gen CHAT	69

F. Diskussion	70
1. Statistische Auswertung	72
2. Häufigkeitsverteilung der Mutationen	74
3. Genotyp / Phänotyp Korrelationen	75
4. Der Vorhersagewert einzelner phänotypischer Merkmale für das ursächliche Gen	82
G. Literaturnachweis	86
H. Anhang	93
1. Tabellen	93
2. Abbildungen	97
3. Diagramm	103
4. CMS Fragebogen	104
5. Ehrenwörtliche Erklärung	108
6. Lebenslauf	109

## A. ZUSAMMENFASSUNG

Unter dem Sammelbegriff CMS (congenitale myasthene Syndrome) werden seltene hereditäre Erkrankungen zusammengefasst, deren pathophysiologische Grundlage eine Störung der neuromuskulären Erregungsübertragung darstellt, die auf verschiedenen Ebenen im Bereich der neuromuskulären Endplatte lokalisiert sein kann und mit einer großen Bandbreite an phänotypischen Manifestationen, vor allem des Kindesalter, einhergeht. Als gemeinsames klinisches Merkmal liegt allen Ausprägungen die pathologische Ermüdbarkeit der Muskulatur zugrunde, reichend von einer leichten Ptose bis hin zu gravierenden muskulären Insuffizienzen mit respiratorischen Defiziten, die eine Beatmung erfordern. Eine Besonderheit dieser genetischen Erkrankung ist die Möglichkeit einer differenzierten medikamentösen Therapie auf der Grundlage des jeweiligen Pathomechanismus.

Im Verlauf der letzten Jahre wurde eine zunehmende Zahl von Genen identifiziert, deren Mutationen ursächlich für CMS sind: Hierzu zählen die vier Gene der Untereinheiten des adulten Acetylcholinrezeptors, die entweder eine autosomal dominante oder eine rezessive Form des CMS verursachen (*CHRNA1*, *CHRNBI*, *CHRNE*, *CHRND*) sowie weitere Endplatten-assoziierte Gene, deren Mutationen ursächlich für autosomal rezessive Formen sind, dazu zählen die Gene *CHAT*, *COLQ*, *DOK7*, *RAPSN*, *SCN4A*, *MUSK*, *LAMB2*, *AGRN*, *PLEC* und *GFPT1*<sup>1,2,3</sup>, hinzu kamen kürzlich noch die Gene *ALG2*, *ALG14* und *DPAGT1*<sup>3</sup>.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, ein Kollektiv von CMS-Patienten, das im Rahmen eines Forschungsprojekts zur molekularen Charakterisierung der CMS am Friedrich-Baur-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München gebildet worden war und weltweit eines der größten Patientenkollektive darstellt, statistisch zu erfassen und hinsichtlich klinischer Besonderheiten bei Patienten mit und ohne molekulare Diagnose weiter zu untersuchen.

In der Kohorte der 680 unabhängigen Patienten wurden zunächst systematisch die vorliegenden Informationen zu klinischen, elektrophysiologischen, muskelbiptischen und molekulargenetischen Befunden erfasst. Die im Gesamtkollektiv erfassten Daten wurden dann hinsichtlich der Häufigkeit phänotypischer Besonderheiten ausgewertet. Die Verteilung dieser Merkmale wurde zum einen in den beiden Gruppen der Patienten mit und ohne molekulare Diagnose gegenübergestellt, zum anderen wurde sie mit dem spezifischen Genotyp der molekular diagnostizierten Patienten korreliert.



Die Auswertung der klinischen Daten zum Krankheitsverlauf verdeutlichte unter anderem, dass es sich bei den CMS in der Regel um eine frühkindlich manifestierende Erkrankung handelt. Bei 422 von 680 Patienten traten erste Symptome pränatal beginnend bis zum 6 Lebensjahr auf (62%), mit einem Maximum von 157 Patienten, die eine Erstmanifestation bereits bei Geburt zeigten (23%). Nur bei 39 Patienten kam es zu einem Erstauftreten der Symptome nach dem 20 Lebensjahr (5,7%). Insgesamt war bei 299 Patienten (44%) durch die vorangegangenen molekulargenetischen Untersuchungen eine molekulare Diagnose mit einem Mutationsnachweis in einem der o.g. Gene gestellt worden. Durch Mutationsnachweise in den Genen *CHRNE* (22%), *RAPSN* (6%), *COLQ* (6%), *DOK7* (5%), *CHAT* (2%), *GFPT1* (2%), *CHRNA1*, *CHRN1* und *MUSK* (jeweils <1%) bei insgesamt 299 Patienten (44%) bestätigte sich die zuvor angenommene große genetische Heterogenität der Erkrankung.<sup>4</sup>

Bereits früher beobachtete Genotyp- Phänotyp Korrelationen konnten bestätigt werden, so das schon zuvor in der Literatur beschrieben Auftreten von Apnoen und krisenhaften respiratorischen Verschlechterungen als charakteristisches Merkmal von Mutationen insbesondere des *RAPSN* oder *CHAT* Gens, des weiteren der Phänotyp einer Gliedergürtelschwäche bei vorliegender Mutation im *COLQ*, *DOK7* und *GFPT1* Gen.

Die Auswertung der erhobenen Daten zeigte, dass die CMS ein heterogenes klinisches Krankheitsbild darstellen und dass ein Einzel-Gen Screening auf Mutationen in den bekannten CMS-ursächlichen Genen bei einer signifikanten Patientengruppe Mutationen nachweist. Die Mutationsdetektionsrate ist dann besonders hoch anzunehmen, wenn phänotypische Besonderheiten des Patienten in der Reihenfolge der genetischen Testung berücksichtigt werden. Die Auswertung des Kollektivs zeigte jedoch auch, dass – auch bei klinisch gut charakterisierten Patienten - ein erheblicher Anteil (56%) durch die sequentielle Einzelgentestung nicht genetisch diagnostiziert werden konnte. Hier müssen noch andere bislang nicht identifizierte genetische Ursachen vermutet werden. Für den einzelnen an CMS erkrankten Patienten ist eine molekulare Typisierung seiner individuellen Form bezüglich Prognose des Krankheitsverlaufs, Behandlungsoptimierung oder auch Vererbbarkeit von großer Bedeutung. Möglicherweise kann zukünftig durch neue Methoden der genetischen Diagnostik unter Einbeziehung von gut erstellten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen eine gezieltere Beratung und verbesserte Therapie von CMS-Patienten erreicht werden.

## B. EINLEITUNG

Nach Erstbeschreibung myasthener Syndrome unter dem Oberbegriff Myasthenia gravis durch Wilks 1877 (Samuel Wilks, britischer Neurologe 1824-1911) und Erb 1879 (Wilhelm Erb, deutscher Neurologe 1840-1921) galten sie bei Kindern als seltene Ereignisse.<sup>5</sup>

In den Jahren 1900-1932 wurden ähnliche „Symptome“ bei Patientenkollektiven weiter erforscht, jedoch waren die meisten Patienten dieser Gruppen erwachsen, die wenigsten hatten bei Erstdiagnose ein Alter unter 10 Jahren. Zusätzlich wurden Kinder, die myasthene Auffälligkeiten zeigten oft unter der Diagnose Möbius Syndrom falsch eingeordnet. 1937 beschrieb Rothbart<sup>6</sup> erstmalig eine familiäre Häufung myasthener Syndrome bei Kindern, er fand 5 Brüder einer Familie, die alle im Alter unter 2 Jahren an Muskelschwäche variabler Ausprägung erkrankt waren, einer davon verstarb im Alter von 9 Monaten an einer Pneumonie. Eltern und Schwester der Patienten waren phänotypisch unauffällig. In der Zeit danach fanden sich ähnliche Fälle, wenn auch in weit geringerer Anzahl, eine Schlussfolgerung als mögliche zur Myasthenia gravis abzugrenzende andere Erkrankung wurde jedoch nicht gezogen.

Erst in den 70 Jahren kam es unter anderem durch Beschreibung von 72 Fällen frühkindlicher Myasthenie durch Sarah Bunday<sup>7</sup> und durch die Identifizierung der Myasthenia gravis als Autoimmunerkrankung zur Abgrenzung der congenitalen myasthenen Syndrome (CMS)<sup>8</sup>.

Durch die Weiterentwicklung der genetischen Forschung konnten im Lauf der Jahre seitdem verschiedene genetische Veränderungen als auslösend für diese Syndrome nachgewiesen werden.

Obwohl die Variabilität der Ausprägung, also des Phänotyps des Einzelerkrankten hoch ist, liegt allen Erkrankungen die pathologische Ermüdbarkeit der Muskulatur bei Belastung zugrunde, reichend von einer leichten Ptose über eine generalisierte Muskelschwäche bis hin zu schwereren Ausprägungen mit z.B. einer Beatmungspflichtigkeit bei Infektionen.

# 1. Grundlagen der Funktion der motorischen Endplatte (neuromuskuläre Übertragung)

## 1.1 Aufbau der neuromuskulären Endplatte

Zum willkürlichen wie unwillkürlichen Bewegungsablauf wird physiologischerweise ein Aktionspotential von einem Nerv auf einen Muskel übertragen und so die Kontraktion ausgelöst. Hierbei gilt: Eine Nervenverzweigung erregt eine Muskelzelle. Dazu teilt sich der Hauptnerv in viele Abzweigungen auf, die als kleine Auftreibungen in einer Vertiefung der Muskelzelle enden. Diese Einheit wird neuromuskuläre Endplatte genannt.

Die Ausbildung dieses synaptischen Zellkontakts zwischen Motoneuron und Muskelfaser (Synaptogenese) erfordert eine räumlich und zeitlich koordinierte Spezialisierung der Plasmamembran der beteiligten Zellen.<sup>10, 11, 12</sup> Während der Embryogenese entwickeln sich zunächst multiple Synapsen zwischen Motoneuronen und Muskelfasern, die im Laufe der weiteren Entwicklung zu einem Großteil eliminiert werden, bis im adulten Organismus genau eine neuromuskuläre Endplatte pro Muskelfaser existiert. Während der Synaptogenese bewegen sich die Wachstumskegel der Motoneuronaxone auf die Muskelfasern zu. Während der Kontaktaufnahme wird lokal die Bildung der Synapse ausgelöst. An ihren Rändern durch die glialen Schwann-Zellen begrenzt, bilden sich im Motoaxon präsynaptisch Cluster synaptischer Vesikel für eine spätere effiziente regulierte Neurotransmitterausschüttung. Im synaptischen Spalt entsteht die synaptische Basalmembran. Postsynaptisch kommt es zu einer Invagination der muskulären Plasmamembran mit starker Fältelung der Oberfläche, an deren Spitzen sich die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren und in deren Tälern sich die spannungsabhängigen Natriumkanäle in hoher Konzentration anreichern. Unter der Synapse wird die Expression der vier verschiedenen Untereinheiten des nikotinischen Acetylcholinrezeptors induziert, nach der Fetalzeit wird die gamma-Untereinheit des embryonalen Rezeptors durch die epsilon-Untereinheit des adulten Rezeptors ersetzt, der sowohl eine kürzere Öffnungszeit als auch eine erhöhte Leitfähigkeit aufweist und sich an der Synapse anreichert.<sup>12, 13</sup> Einen wichtigen Beitrag bei der Induktion, Organisation und dem Erhalt der neuromuskulären Synapse hat hierbei die Agrin<sup>14</sup>, das von den präsynaptischen Motoneuronen synthetisiert wird und über einen postsynaptischen Signaltransduktionsweg, an dem unter anderem die Proteine Lrp4, MuSK und Dok7 beteiligt sind, das Clustern und der AChR und den Erhalt der synaptischen Formation vermittelt.<sup>10, 12, 15</sup> Durch genetische

Veränderungen von verschiedenen Proteinen, die an Erregungsübertragung und Ausbildung der neuromuskulären Synapse beteiligt sind, kann es zu Störungen der synaptischen Funktion und damit zum klinischen Bild eines CMS kommen.

## 1.2 Neuromuskuläre Erregungsübertragung

Im Cytoplasma der Nervenendigung wird unter Katalyse durch Cholin-Acetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-CoA und Cholin der Neurotransmitter Acetylcholin synthetisiert. Anschließend wird dieser Neurotransmitter mit Hilfe der vesikulären Acetylcholintransferase (vAChT) in synaptischen Vesikel gelagert. Der Hauptanteil dieser Transmitter beladenen Vesikel befindet sich direkt an der, der Synapse zugewandten Seite des Motoaxons, in mikroskopisch sichtbaren aktiven Zonen.<sup>16</sup>

Wenn ein über die motorische Nervenfasern laufendes Aktionspotenzial, das über die Aktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle erzeugt wird, in die präsynaptische Nervenendigung einläuft, kommt es zur Depolarisation. Diese Spannungsänderung ist der spezifische Reiz zur Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Die Öffnung der Calciumkanäle führt durch den elektrochemischen Gradienten für Calcium zum Einstrom von Calcium in die präsynaptische Endigung und es kommt über verschiedene Enzymwege vermittelt zur Exocytose von ACh in den synaptischen Spalt

Über Diffusion<sup>17</sup> gelangt das ausgestoßene ACh zu den postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren, an die es sich bindet. Die Bindung von ACh an die ACh-Rezeptoren bewirkt die Öffnung von Kationenkanälen und dadurch eine Depolarisation der postsynaptischen Membran. Diese Depolarisation entspricht dem exzitatorischen postsynaptischen Potenzial.<sup>18</sup>

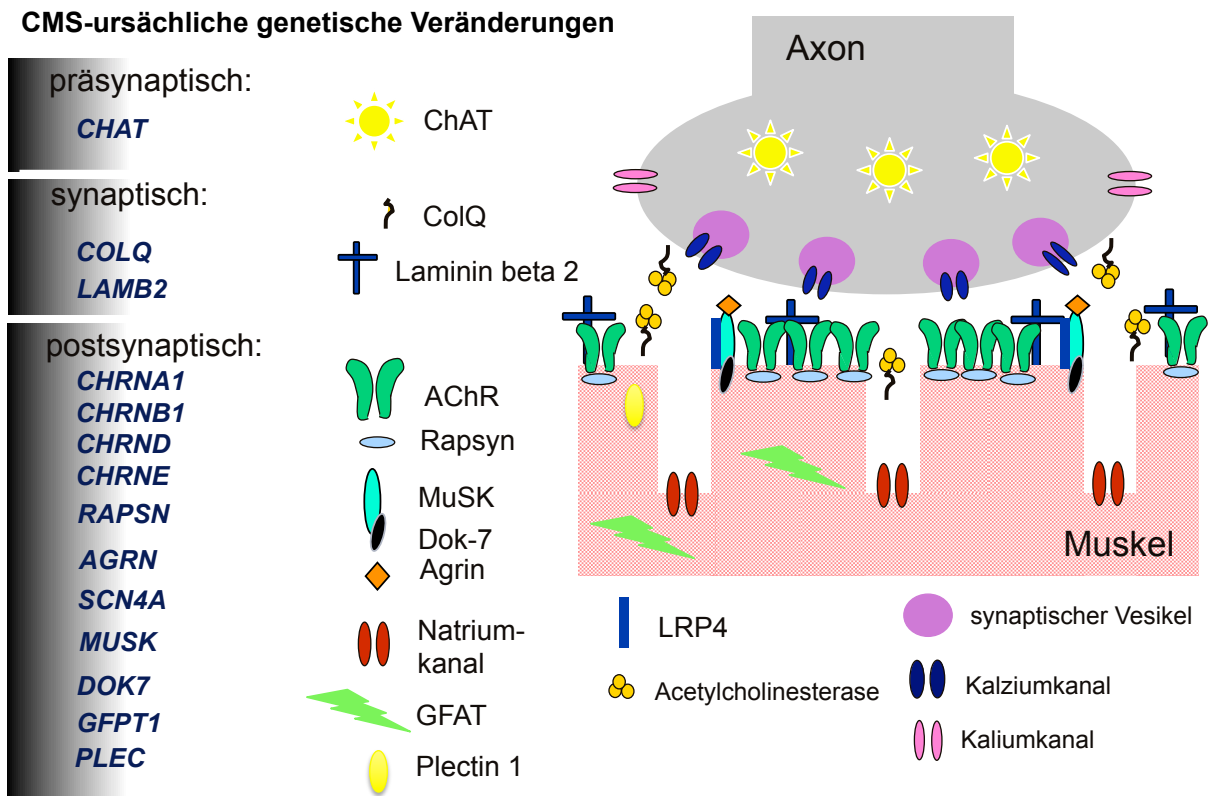
Wenn die postsynaptische Membran des Muskels durch die Aktivierung des AChR und das dadurch erzeugte exzitatorische postsynaptische Potenzial den Schwellenwert, der für die Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle notwendig ist, erreicht hat, kommt es zur Aktivierung der Natriumkanäle, diese öffnen sich und ein Natriumeinstrom ist die Folge. Die Depolarisation breitet sich so über die gesamte Muskelfaser aus, die aktivierte Muskelfaser kontrahiert. Zum Abschluss und zur Begrenzung der Erregung / des Aktionspotentials wird im synaptischen Spalt ACh durch die dort mit einem kollagenartigen „Schwanz“ (ColQ) in der postsynaptischen Basalmembran verankerte AChE hydrolytisch gespalten.

Die Repolarisation erfolgt über die Öffnung von Kaliumkanälen mit anschließendem Kaliumausstrom der zu einer Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials führt.

## 2. CMS und ihre molekularen Defektebenen an der Endplatte

Die molekularen Ursachen der CMS sind auf verschiedenen Ebenen der neuromuskulären Synapse angesiedelt. Je nach Lokalisation des ursächlichen Defekts lassen sich so die präsynaptischen, synaptischen und postsynaptischen Unterformen einteilen. (Abb. 1)

Abbildung 1, CMS-ursächliche genetische Veränderungen



Modifiziert nach McConville and Vincent 2002<sup>9</sup>

### 2.1 Präsynapse

In der ausgereiften neuromuskulären Endplatte befinden sich, wie zuvor beschrieben, mit dem Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) gepackte Membranvesikel in den der Muskelzelle zugewandten Seiten der Motoraxone. An einigen Stellen lagern die Vesikel so dicht aneinander, dass sie mikroskopisch als aktive Bereiche nachweisbar sind. Das eingelagerte Acetylcholin wird mit Hilfe des Enzyms Cholin- Acetyltransferase (ChAT) im Zytoplasma

der Nervenzelle aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. Die hierzu nötige Energie liefern die an dieser Stelle in hoher Anzahl befindlichen Mitochondrien, die ebenso dazu beitragen, dass das synthetisierte Acetylcholin in den synaptischen Spalt freigesetzt werden kann.<sup>18</sup> Bis zur Freisetzung wird das ACh mit Hilfe des vesikulären Acetylcholintransporters (vAChT) in synaptischen Vesikeln gelagert. Die Cholin-Acetyltransferase katalysiert die Biosynthese des Neurotransmitters Acetylcholin aus Cholin und Acetyl-CoA im Cytoplasma präsynaptischer Neuronen.

Das Gen *CHAT* kodiert für das Enzym Cholin-Acetyl-Transferase und ist lokalisiert auf dem Chromosom 10q11.23<sup>19</sup>

Autosomal rezessive Mutationen in diesem Gen wurden im Jahr 2001 als ursächlich für die bislang einzige präsynaptische CMS-Form beschrieben<sup>20</sup>.

## 2.2 Synapse

Die Acetylcholinesterase (AChE) bewirkt eine rasche hydrolytische Spaltung von freigesetztem Acetylcholin. Um die Erregung nach Ausstoß des Acetylcholins in den synaptischen Spalt wieder begrenzen zu können, ist das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) in der Basalmembran des synaptischen Spalts verankert, diese Verankerung gewährleistet das peitschenförmige kollagenartige Protein (ColQ, ColQ-collagen-like tail), ein Protein das Muskel-spezifisch exprimiert wird.

Autosomal rezessive Mutationen des ColQ-Gens (*COLQ*, Chromosom 3p25.1) wurden 1998 als<sup>21</sup> Ursache eines synaptischen CMS beschrieben. Durch eine fehlende Verankerung der AChE kommt es zu einem Mangel an diesem Enzym. Dies führt zur verlängerten Wirkung von ACh auf den AChR, und damit zu verlängerten Endplattenpotentialen, der Acetylcholinrezeptor wird desensibilisiert und es kommt zu einer Depolarisationsblockade bei physiologischer Stimulation. Durch die kationische Überladung der postsynaptischen Region kommt es zu einem Verlust von AChR und damit zu einer Myopathie.

## 2.3 Postsynapse

Die invaginierte postsynaptische Membran der Muskelzelle ist eine sehr spezialisierte Struktur. Sie ist sehr stark gefaltet, hier befinden sich nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR), die vor allem an den Spitzen der Falte, gegenüber den aktiven Bereichen der praesynaptischen Nervenendigung in sehr hoher Dichte lokalisiert sind und spannungsaktivierte Natriumkanäle, die das muskuläre Aktionspotential generierenden und vor allem in den Vertiefungen der Fältelung liegen.

### 2.3.1 Acetylcholinrezeptor (AChR)

Bei den ACh-Rezeptoren (Abb.2) handelt es sich um Transmembranrezeptoren, die in verschiedenen Bereichen des Nervensystems angesiedelt sind. Aktiviert werden die ACh-Rezeptoren durch Bindung des Agens Neurotransmitters Acetylcholin, sowie durch das namensgebende Nikotin. Es handelt sich also um Liganden-aktivierte Ionenkanäle.

Grundsätzlich können zwei Typen von ACh-Rezeptoren unterschieden werden, die sich in ihrem Aufbau gänzlich unterscheiden. Der nikotinsche Acetylcholinrezeptor (nAChR), mit seinen Untertypen n1 (NME) und n2 (neuronal, prä auf postganglionär), der sich vor allen Dingen im peripheren Nervensystem findet und der muskarinsche (mAChR) Acetylcholinrezeptor, der vor allem im zentralen Nervensystem und an der glatten Muskulatur von Drüsen (Pankreas, Speicheldrüsen) vorkommt.

In die Pathogenese der CMS involviert ist der nAChR, weswegen sein Aufbau hier näher beschrieben wird: <sup>22,23,24</sup>

Nikotinsche Acetylcholinrezeptoren sind membranständige große zylindrische Glykoproteine, die in der adulten Form aus fünf Untereinheiten ( $2\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ) bestehen. Die in der Fetalzeit exprimierte embryonale Form des Rezeptors ( $2\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) wird im Verlauf der Entwicklung unter zunehmender Innervation des fetalen Muskels weitestgehend ersetzt und nur nach Denervierung des Muskels erneut gebildet.

Über die  $\alpha 1$  Untereinheiten kann ACh an den Rezeptor gebunden werden, da es zwei  $\alpha 1$  Untereinheiten gibt, bedarf es auch zweier gebundener ACh- Moleküle um den Rezeptor zu aktivieren. Damit ist der Kanalöffnungsmechanismus unempfindlicher gegenüber kleinen Konzentrationen von Neurotransmittern und hoch empfindlich in dem Konzentrationsbereich,

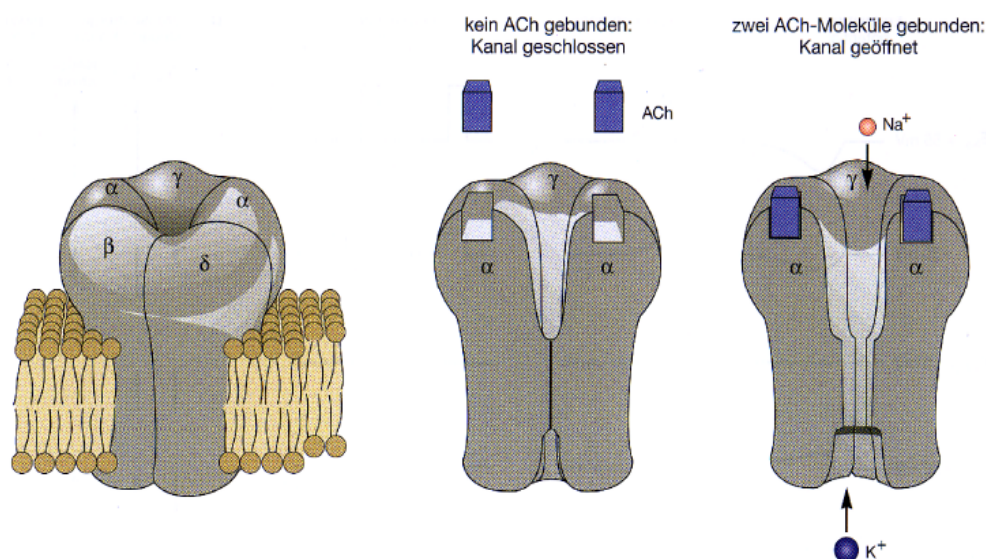


der während der synaptischen Übertragung vorliegt.

Die Transmembranregion der AChR-Untereinheiten bildet eine wässrige Pore, nach Bindung des Neurotransmitters ACh ändert sich die dreidimensionale Struktur des Rezeptors und die Pore öffnet sich. Natrium- und in geringerem Maß Calcium-Ionen strömen in die Zelle ein, Kalium strömt in wesentlich geringerer Menge aus. Durch die Ladungsverschiebung kommt es zur Depolarisation, die dem exzitatorischen postsynaptischen Potential entspricht. Wird dadurch der für die Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle nötige Schwellenwert überschritten, kommt es zur Fortleitung der Depolarisation über die gesamte Muskelmembran und dadurch zur Kontraktion.<sup>24</sup>

Der ligandenbesetzte Rezeptor kommt somit in zwei Formen vor, offen und geschlossen, beide Zustände gehen schnell ineinander über. Parallel dazu geht die geschlossene noch aktivierte, da Neurotransmitter-besetzte Form, über Desensibilisierung mit etwas zeitlicher Verzögerung in eine noch besetzte inaktive Form über, diese wandelt sich dann über Abspaltung von ACh wieder in die inaktivierte geschlossene Form um. Durch die Brownsche Molekularbewegung (R.Brown, 1827<sup>17</sup>) diffundieren die ACh-Moleküle wieder vom Rezeptor ab und werden im synaptischen Spalt durch die Acetylcholinesterase hydrolytisch abgebaut. Durch weiteres Absinken der Neurotransmitterkonzentration unter 10 nM regeneriert sich der Rezeptor wieder in seine ursprüngliche Form. Die mittlere Schließungszeit des Kanals beträgt bei einer vorherrschenden ACh Konzentration von 1mM rund 20-50 ms.<sup>1,8</sup>

Abbildung 2, ACh-Rezeptor<sup>92</sup>



### 2.3.1.1 Das Slow-Channel Syndrom

Das Slow-Channel-Syndrom (SCCM) beschreibt einen Funktionszustand des AChRs, der durch spezielle Mutationen der verschiedenen, die Untereinheiten kodierenden Gene *CHRNA1*, *CHRNBI*, *CHRND* und *CHRNE* verursacht sein kann. Hierbei besteht eine erhöhte Affinität des AChR zu Acetylcholin sowie eine erhöhte Öffnungsrate mit folgender prolongierter Öffnungszeit des Kanals bei Besetzung des Rezeptors mit dem Transmitter. Zusätzlich ist die Diffusion des ACh vom Rezeptor herabgesetzt. Der folgende Depolarisationsblock mündet in einer belastungsabhängigen Muskelschwäche.

Es kommt zu einem Natrium und Kalziumioneneinstrom die sich in der postsynaptischen Membran akkumulieren und weitere Enzyme induzieren, dadurch kommt es zur protrahierten Zerstörung synaptischer Strukturen, wie Aufhebung der Fältelung und Verlust von AChR, Zellapoptose und Verbreiterung des synaptischen Spalts. Das Resultat ist eine therapieresistente Endplatten Myopathie.<sup>23, 25, 26</sup>

Die meisten dieser SCCMS verursachenden Genmutationen betreffen die extrazelluläre ACh-Bindungsdomäne der alpha-Untereinheit oder die M2 Transmembrandomäne der Kanalpore, gebildet durch verschiedene Untereinheiten. Es handelt sich um Missense Mutationen die als Gain-of-function Mutationen die einzigen autosomal dominant erblichen Genveränderungen bei den CMS darstellen.<sup>27</sup>

### 2.3.1.2 Das Fast-Channel Syndrom

Fast-Channel-Syndrome sind sehr selten nachzuweisen. Pathophysiologisch kommt es zu einem Herabsetzen der Öffnungswahrscheinlichkeit des AChR in Kombination mit einer erhöhten Schließrate. Dabei wird das Schwellenpotential der Endplatte nicht überschritten, und somit kann das einlaufende Aktionspotential nicht an die Muskelzelle weitergeleitet werden. Die bislang beschriebenen Fast-Channel Mutationen der Gene der AChR-Untereinheiten werden autosomal rezessiv vererbt.<sup>19, 23</sup>

### 2.3.1.3 Die AChR-Defizienz

Die meisten bislang beschriebenen Mutationen der AChR-Untereinheiten verändern nicht die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptorproteins, sondern führen als autosomal rezessive loss-of-function Mutationen zu einer reduzierten Rezeptorexpression. Der Mangel an AChR an der postsynaptischen Membran führt zu einer neuromuskulären Erregungsübertragungsstörung. Besonders häufig betreffen derartige Mutationen die epsilon-Untereinheit (Gen *CHRNE*), möglicherweise weil hier ein Kompensationsmechanismus durch eine Hochregulation der fetalen gamma-Untereinheit besteht.<sup>28</sup>

### 2.3.2 AChR Clustering

Die Anordnung in einer hohen Dichte (Clustering) von Neurotransmitterrezeptoren an der postsynaptischen Membran ist von großer Wichtigkeit. An der neuromuskulären Endplatte erreichen die nicotineren AChR eine Dichte von 10,000/qum.<sup>11, 13</sup>

Die Mechanismen, die diesem Vorgang unterliegen, wurden in den letzten Jahren ausführlich untersucht. Besondere Bedeutung hat hier der sogenannte Agrin-LRP4-MuSK-Dok7 Signaltransduktionsweg, bei dem auch das dem AChR eng assoziierte Protein Rapsyn eine entscheidende Rolle spielt.<sup>29, 30</sup>

#### 2.3.2.1 Agrin

Agrin ist ein ca. 200 kDa große Heparansulfat-Proteoglykan, das durch verschiedene Zellen synthetisiert wird, die jeweils einen anderen Wirkmechanismus bedingen. Durch ein alternatives Spleißen entstehen außerdem verschiedenen Protein Isoformen, hierunter auch die schon zuvor beschriebene, von der präsynaptischen Nervenendigung synthetisierte, neuronale Agrin Isoform. Die neuronalen Agrinformen werden vom Motoneuron direkt in den synaptischen Spalt sezerniert. Agrin besitzt einen großen Anteil Kohlehydratseitenketten und verankert sich mit einer Aminoseitengruppe in der extrazellulären Matrix.<sup>31</sup> Postsynaptisch veranlasst Agrin, vermittelt über LRP4, die intrazelluläre Phosphorylierung der muskelspezifischen Tyrosinkinase (MuSK)<sup>32</sup>, die über weitere an der Signaltransduktion beteiligte Proteine die Aggregation des Cycloskelettproteins Rapsyn und damit das Clustering der nicotineren Acetylcholinrezeptoren veranlasst.<sup>31, 32, 33, 34, 35</sup>

Mutationen des kodierenden Gens *AGRN* (Chromosom 1p36.33) als Ursache eines autosomal rezessiven CMS wurden 2009 in einer Familie beschrieben<sup>36</sup>, eine zweite Familie wurde 2012 beschrieben.<sup>37</sup>

### 2.3.2.2 MuSK und Dok7

Die muskelspezifische Tyrosinkinase MuSK ist in der postsynaptischen Basalmembran lokalisiert. MuSK besteht aus vier Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer cysteinreichen Region, der Juxtamembran- und Tyrosinkinase-Domäne. MuSK wird einerseits intrazellulär aktiviert, durch das Adaptorprotein Dok7<sup>38</sup>, andererseits von extrazellulär durch Lrp4.<sup>39</sup> Unter Vermittlung verschiedener intracellulärer Kinase Kaskaden trägt MuSK wesentlich zu Clustering und Stabilisierung der AChR bei<sup>40</sup>. Wird die funktionelle Aktivität von MuSK im Mäuseexperiment ausgeschaltet, verlieren deren Muskelzellen die Fähigkeit zur Differenzierung der postsynaptischen Membranen. Die Ausbildung der AChR-Cluster unterbleibt, die Mäuse versterben kurz nach der Geburt an einer ausgeprägten Muskelschwäche.<sup>32, 33, 35, 41</sup>

Bislang wurden autosomal rezessive CMS ursächliche Mutationen in *MUSK* erst in 3 Familien beschrieben.<sup>42</sup> Die im Jahr 2006 erstbeschriebenen autosomal rezessiven Mutationen in *DOK7* Mutationen<sup>43</sup> sind dagegen relativ häufig, insbesondere findet man häufig die als mitteleuropäische Founder-Mutation bekannte Veränderung in Exon 7 (c.1124\_1127dupTGCC).

### 2.3.2.3 Rapsyn

Rapsyn (receptor-associated protein of the synapse) ist ein 43 kDa großes, cytoplasmatisches der postsynaptischen Membran assoziiertes Protein. Im Rahmen des Agrin-MuSK-Rapsyn Transduktionswegs spielt es eine entscheidende Rolle beim „Clustering“ der Acetylcholinrezeptoren an der postsynaptischen Membran. Rapsyn ist durch einen myristinylierten N-Terminus in der postsynaptischen Membran verankert und enthält sieben Tetratricopeptid-Wiederholungen, die die Selbstassoziation seiner Moleküle ermöglichen, eine Voraussetzung für das Clustern von AChR. In seinem C-terminalen Ende trägt Rapsyn eine Coiled-coil-Domäne, diese dient den Wechselwirkungen mit den AChR Untereinheiten.

Rapsyn kommt im Verhältnis 1:1 mit den AChR vor und interagiert direkt. Im Tierversuch mit sogenannten „knock-out“ Mäusen die einen Rapsyn Defekt trugen, unterblieb das AChR Clustering, was zu einem schnellen Tod durch Atemlähmung führte.<sup>33, 35, 41, 44</sup>

Autosomal rezessive Mutationen des *RAPSN*-Gens (Chromosom 11p11.2) wurden bereits bei einer großen Anzahl von CMS Patienten beschrieben.<sup>45</sup>

#### 2.3.2.4 *GFAT/ GFPT1*

Glutamine-fructose-6-phosphat-transaminase-1 ist ein 2011 erstbeschriebenes funktionelles Enzym<sup>46</sup>, der Gen - Locus für die Kodierung befindet sich auf Chromosom 2p13.

Das Enzym ist involviert in die Hexosamin-Biosynthese, indem es im ersten Schritt dieser Synthese den Transfer einer Aminogruppe von Glutamin auf Fruktose-6-Phosphat katalysiert, anschließend liegt Glucosamin-6-Phosphat (GlcN-6-P) und Glutamat vor. Im weiteren Verlauf entsteht nach weiteren Einzelschritten als Endprodukt das für die Synthese von Glykoproteinen, -lipiden und Proteoglykanen obligat nötige UDP-N-Acetylglucosamin.

Patienten mit einer Mutation in *GFPT1* zeigen häufig tubuläre Aggregate in der Muskelbiopsie, einer frühen Gliedergürtelmyasthenie ohne okuläre Beteiligung mit Nachweis von tubulären Aggregaten.<sup>47</sup>

### 3. CMS und ihre bekannten Genotyp/Phänotyp Korrelationen

Für genetisch definierte CMS-Subformen, die häufiger bei Patienten identifiziert wurden, kristallisierten sich in den letzten Jahren einige Genotyp / Phänotypkorrelationen heraus.

Die bislang publizierten Patienten mit Mutationen in *CHAT*<sup>20, 48, 49</sup> und *RAPSN*<sup>50</sup> zeichnen sich insbesondere durch ein häufiges Auftreten von frühkindlichen Apnoen aus,<sup>48</sup>

- Im Unterschied zu Patienten mit nachgewiesener Mutation in *CHAT* zeigen Patienten mit Mutationen in *RAPSN*<sup>50</sup> häufig Kontrakturen und Dismorphien.

Mutationen in *DOK7*<sup>51</sup>, *COLQ*<sup>52</sup> und *GFPT1*<sup>47, 53</sup> zeigen häufig einen Gliedergürtelbefall. Hauptunterscheidungsmerkmale sind

- Patienten mit einer Mutation in *COLQ* werden sehr früh, teilweise schon durch verminderte intrauterine Beweglichkeit auffällig. Demgegenüber erkranken Patienten mit einer Mutation in *DOK7* oder *GFPT1* nach anfänglich normaler motorischer Entwicklung erst im höheren Kindes- / Jugendlichenalter, einige erst in der dritten Lebensdekade.
- Respiratorische Krisen finden sich vor allem bei Mutationen in *COLQ*, etwas weniger bei Mutationen in *DOK7* und praktisch nie bei Patienten die eine Mutation in *GFPT1* haben.
- Das sonst hauptsächlich und somit auch für *COLQ* in hohem Maß nachweisbare Merkmal der Ptose, wird bei Mutationen in *DOK7* weniger, bei Mutationen in *GFPT1* praktisch nie beobachtet.
- Hauptunterschied ist jedoch das Ausbleiben einer Besserung oder sogar die Verschlechterung der Symptome unter ACHE-Hemmer Therapie für die Patienten mit einer Mutation in *COLQ* und *DOK7*.<sup>5</sup>

Die Wahrscheinlichkeit bei vorliegenden myasthenen Symptomen eine Mutation in *CHRNE* nachzuweisen ist allein schon bei Zugehörigkeit zum Volksstamm der Roma bzw. Abstammung aus dem Südosteuropäischen Raum erhöht.<sup>55, 56</sup> Dies ist in Kombination mit dem Vorliegen einer Ptose und insgesamt eher mildem Verlauf der Erkrankung fast wegweisend.

## C. ZIELSETZUNG

Eine Besonderheit der CMS ist die Möglichkeit einer differenzierten medikamentösen Therapie auf der Grundlage des jeweiligen Pathomechanismus. Die genetische Diagnostik hat daher einen besonderen Stellenwert.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, ein Kollektiv von CMS-Patienten, das im Rahmen eines Forschungsprojekts zur molekularen Charakterisierung der CMS am Friedrich-Baur-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München gebildet worden war und weltweit eines der größten Patientenkollektive darstellt, statistisch zu erfassen und hinsichtlich klinischer Besonderheiten bei Patienten mit und ohne molekulare Diagnose weiter zu untersuchen.

Aus den systematisch ausgewerteten Daten zu klinischen, elektrophysiologischen, muskelbiptischen und molekulargenetischen Befunden der über 600 unabhängigen Patienten sollten sich neue Erkenntnisse zum klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung hinsichtlich der Häufigkeit und Verteilung phänotypischer Besonderheiten im Gesamtkollektiv bzw. bei den Patienten mit spezifisch nachgewiesener Mutation ergeben. Aus der systematischen Auswertung sollte weiterhin hervorgehen, wie hoch jeweils der Anteil der Patienten mit und ohne Nachweis einer ursächlichen Mutation ist und ob phänotypische Besonderheiten die Mutationsdetektionsrate insgesamt oder bezogen auf die verschiedenen ursächlichen Genen beeinflussen. Die Kenntnis der Mutationsdetektionsraten für einzelne Gene sollte es ermöglichen, eine effiziente Strategie in der genetischen Testung vorzugeben. Genaue Genotyp-Phänotyp Korrelationen und klinische Besonderheiten, auch in der Gruppe der bislang nicht diagnostizierten Patienten, könnten eine wertvolle Voraussetzung darstellen für zukünftige molekulargenetische Untersuchungen in der bislang nicht molekular charakterisierten Patientengruppe.

## D. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Kollektiv

Für diese Arbeit wurde ein Gesamtkollektiv bestehend aus 680 CMS Patienten weltweiter Herkunft retrospektiv ausgewertet.

#### 1.1 Einschlusskriterien

Die Auswahl der Patienten erfolgte durch erfahrene pädiatrische oder neurologische Kollegen, basierend auf dem klinischen Bild des Patienten, in Kombination mit dem Ergebnis von elektrophysiologischen Untersuchungen (repetitive Nervenstimulation), oder einer probatorische AChE-Inhibition.

Einschlusskriterium war unter anderem der Beginn myasthener Symptome in der Kindheit, typischerweise zählen hierzu eine neonatale Hypotonie der Muskulatur, eine Ptosis, Ophthalmoparese, eine belastungsabhängige / induzierte Muskelschwäche, möglicherweise milde dysmorphe Stigmata (wie hoher Gaumenbogen, verlängerter Gesichtsschädel), es können angeborene Kontrakturen bestehen, weiterhin bulbäre Symptome (Fütter-, Schluck- und Kauschwierigkeiten, Aspiration, Speicheln), Exazerbation der Symptome bis hin zur Beatmungspflicht bei Infekten, Fieber oder Stress, plötzliche Apnoen oder Ateminsuffizienzen, verzögerte motorische Entwicklung, Muskelatrophie, Ganganomalien (Watschelgang), weiterhin positives Dekrement im EMG (repetitive Nervenstimulation) und Besserung der Symptome auf AChE-Hemmer .

Bei Fehlen sicherer diagnostischer Kriterien für CMS erfolgte die Auswahl der Patienten letztendlich bei Kombination oben genannter Symptome aufgrund der Einschätzung der erfahrenen Kliniker.

War bekannt, dass mehrere Angehörige einer Familie erkrankt waren, wurde für die Erfassung ein Mitglied der Familie als Indexpatient stellvertretend ausgewählt.



## 1.2 Ausschlusskriterien

Um eine Durchmischung mit autoimmuninduzierten Myasthenien zu vermeiden wurden Patienten ausgeschlossen, bei denen anti-AChR / anti-MuSK Antikörper nachgewiesen wurden. Waren diese Tests nicht erbracht worden, wurden die Patienten nur ins Kollektiv aufgenommen, wenn die Symptome vor dem 2. Lebensjahr auftraten oder in der Familie anamnestisch schon angeborene Myasthenien bekannt waren.

Weiterhin wurden Patienten ausgeschlossen, in deren Grundanamnese oder Verlaufsbeobachtung eine geistige Retardierung festgestellt wurde, bei denen ein Therapieerfolg durch eine immunsuppressive Therapie vorlag, deren elektrophysiologische Messungen eindeutige Hinweise auf eine Demyelinisierung oder einen axonalen Schaden ergaben, Personen mit signifikant erhöhten CK-Werten (>1000 U/l) sowie Patienten, die muskelbiologisch deutliche Zeichen dystropher oder neuropathische Veränderungen zeigten.

## 1.3 Zuweisende internationale Zentren

Die Patienten waren in den Jahren 1997 – 2011 durch wissenschaftliche Kooperationspartner unterschiedlicher nationaler und internationaler neuromuskulärer Zentren zugewiesen worden. Demzufolge setzte sich das Kollektiv aus Patienten verschiedener ethnischer Herkunft zusammen.

Tabelle 1, Verteilung der Patienten über die Nationen, n= 680

Deutschland	170	Algerien	8	USA	5	Albanien	2
Spanien	80	UK	8	Slowakei	3	Eritrea	1
Türkei	47	Griechenland	7	Libanon	3	Katar	1
Ungarn	36	Israel	7	Libyen	3	Ukraine	1
Serbien	35	Iran	7	Belgien	3	Georgien	1
Italien	31	Finnland	7	Afrika	3	Sudan	1
Tschechei	26	Österreich	5	Asien	3	Persien	1
Portugal	26	Arabien	5	Polen	3	Guinea	1
Brasilien	20	Bulgarien	4	Luxemburg	2	Sri Lanka	1
Jordanien	19	Kosovo	4	Rumänien	2	Afghanistan	1
Kroatien	12	Norwegen	4	Pakistan	2	Australien	1
Chile	12	Indien	4	Syrien	2	Ägypten	1
Schweden	10	Marokko	4	Russland	2	Bosnien	1
Schweiz	9	Kanada	4	Irak	2		

## 2. Molekulargenetische Daten

Für die im Vorfeld durchgeführten molekulargenetischen Analysen, deren Ergebnisse für eine Auswertung zur Verfügung standen, war in den Jahren 1997-2011 Untersuchungsmaterial (EDTA-Vollblut, genomischer DNA) von verschiedenen internationalen Zentren zur molekulargenetischen Untersuchung eingesandt worden. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Patienten war teilweise auch Material (EDTA-Vollblut, genomische DNA) von deren Angehörigen in weitere Untersuchungen einbezogen worden.

Alle durchgeführten Untersuchungen waren mit Zustimmung der Patienten bzw. mit Zustimmung der Erziehungsberechtigten erfolgt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München lag vor (Projekt 084/00, Amendment 2007).

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sanger Sequenzierung waren die kodierenden Exons bzw. Exon-Intron Grenzen folgender bekannter CMS-ursächlicher Gene untersucht worden: *CHRNA1*, *CHRNBI*, *CHRNE*, *CHRND*, *CHAT*, *COLQ*, *RAPSN*, *DOK7*, *MUSK* und *GFPT1*. Für die Gene *RAPSN* und *CHRNE* waren aufgrund bekannter Mutationen im Promoterbereich zusätzlich die entsprechenden Abschnitte der 5'-nicht kodierenden Region untersucht worden. Alternativ zu einer primären Kompletsequenzierung war teilweise auch gezielt auf häufiger beschriebene Mutationen in einzelnen Genen untersucht worden: Eine gezielte Analyse beinhaltete das Screening auf die bekannten Mutationen in *CHRNE* (c.1267delG; Exon 12, Founder Mutation der Roma), *RAPSN* (p.N88k:Exon 2, Founder Mutation für Mitteleuropa) und *DOK7* (c.1124-1127dupTGCC; Exon 7). Zusätzlich waren die Gene *LRP4*, *VACHT* und *CNTNI* als potentiell neue Kandidatengene für CMS analysiert worden. Die bekannten CMS-ursächlichen Gene *SCN4A*, *LAMB2*, *AGRN* und *PLEC* waren aufgrund der dort nur in Einzelfällen nachgewiesenen Mutationen nicht untersucht worden. Bis jetzt konnten Mutationen in *LAMB2* und *PLEC* außerdem nur bei Patienten mit einem sehr speziellen und erkennbaren Phänotyp nachgewiesen werden (*LAMB2* mit nephrotischem Syndrom und *PLEC* mit erhöhter Neigung zu Blasenbildung/ Epidermolysis bullosa). Trotzdem waren die Genloci für *SCN4A* und *AGRN* bei 47 ausgewählten Familien im Rahmen einer Haplotypanalyse mit Mikrosatellitenmarkern untersucht worden.

Die Anzahl der untersuchten Gene war bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich. Die Abfolge und Breite der genetischen Testung veränderte sich zudem im Verlauf der Zeit, da

immer mehr Gene als CMS auslösend identifiziert wurden und die Erkenntnisse über die Phänotyp-Genotyp Korrelationen wuchsen. Jeder der 680 ausgewählten Patienten war mindestens auf ein bekanntes CMS auslösendes Gen getestet, bei vielen Patienten waren mehrere bis alle der o.g. bekannten Gene untersucht worden. Wurde eine pathogene Mutation identifiziert, erfolgten keine weiteren genetischen Analysen mehr. Ein einzelnes Gen (gezielte Mutationssuche und/oder Kompletsequenzierung) war bei 277 Patienten getestet worden (*CHRNE* bei 136, *RAPSN* bei 63, *DOK7* bei 45, *COLQ* bei 25, und *CHAT* bei 8 Patienten)

Ein Screening auf Mutationen in den beiden häufigsten CMS-Genen *CHRNE* und *RAPSN* (ganzes Gen und/oder gezielter Mutationsnachweis in Exon 2) war bei 33 Patienten, ein Screening auf Mutationen in den die zwei häufigen Genen *RAPSN* (gezielte Analyse oder ganzes Gen) und *DOK7* (gezielte Analyse oder ganzes Gen) war bei 70 Patienten durchgeführt worden. Ein kombiniertes Screening von *CHRNE*, *RAPSN* und *DOK7* erfolgte bei 46 Patienten. Bei 101 Patienten erstreckte sich das Screening auf vier oder mehr Gene (4 bei 43, 5 bei 16, 6 bei 21, 7 bei 13 und mehr als 7 bei 8 Patienten).

Insgesamt waren 369 Patienten auf Mutationen in *RAPSN* (213 gezielt, 156 ganzes Gen), 337 auf *CHRNE* (110 gezielt, 127 ganzes Gen), 313 auf *DOK7* (244 gezielt, 69 ganzes Gen), 127 für *COLQ*, 80 auf *CHAT*, 77 auf *CHRNA1* (24 gezielte Analyse nur der Genregionen mit beschriebenen autosomal dominanten Mutationen, 53 ganzes Gen), 68 für *CHRNBI* (18 gezielte Analyse nur der Genregionen mit beschriebenen autosomal dominanten Mutationen, 50 ganzes Gen), 54 für *CHRND* (39 gezielte Analyse nur der Genregionen mit beschriebenen autosomal dominanten Mutationen, 15 ganzes Gen), 25 für *MUSK* und 39 Patienten für *GFPT1* getestet.

### 3. Erfasste Patientendaten

Um eine standardisierte Anamnese des Einzelpatienten zu ermöglichen und für die Studie wichtige Eckdaten erfassen zu können, war durch mehrere erfahrene genetische und pädiatrische Fachkollegen ein Fragebogen entwickelt worden, anhand dessen für die eingesandten Proben die wichtigsten familienanamnestischen und klinischen Informationen normiert abgefragt werden konnten (Erfassungsbogen CMS, siehe Anhang). Zusätzlich lagen, insbesondere für die Patienten aus ausländischen Zentren, medizinische Epikrisen und/oder ärztliche Befundberichte zu klinischer Symptomatik oder vorangegangenen Untersuchungen (z.B. Muskelbiopsie, Elektrophysiologie). Anhand dieser Daten wurde über den Ein- oder Ausschluss in das Kollektiv bzw. eine molekulargenetische Diagnostik im Rahmen des wissenschaftlichen Projekts entschieden.

Ältere Patientendaten, für die eine molekulargenetische Diagnostik abgeschlossen war, standen in anonymisierter Form für eine Auswertung zur Verfügung. Patientendaten, für die eine molekulargenetische Diagnostik noch nicht abgeschlossen war und für die eine Befundmitteilung durch den Patienten erwünscht war, lagen nicht anonymisiert vor, wurden jedoch für die elektronische Erfassung und Auswertung anonymisiert.

#### 3.1 Anonymisierte Patientenerfassung

Die folgenden Datenelemente wurden in einer Exceltabelle erfasst:

##### Mutationsstatus

**Nachweis einer pathogenen Mutation/kein Nachweis einer pathogenen Mutation**

*falls pathogene Mutation nachgewiesen*

Name der Gens und Mutationsbenennung

Untersuchte Gene ohne Mutationsnachweis

Familienanamnese**Vater betroffen:**

Ja/ Nein/ k.A.

**Mutter betroffen:**

Ja/ Nein/ k.A.

**Anzahl betroffener Geschwister:**

Anzahl/ k.A.

**Anzahl nicht betroffener Geschwister:**

Anzahl/ k.A.

**Consanguinität der Eltern:**

Ja /Nein / k.A.

**Ethnische Abstammung:** TextGeschichte**Schwangerschaftsverlauf**

Nachweis reduzierter intrauteriner Motilität des Feten

Geburtsverlauf

Arthrogryposis congenita multiplex

**Beginn der Symptome:**

anteperatal / bei Geburt/ 1. Lebensjahr / 2. Lebensjahr / 3.-6. Lebensjahr/ 7.- 10. Lebensjahr /  
 11.-20. Lebensjahr / 21.-30. Lebensjahr / 31.-40. Lebensjahr / 41.-50. Lebensjahr / > 50.  
 Lebensjahr / k.A.

**Alter bei Diagnosestellung****Motorische Entwicklung:**

normal/ verzögert / k.A.

**Laufalter:** bei Vorstellung zu jung zum Laufen /  $\leq$  12 Monate / 12-18 Monate / > 18  
 Monate / >24 Monate / nie / k.A.

**Kognitive Entwicklung:**

normal/betroffen/k.A.

**Erkrankungsverlauf** ( bei letzter Vorstellung und/oder im letzten Jahr )

stetig progressiv / zwischenzeitliche Verschlechterung mit völliger Remission /  
zwischenzeitliche Verschlechterung mit unvollständiger Remission / ohne Progression /  
komplette Remission / k.A.

**Änderung im Erkrankungsmuster während des Verlaufs im Unterschied zum aktuellen Status?**

Ja/ Nein / k.A

- wenn Ja kurze Beschreibung (Text).

**Exazerbationen**

Nein / Ja, mit plötzlicher schwerer Erkrankung (Muskelschwäche) / Ja, mit plötzlicher  
schwerer Erkrankung (Muskelschwäche) und respiratorischen Insuffizienzen / Ja, mit  
ausschließlich plötzlichen respiratorischen Insuffizienzen / k.A.

- falls Ja :- kurze Beschreibung der Merkmale (Text)

- Alter bei Beginn der Krisen und Häufigkeit der Krisen

Muskelbiopsie**Muskelbiopsie**

Durchgeführt / nicht durchgeführt / k.A.

*falls durchgeführt*

Ergebnis:

Normal / unspezifische Veränderungen / Typ I Prädominanz, Typ II Atrophie /  
neuropathische Veränderungen / Lipidose / tubuläre Aggregate / andere Veränderungen

- wenn Ja : kurzer Text / k.A

Faser Typisierung

Core

Core ähnliche Bereiche

Klinische Symptome (bei letzter Vorstellung)**Art der muskulären Schwäche :**

belastungsabhängig / permanent / tageszeitenabhängig / k.A.

Schwere der Erkrankung:

mild / moderat / schwer / k.A.

**Motorische Einschränkungen**

keine Einschränkungen / leichte Einschränkungen / auf den Rollstuhl angewiesen

**Verteilung der Paresen:**

generalisiert / einzelne Muskelgruppen / k.A.

- falls Nennung einzelne Muskelgruppen:

nur Ptose / nur Ptose und Ophtalmoparese / nur distale Muskeln / Gliedergürtel-

Phänotyp

**Betroffene Muskelgruppen :**

Ptose // extraokuläre Muskeln // mimische Schwäche // nasale Sprache // Schluckschwierigkeiten // Kau Schwierigkeiten // distale Extremitäten // proximale Extremitäten // k.A.

**Spezifische Phänotypische Merkmale:**

Scapula alatae // Watschelgang // Skoliose // Kontrakturen // Muskelatrophie // Dysmorphien // cognitive Beeinträchtigung // verzögerter Pupillenreflex // Ataxie // plötzliche Apnoen, chronische respiratorische Insuffizienzen // assistierte Beatmung // Tracheostomie // Doppelbilder // Andere / genaue Beschreibung

Elektrophysiologie**EMG:**

nicht durchgeführt / normal / myopathische Veränderungen / neuropathische Veränderungen / k.A.

**NLG:**

Nicht durchgeführt / normal / axonal / Demyelisierung / k.A:

Repetitive Stimulation:

nicht durchgeführt // distale und proximale Muskeln // nur distale Muskeln // nur proximale Muskeln // Gesichtsmuskulatur // k.A.

**Ergebnis der repetitiven Stimulation:**

pathologisches Dekrement / kein Dekrement / k.A.

- bei Angabe eines pathologischen Dekrements, Angabe des Prozentwerts:

Text

Laborchemie:**Creatinkinase:**

normal / leicht erhöht / signifikant erhöht / k.A:

**Autoantikörper (AChR):**

normal / erhöht / k.A.

**Autoantikörper (MUSK):**

normal / erhöht / k.A.

**Autoantikörper (andere):**

normal / erhöht / k.A:

*falls erhöht*, genauere Spezifizierung:

Text

**Gen** – negative Ergebnisse – Aufzählung aller negativen Nachweise der Liste



Genetik

**Gen** – Auswahl des betroffenen Gens aus der Vorlage

**Mutation Allel 1** – Auflistung der DNA / Protein Mutation

**Mutation Allel 2** – ebenso

Therapie

**Ansprechen auf AChE- Hemmer** (intravenös):

nicht versucht / kein oder kein sicherer Effekt / Zunahme der Symptome / k.A.

**Ansprechen auf AChE- Hemmer** (oral) :

nicht versucht / kein oder kein sicherer Effekt / Zunahme der Symptome / k.A.

Wenn Ja, genauere Angaben (Substanz, Dosierung, Ansprechen): Text

**Andere Therapien / Versuch:**

keine anderen Therapieversuche // Ja, immunsuppressive Therapie // Ja, 3,4-Diaminopyridin

// Ja, Ephedrin // Ja, Fluoxetin // Ja, Quinidin // Ja, andere

Salbutamol // Ja

Effekte :

Zusätzliche Angaben:

klinisches Follow-up, klinischer Verlauf, Ansprechen auf Therapie

Untersuchung**Untersucher**

Abkürzungen:

/ Auswahl auf ein Kriterium beschränkt

// Mehrfachnennung möglich

k.A. keine Angabe

R rechts

L links

#### 4. Auswertung unter Zuhilfenahme des Fisher-Tests für kleine Stichproben

Da die CMS eine seltene Erkrankung ist, ergab sich bei der Auswertung die Schwierigkeit verlässliche Signifikanzen auch bei kleinen Trefferquoten nachzuweisen.

Hierfür benützen wir den Exakten Fisher Test (Ronald Aylmer Fisher 1890-1962, brit. Mathematiker), dieser ist ein Signifikanztest auf die Unabhängigkeit in einer Kontingenztafel, welche nur eine geringe Anzahl von Beobachtungen enthält. Als Weiterentwicklung des Chi-Quadrat- Tests, für den die eine Beobachtungszahl von mindestens 5 beobachtete Treffern pro Tafelfeld nötig ist, liefert der Fisher Test auch bei niedriger Anzahl zuverlässige Resultate.

##### 4.1 Definition des Fisher-Test

Beispiel : Mutationsträger (M)/Pat. ohne Mutation (oM), Ptose (Pt)/ keine Ptose (kPt)

Tabelle 2, Signifikanz einer Ptose für den Nachweis einer Mutation

	<b>M</b>	<b>oM</b>	
<b>Pt</b>	<b>230(a)</b>	<b>272(b)</b>	502
<b>kPt</b>	<b>69(c)</b>	<b>109(d)</b>	178
	299	381	680(n)

Fischer zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit eine solche Verteilung zu erhalten durch die sogenannte hypergeometrische Verteilung erfolgt.

$$p = \frac{\binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c}}{\binom{n}{a+c}} = \frac{(a+b)!(c+d)!}{a!b!c!d!n!} \cdot \frac{a!c!}{(a+c)!(b+d)!}$$

(R.A. Fisher, *Statistical Methods for Research Workers* 1925)

n

hier steht  $k$  als binomialer Koeffizient.

Der Binomialkoeffizient gibt an, auf wie viele verschiedene Arten man  $k$  Objekte aus einer Menge von  $n$  verschiedenen Objekten ohne Zurücklegen oder Reihenfolge auswählen kann, hierdurch erhält man die Anzahl der  $k$ -elementigen Teilmengen einer  $n$ -elementigen Menge).

Das Zeichen  $!$  steht für die Fakultät (also  $4! = 4 \times 3 \times 2 \times 1$ )

Die obenstehende Formel beschreibt die exakte hypergeometrische Wahrscheinlichkeit genau diese Datenabfolge unter Einhaltung der Rahmensummen zu erhalten. Als Nullhypothese ( $N_0$ ) wird angenommen, dass es für den Nachweis einer Ptose keinen Unterschied macht, ob der Patient eine Mutation trägt oder nicht, die Alternativhypothese, die es zu beweisen oder zu widerlegen gilt, wäre dann  $N_1 =$  es macht einen Unterschied.

Geht man also davon aus, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Mutationsträger eine Ptose hat  $a$  ist, die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient ohne Mutation eine Ptose hat  $b$  ist, dass desweiteren beide mit Nachweis einer Ptose unabhängig davon, ob sie Mutationsträger oder nicht sind, in das Kollektiv aufgenommen wurden, so ergibt sich aus der hypergeometrischen Verteilung die Wahrscheinlichkeit, die tatsächlichen Treffer  $a$ ,  $b$ ,  $c$  und  $d$  für die vorgegebenen absoluten Rahmensummen (hier 299, 381, 502, 178, 680) in der Vierfeldertafel zu finden. Dies gilt auch dann, wenn man annimmt, dass Mutationsträger mit einer anderen Wahrscheinlichkeit, als Patienten ohne Mutation in unsere Erfassung aufgenommen wurden; wichtig ist nur, dass die Ereignisse Mutationsträger / Pat. ohne Mutation und Ptose/ keine Ptose nicht miteinander assoziiert sind.

Im obengenannten Fall wäre  $p = 0,113$  und somit die Nullhypothese  $N_0$  : eine Ptose ist nicht spezifisch für den Nachweis einer Mutation, angenommen und die Alternativhypothese,  $N_1$ : eine Ptose ist spezifisch für den Nachweis einer Mutation, grundsätzlich verworfen.

Fisher bewies, dass eine verlässliche Signifikanz dieser Annahme / Verwerfung allein dadurch erreicht wird, dass man die absoluten Rahmensummen (Reihen und Spaltensummen) der ursprünglichen Vierfeldertafel im Vergleich / der Kombination mit einer extremisierten Tabelle gleicher Rahmensummen betrachtet. (Tabelle 3)

Tabelle 3, extremisierte Tabelle für die Signifikanz des Nachweises einer Ptose

	<b>M</b>	<b>oM</b>	
<b>Pt</b>	<b>298</b>	<b>204</b>	<i>502</i>
<b>kPt</b>	<b>1</b>	<b>177</b>	<i>178</i>
	<i>299</i>	<i>381</i>	<i>680</i>

hier wäre  $p = 0,95$

Um die Signifikanz der erworbenen Daten, also die absolute Wahrscheinlichkeit, die Daten als aussagekräftig anzunehmen unter der Maßgabe, dass die Nullhypothese gilt, muss man beide Ergebnisse addieren.

Dies bezeichnet man als den sogenannten "one-tailed" Test.

Im Beispielfall wäre das  $p = 0,113 + P = 0,95$  wäre  $p = 1,6$

Je kleiner  $p$ , desto größer die Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese richtig zu verwerfen; im Beispielfall wäre die Nullhypothese und damit, dass es für das Symptom der Ptose keinen Unterschied macht, ob man Mutationsträger ist oder nicht, mit  $p = 1,6$  angenommen.

Für das Beispiel: Dekrement(D) oder kein Dekrement (kD) bei Mutationsnachweis (M) oder Fehlen dessen (oM)

bzw.  $N_0 =$  es macht für ein pathologischen Dekrementnachweis keinen Unterschied ob man eine nachgewiesene Mutation trägt oder nicht /  $N_1 =$  es macht einen Unterschied

Tabelle 4, Signifikanz des Nachweises eines pathologischen Dekrements

	<b>M</b>	<b>oM</b>	
<b>D</b>	<b>125</b>	<b>109</b>	<i>134</i>
<b>kD</b>	<b>27</b>	<b>126</b>	<i>153</i>
	<i>152</i>	<i>235</i>	<i>387</i>

wäre  $p < 0,0001$  und damit die Nullhypothese wiederlegt und  $N_1$  angenommen.

Die letzten Beispiele zeigten die Signifikanz für Symptome die in einer höheren Frequenz auftreten, gleiches gilt, im speziellen, für geringe Trefferquoten wie bei der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Skoliose (S) bei Mut./keiner Mut

Tabelle 5, Signifikanz des Nachweises einer Skoliose

	<b>M</b>	<b>oM</b>	
<b>S</b>	<b>10</b>	<b>38</b>	<i>48</i>
<b>kS</b>	<b>289</b>	<b>344</b>	<i>633</i>
	<i>299</i>	<i>381</i>	<i>680</i>

$p= 0.0008$  und damit mit hoher Signifikanz davon auszugehen, dass das Symptom der Skoliose ein Hinweis auf eine Mutation ist.

## E. ERGEBNISSE

### 1. Genetische Daten

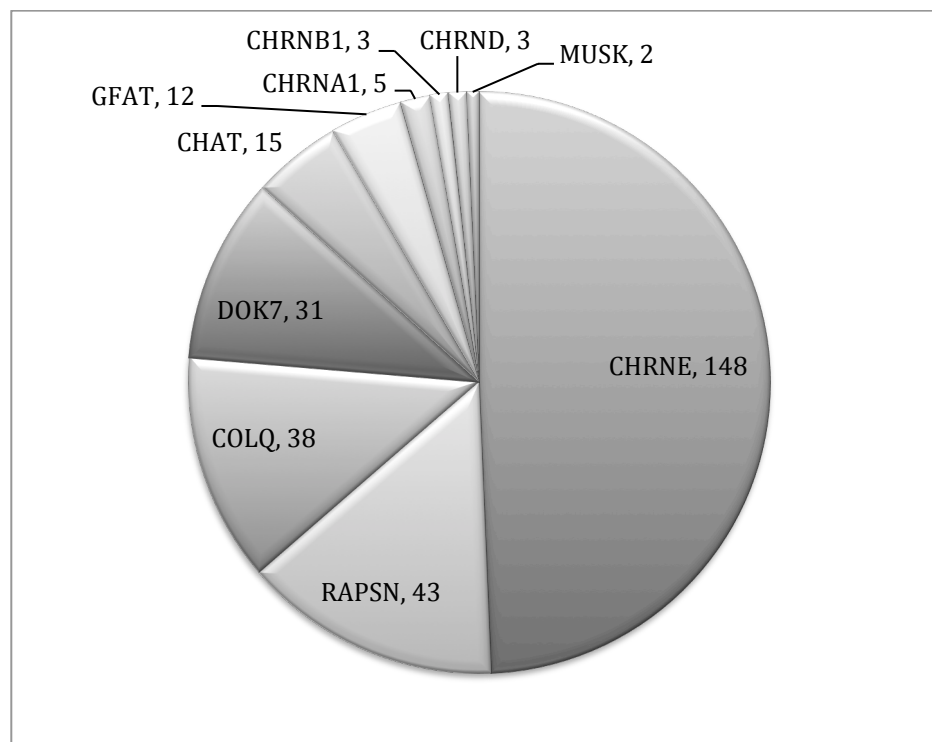
#### 1.1. Mutationsdetektionsrate und -verteilung

(Alle im Patientenkollektiv identifizierten Mutationen sind in Tabelle 1 A- 8 A im Anhang aufgeführt.)

Bei 299 von 680 Patienten des Kollektivs konnten pathogene Mutationen in 10 bekannten CMS-ursächlichen Genen nachgewiesen werden. (*CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRNE*, *CHRND*, *CHAT*, *COLQ*, *DOK7*, *RAPSN*, *MUSK* und *GFPT1*).

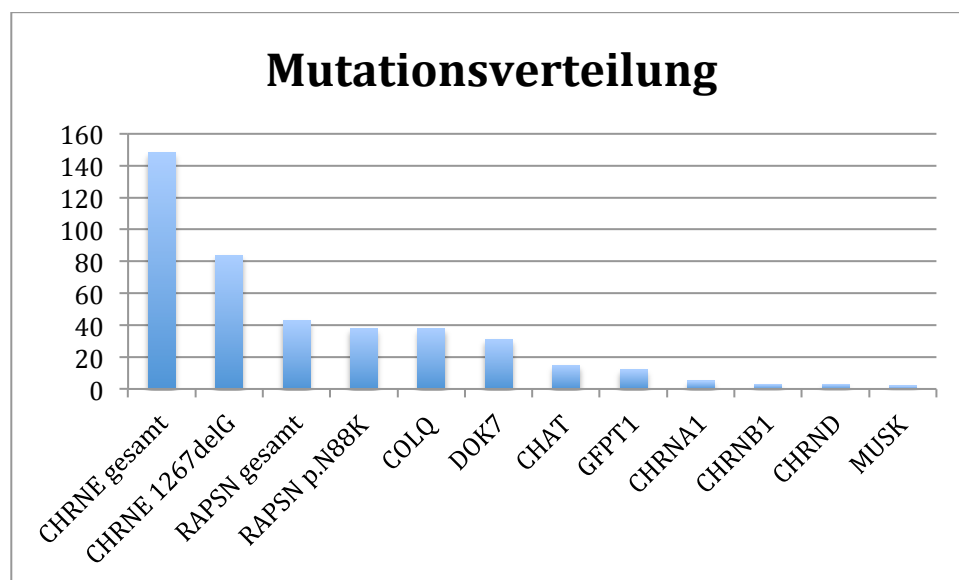
Mit einem Nachweis bei 148 Patienten (49% der 299 Patienten mit Mutationsnachweis) fanden sich die meisten Mutation im Gen *CHRNE*, kodierend für die epsilon-Untereinheit des ACh Rezeptors. In absteigender Häufigkeit folgten Mutationen in *RAPSN* mit 43 (14%), *COLQ* mit 38 (13%), *DOK7* mit 31 (10%), *CHAT* mit 15 (5%), *GFAT* mit 12 (4%), *CHRNA1* mit 5 (2%), *CHRN1* und *CHRND* mit jeweils 3 (1%) und *MUSK* mit 2 (1%) betroffenen Patienten. (Abb. 3)

Abbildung 3, Mutationsverteilung



Bei den Einzelnachweisen zeigte sich eine große Zahl der bekannten Foundermutationen für *CHRNE* p.1267delG und für *RAPSN* p.N88K. (siehe Diagramm 1)

Diagramm 1, Mutationsverteilung mit gesonderter Darstellung der Anteile der Foundermutationen p.1267delG und p.N88K an *CHRNE* und *RAPSN* gesamt



Es konnten keine pathogenen Genvarianten in den bei einer begrenzten Anzahl von Patienten getesteten Genen *VACHT* (17 getestete Patienten), *CNTNI* (3 Patienten) und *LRP4* (13 Patienten) nachgewiesen werden.

Eine Zusammenfassung der Verteilung der pathogenen Mutationen zeigt Tabelle 1 A

Die meisten gefundenen Mutationen waren „private“ Mutationen, also nur eine Familie betreffend, einige Mutationen konnten in mehreren Familien nachgewiesen werden, einzelne fanden sich wiederholt (>3x) in nicht verwandten Familien.

Eine Ausnahme stellte die Mutation c.1267delG im Gen *CHRNE* dar, die bei insgesamt 41 von insgesamt 48 erfassten Roma-stämmigen Patienten nachgewiesen wurde.

Insgesamt lag der anamnestisch erhobene Anteil der Romastämmigen am Gesamtkollektiv bei 7%.

Obwohl im Screening nicht jeder Patient auf alle bekannten CMS ursächlichen Gene getestet wurde, konnten in insgesamt 299 (44%) der Patienten Mutationen nachgewiesen werden. Bei einer Untergruppe von Patienten, die aus informativen Familien mit mehreren betroffenen oder /und nicht betroffenen Geschwistern stammten, war zusätzlich eine Haplotyp-Analyse

der bekannten CMS-Loci erfolgt. In dieser Untergruppe von 47 Patienten gelang ein Nachweis der ursächlichen Mutation durch eine nachfolgende Analyse in Frage kommender CMS-Gene bei 15 Patienten (32%).

Da nicht bei allen Patienten sämtliche CMS-Gene untersucht wurden, sind die Mutationsdetektionsraten für die einzelnen Gene bezogen auf das Gesamtkollektiv aller CMS-Patienten und bezogen auf die Anzahl der tatsächlich auf Mutationen im jeweiligen Gen untersuchten Patienten unterschiedlich (Tabelle 1). Die Mutationsdetektionsraten liegen für die meisten Gene bezogen auf die untersuchten Patienten deutlich höher als bezogen auf das Gesamtkollektiv.

Bei 277 der 680 Patienten des Kollektivs wurde jeweils nur ein einzelnes Gen sequenziert. Die entsprechenden Mutationsdetektionsraten sind in Tabelle 6 aufgeführt, ebenso für die Patienten, bei denen jeweils insgesamt zwei und jeweils insgesamt drei Gene untersucht wurden. (Tabelle 7)

Tabelle 6, Mutationsdetektionsrate

Gen	Anzahl Patienten mit Mutation	% aller Patienten	% aller Mutationen	Anzahl der Patienten, die auf Mutationen in diesem Gen getestet wurden	Mutationsnachweis in % der getesteten Patienten
<i>CHAT</i>	15	2%	5%	82	15/82 = 18%
<i>COLQ</i>	38	6%	12%	126	38/126 = 30%
<i>CHRNE</i>	148	22%	49%	350 *	148/350 = 42%
<i>CHRNA1</i>	5	<1%	1%	77**	5/77 = 6%
<i>CHRNB1</i>	3	<1%	1%	50**	3/50 = 6%
<i>CHRND</i>	3	<1%	1%	54**	3/54 = 6%
<i>RAPSN</i>	43	6%	15%	369***	43/369 (11%)
<i>DOK7</i>	31	5%	10%	373****	31/373 (8%)
<i>MUSK</i>	1	<1%	<1%	24	1/24 (4%)
<i>GFPT1</i>	12	2%	4%	39	12/39 (31%)
<i>Alle Gene</i>	299	44%	100%		

\**CHRNE*: gesamtes Gen bei 156 Patienten, gezielte Testung auf c.1267 delG bei 241 Patienten ;  
 \*\*nur Teilanalyse auf "slow-channel"-exons  
 \*\*\* *RAPSN*: ganzes Gen bei 156 Patienten, gezielte Testung auf p.N88K bei 213 ;  
 \*\*\*\**DOK7*: ganzes Gen bei 71 Patienten, gezielte Testung auf Exon 7 (c.1124\_1127dupTGCC) bei 302 Patienten



Tabelle 7, Mutationsdetektionsrate bei Einzelgentestung

Ausgewähltes Screening		Mutationsnachweis: Zahl getesteter Pat./ Zahl der Patienten mit Mut.	% Mutation positiv
<i>Einzelgen</i>	<i>Nur CHRNE</i>	136/120	88%
	<i>Nur RAPSN</i>	63/30	48%
	<i>Nur DOK7</i>	45/12	26%
	<i>Nur COLQ</i>	25/19	76%
	<i>Nur CHAT</i>	8/7	88%
<i>2 Gene</i>	<i>CHRNE/RAPSN:</i>	33/15	45%
<i>3 Gene</i>	<i>CHRNE/RAPSN/DOK7:</i>	46/8	17%

Neben sicher als pathogen bewerteten Mutationen wurden bei einzelnen Patienten auch genetische Varianten identifiziert, die nach derzeitigem Wissenstand nicht eindeutig als pathogene Mutation oder als Normvariante einzuordnen sind (Tabelle 1 A).

In den vier Genen (*CHRNA1*, *CHRNBI*, *CHRNE*, *CHRND*) die für die Untereinheiten des AChR kodieren, konnten bei insgesamt 159 Patienten Mutationen nachgewiesen werden. Dies macht mit 53% den größten Anteil an den gefundenen Mutationen aus. Hauptanteil tragen mit 148 (22% bezogen auf Gesamtkollektiv, 93% bezogen auf Mutationen des AChR) genetische Veränderungen im *CHRNE* Gen. Mutationen in den anderen die Untereinheiten kodierenden Gene wurden nur in 11 Fällen festgestellt, darunter 5 Mutationen im *CHRNA1* Gen (0,7%) und jeweils 3 für *CHRNBI* und *CHRND* (0,3%) (Abbildung 3)

Die insgesamt am häufigsten nachgewiesene Mutation ist mit insgesamt 84 (57% / 149, 28% / 299, 12% / 680) Nachweisen die als Roma-Foundermutation beschriebene Veränderung c.1267delG. Bei 41 (49%) der derart Betroffenen wurde anamnestisch eine ethnische Zugehörigkeit zu dieser Volksgruppe angegeben. Die meisten gefundenen Mutationen im *CHRNE* Gen waren autosomal rezessive loss-of-function Mutationen. Bei 4 Patienten wurden Mutationen identifiziert, die den autosomal rezessiven „fast-channel“ Mutationen zuzuordnen sind (P121L, A411P und N436del). Dominante Mutationen, welche die kinetischen Eigenschaften des AChR im Sinne eines „Slow-Channel“ Syndroms verändern, konnten in *CHRNE* nur in 2 Fällen nachgewiesen werden ( p.V259L und p.L269F ).

Im Gen *CHRNA1* wurden insgesamt vier autosomal dominante Mutationen identifiziert, die im Sinne eines „Slow-Channel- Syndroms“ zu verlängerten Kanalöffnungszeiten des

Rezeptors führen. Weiterhin wurden jeweils 3 Mutationen im Gen *CHRN1* bzw. *CHRN2* nachgewiesen (Tabelle 2A, 3A, 4A).

Zweithäufigste Ursache einer CMS ist mit 43 Fällen (15%) eine Mutation im *RAPSN* Gen. Hauptanteil der Mutationen bildet die bei 38 von 43 Patienten (und damit 90%) auf mindestens einem Allel nachgewiesenen Veränderung p.N88K.

## 2. Erfasste Merkmale im Gesamtkollektiv

Im Folgenden sind die erfassten Parameter zu Herkunft, Familienanamnese und klinischen Daten der Patienten hinsichtlich Häufigkeit im Gesamtkollektiv dargestellt. Das Auftreten einzelner Parameter in den beiden Gruppen der Patienten mit und ohne Mutationsnachweis wird jeweils vergleichend gegenübergestellt. Weiterhin wird das Auftreten einzelner Parameter mit dem jeweiligen Genotyp der Patienten mit Mutationsnachweis korreliert.

### 2.1 Herkunft

Die DNA-Proben und Patientendaten des Kollektivs wurden zum Teil von deutschen Zentren eingesandt, stammen vielfach aber aus internationalen neuromuskulären Zentren. Angaben zur ethnischen Abstammung der Patienten wurden in 665 Fällen gemacht (Tabelle 3). Den Hauptanteil des Kollektivs bilden mit 170 (davon in 53 Fällen nachgewiesene Mutationen) Fällen Patienten aus Deutschland. Die meisten anderen Patienten stammten aus anderen europäischen Ländern (insgesamt 511 Patienten aus Europa) oder es wurde unspezifisch die Angabe einer „kaukasischen“ Abstammung gemacht.

Tabelle 8, Mutationshäufigkeiten in der BRD (53 Patienten mit nachgewiesener Mutation von 170 Patienten des Kollektivs)

n = 53	<i>CHRNE</i>	<i>CHRNAI</i>	<i>CHRNBI</i>	<i>CHRND</i>	<i>RAPSN</i>	<i>CHAT</i>	<i>DOK7</i>	<i>COLQ</i>	<i>MUSK</i>	<i>GFAT</i>
31%	<i>gesamt</i> % / 148	<i>gesamt</i> % / 5	<i>gesamt</i> % / 3	<i>gesamt</i> % / 3	<i>gesamt</i> % / 43	<i>gesamt</i> % / 15	<i>gesamt</i> % / 31	<i>gesamt</i> % / 38	<i>gesamt</i> % / 2	<i>gesamt</i> % / 12
<b>BRD</b>	14 / 10%	2 / 40%	1 / 33%	1 / 33%	18 / 42%	1 / 7%	6 / 19%	7 / 18%	1 / 50%	2 / 17%

Jeweils eine geringere Anzahl oder auch nur einzelne Patienten gaben eine Abstammung aus außereuropäischen Ländern, darunter z.B. 5 Patienten aus der USA oder 3 aus Afrika (Verteilung siehe Tabelle 10 ). Relativ hoch ist der Anteil von Patienten aus dem südosteuropäischen Raum (n=101, 15 % des Gesamtkollektivs). Hier spielt insbesondere die besondere ethnische Gruppe der Roma-stämmigen Patienten eine Rolle (35 Roma Patienten von 101 insgesamt südosteuropäischen Patienten).

Tabelle 9, Abstammung

	Mutationsnachweis	ohne Mutation	
Süd-Ost Europa/ Roma	106 (57%)	79	185
andere Länder	193 (39%)	302	495
			680
			P < 0.0001

Hier zeigte sich, dass allein die Abstammung aus dem Südosteuropäischen Raum in Kombination mit der ethnischen Abstammung von der Volksgruppe der Roma eine hohe Signifikanz bezüglich eines Mutationsnachweises hat.

Und folgend wegen des hohen Anteils der Roma die Foundermutation c.1267delG den Hauptanteil der Mutationen die in dieser Subgruppe nachgewiesen werden konnten darstellt.

Diagramm 2, Mutationsnachweis für die Subgruppe der Süd-Ost-Europäer

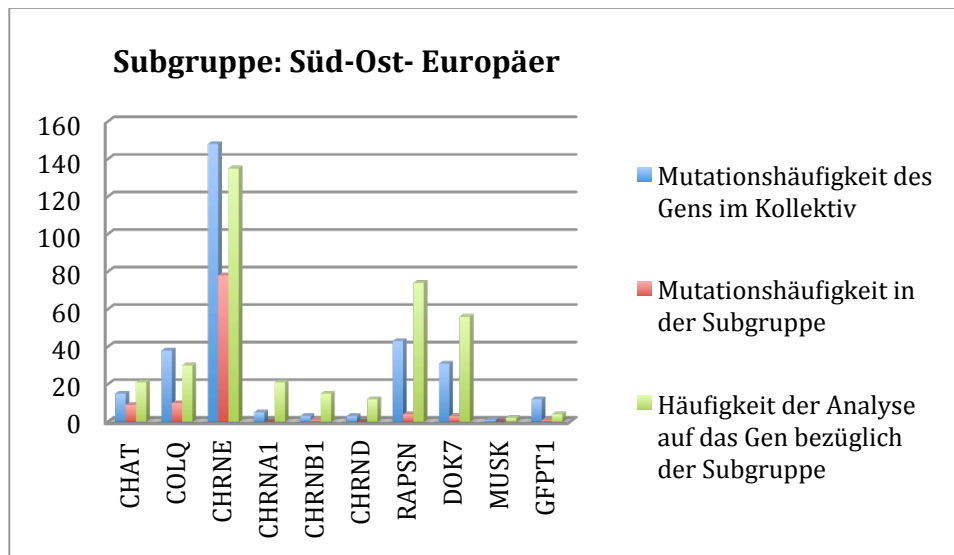


Tabelle 10 (modifizierte Tab.1), Länderverteilung, mit Einzelnennung der "Kaukasischen" Abstammung, n= 680

Deutschland	170	Algerien	8	Kanada	4	Irak	2
Spanien	58	UK	8	USA	4	Albanien	2
Türkei	47	Griechenland	7	Slowakei	3	Eritrea	1
Kaukasisch*	39	Israel	7	Libanon	3	Katar	1
Ungarn	36	Iran	7	Libyen	3	Ukraine	1
Serbien	34	Finnland	7	Belgien	3	Georgien	1
Italien	29	Schweden	5	Afrika	3	Sudan	1
Tschechei	24	Österreich	5	Asien	3	Persien	1
Portugal	22	Arabien	5	Polen	3	Guinea	1
Brasilien	20	Bulgarien	4	Luxemburg	2	Sri Lanka	1
Jordanien	19	Kosovo	4	Rumänien	2	Afghanistan	1
Kroatien	12	Norwegen	4	Pakistan	2	Australien	1
Chile	12	Indien	4	Syrien	2	Ägypten	1
Schweiz	8	Marokko	4	Russland	2	Bosnien	1

\*Anmerkung: Unter Kaukasisch verstand sich nach medizinischer Terminologie die "kaukasische Rasse" und bezeichnet nicht ganz Zeit- oder Ethikgemäß die "Weiße" Rasse. Diese Terminologie ist vor allem im Südeuropäischen und Englischsprachigen Raum noch verbreitet. Als kaukasisch wurden von den einsendenden Ärzten 22 spanische, 5 schwedische, 4 portugiesische, jeweils 2 italienische und tschechische, und jeweils 1 schweizer, serbischer und amerikanischer Patient eingeordnet. Der Form halber belieben wir die Patienten jedoch wie von den Einsendern eingeordnet.

## 2.2 Familienanamnese

Für 600 Patienten lagen sichere Angaben zur Familienanamnese vor.

Bei 133 der insgesamt 680 Patienten des Kollektivs (20%) wurde eine positive Familienanamnese angegeben:

- Basierend auf einer Übertragung der Mutation von einem betroffenen Elternteil auf ein betroffenes Kind ließ sich in 27 Fällen (4 %) eine autosomal dominante Vererbung vermuten.
- Bei insgesamt 82 Patienten (12%) wurde eine Erkrankung von mindestens einem Geschwisterkind angegeben, bei gleichzeitig gesunden Eltern hinweisend auf einen autosomal rezessiven Erbgang.
- Bei den restlichen 14 der 133 Patienten mit Angabe einer positiven Familienanamnese ließen die anamnestisch erhobenen Daten keinen eindeutigen Rückschluss auf den zugrundeliegenden Vererbungsmodus zu.

Eine positive Familienanamnese und die Angabe über betroffene Geschwister fand sich in der Gruppe der Patienten mit Mutationsnachweis signifikant häufiger, als in der Gruppe der Patienten ohne Mutationsnachweis:

- Bezogen auf die Anzahl von 600 Patienten des Gesamtkollektivs, für die sichere Angaben zur Familienanamnese vorlagen, war eine positive Familienanamnese bei 73 (11%) der Mutationsträger und bei 60 (9%) der Patienten ohne nachgewiesene Mutation angegeben (Tabelle 11).
- Bezogen auf das Gesamtkollektiv war die Angabe von mindestens einem erkrankten Geschwisterkind signifikant häufiger bei den Mutationsträgern zu finden (Tabelle 12).
- In der Gruppe der Patienten mit Mutationsnachweis waren insgesamt mehr betroffene Geschwisterkinder (Tabelle 13).

Tabelle 11, Positive Familienanamnese

Fisher Test	Mutationsnachweis	ohne Mutation	
positiv	83 (55%)	60	143
negativ	178 (31%)	289	467
	261	349	n 610 (sichere Angaben)
			P eq. 0.0007

Tabelle 12, Betroffene/erkrankte Geschwisterkinder

Fisher Test	Mutationsnachweis	ohne Mutation	
erkrankte Geschwisterkinder	53 (54%)	45	98
keine erkrankten Geschwisterkinder	236 (41%)	336	572
	299	381	n 680
			P eq. 0.0364

Tabelle 13, Erkrankte Geschwisterkinder

	1 Geschwisterkind	2 Geschwisterkinder	3 Geschwisterkinder	4 Geschwisterkinder
<b>Patienten mit Mutationsnachweis</b>	43	6	3	1
<b>Patienten ohne Mutationsnachweis</b>	39	5	1	

Betrachtet man die Gruppe der Patienten mit Mutationsnachweis, so waren die meisten betroffenen Geschwisterkinder in der Gruppe der Patienten mit Mutationen im Gen *CHRNE* zu finden (Tabelle 14).

Tabelle 14, Aufschlüsselung der Mutationsnachweise bei erkrankten Geschwisterkindern

	<i>CHRNE</i>	<i>COLQ</i>	<i>CHAT</i>	<i>GFAT1</i>	<i>RAPSN</i>	<i>DOK7</i>
<b>1 Kind</b>	17	8	2	4	6	6
<b>2 Kinder</b>	5					1
<b>3 Kinder</b>	2	1				
<b>4 Kinder</b>	1					

In der Fragebogen-basierten Erfassung wurde bei 31 Patienten ein verstorbene Geschwisterkind angegeben. Hier war nur die Angabe Ja / Nein möglich, nicht eine Angabe der Anzahl der verstorbenen Geschwisterkinder. Teilweise waren in den Familien aber sogar mehrere Geschwisterkinder verstorben, was der freien Anamnese am Anfangsteil des Fragebogens bzw. dem Schriftverkehr zwischen Ärzten und dem Friedrich-Baur-Institut zu entnehmen war. Insgesamt wurde damit anamnestisch von 41 verstorbenen Geschwisterkindern berichtet. Bei diesen verstorbenen Geschwistern lag retrospektiv eine

ähnliche Symptomatik vor wie bei dem betroffenen Indexpatienten der Familie, darunter aber auch 4 Fälle, in denen Geschwisterkinder unter der Diagnose eines Sudden Infant Death Syndrom (SIDS) verstorben waren. In zwei dieser Familie mit einem anamnestischen SIDS lag eine *COLQ*-Mutation beim Indexpatienten vor, bei den beiden anderen Familien gelang ein Mutationsnachweis nicht. Bei drei molekulargenetisch nicht gesicherten CMS-Patienten wurde über einen intrauterinen Fruchttod eines Geschwisterkindes berichtet. Insgesamt 18 der 30 verstorbenen Geschwisterkinder kamen aus Familien mit positivem Mutationsnachweis (*CHRNE* 6 (+6)\*, *COLQ* 4 (+2), *RAPSN* 4, *CHAT* 1, *DOK7* 1, *GFPT1* 1, *CHRND* 1 (+1)\*) (Tabelle 8). Die Mutationsdetektionsrate in den Familien, in denen über ein verstorbenes Geschwisterkind berichtet wird, ist signifikant höher als in den übrigen Familien. (Tabelle 16)

Tabelle 15, Verstorbene Geschwisterkinder, SIDS, IUFT

gesamt 40 /4/3	ohne Mutation /SIDS/IUFT	<i>CHRNE</i> /SIDS /IUFT	<i>COLQ</i> /SIDS	<i>RAPSN</i> /SIDS	<i>CHAT</i> /SIDS	<i>DOK7</i> /SIDS	<i>GFAT</i> /SIDS	<i>CHRND</i> /SIDS
Deutschland	1 /1/2		0/2	1				
Türkei	1	1		1				
Iran	2	1 (4)*	1					
Serbien	1	1		1				
Arabien			2					
Israel		1 (1)	1(2)*					
Kroatien	1/1							
Griechenland	1							
Algerien		1 (1)/0/1*						
Portugal								
Italien					1		1	
Ungarn						1		
Schweden								1 (1)*
Spanien	1			1				
Österreich	1							
Persien	1							
Libyen	1							
Syrien	1							
Brasilien	1(1)*							
Norwegen	0/0/1							
Albanien		1						

\*im Fragebogen war nur die Nennung verstorbenes Geschwisterkind ohne Angabe der Anzahl möglich, die Zahl in Klammern bezieht sich auf weitere verstorbene Geschwisterkinder.

Tabelle 16, Familien mit verstorbenen Geschwisterkindern

Fisher Test	Mutationsnachweis	ohne Mutation	
Familien mit verstorbenen Geschwisterkindern (CMS und SIDS)	31 (70%)	13	44
Familien ohne verstorbenen Geschwisterkinder	268 (42%)	368	636
	299	381	n 680
			P eq. 0.004

Eine Konsanguinität der Eltern wurde in 94 (14%) der Fälle angegeben.

- Darunter sind 44 Patienten (6%) mit und 50 Patienten (7%) ohne Mutationsnachweis. Der Anteil der Mutations-positiven Patienten liegt damit bei den Patienten aus den konsanguinen Familien nicht signifikant höher (Tabelle 17).
- Hauptanteil konsanguiner Patienten bildeten mit 20 Fällen Kinder aus der Türkei, gefolgt von Spanien (8), Algerien (7), Jordanien (6), Italien, Iran, Israel (jeweils 5), BRD (4), Arabien, Libyen (jeweils 3), Syrien, Libanon, Serbien (jeweils 2), die restlichen 18 Fälle verteilten sich einzeln.
- Unter den Patienten aus konsanguinen Familien entfielen die meisten nachgewiesenen Mutationen auf die Gene *CHRNE* und *COLQ* (Tabelle 18)

Tabelle 17, Konsanguinität

Fisher Test	Mutationsnachweis	ohne Mutation	
konsanguin	44 (47%)	50	94
nicht konsanguin	255 (66%)	331	386
	299	381	n 680
			P eq. 0.4156

Tabelle 18, Konsanguinität und Mutationsnachweis

Gen	Anzahl Pat. mit Mut.	% der Konsanguinen	% vom ges. Kollektiv
<i>CHRNE</i>	17	18 %	3 %
<i>CHRND</i>	1	1 %	0
<i>RAPSN</i>	1	1 %	0
<i>CHAT</i>	4	4 %	1 %
<i>COLQ</i>	15	16 %	2 %
<i>MUSK</i>	1	1 %	0



## 2.3 Klinische Daten

### 2.3.1 Erkrankungsbeginn

Bei 511 (75%) Patienten lagen genaue Angaben bezüglich des Auftretens erster Symptome vor (Tabelle 19). So fielen 31% der Patienten (n=213) bereits bei Geburt auf, darunter 57 Patienten (8%) die schon intrauterin eine reduzierte Beweglichkeit zeigten. Insgesamt lag das Maximum der Inzidenz mit 276 Nennungen im Zeitraum von der Geburt bis zur Vollendung des ersten Lebensjahrs.

Tabelle 19, Erkrankungsbeginn

Erkrankungsbeginn	Kollektiv	Pat. mit Mutationen	Pat. ohne Mutationen
Antepartal	57 / 8%	18 / 3%	39 / 6%
Bei Geburt	156 / 23%	66 / 10%	90 / 13%
1tes LJ	120 / 19%	58 / 9%	62 / 9%
2tes LJ	32 / 5%	9 / 1%	23 / 3%
3-6 LJ	56 / 8%	22 / 3%	34 / 5%
7-10 LJ	22 / 3%	9 / 1%	13 / 2%
11-20 LJ	27 / 4%	6 / 1%	21 / 3%
21-30 LJ	20 / 3%	5 / 1%	15 / 2%
31-50 LJ	19 / 3%	3 / < 1%	16 / 2%
> 50 LJ	2 / <1%		2 / <1%

Schlüsselt man die Mutationsträger nach Erstmanifestation der Symptome auf so fällt auf, dass Patienten mit Mutationen in *CHRNE*, *CHRNBI*, *CHRND*, *RAPSN* und *COLQ* eine gleichmäßige Verteilung entsprechend der Tabelle 20 zeigen, der Erkrankungsbeginn bei Mutationen in *CHRNA1*, *GFAT*, *DOK7* sowie *MUSK* jedoch eher in der späteren Kindheit sowie Adoleszenz liegt.

Ein früherer Erkrankungsbeginn korreliert statistisch signifikant mit dem Nachweis einer pathogenen Mutation ( $p=0,027$ ; Tabelle 21).

Tabelle 20, Erkrankungsbeginn nach Mutationen, und in Prozent nach Häufigkeit/Mutation

	<i>CHRNE</i> %/148	<i>CHRNA1</i> %/5	<i>CHRNBI</i> %/3	<i>CHRND</i> %/3	<i>RAPSN</i> %/43	<i>CHAT</i> %/15	<i>DOK7</i> %/31	<i>COLQ</i> %/38	<i>MUSK</i> %/2	<i>GFAT</i> %/12
<b>anteperatal</b>	3 / 2%	0	2 / 67%	0	9 / 21%	2 / 13%	2 / 6%	4 / 11%	0	0
<b>Geburt</b>	22 / 15 %	0	0	2 / 67%	13 / 30%	6 / 40%	4 / 13%	15 / 39%	0	0
<b>1 LJ</b>	32 / 22%	0	0	0	4 / 9%	6 / 40%	5 / 16%	9 / 24%	0	2 / 17%
<b>2 LJ</b>	2 / 1%	0	0	1 / 33%	0	1 / 7%	2 / 6%	3 / 8%	0	0
<b>3-6 LJ</b>	4 / 3%	1 / 20%	0	0	2 / 5%	0	8 / 26%	5 / 13%	0	2 / 17%
<b>7-10 LJ</b>	1 / 1%	0	0	0	1 / 2%	0	2 / 6%	1 / 3%	0	4 / 33%
<b>11-20 LJ</b>	0	0	0	0	0	0	3 / 10%	0	1 / 50%	3 / 25%
<b>21-30 LJ</b>	0	1 / 20%	1 / 33%	0	1 / 2%	0	2 / 6%	0	0	0
<b>31-50 LJ</b>	0	3 / 60%	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>&gt;50 LJ</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 21, Alter bei Erkrankungsbeginn

Fisher-Test	Mutation	ohne Mutation	
0-1-2 LJ	151 (41%)	214	365
3 LJ und >3L	45 (31%)	101	146
	196	315	n 511
			P eq. 0,0272

Bei insgesamt 215 der aufgenommenen Patienten war anamnestisch eine verzögerte motorische Entwicklung beobachtet worden. Davon bei 79 Patienten bei denen eine Mutation nachgewiesen wurde. Mit einem P-Wert von  $p \text{ eq. } 0,01$  (siehe Tabelle 22) ergibt sich für dieses Merkmal also eine hohe statistische Signifikanz für den Nachweis einer Mutation.

Das angegebene Erstlaufalter lag mit  $\leq 12 - 18$  Monaten bei 113 (davon 28 Patienten mit nachgewiesener Mutation) Patienten in der Norm, nur 10 (3 m. Mut.) Patienten erlernten das Laufen nie, 57 (22 m. Mut.) waren bei Laufbeginn älter als 18 Monate. Auch hierfür ergibt sich im Vergleich mit einem P - Wert von  $p \text{ eq. } 0.001$  ( siehe Tabelle 23) eine höchstsignifikante Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Mutation

Tabelle 22, Verzögerte motorische Entwicklung

Fisher-Test	Mutation	ohne Mutation	
verzögerte motorische Entwicklung	79 (37%)	136	215
normale motorische Entwicklung	220 (47%)	245	465
	299	381	n 680
			P eq. 0,0101

Tabelle 23, Verzögertes Laufalter

Fisher-Test	Mutation	ohne Mutation	
normales Laufalter	28 (25%)	85	113
verzögertes Laufalter	271 (48%)	296	567
	299	381	n 680
			P eq. 0,0001

### 2.3.2 Infektexazerbation

In 501 Fällen (180 Mutationsträger/ 321 ohne nachgewiesene Mutation) wurden Angaben über Verschlechterungen der Symptome bei Infekt, Fieber oder Stress gemacht (Tabelle 24).

- Hiervon im einzelnen 281 (75/206) die keine Zunahme der Symptome beschrieben, 68 (23/45) mit verstärkten Symptomen, 142 (73/69) mit zusätzlicher respiratorischer Beteiligung und 10 (9/1) mit ausschließlich auftretenden respiratorischen Krisen.
- Die Angabe einer krisenhaften Verschlechterung korrelierte signifikant mit einem positiven Mutationsnachweis (Tabelle 25).
- Die Verteilung der identifizierten Mutationen auf die einzelnen Gene und die jeweilige Mutationsdetektionsrate stellt Diagramm 3 in der Gruppe der Patienten mit einer krisenhaften Verschlechterung der Symptomatik dar.

Tabelle 24 , Krisenhafte Verschlechterungen bei Fieber, Infekt, Stress (keine Nennung für *MUSK*)

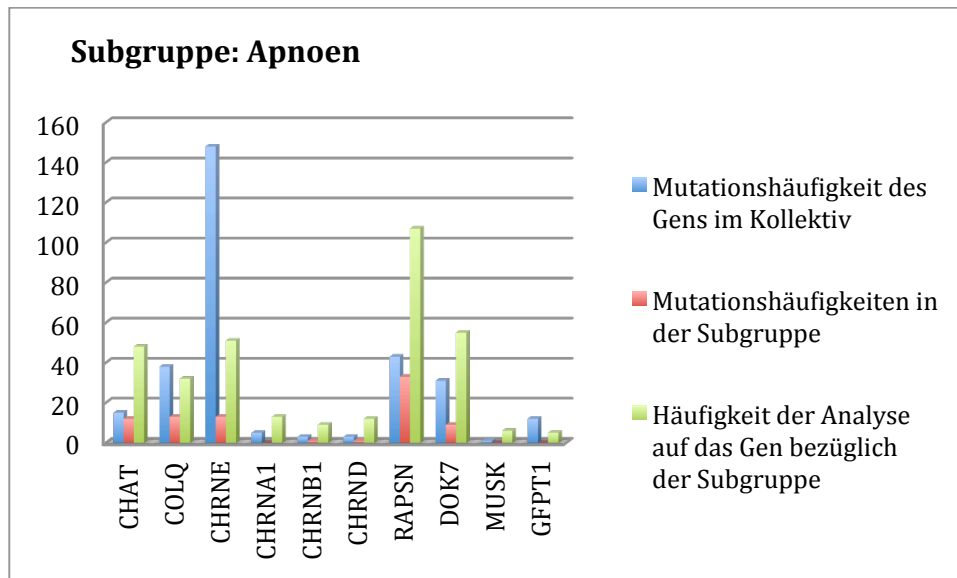
Krisenhafte Verschlechterungen	o. Mut. %/381	<i>CHRNE</i> %/148	<i>RAPSN</i> %/43	<i>COLQ</i> %/38	<i>DOK7</i> %/31	<i>CHAT</i> %/15	<i>GFPT1</i> %/12	<i>CHRNA1</i> %/5	<i>CHRN1</i> %/3	<i>CHRND</i> %/3
ausschließlich Verschlechterung	45 12%	3 2%	5 12%	5 13%	4 13%		3 25%	3 60%		1 33%
zusätzlich respiratorische Schwäche	69 18%	13 9%	27 63%	12 32%	8 26%	12 80%				
ausschließlich respiratorische Schwäche	1 0%		6 14%	1 6%	2 6%				1 33%	

Tabelle 25 , Krisenhafte Verschlechterung:

	Mutations nachweis	kein Mutationsnachweis	
Krisenhafte Verschlechterung	105 (88%)	115	120
keine Verschlechterung	75 (41%)	206	181
	180	321	n 501
			P < 0.0001

Die Angaben über die krisenhaften Verschlechterungen enthielten wie in Tabelle 24 aufgelistet einen Anteil an Patienten bei denen respiratorische Insuffizienzen beschrieben wurden. Diese Insuffizienzen wurden als Subgruppenmerkmal "plötzliche Apnoen" zusammengefasst, unabhängig davon ob sie in Kombination mit allgemeiner Symptomzunahme auftraten. Hierbei konnte sehr schön der hohe Anteil der Nachweise für die Mutationen der Chromosome *CHAT* und *RAPSN* gezeigt werden.

Diagramm 3, Mutationsnachweis für die Subgruppe der Patienten mit Apnoen



### 2.3.3 Klinische Symptome

Die betreuenden Kliniker waren aufgefordert, die Schwere der klinischen Symptomatik als „mild“, „moderat“ oder „schwer“ einzustufen. Tabelle 26 gibt die Verteilung der Schweregrade in der Gruppe der Patienten mit Mutationsnachweis bezogen auf die jeweils identifizierten ursächlichen Gene wieder.

Insgesamt waren 20 einzelne klinische Symptome abgefragt. Tabelle 27 zeigt die Verteilung in der Gruppe der mutationspositiven Patienten bezogen auf das jeweils ursächliche CMS-Gen.

Tabelle 26, Schwere der Symptome

Schwere Symptome	der	o. Mut. %/381	<i>CHRNE</i> %/148	<i>RAPSN</i> %/43	<i>COLQ</i> %/38	<i>DOK7</i> %/31	<i>CHAT</i> %/15	<i>GFPT1</i> %/12	<i>CHRNA1</i> %/5	<i>CHRNB1</i> %/3	<i>CHRND</i> %/3	<i>Musk</i> %/3
Mild		121 32%	16 11%	5 12%	2 5%	2 6%	1 7%	2 17%	1 20%			
Moderat		155 41%	19 13%	12 28%	21 55%	10 32%	5 33%	6 50%	2 40%	1 33%	2 67%	1 33%
Schwer		65 17%	6 4%	6 14%	11 29%	15 48%	5 33%	1 8%	2 40%	1 33%	1 33%	

Tabelle 27, Symptome

	<b>o. Mut.</b> %/381	<b>CHRNE</b> %/148	<b>RAPSN</b> %/43	<b>COLQ</b> %/38	<b>DOK7</b> %/31	<b>CHAT</b> %/15	<b>GFPT1</b> %/12	<b>CHRNA1</b> %/5	<b>CHRN1</b> %/3	<b>CHRN2</b> %/3	<b>MUSK</b> %/2
PTOSE	272 71%	132 89%	29 67%	27 71%	16 52%	15 100%	2 17%	3 60%	3 100%	2 67%	2 100%
EXTRAOC. MUSKELN	116 30%	124 84%	10 23%	17 45%	7 23%	1 7%	1 8%	1 20%	2 67%	0	0
FAZIALE SCHWÄCHE	119 31%	17 11%	19 44%	16 42%	15 48%	3 20%	3 25%	1 20%	0	2 67%	1 50%
NASALE SPRACHE	57 15%	15 10%	7 16%	9 24%	11 35%	2 13%	0	0	1 33%	1 33%	1 50%
SCHLUCK SCHWÄCHE	98 26%	14 9%	18 42%	9 24%	11 35%	5 33%	0	1 20%	2 67%	1 33%	0
KAU SCHWÄCHE	49 13%	10 7%	8 19%	7 18%	9 29%	4 27%	1 8%	1 20%	2 67%	1 33%	1 50%
DISTALE MUSKELN	116 30%	5 3%	5 12%	13 34%	9 29%	4 27%	2 17%	4 80%	1 33%	0	0
PROXIMALE MUSKELN	195 51%	32 22%	8 19%	32 84%	27 87%	5 33%	9 75%	4 80%	2 67%	1 33%	1 50%
SCAPULA ALATAE	38 10%	2 1%	0	6 16%	9 29%	1 7%	4 33%	0	1 33%	0	0
GANG ANOMALIE	43 11%	7 5%	0	7 18%	12 39%	3 20%	5 42%	2 40%	0	0	1 50%
SKOLIOSE	38 10%	2 1%	1 2%	5 13%	0	1 7%	0	0	0	1 33%	0
KONTRAKTUR	18 5%	1 1%	7 16%	0	9 29%	0	0	0	1 33%	1 33%	0
MUSKULÄRE ATROPHIE	58 15%	3 2%	1 2%	8 21%	1 3%	3 20%	0	0	2 67%	1 33%	0
DYSMORPHES AUSSEHEN	21 6%	0	0	0	0	1 7%	0	0	0	0	0
KOGNITIVE SCHWÄCHE	7 2%	0	0	2 5%	0	1 7%	0	0	0	0	0
VERMINDERTER PUPILLENREFL.	9 2%	1 1%	1 2%	5 13%	0	1 7%	0	0	0	0	0
ATAXIE	2 1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EPILEPSIE	2 1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BEATMUNGS PFLICHT	30 8%	3 2%	5 12%	6 16%	6 19%	7 47%	1 8%	0	0	0	0
TRACHEOTOMIE	5 1%	1 1%	0	0	2 6%	1 7%	0	0	0	0	0

Hauptgenanntes Symptom war in beiden Gruppen (Mutationsträger / Patienten ohne Mutationsnachweis mit insgesamt 502 (74%) Nennungen die Ptose (230/272).

- Im Hinblick auf einen häufigeren Mutationsnachweis bei Nennung einer Ptose als Einzelmerkmal ergibt sich keine Signifikanz (Tabelle 28),
- in Verbindung mit dem für 279 (41%) Fälle am zweithäufigsten genannten Merkmal der Ophthalmoparese allerdings schon (Tabelle 29).
- Diagramme 4 und 5 zeigen die jeweilige Mutationsverteilung auf die einzelnen Gene in der Subgruppe der Patienten mit jeweils einer Ptose bzw. einer Ptose und Ophthalmoparese. In diesen beiden Subgruppen wurden jeweils besonders häufig Mutationen des Gens *CHRNE* nachgewiesen, gefolgt von einem deutlich selteneren Mutationsnachweis in den Genen *COLQ*, *RAPSN* und *DOK7*.

Tabelle 28, Ptose

	Mutations nachweis	kein Mutationsnachweis	
Nachweis Ptose	230 (46 %)	272	502
keine Ptose	69 (39%)	109	178
	299	381	680
			P eq.0,114

Tabelle 29, Ptose und Ophthalmoparese:

	Mutations nachweis	kein Mutationsnachweis	
Nachweis einer Ptose und Ophthalmoparese	152 (55 %)	123	275
kein Nachweis einer Ptose und Ophthalmoparese	147 (36%)	258	405
	299	381	680
			P < 0.0001

Diagramm 4, Mutationsnachweis für die Subgruppe der Patienten mit dem Symptom einer Ptose

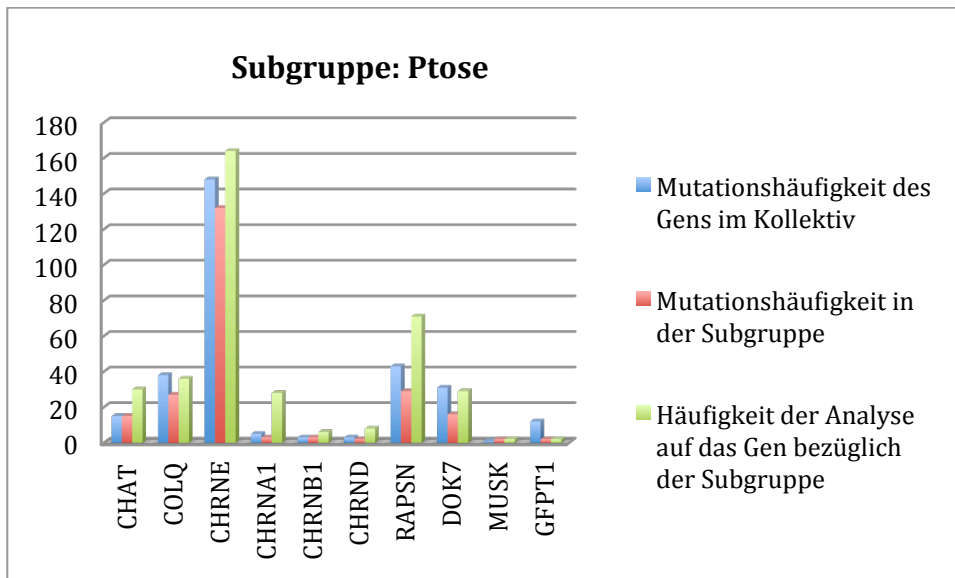


Diagramm 5, Mutationsnachweis für die Subgruppe der Patienten mit dem Symptom einer Ophthalmoparese

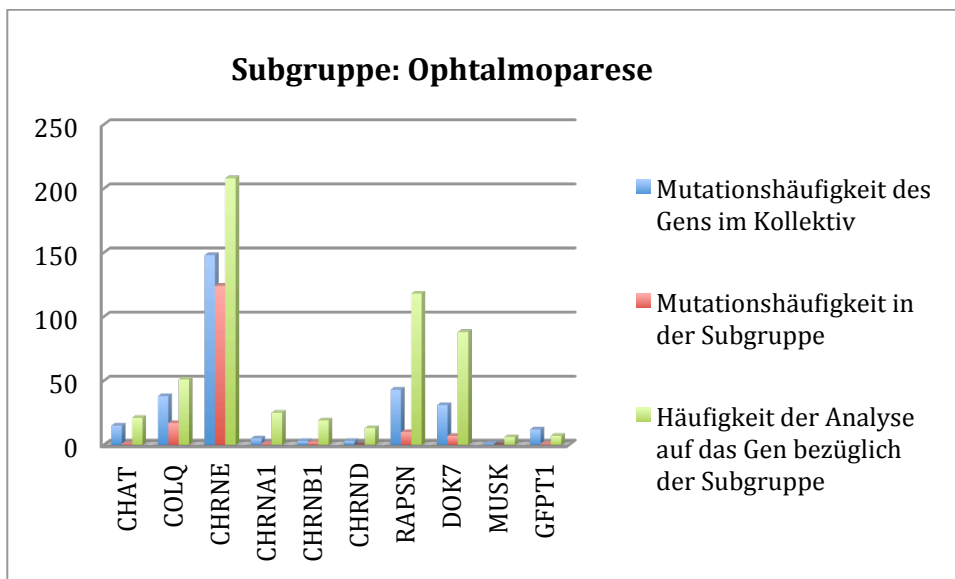
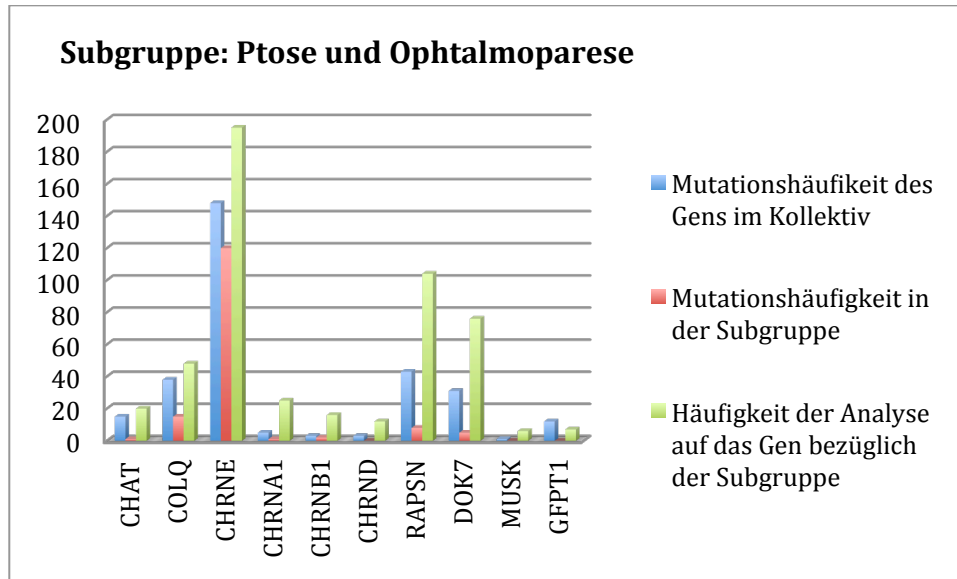




Diagramm 6, Mutationsnachweis für die Subgruppe der Patienten mit der Kombination der Symptome Ptose und Ophthalmoparese



Patienten, bei denen die okuläre Symptomatik (Ptose und Ophthalmoparese) isoliert bestand oder gegenüber anderen milden Symptomen deutlich im Vordergrund stand, wurden als Patienten mit vorherrschend okulärer Symptomatik klassifiziert (insgesamt 176 Patienten). Davon insgesamt 109 mit Ptose und Ophthalmoparese (86 Pat. m.Mut. / 23 o.Mut.) und 63 mit alleiniger Ptose ( 13 m.Mut. / 50 o. Mut.) sowie 4 mit alleiniger Ophthalmoparese (3 m.Mut./ 1 o.Mut.)

Tabelle 30, Vorherrschend okuläre Symptomatik

	Mutation	keine Mutation	
vorherrschend okuläre Symptomatik	102 (58%)	74	176
keine vorherrschende okuläre Symptomatik	197 (38%)	307	514
	299	381	680
			P < 0.0001

Eine Schwäche der fazialen Muskulatur wurde in insgesamt 195 Fällen angegeben, hier konnte keine erhöhte Signifikanz im Hinblick auf einen Mutationsnachweis nachgewiesen werden (Tabelle 31).

Bei 355 Patienten (151 Träger von Mutationen/ 204 ohne Mutationsnachweis) wurden bulbäre Symptome wie nasale Sprache, Kau- und Schluckschwäche berichtet. Auch hier ergab sich keine Signifikanz im Hinblick auf einen Mutationsnachweis (Tabelle 32).

Eine Schwäche der proximalen Muskulatur wurde in 316 (121 Patienten mit Mutation / 195 ohne Mutation) angegeben. Den Hauptanteil der Patienten mit Mutation trugen jene bei, die eine Mutation in *COLQ* (32) und *DOK7* (27) trugen. Auch hier konnte eine hohe Signifikanz bezüglich des Vorliegens einer Mutation nachgewiesen werden (siehe Tabelle 33)

Tabelle 31, Mimische Schwäche:

	Mutations nachweis	kein Mutationsnachweis	
mimische Schwäche	76 (39%)	119	195
keine mimische Schwäche	223 (46%)	262	485
	299	381	680
			P eq. 0,10

Tabelle 32, Bulbäre Symptome:

	Mutations nachweis	kein Mutationsnachweis	
bulbäre Schwäche	151 (43%)	204	355
keine Auffälligkeit	148 (46%)	176	325
	299	381	680
			P eq. 0.44

Tabelle 33, Proximale Muskelschwäche:

	Mutations nachweis	kein Mutationsnachweis	
proximale Muskelschwäche	121 (38%)	195	316
keine Auffälligkeit	178 (49%)	186	364
	299	381	680
			P eq. 0,0067

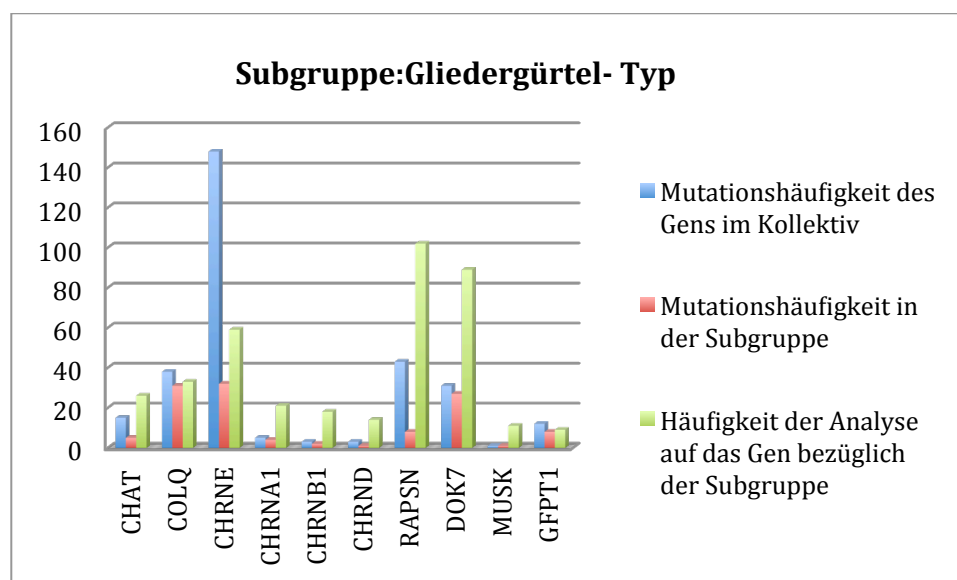
Eine den Gliedergürtel betreffende Symptomatik wurde bei 105 Patienten beobachtet, hierfür ergab sich in der Gesamtheit aber keine Signifikanz bezüglich des Vorliegens einer Mutation.

Tabelle 34, Gliedergürteltyp

	Mutationsnachweis	kein Mutationsnachweis	
Nachweis eines Gliedergürteltyps	45 (43%)	60	105
keine Nachweis	254 (44%)	321	575
	299	381	680
			P eq. 0.8

Betrachtet man jedoch die Untergruppen der Mutationsnachweise ergibt sich ein deutlich gehäuftes Auftreten dieses Phänotyps bei Patienten mit nachgewiesener Mutation in *DOK7*, *COLQ*, *MUSK* und *GFPT1*

Diagramm 7, Mutationsnachweis für die Subgruppe der Patienten mit den Gliedergürtel betreffenden Symptomen



### 2.3.4 Elektrophysiologie

Aussagekräftige Informationen lagen zu 387 (56%) von 535 Patienten vor, für die die Angabe einer durchgeführten repetitive Nervenstimulationen proximaler, distaler oder fazialer Muskelgruppen gemacht worden war.

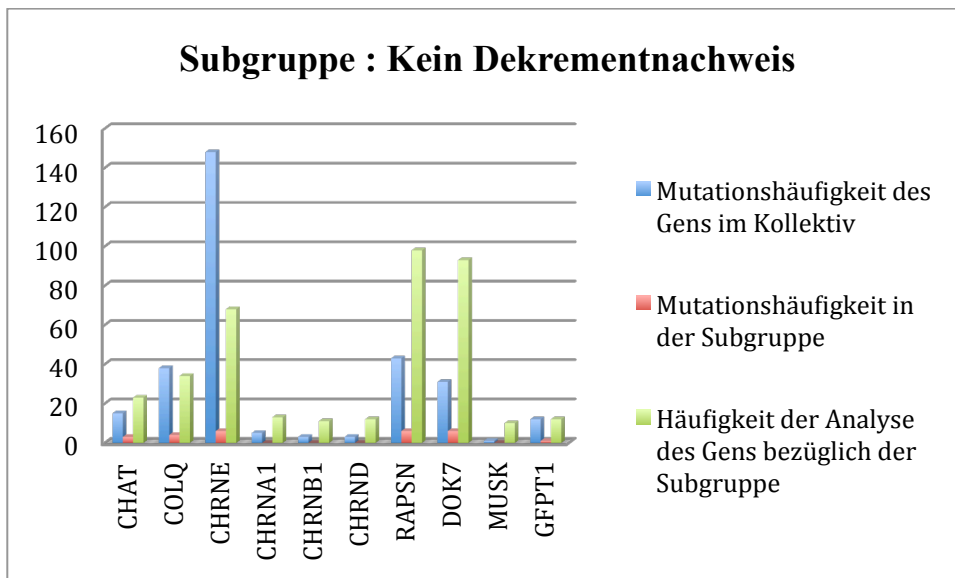
- Bei 234 von diesen war ein pathologisches Dekrement nachgewiesen worden, darunter 158 Patienten aus der Gruppe der Mutationsträger. Der Nachweis eines pathologischen Dekrements korrelierte statistisch signifikant mit einem positiven Mutationsnachweis ( $P < 0.0001$ ; Tabelle 35).

- Den größten prozentualen Anteil der Patienten mit Nachweis eines pathologischen Dekrements stellte mit 32 (84%) von 38 Fällen die Gruppe der Patienten mit Mutationen im *COLQ*-Gen dar.
- In der Subgruppe der Patienten ohne Nachweis eines pathologischen Dekrements entfielen die wenigen nachgewiesenen Mutationen relativ gleichmäßig auf unterschiedliche Gene (Diagramm 8)

Tabelle 35, Pathologisches Dekrement:

Fisher-Test	Mutationsnachweis	k. Mutationsnachweis	
pathologisches Dekrement nachgewiesen	125 (53%)	109	234
pathologisches Dekrement nicht nachgewiesen	27 (18%)	126	153
	152	235	387 (Angaben über Stim.)
			P < 0.0001

Diagramm 8, Mutationsnachweis für die Subgruppe der Patienten bei denen kein Dekrement nachgewiesen werden konnte



Das Ergebnis eines Elektromyogramms (EMG) lag für 284 Patienten (darunter 87 Patienten mit Mutation) vor. In 147 Patienten (32 mit Mutation) wurde dieses als unauffällig bewertet, bei 121 Patienten (50 mit Mutation) zeigten sich myopathische, bei 15 Patienten (5 mit Mutation) fraglich neuropathische Veränderungen.



### 2.3.6 Laborparameter

Bei insgesamt 45 Patienten wurde eine CK Erhöhung festgestellt, 11 davon Mutationsträger (insgesamt 4 mit einer Mutation in *GFPT1*, 2 bei Mutationen in *RAPSN* und *COLQ*, 1 *MUSK*, 1 *CHRNA1*, 1 *CHAT*). 287 Patienten wiesen eine normale CK auf (80 Mutationsträger). Autoantikörper gegen AChR waren in 6 Fällen erhöht (2 Mutationsträger, *DOK7 /CHRNE*), dokumentiert unauffällig waren sie bei 287 (74 Mutationsträger) Patienten.

### 2.3.7 Medikamentöse Therapie

Eine Therapie mit Acetylcholinesterasehemmern wurde in insgesamt 380 Fällen begonnen,

- bei 271 Patienten trat daraufhin eine Besserung der Symptome ein, davon 138 Patienten mit Genmutationen.
- Zu einer Verschlechterung der Symptomatik kam es bei 35 Patienten, davon 19 Mutationsträger (14 mit einer Mutation in *COLQ*, 4 mit einer Mutation in *DOK7* und 1 mit einer Mutation in *CHRNA1*).

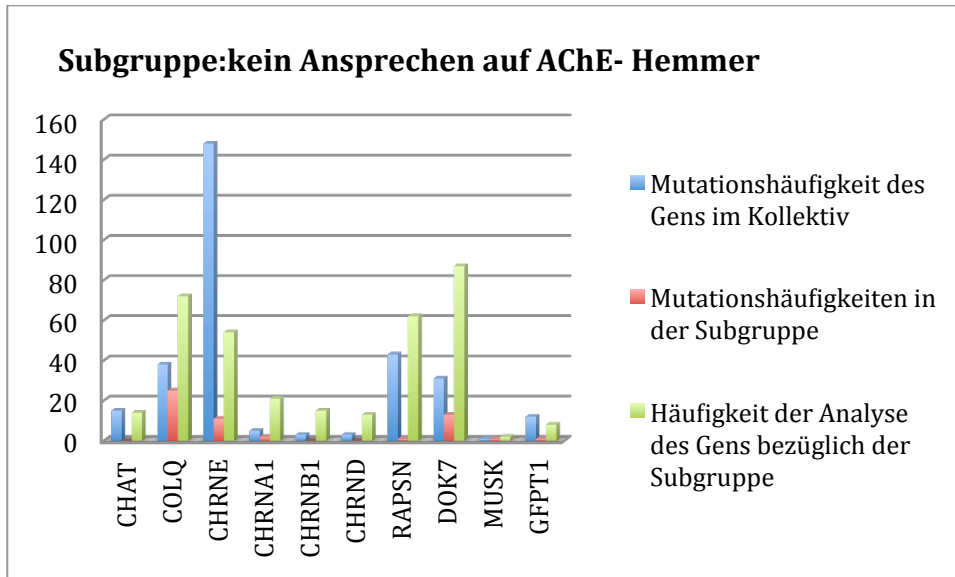
Vergleicht man die Gruppen mit und ohne Ansprechen auf eine AChE-inhibitorische Therapie, so ist die Mutationshäufigkeit in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 37).

Diagramm 9 zeigt, dass bei den Patienten ohne Ansprechen auf AChE-Inhibitoren die meisten Mutationen in *COLQ*, gefolgt von *DOK7* gefunden wurden. Bei insgesamt 11 Patienten wurden aber auch Mutationen im Gen *CHRNE* gefunden, darunter 1 Patient, mit einem vermutlichen Slow-Channel Syndrom. Weiterhin bei 3 Patienten in dieser Gruppe Mutationsnachweis in *CHRNA1*, hier handelt es sich um einen Patienten mit Slow-Channel Syndrom.

Tabelle 37, Ansprechen auf Acetylcholinesterasehemmer:

	Mutationsnachweis	ohne Mutation	
positives Ansprechen	138 (51%)	133	271
kein Ansprechen	56 (39%)	86	142
	194	219	413 (AChE-Hemmer getestet)
			P eq. 0.0294

Diagramm 9, Mutationsnachweis für die Subgruppe der Patienten die nicht auf eine Therapie mit AChE-Hemmern ansprechen



In 31 Fällen wurde der therapeutische Versuch einer medikamentösen Immunsuppression unternommen, in 10 Fällen (davon 8 Träger von Mutationen) zeigte sich hierauf eine Verbesserung der Symptomatik (2 Mutationsträger).

Die Gabe von Ephedrin war bei 4 vor Mutationsnachweis unternommenen Therapieversuchen in 2 Fällen erfolgreich, davon 1 Patient mit nachträglichem Mutationsnachweis.

Fluoxetin wurde bei 3 Fällen gegeben, es erbrachte nur bei einem Patienten, der Mutationsträger war, eine Verbesserung.

### 3. Genotyp-Phänotyp Korrelationen für einzelne Gene

Für die zahlenmäßig größten Gruppen der Patienten mit Mutationen in einzelnen Genen (Mutationen in *CHRNE*, *RAPSN*, *CHAT*, *DOK7* und *COLQ*) sind im folgenden die erfassten Merkmale und einzelne Korrelationen aufgeführt:

#### 3.1 Gen CHRNE

- Das Erkrankungsalter für Patienten mit einer Mutation in *CHRNE* lag in 39 % der angegebenen Fälle vor dem 2. Lebensjahr.
- In den 40 (27%) angegebenen Fällen hatten 25 (17%) eine normale motorische Entwicklung, 15 (10%) eine verzögerte Entwicklung, 20 gaben einen gleichbleibenden Verlauf der Erkrankung an.
- Über den Verlauf der Erkrankung bezüglich Verschlechterungen bei Infekten wurden nur in 16 Fällen Angaben gemacht, hier wurde in allen Fällen von einer extremen Verschlechterung der muskulären Symptome berichtet, bei 3 Patienten zusätzlich von respiratorischen Störungen.
- Hauptsymptom war mit 89% die Ptose, gefolgt von einer Ophthalmoparese, die in 84 % nachweisbar waren. Bulbäre Symptome wie Kau-, Schluck-, oder mimische Schwäche lagen in 37% der Fälle vor. In 22% waren die proximalen Extremitätenmuskeln betroffen.
- Die Symptome traten in 35 Fällen vor allem bei Belastung, in 11 Fällen permanent und in 7 Fällen tageszeitlich schwankend auf.
- Bezüglich der Abfrage der betroffenen Muskelgruppen wurden 85 Angaben gemacht, hier wurde in 72 Fällen von einem generalisierten und in 13 Fällen von einem einzelne Muskelgruppen betreffenden Befall berichtet.
- Bei 41 Patienten wurden Aussagen über die Schwere der Erkrankung gemacht, 16 mal wurde eine milde, 19 mal eine moderate und 6 mal eine schwere Verlaufsform angegeben.
- Ärztlicher Dauerbetreuung bedurften 29 von 41 Patienten, bei denen dazu Angaben gemacht wurden.
- Ein pathologischer Dekrementnachweis war in 49 von 55 elektrophysiologisch untersuchten Fällen möglich, im EMG fanden sich in 8 von 14 Fällen myopathische Veränderungen



Eine Muskelbiopsie wurde in 5 Fällen durchgeführt, 4 davon zeigten eine Typ II Atrophie, einer eine Typ I Atrophie

Für die Therapie ACHE- Hemmern lagen in 81 Fällen Angaben vor, hier erbrachte sie bei 70 Patienten eine Verbesserung der Erkrankung.

Da mit insgesamt 89 Patienten die Mutation 1267del G den Hauptanteil an den Mutationen in *CHRNE* ausmacht folgen eine Einzelaufschlüsselung der Symptome zum besseren Vergleich mit denen der anderen der Gruppe der in *CHRNE* nachgewiesenen Mutationen

Tabelle 38, Symptome bei Patienten mit Mutation c.1267delG in *CHRNE*

	Mutation c.1267delG n=89	<i>CHRNE</i> andere Mutationen n=59	Symptome	Mutation c.1267delG n=89	<i>CHRNE</i> andere Mutationen n=59
PTOSE	76 85%	56 95%	SKOLIOSE	2 2%	0
EXTRAOC. MUSKELN	70 79%	54 91%	KONTRAKTUR	1 1%	0
FAZIALE SCHWÄCHE	8 9%	9 15%	MUSKULÄRE ATROPHIE	2 2%	1 2%
NASALE SPRACHE	6 7%	9 15%	DYSMORPHES AUSSEHEN		0
SCHLUCK SCHWÄCHE	7 8%	7 12%	KOGNITIVE SCHWÄCHE		0
KAU SCHWÄCHE	4 4%	6 10%	VERMINDERTER PUPILLENREFL.	1 1%	0
DISTALE MUSKELN	4 4%	9 15%	ATAXIE		0
PROXIMALE MUSKELN	12 13%	20 34%	EPILEPSIE		0
SCAPULA ALATAE	1 1%	1 2%	BEATMUNGS PFLICHT		3 5%
GANG ANOMALIE	3 3%	4 7%	TRACHEOTOMIE		1 2%

Hier zeigte sich, dass Patienten mit der Mutation c.1267 delG eher milder betroffen waren als der Rest, kein Patient war Beatmungspflichtig und auch bulbäre Symptome waren weit seltener angegeben worden.

### 3.2 Gen *RAPSN*

Erstauftritt der Symptome lag wie bei den anderen Mutationen hauptsächlich vor dem zweiten Lebensjahr (26).

In 13 Fällen war die motorische Entwicklung verzögert, Angaben über das Laufalter lagen nur in 3 Fällen vor, hier einmal im ersten Lebensjahr, einmal im 2. Lebensjahr und einmal war das Kind bei Aufnahme ins Kollektiv noch zu klein zum Laufen.

Der Verlauf der Erkrankung wurde in einem Fall als progressiv, in 10 Fällen als gleichbleibend und in 2 Fällen als zwischenzeitlich deutlich verschlechtert aber dann wieder komplett remittiert beschrieben. Bei drei Kindern ging man von der Tendenz zu kompletten Remission aus.

Die Symptome lagen in 10 Fällen nur bei Betätigung, in 5 Fällen permanent und in 6 Fällen tageszeitlich schwankend vor.

Hauptsymptom war die Ptose (29 Fälle), gefolgt von der Nennung der fazialen Schwäche (19 Fälle). Bei 18 Patienten kam es zu Schluckbeschwerden, 8 hatten Probleme beim Kauen.

Phänotypisch fielen in 4 Fällen dysmorphe Stigmata wie hoher Gaumen oder verlängertes Gesicht auf.

7 der Kinder hatten Kontrakturen, in 4 Fällen wurde anamnestisch von einer Arthrogryposis multiplex berichtet.

Krisenhafte Verschlechterungen im Rahmen von Infekten, Fieber oder Stress traten bei 5 Patienten nur mit verstärkten myasthenen Syndromen, bei 6 Patienten nur mit Ateminsuffizienz und bei 27 Patienten mit beidem auf. Veränderungen in *RAPSN* bewirkten in 5 Fällen eine dauerhafte Beatmung.

23 Patienten wurden auf ein pathologisches Dekrement überprüft, bei 14 Patienten wurde der Nachweis erbracht, in 3 Fällen zeigte sich im EMG eine myopathische und im NLG in einem Fall eine axonale Veränderung.

Eine Muskelbiopsie wurde in 7 Fällen durchgeführt, hier zeigte sich in 3 Fällen eine Typ I Atrophie und jeweils in einem Fall eine Typ II Atrophie sowie einmal myopathische Veränderungen.

30 (70%) der Patienten brachte eine Therapie mit Acetylcholinesterasehemmern eine Besserung der Symptomatik.

### 3.3 Gen *COLQ*

Haupterkrankungsbeginn lag auch bei *COLQ* Mutationen vor allem in der frühen Kindheit 28 (74%) der 38 Patienten zeigten Symptome vor dem 2. Lebensjahr. Auffällig ist, dass weitere 9 Patienten zwischen dem 2. und dem 10. LJ erkrankt sind.

Insgesamt 23 zeigten eine krisenhafte Verschlechterung der myasthenen Syndrome bei Infekten, Fieber, Stress, 17 davon mit zusätzlicher Apnoe und Ateminsuffizienz, 6 der Patienten bedurften der dauerhaften assistierten Beatmung.

Der Erkrankungsverlauf war bei 11 Patienten mit stetiger Tendenz zur Verschlechterung. In 32 der 38 Fälle wurde ein insgesamt moderater oder schwerer Verlauf angegeben (21/11) was in 27 Fällen eine dauerhafte ärztliche Betreuung nötig machte.

Die motorische Entwicklung war bei 28 der Patienten verzögert, das Laufalter wurde in 21 Fällen angegeben, Hauptnennung war hier mit 8 Fällen das Laufalter >24 Monate (<12 Mo. 2, 12-18 Mo. 4, >18 Mo. 5), 2 Kinder waren bei Aufnahme zu klein zum Laufen. 5 der Patienten sitzen im Rollstuhl.

Bei 27 Patienten waren die Muskeln generalisiert betroffen, bei 4 vereinzelt.

Hauptsymptom war mit 32 Nennungen die proximale Muskelschwäche (84%), gefolgt von 27 Nennungen der Ptose (71%) und 17 der Ophtalmoparese (45%). Eine mimische Schwäche mit teilweiser Dysphonie und Speicheln wurde für 16 Patienten angegeben (42%). Bulbäre Symptome lagen in insgesamt 25 Fällen vor (nasale Sprache 9, Kau- und Schluckschwäche 9/7).

32 zeigten im CMAP ein pathologisches Dekrement, 15 im EMG myopathische und 2 neuronale Auffälligkeiten.

nur bei 5 war eine Therapie mit Esteraseinhibitoren erfolgreich, bei 14 kam es dadurch sogar zu einer Verschlechterung der Symptome, 12 zeigten keine Veränderung des Krankheitsverlaufs unter Therapie, für die fehlenden Fälle lagen keine Daten vor

### 3.4 Gen *DOK7*

Anders als bei den anderen Mutationen lag das Erstsymptomalter bei den *DOK7* Mutationsträgern breit gefächert durch alle erfragten Altersgruppen, mit einem Peak bei 3-6 Jahren (8 Patienten).

Eine Infektexazerbation mit plötzlicher Verschlechterung der Symptome gaben 4 Patienten an, 8 mit zusätzlichen respiratorischen Defiziten und 2 mit ausschließlich respiratorischen Defiziten ohne Verschlechterung der sonstigen Symptome.

14 gaben einen progredienten Verlauf der Erkrankung an.

Bei 10 Patienten war die motorische Entwicklung verzögert. Das durchschnittliche Lauflernalter war leicht erhöht (12 Angaben, davon 3 mit 12 Mo., 3 zwischen 12 und 18 Mo., 4 mit >18 Monaten und 2 >24 Monaten).

Die Symptome traten in 14 Fällen belastungsabhängig auf, bei 17 Patienten waren sie permanent und bei 4 Tageszeitenabhängig.

Auffällig war auch, dass sich die betroffenen Muskelgruppen auf den Schulter- wie Hüftbereich konzentrierten, die Nennungen „Watschelgang“ (12 Pat.) und „Abstehendes Schulterblatt“ (9 Pat.) wurden am häufigsten bei dieser Mutation genannt. Insgesamt zeigten sie also eher einen Gliedergürtelbefall.

Die häufigste Nennung war mit 27 Fällen die proximale Muskelschwäche, gefolgt von Ptose (16), mimischer Schwäche (15) und Beteiligung extraokulärer Muskeln (7).

Ein Drittel der Patienten litt an bulbären Symptomen (nasale Sprache 11= 35%, Schluckschwierigkeiten 11=35%, Kauschwierigkeiten 9=29%).

In 21 der Fälle war durch die Erkrankung eine dauerhafte medizinische Zuwendung nötig, 5 der Patienten waren auf den Rollstuhl angewiesen.

22 litten an einer generalisierten Muskelschwäche, bei 13 waren nur einzelne Muskeln betroffen.

Für Patienten mit Mutationen in *DOK7* liegen die meisten Angaben für Veränderungen im Muskel vor, da hier in 21 Fällen eine Biopsie durchgeführt wurde. 4 Mal ergaben sich unspezifische, 3 mal myopathische und 1 mal neuronale Veränderungen sowie 5 Mal Typ I Atrophien und 7 mal Typ II Atrophien.

Ein pathologisches Dekrement war bei 22 Patienten nachweisbar, 12 zeigten myopathische und einer neuronale Auffälligkeiten im EMG. Ein in 8 Fällen durchgeführtes NLG war in 2 Fällen axonal und einem myopathisch verändert.

Es kam nur bei 5 von 31 Patienten zu einer Besserung der Symptomatik durch Acetylcholinesterasehemmer in 4 Fällen verschlechterte sich der Zustand nach Gabe sogar.

### 3.5 Gen *CHAT*

Bei allen 15 Patienten mit Mutationen in *CHAT* kam es zu einem Erkrankungsbeginn bei Geburt oder früher Kindheit. Angaben über das Laufalter wurden nur in 6 Fällen gemacht, 2 Kinder erlernten das Laufen nie, 4 zwischen dem 1. und 2 Lebensjahr.

Im Gesamtverlauf stellt sich die Erkrankung bei Mutationsträgern in *CHAT* eher schwer dar, bei 13 der 15 Betroffenen kam es im Verlauf von Infekten zu schweren Exazerbationen mit respiratorischen Insuffizienzen, 7 der Patienten bedurften im tägliche Leben der assistierten Beatmung. Hauptsymptom hier war in 100% der Fälle die Ptose, gefolgt von bulbären Symptomen (14 Nennungen) und Schwächen der proximalen und distalen Muskelgruppen (9 Nennungen). Auch wurde in 20% der Fälle eine Muskelatrophie angegeben (in der Vergleichsgruppe der Pat. ohne Mutationsnachweis waren es 15%).

In 8 Fällen traten die Probleme vor allem bei Belastung, in 5 Fällen permanent auf.

Insgesamt 10 Patienten gaben einen moderaten oder schweren Verlauf der Erkrankung an (5/5). Dieses ist leider ein subjektives Kriterium, was sich daran ablesen lässt, dass insgesamt 3 Patienten auf den Rollstuhl angewiesen waren und 9 wenigstens dauerhafter ärztlicher Betreuung bedurften. 8 litten an generalisierten betroffenen Muskelgruppen, zusammen mit den oben erwähnten 13 Patienten bei denen es im Verlauf von Infekten zu respiratorischen Krisen kam, ist die Zahl der schwer Erkrankten objektiv sicher höher einzustufen.

Bei 10 Patienten konnte im cMAP ein pathologisches Dekrement beobachtet werden, bei 3 myopathische Veränderungen im EMG.

Die Therapie mit Esteraseinhibitoren war in 13 Fällen erfolgreich, für 2 Fälle lagen dazu keine Daten vor.

## F. DISKUSSION

Nicht zuletzt durch die molekulargenetische Forschung hat die Medizin angefangen, immer mehr - früher als unheil- oder behandelbar geltende Erkrankungen - zu verstehen und damit therapeutische Möglichkeiten aufzuzeigen. In der weiteren Konsequenz bietet sich dadurch außerdem die Möglichkeit, durch präventives Vorgehen Krankheitszustände zu vermeiden oder in der Entstehung zu mildern. Fortschritte der Molekulargenetik haben in den letzten beiden Jahrzehnten auch dazu beigetragen, die Pathogenese der CMS aufzuklären. So wurden in den letzten Jahren immer mehr CMS ursächliche Gene identifiziert<sup>3,57</sup>, zum Zeitpunkt der Auswertung des Kollektivs lagen insgesamt 14 bekannte Gene vor, inklusive des erst kürzlich neu identifizierten Gens *GFPT1*.<sup>58</sup>

Im Unterschied zu vielen anderen genetischen Erkrankungen, für die bislang weiterhin keine effektive Therapie zur Verfügung steht, stellen die CMS bereits eine potentiell behandelbare Erkrankung dar. Insofern kommt einer korrekten Diagnosestellung eine besondere Bedeutung zu, was jedoch aufgrund einiger Besonderheiten erschwert sein kann. Mit einer Häufigkeit von ca. 1 auf 500 000 Personen stellen CMS eine seltene genetische Krankheit dar, die ein variantenreiches Bild bietet, das von sehr milden, nur myasthenen Symptomen bis zu schwerwiegenden Verlaufsformen, die schon antepartal oder im Säuglingsalter zum Tod führen können, reicht. Im Gegensatz zu häufigen genetischen Erkrankungen wie z.B. dem Down-Syndrom mit einer hohen Prävalenz von 1:1000<sup>59</sup>, das durch eine Chromosomenanalyse einfach und eindeutig diagnostiziert werden kann, und zu dem es eine Vielzahl klinischer Beobachtungen gibt, existieren für die CMS weltweit nur sehr wenige größere Patientenkollektive, die der systematischen Informationssammlung über die Pathophysiologie, Genetik oder klinische Symptomatik dieser Erkrankungsgruppe dienen können. Erschwerend hinzu kommt, dass es für CMS weder einen eindeutigen klinischen oder biochemischen Marker gibt, noch einen allumfassenden genetischen Test.

Das untersuchte Kollektiv stellt mit seinen fast 700 Patienten eine der international größten Patientenkohorten dar. Insofern bietet allein die Größe des Kollektivs eine einzigartige Möglichkeit, aussagekräftige Daten spezifisch im Hinblick auf CMS zu gewinnen. Durch Vorarbeiten anderer in den vergangenen Jahren, wurden alle Patienten des Kollektivs molekulargenetisch gezielt auf Mutationen in einzelnen oder mehreren bekannten CMS verursachenden Genen untersucht. Dadurch war es möglich, systematisch die Häufigkeit von

Mutationen in unterschiedlichen CMS verursachenden Genen auszuwerten. In Kombination mit den gesammelten klinischen Daten ermöglichte dies eine umfangreiche Korrelation von Geno- und Phänotypen. Ein Ziel dieser Arbeit war es auch, nicht nur die Gruppe der mutationspositiven Patienten auszuwerten, sondern auch einen Vergleich zu ziehen mit der Gruppe der mutationsnegativen Patienten, um so möglicherweise klinische Parameter zu erfassen, die eine besondere Wahrscheinlichkeit für einen positiven Mutationsnachweis zu identifizieren. Langfristig würde dies ermöglichen, die Erkrankten einer schnelleren Diagnose und damit Therapie zuführen zu können.

Die gesammelten Daten entsprechen in ihrer Qualität nicht einer systematischen prospektiven Studie, so wurden die Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten an unterschiedlichen klinischen Zentren untersucht, und bei weitem nicht immer waren alle Daten vollständig erhoben oder dokumentiert worden. Dies stellt jedoch ein generelles Problem bei seltenen Erkrankungen dar, für die oft nur in internationaler Zusammenarbeit größere Fallzahlen gesammelt werden können. Dies behindert generell auch die Durchführung von klinischen Therapiestudien bei seltenen Erkrankungen, da kleinere therapeutische Effekte oft nur messbar sind, wenn der natürliche Verlauf einer genetischen Erkrankung gut beschrieben ist. Auf dem Gebiet der seltenen Erkrankungen gibt es Ansätze, dieses Problem durch die Einrichtung von internationalen Patientenregistern zu lösen, die auch eine Möglichkeit bieten, gute prospektive Daten zum natürlichen Verlauf seltener Erkrankungen zu liefern (DMD / SMA Register für Deutschland; [www.treatment-nmd.de/register/](http://www.treatment-nmd.de/register/) oder [www.SMA-Register.de](http://www.SMA-Register.de)) Da es derartige Ansätze für die CMS bislang nicht gibt, stellen die im untersuchten Kollektiv erhobenen klinischen Daten trotz einiger Einschränkungen allein aufgrund der vielen erfassten Patienten eine sehr wertvolle Informationsquelle dar

Hinsichtlich der ethnischen Abstammung ist das Kollektiv international zusammengesetzt. Einzelne ausländische Zentren, die besonders viele Patienten zuwies, erklären Häufungen bestimmter Nationalitäten (z.B. 51 Patient über Dr. Colomer, Spanien; 13 Patienten über Dr. Seemann, Prag). Die hohe Frequenz von Patienten aus dem osteuropäischen Raum erklärt sich auch durch die dort häufige Founder-Mutation der Roma im Gen *CHRNE* (c.1267delG) und die dort stattgefundenene Sensibilisierung der Kliniker für dieses Krankheitsbild in dieser Bevölkerungsgruppe.<sup>60, 61</sup>

## 1. Statistische Auswertung

Grundsätzlich ist es schwierig bei kleinen Erkrankungskollektiven mit jeweils niedriger Anzahl von Patienten mit spezifischen genetischen Veränderungen signifikante Korrelationen mit bestimmten klinischen Parametern zu beweisen (30-50%). ( Beeson et al. 2008 40%<sup>28</sup>, Kinali et al. 2008 33%<sup>63</sup>).

Hinsichtlich einer vergleichenden Gegenüberstellung der Patienten mit und ohne Mutation sind auch Einschränkungen zu berücksichtigen: Letztlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei den über 50% der Patienten ohne nachweisbare Mutation doch eine CMS-ursächliche genetische Veränderung vorliegt, die jedoch nicht identifiziert wurde.

Andererseits könnten sich in dieser Gruppe Patienten verbergen, die tatsächlich gar kein CMS haben. Das könnte daran liegen, dass die Einschlusskriterien nicht spezifisch genug waren, also einige Patienten an ganz anderen neuromuskulären Erkrankungen litten und trotzdem fälschlicherweise in die Gruppe der CMS eingeordnet wurden. Unter Kenntnis der erheblichen phänotypischen Varianz der CMS musste dies aber in Kauf genommen werden. Andernfalls wären Patienten, die andere als nur die klassischen Symptome eines CMS zeigten, nicht in die Studie aufgenommen worden. Gerade bei derartigen Patienten könnte aber möglicherweise eine interessante und neu aufzudeckende Pathophysiologie zugrundeliegen: Wie sich in letzter Zeit zeigte konnte man für spezielle CMS Formen eine erhebliche klinische und auch pathophysiologische Überschneidung mit Muskelerkrankungen aus dem Formenkreis der Myopathien beobachten.<sup>56</sup> Klinisch ist dies speziell für die Gruppe der sogenannten „Gliedergürtelmyasthenien“ der Fall, bei der vor allem ursächliche Mutationen in den Genen *COLQ*, *DOK7*, *MUSK* und *GFPT1* beschrieben sind<sup>47,52,53,56,64,65</sup>. Bei Patienten mit diesem Phänotyp liegt eine Gliedergürtel-betonte Verteilung der Paresen vor, die Patienten haben eine proximale Muskelschwäche typischerweise mit einem „watschelnden“ Gangbild. Bei möglicherweise leicht erhöhten CK-Werten und einer oft völlig fehlenden okulären Symptomatik fällt eine klinische Abgrenzung zu den kongenitalen Myopathien schwer<sup>54, 65</sup> Kommt – bei Mutationen im *COLQ*-Gen<sup>52</sup> noch ein fehlendes Ansprechen auf AChE-Inhibitoren hinzu, kann die Diagnosestellung noch schwieriger sein. Dieser Überschneidungsbereich zu den Myopathien lässt sich auch pathophysiologisch beobachten, insbesondere für die Mutationen in den Genen der postsynaptischen *AGRN*-*MUSK*-*DOK7*-Signalalkaskade, für die es in der Muskelbiopsie auch zu leichten myopathischen Veränderungen kommen kann.<sup>66,67</sup>



Für diese Studie wurden nicht alle Patienten des Kollektivs auf Mutationen in allen bekannten CMS verursachenden Genen getestet, zum Zeitpunkt des Abschlusses der Auswertung waren dies 14 verschiedene Gene. Die genetische Charakterisierung der Patienten, die Voraussetzung für die Auswertung des Patientenkollektivs im Rahmen dieser Arbeit war, erstreckte sich über mehrere Jahre. Zu Beginn der genetischen Charakterisierung waren erst wenige CMS-ähnliche Gene bekannt, weitere kamen erst im Verlauf hinzu. Nicht immer war zu einem späteren Zeitpunkt ausreichend Untersuchungsmaterial vorhanden, um neu beschriebene Genveränderungen zu analysieren. So gibt es Patienten im Kollektiv, für die sehr umfangreiche genetische Analysen zur Verfügung stehen, bei anderen Patienten wurden dagegen nur einzelne Gene analysiert (Tabelle 6, 7) Eine parallele Analyse aller Gene war zudem in den letzten Jahren mit den zur Verfügung stehenden Techniken noch sehr aufwendig, wenngleich sie möglicherweise mit den heute zunehmend zur Verfügung stehenden neuen Sequenziertechnologien möglich wäre. Insofern ist es durchaus möglich, dass einige der Patienten aus dem Mutations-negativen Kollektiv doch Träger nicht identifizierter Mutationen in den nicht getesteten Genen sind. Zudem mag es sein, dass ein Nachweis von Mutationen in bis jetzt unbekannt regulatorisch wirkenden Gen-Regionen oder Deletionen einzelner Genabschnitte aufgrund der angewandten PCR-basierten direkten Sequenzierung unterblieb.<sup>68</sup> Zu vermuten ist auch, dass zumindest bei einigen Patienten ohne Mutationsnachweis in den bekannten CMS-ursächlichen Genen Mutationen in bislang nicht beschriebenen CMS-ursächlichen Genen, möglicherweise auf einem ganz neuen Pathomechanismus beruhend, vorliegen. Hinweisend dafür ist, dass in einigen von uns untersuchten Familien trotz eines ausgeprägten phänotypischen Bildes und sicheren klinischen Zeichen eines CMS auch nach weit gefasster genetischer Testung keine genetische Ursache der Erkrankung nachgewiesen werden konnte.

Hier als Beispiel der Fall eines Patienten konsanguiner nicht betroffener Eltern aus Persien. Anamnestisch verstarb ein Geschwisterkind mit 14 Monaten an respiratorischen Problemen, drei Onkel des Patienten waren ebenfalls von myasthenen Symptomen nicht näher bezeichneter Art betroffen. Der Patient selbst zeigte ab dem 4. Lebensmonat eine schwere generalisierte muskuläre Schwäche, vor allem der proximalen Muskulatur. Ein Aufrichten in den Stand war nur mit Hilfe des Gowers-Manövers möglich und nach einem doch normalen Laufbeginn mit 13 Monaten verschlechterte sich die Laufentwicklung später auf eine mit Unterstützung zurückgelegte 10 m limitierte Gehstrecke. Weiter waren die typischen Symptome wie Ptose und Ophthalmoparese sowie in der frühen Kindheit erhebliche

Schluckbeschwerden nachweisbar. Die proximale, distale und faciale Muskulatur zeigte zudem in der repetitiven Nervenstimulation ein pathologisches Dekrement. Unter Kenntnis der hohen Signifikanz einer Ptose und eines pathologischen Dekrements sowie der positiven Familienanamnese für den Nachweis einer Mutation ergibt sich hier die doch sehr hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer ursächlichen genetischen Veränderung, die aber bislang nicht identifiziert wurde.

Ein anderes Beispiel ist der Fall eines Sohnes nicht konsanguiner, nicht betroffener Eltern (Vater Österreicher, Mutter Thailänderin), dessen Schwester im Alter von 2,5 Jahren an mit einer congenitalen Myasthenie gut vereinbaren Symptomen verstorben war. Das Kind selber zeigte eine leicht verzögerte motorische Entwicklung (Laufbeginn 18 Monate), krisenhafte Verschlechterung der Symptome mit respiratorischen Krisen, die typische Ptose und Ophthalmoparese sowie ein positives Dekrement.

## 2. Häufigkeitsverteilung der Mutationen

Bezüglich der relativen Häufigkeit der Mutationen glichen unsere Ergebnisse denen anderer durchgeführter Studien (Engel et al, 2010: 295 Mutationsträger<sup>69</sup>; Beeson et al., 189 Mutationsträger<sup>1,29</sup>).

Wie schon in einer Studie aus der Mayo Klinik (Jahre 88-08), die in einer Gruppe von 295 Mutationsträgern in 54% der Fälle einen Defekt in einem der Gene der AChR-Untereinheiten zeigten, waren derartige Mutationen auch in unserem Kollektiv bei 50% der Patienten nachweisbar. Die meisten dieser Mutationen betrafen die epsilon Untereinheit des Rezeptors (93% der Mutationen), hier trug der größte Anteil der Patienten (84 Patienten) die bekannte Foundermutation c.1267delG des *CHRNE* Gens (siehe Diagramm 1 und Tabelle 1 A Anhang). Der Anteil getesteter Patienten aus dem südosteuropäischen Raum mag in unserem Kollektiv überproportional hoch sein, vergleicht man die absoluten Häufigkeiten vor und nach Einschluss der Mutation c. 1267delG miteinander, so stellen Mutationen der AChR-epsilon Untereinheit jedoch mit ca. 30% immer noch die größte Fraktion dar. Die prozentualen Anteile der anderen Gene und ihrer Mutationen verändern sich nach Ausschluss von c.1267delG Trägern bezüglich RAPSN (dem zweithäufigst gefundenen mutierten Gen) von 15 auf 20%, *COLQ* von 12 auf 17%, *DOK7* von 10 auf 15% und *CHAT* von 5 auf 7%. Auch diese Nachweise entsprechen den Daten der früheren Studien. (Engel et al.<sup>4</sup>: *CHAT* (16/295=5%). *COLQ* 43/295=15%, *RAPSN* 43/295=15%, *DOK7* 25/295=8%).

Da eine Mutation in *CHRNE* mit 148 Nachweisen zu den am häufigsten detektierten Defekten zählt, ist hier allein aufgrund der Häufigkeit die Wahrscheinlichkeit eines Mutationsnachweis am höchsten, insbesondere wenn der Patient aus dem süd-ost europäischen Raum stammt und/oder eine ethnische Abstammung aus der Bevölkerungsgruppe der Roma bekannt ist.

Mutationen der anderen Gene der AChR-Untereinheiten (Gene *CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRND*) kamen dagegen selten vor. Für Mutationen der epsilon-Untereinheit des AChR (*CHRNE*) ist bekannt, dass sie durch eine Hochregulation der eigentlich nur in der Fetalzeit exprimierten gamma-Untereinheit kompensiert werden können. Als ursächlich für die relative Seltenheit anderer AChR-Mutationen in unserem CMS-Kollektiv kann daher diskutiert werden, dass schwerwiegendere autosomal rezessive Mutationen dieser Untereinheiten schlechter mit dem Leben vereinbar sind bzw. zu bereits fetal manifestierenden Erkrankungen führen können.<sup>23, 69, 70, 71</sup>

Spezielle autosomal dominante Mutationen der AChR-Untereinheiten, die funktionell die Kanaleigenschaften des Rezeptors beeinflussen, aber nicht zu einem völligen Fehlen des Proteins führen, sind dagegen Ursache des selteneren, aber auch in unserem Kollektiv beobachteten CMS-Phänotyps eines Slow-Channel Syndroms.

### 3. Genotyp-Phänotyp Korrelationen

In mehreren vorangegangenen Publikationen der letzten Jahre wurden bereits Genotyp-Phänotyp-Korrelationen für einzelne bekannten CMS-ursächliche Gene beschrieben.<sup>28, 68, 69</sup> Die diesbezüglichen Daten aus der im Rahmen der vorgelegten Arbeit erfolgten Gesamtauswertung unseres Patientenkollektivs<sup>58</sup> die für einzelne Gene auch bereits in den vergangenen Jahren publiziert wurden<sup>59, 70, 73, 74</sup>, entsprechen im Wesentlichen den durch andere beschriebenen Daten. Die Auswertung des Gesamtkollektivs ergab aber auch einzelne nennenswerte Besonderheiten:

Patienten, die eine Mutation in *CHRNE* tragen, zeigten zwar – wie in der Literatur beschrieben<sup>72, 74</sup> – einen eher milderen Verlauf, trotzdem wurde eine relativ hohe Anzahl verstorbener Geschwisterkinder angegeben. Im Gesamtkollektiv wurden unter Einbeziehung der freien Anamnese insgesamt 41 verstorbene Geschwisterkinder bei 31 maliger prinzipieller Angabe des Todes eines Geschwisterkindes genannt (im Fragebogen konnte nur die Angabe "betroffenes Geschwisterkind verstorben", "SIDS" und "IUFT" ohne Anzahl gemacht

werden), davon entfielen 7 auf Patienten mit Mutationen der AChR-Untereinheiten: In einer Familie liegt eine mit neonatalen Apnoen assoziierte Mutation der delta-Untereinheit des AChRs vor, wie dies auch für einen anderen Patienten publiziert wurde.<sup>74</sup> Die restlichen Fälle betreffen überraschenderweise die klinisch eigentlich als benigne und eigentlich nicht mit Apnoen assoziierten Mutationen des Gens *CHRNE*<sup>75</sup>, in 2 Fällen handelt es sich um die Roma-Founder Mutation c.1267delG. Ursache hierfür mag die insgesamt höhere Geschwisterzahl bei Patienten aus dem südosteuropäischen Raum sein, möglicherweise spiegelt sich hier auch ein schlechterer Zugang zum Gesundheitssystem für die Bevölkerungsgruppe der Roma in ihren Heimatländern.

Bei Patienten mit einer Mutation im *RAPSN* Gen zeigte sich laut freier Anamnese oft auf den ersten Blick ein verlängerter Gesichtsschädel und ein hoher Gaumenbogen. Haupterkrankungszeitpunkt ist zwar von Geburt bis zur Vollendung des ersten Lebensjahrs, es gibt aber einen zweiten Peak zwischen dem 3-6 und 7-10 Lebensjahr. Dies wird auch in der Literatur beschrieben.<sup>50</sup> Hier wurde wieder in die zwei Gruppen early und late onset eingeordnet, mit einem postulierten milderen Verlauf für die late onset Gruppe. Auch in unserem Kollektiv zeigte sich, dass Mutationen in *RAPSN* das Auftreten von exzitatorischen Krisen, mit plötzlicher Apnoe, respiratorischen Insuffizienzen und Zunahme der muskulären Schwäche bei Infekten oder Stress begünstigen. Bei Geburt waren 4 Kinder auffällig wegen einer Arthrogryposis multiplex, im Verlauf kam es in 42% der Fälle zu Schluck- und damit Fütterbeschwerden. Die mimische Schwäche und die ebengenannten Schluckbeschwerden sind von der Häufigkeit der Nennungen spezifisch für die Mutation. Dies deckt sich mit vorhergehenden Studien.<sup>50</sup>

Der Phänotyp der Patienten mit *RAPSN* Mutationen entsprach im Wesentlichen dem Bild aus der Literatur<sup>76</sup>, auch bei unseren Patienten waren häufig die typischen Dysmorphien genannt (5 Patienten, 12%, erhoben in der freien Anamnese), es gab Patienten mit kongenitalen Kontrakturen (7, 16%), fast alle Patienten zeigten ein gutes Ansprechen auf AChE-Hemmer und sehr viele Patienten (33, 77%) waren durch frühkindliche Apnoen aufgefallen. Auch das häufige Vorkommen der bekannten Founder-Mutation p.N88K<sup>77</sup> bestätigte sich in unserem Kollektiv (Diagramm 1).<sup>76, 78</sup>

Auch bei den Patienten mit Mutationen in *COLQ* decken sich unsere Befunde mit denen vorangegangener Studien.<sup>52</sup> Der Gipfel des Erkrankungsbeginns liegt neonatal und bei

Geburt, etwas abflachend über das erste Lebensjahr. Die späteste Erstmanifestation beobachteten wir im Alter von 7-10 Jahren. Die Kinder sind in der Regel relativ schwer betroffen, neigen zu respiratorischen Insuffizienzen und Zunahme der muskulären Schwäche bei Infekten und Stress. Pathophysiologisch kommt es bei Mutationen in *COLQ* durch eine fehlende Verankerung der AChE im synaptischen Spalt und demzufolge eine mangelnde Enzymaktivität zu einem Aufstau an ACh im synaptischen Spalt, der in einen Depolarisationsblock mündet und bei dauerhaftem Bestehen zu einer Myopathie der Endplatte führt. Hieraus ergibt sich, dass eine Therapie mit Acetylcholinesterasehemmern nicht zum Erfolg führen kann, dies wurde durch unsere Zahlen erneut bestätigt. Eine Therapie mit AChE-Inhibitoren kann bei Patienten mit *COLQ*-Mutation zu einer dramatischen Verschlechterung der Symptomatik bis hin zu einer Ateminsuffizienz führen. Bestenfalls zeigt die probatorische Gabe keinen Effekt. Zu diskutieren ist daher, vor einer probatorischen AChE-Inhibitorgabe das Vorliegen einer *COLQ*-Mutation auszuschließen.

Die in unserem Kollektiv gefundenen Häufigkeiten von muskulärer Atrophie, Kontrakturen, Skoliose und Betonung der axialen/proximalen Muskulatur, belegen, dass dieses phänotypische Merkmal als Hinweis auf eine Mutation dieses Gens zu werten ist. Betroffene Patienten zeigen oft, aber nicht immer, eine ausgeprägte okuläre Symptomatik und mimische Schwäche. Eine interessante Beobachtung in unserem Kollektiv ist, dass auch bei Patienten mit Mutationen in *COLQ* mehrfach die Nennung eines oder mehrerer verstorbener Geschwisterkinder gemacht wurde. Nach Patienten mit *CHRNE* Mutationen, wurden die zweithäufigsten Nennungen verstorbener Geschwister bei *COLQ*-Patienten gemacht: So lagen in 26% der Fälle Angaben zu erkrankten und in 16% der Fälle Angaben zu insgesamt 8 verstorbenen Geschwisterkindern vor. Eine weitere wichtige Beobachtung ist die hohe Rate an beatmungspflichtigen Patienten (16%, 6), die in der Gruppe der *COLQ*-Patienten gemacht wurde. Der offenbar relativ häufig durch respiratorische Insuffizienz gekennzeichnete Krankheitsverlauf unterstreicht die Notwendigkeit einer genetischen Diagnose dieser Patienten, insbesondere, da es in der Literatur Fallberichte über ein Ansprechen der Patienten auf eine medikamentöse Therapie mit dem Medikament Ephedrin gibt.<sup>79</sup>

Die erfassten klinischen Parameter für *DOK7* decken sich weitestgehend mit denen in anderen Arbeiten.<sup>51,80</sup> Hinweisend auf *DOK7* kann ein höheres Erkrankungsalter sein, in unserem Kollektiv erkennbar daran, dass 48% der Patienten erst nach dem 2. Lebensjahr erkrankten (bei 28 Patienten lagen Angaben zum Erkrankungsalter vor, 15 davon erkrankten nach dem 2. Lebensjahr). Eine in der Literatur bislang wenig zur Kenntnis genommene Beobachtung ist

die doch recht häufige Angabe einer krisenhaften Verschlechterung bei 14 Patienten, davon bei 10 mit respiratorischer Schwäche. Anders als bei Mutationsträgern in *CHAT* oder *RAPSN* liegt diese nicht in früher Kindheit, sondern eher jenseits des 6. Lebensjahrs. Somit ist eine respiratorische Schwäche, die erst nach der frühen Kindheit auftritt, als möglicher Hinweis auf eine Mutation in *DOK7* zu werten.

Bezüglich der Gliedergürtelsymptomatik grenzt sich die Erkrankung von Mutationen in anderen damit assoziierten Genen (z.B. *DOK7*) durch den schwächeren Befall der extraokulären Muskeln ab, auch ist Ptose in nur der Hälfte der Fälle des jetzigen Kollektivs beobachtet worden. In dem noch deutlich kleineren Kollektiv wurde 2006 bei fast allen Patienten eine Ptose beobachtet.<sup>81</sup> Ähnlich wie für Patienten mit einer Mutation in *COLQ* sprechen auch Patienten mit einer Mutation in *DOK7* schlecht auf AChE-Hemmer an. Eine klinisch wichtige Beobachtung aus unserem Kollektiv ist, dass im Verlauf der Erkrankung 19% der Patienten teilweise (nachts) beatmungspflichtig wurden. Dies ist wichtig in der klinischen Betreuung der Patienten, da eine unerkannte Hyperkapnie zu ausgeprägten Beschwerden mit Tagesmüdigkeit, Kopfschmerzen und einer generellen Verschlechterung der muskulären Symptomatik führen kann und die Einleitung einer nächtlichen assistierten Beatmung Allgemeinzustand und Lebensqualität des Patienten signifikant verbessern kann.

Fast pathognomonisch für das Vorliegen einer Mutation in *CHAT* ist das Auftreten von frühkindlichen, krisenhaften respiratorischen Insuffizienzen bis hin zur Apnoe. Alle der erfassten Patienten mit einer Mutation in *CHAT* wiesen dieses Symptom auf, 47% der Patienten waren teilweise beatmungspflichtig, damit hierfür die höchste Anzahl von Nennungen in dieser Patientengruppe.

Mutationen in *GFPT1* wurden erst relativ kürzlich, jedoch auch im untersuchten Patientenkollektiv beschrieben.<sup>47, 53</sup> Wie bereits publiziert zeichnen sich die Patienten durch einen Gliedergürtelphänotyp und eine meist fehlende okuläre Symptomatik bei gleichzeitig gutem Ansprechen auf AChE-Inhibitoren aus.<sup>53</sup> Zusätzlich konnten bei einigen Patienten tubuläre Aggregate in der Muskelbiopsie nachgewiesen werden. Die typische Erstmanifestation liegt im ersten Lebensjahrzehnt, nicht unbedingt aber bereits in den ersten Lebensjahren.

Wichtiges Ziel der vorgelegten Arbeit war es, systematisch zu untersuchen, ob das Vorliegen einzelner phänotypischer Besonderheiten oder auch deren Kombination zum einen eine Vorhersage hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit für einen positiven Mutationsnachweis

erlauben würde und zum anderen, ob diese Parameter hinweisend auf spezielle ursächliche Genveränderungen sein könnte. Dazu wurde zunächst die systematisch die Häufigkeit der erfassten familienanamnestischen, klinischen und elektrophysiologischen Parameter in den beiden Gruppen der Patienten mit und ohne Mutationsnachweis erfasst und dann deren Häufigkeit in den beiden Gruppen verglichen.

Im ersten Schritt wurde dazu die Signifikanz eines spezifischen phänotypischen Merkmals (vorhanden/nicht vorhanden) bezüglich der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Mutation untersucht. (Tabelle 9, 11, 12, 16, 17, 21, 22, 23, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37)

Um den Vorhersagewert einzelner phänotypischer Merkmale auf die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Mutation in einem speziellen Gen zu überprüfen, wurden in einem zweiten Schritt alle Patienten mit Vorliegen eines bestimmten phänotypischen Merkmals auf die Verteilung der identifizierten ursächlichen Gene in dieser Patientengruppe untersucht.

Hier zeigte sich, dass Merkmale wie ein früher Erkrankungsbeginn, ein positives Ansprechen auf AChE-Inhibitoren und – mit höchster Signifikanz – der Nachweis eines pathologischen Dekrements in der repetitiven Nervenstimulation die besten Prädiktoren für einen positiven Mutationsnachweis waren. (Diagramm 8, 9; Tabelle 21, 35, 37). Auch wenn eine unauffällige repetitive Stimulation ein CMS nicht ausschließt, unterstreicht dies den Wert einer elektrophysiologischen Diagnostik bei entsprechendem klinischen Verdacht. Bezüglich der phänotypischen Merkmale einer bulbären Symptomatik oder einer mimischen Schwäche ergab sich jeweils keine signifikante Korrelation mit einem positiven Mutationsnachweis (Tabelle 31, 32). Obwohl die Ptose das am häufigsten genannte klinische Symptom war und als typisches Merkmal eines CMS gilt, war die Mutationsdetektionsrate in den Patienten mit und ohne Ptose nicht signifikant unterschiedlich. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dagegen interessanterweise für das Merkmal einer Ophthalmoparese und auch für eine Kombination der Merkmale einer Ptose und einer Ophthalmoparese (Tabelle 28, 29; Diagramm 4, 5, 6) Ein weiteres hochsignifikantes Merkmal stellt einen Aspekt des klinischen Verlaufs dar, nämlich die Beobachtung einer krisenhaften Verschlechterung der Symptomatik bei Infekt, Fieber oder allgemeinen Stress dar.

Die Familienanamnese spielt bei angeborenen genetischen Erkrankungen eine große Rolle.

Eine bekannte Konsanguinität war jedoch interessanterweise in unserem Kollektiv nicht signifikant mit einer erhöhten Mutationsrate verbunden (Tabelle 17). Im Gegensatz dazu war es aber von Signifikanz ob eine positive Familienanamnese vorlag und über erkrankte und / oder verstorbene Geschwisterkinder berichtet wurde (Tabelle 12, 16)

Eine Familienanamnese vereinbar mit einem autosomal dominanten Vererbungsmodus wurde in unserem gesamten Kollektiv nur für 27 Patienten berichtet. Nachdem hier nur bei 7 Patienten Mutationen nachgewiesen wurden, lag die Mutationsdetektionsrate in dieser Subgruppe deutlich unter der Mutationsdetektionsrate des Gesamtkollektivs. Ein autosomal dominanter Erbgang ist bei einem CMS-Patienten sehr verdächtig auf ein Slow- Channel Syndrom, die einzige bislang bekannte Subform eines CMS der ein autosomal dominanter Erbgang zugrunde liegt. Slow-Channel-Syndrome beruhen auf speziellen Mutationen der Gene der AChR-Untereinheiten, die zu einer Verlängerung der Kanalöffnungszeit des Rezeptors führen. Interessanterweise waren derartige Mutationen der Gene *CHRNA1*, *CHRNB1*, *CHRND* oder *CHRNE* jedoch nur bei 4 der 7 Patienten nachweisbar. Von den übrigen 3 Patienten bei denen familienanamnestisch ein autosomal dominanter Erbgang vorlag, trugen zwei Patienten die Roma-Founder Mutation c.1267delG. Hier liegt tatsächlich ein autosomal rezessiver Erbgang zugrunde. Aufgrund der Häufigkeit in dieser Mutation in der Bevölkerungsgruppe der Roma lag jedoch bei jeweils einem der Elternteile die Mutation 1267delG ebenfalls homozygot vor, was zu einer klinischen Symptomatik bei dem entsprechenden Elternteil führte und als Bild einer „Pseudodominanz“ bekannt ist und für eine der beiden Familien auch publiziert wurde<sup>83</sup>. Bei dem dritten Patienten wurden compound heterozygote Mutationen des CHAT-Gens identifiziert, der symptomatische Elternteil ist heterozygoter Anlageträger für eine der beiden Mutationen. Da *CHAT* Mutationen einem autosomal rezessiven Erbgang folgen, erklärt eine heterozygote Anlageträgerschaft die Symptomatik nach derzeitigem Kenntnisstand nicht. Es ist nicht auszuschließen, dass in der Familie eine unabhängige neuromuskuläre Erkrankung vorliegt. Dieser Fall zeigt, dass auch Informationen zur Familienanamnese irreführend sein können,

Umgekehrt lag bei den insgesamt 11 Patienten mit nachgewiesenen autosomal dominanten Slow- Channel Mutationen nur viermal die Angabe vor, dass auch ein Elternteil betroffen und damit ein autosomal dominanter Erbgang anzunehmen war. Für zwei weitere dieser Patienten lagen keine anamnestischen Daten bezüglich der Familiengeschichte vor und bei den 6 verbleibenden war die Familienanamnese negativ, was eine de novo Mutation beim



betroffenen Patienten vermuten lässt. In einer dieser Familien konnte dies auch bestätigt werden, da eine Untersuchung der Eltern zeigte, dass diese beide keine Mutationsträger sind. Dies zeigt, dass auch bei Patienten ohne positive Familienanamnese ein Slow-Channel Syndrom nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann.

Die ethnische Abstammung eines Patienten hatte dann einen hohen prädiktiven Wert (Tabelle 9), wenn eine Zugehörigkeit zur Bevölkerungsgruppe der Roma angegeben wurde bzw. auch dann, wenn ein Patient aus dem südosteuropäischen Raum stammte. Dies liegt begründet in der sehr hohen Heterozygotenfrequenz für die Founder-Mutation c.1267delG im Gen *CHRNE*, die für verschiedene Roma-Gruppen in Europa auf bis zu 5% geschätzt wird<sup>55, 60</sup>. In unserem Kollektiv war für 40 der 89 Patienten mit der Mutation c.1267delG eine Roma-Zugehörigkeit angegeben. Es ist zu vermuten, dass dieser Anteil tatsächlich höher liegt. Die Bevölkerungsgruppe der Roma stammt ursprünglich aus dem indischen Raum und zeichnete sich in den vergangenen 800 Jahren durch große Wanderungsbewegungen innerhalb des Südosteuropäischen Raums aus<sup>55, 60</sup>. Nicht allen Menschen wird eine entsprechende ethnische Abstammung bekannt sein. Zusätzlich kam es durch soziokulturelle Vorbehalte zu einer Stigmatisierung dieser Volkszugehörigkeit, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass eine Zugehörigkeit eher verneint wird. Unsere Daten verdeutlichen, dass trotz dieser Problematik die Frage nach der ethnischen Abstammung wertvoll sein kann, um diagnostische Informationen zu gewinnen.

Der Therapieerfolg mit AChE-Hemmern war einer der signifikanten Prädiktoren eines Mutationsnachweises. Auch bei Patienten ohne Mutationsnachweis ist die Beobachtung eines Ansprechens auf AChE-Inhibitoren wichtig, weil damit dem Patienten eine effektive Therapie zukommt und gleichzeitig die klinische Diagnose einer Störung der neuromuskulären Übertragung untermauert wird. Vor einer genetischen Diagnostik ist diese Beobachtung zudem hilfreich als Hinweis darauf, welches CMS-ursächliche Gen ursächlich sein könnte: Mutationen in den Genen *COLQ* und *DOK7* sind dann unwahrscheinlich, da hier üblicherweise kein oder sogar ein negativer Effekt mit Verschlechterung der Symptome nach Therapie mit AChE-Hemmern beobachtet wird. Eine adverse Reaktion auf AChE-Inhibitoren ist außerdem für die - auch in unserem Kollektiv - seltenen Slow-Channel Syndrome mit speziellen Mutationen der AChR-Untereinheiten bekannt. In unserem Kollektiv lagen für 260 Patienten ausreichende Angaben zum Effekt einer AChE inhibitorischen Therapie vor: Geht man von 39% (150 Patienten) aus, die eine Verbesserung ihrer Symptome erfuhren, stehen dem 24% (92 Patienten) gegenüber die keinen Effekt verspüren, zusätzlich nochmal 5% (18

Patienten) bei denen es zu einer deutlichen Verschlechterung der Symptome kam. Mit sich verbessernden Möglichkeiten einer molekulargenetischen Diagnostik stellt sich die Frage, ob es vertretbar ist, bei einer probatorischen Behandlung eine teilweise massive und möglicherweise lebensbedrohende Verschlechterung der Erkrankung in Kauf zu nehmen. Möglicherweise wäre es sinnvoll, vor einer medikamentösen Therapie zumindest Mutationen im COLQ-Gen auszuschließen, die mit 13% (bezogen auf alle nachgewiesenen Mutationen) die dritthäufigste gefundene genetische Veränderung ausmachen.

#### 4. Der Vorhersagewert einzelner phänotypischer Merkmale für das ursächliche Gen

Um den Vorhersagewert einzelner phänotypischer Merkmale auf die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Mutation in einem speziellen Gen zu überprüfen, wurden in einem zweiten Schritt alle Patienten mit Vorliegen eines bestimmten phänotypischen Merkmals auf die Verteilung der identifizierten ursächlichen Gene in dieser Patientengruppe untersucht.

Eine so gebildete, wichtige Gruppe stellten – als zahlenmäßig größte Gruppe - die Patienten mit dem Merkmal frühkindlicher Apnoen dar. Insgesamt waren Apnoen für 152 Patienten angegeben. Hauptanteil der nachgewiesenen genetischen Veränderungen in dieser Gruppe hatten erwartungsgemäß Mutationen in den Genen *RAPSN* und *CHAT* (Diagramm 3, Tabelle 25).<sup>45, 83, 84</sup>

Charakteristisch für diese Patienten ist ein Phänotyp, der sich auszeichnet durch einen Symptombeginn vor dem 3. Lebensjahr und krisenhafte Verschlechterungen mit oder ohne plötzliche Apnoen. Ein derartiger Phänotyp war für insgesamt 112 Patienten unseres Kollektivs angegeben. 45 dieser Patienten wurden auf Mutationen im *CHAT*-Gen getestet, dabei konnte bei insgesamt 12 Patienten eine krankheitsursächliche Mutation identifiziert werden. Bei nur 3 unserer insgesamt 15 Patienten mit Mutationen in *CHAT* wurde zum Zeitpunkt der Vorstellung zur genetischen Testung zwar ein früher Krankheitsbeginn, aber kein gemeinsames Auftreten von frühem Beginn und Apnoen berichtet. Erst im weiteren Verlauf der Erkrankung kam es bei diesen Kindern zu respiratorischen Störungen. Hätte man sich bei diesen Kindern vor Untersuchung des Gens *CHAT* strikt an die Vorgabe eines

zwingenden Vorliegens früher Apnoen gehalten, wären diese Kinder einem Mutationsnachweis entgangen. Bei insgesamt 82 Patienten die auf eine Mutation in *CHAT* getestet wurden ergaben sich 15 Mutationsnachweise, was einer Mutationsdetektionsrate von 18% entspricht. Bezogen auf die Daten des Gesamtkollektivs hatte eine Untersuchung des *CHAT*-Gens damit nach Mutationen des Gens *CHRNE* die beste „Trefferquote“. Dies unterstreicht grundsätzlich die Sinnhaftigkeit einer molekulargenetischen Stufendiagnostik bei bestimmten phänotypischen Auffälligkeiten. Episoden mit (plötzlicher) respiratorischer Insuffizienz oder Muskelschwäche sind bis jetzt vor allem für *RAPSN*<sup>80, 84, 87, 88</sup> und *CHAT*<sup>41,48,49,72</sup> beschrieben worden. In unserem Kollektiv zeigte sich jedoch, dass auch Patienten mit Mutationen in *COLQ* potentiell gefährdete Kandidaten sind. In unserem Kollektiv wurden für 12 der 38 Patienten mit *COLQ*-Mutationen über plötzliche respiratorische Krisen berichtet. Darüber hinaus waren in unserer Subgruppe von Patienten mit Apnoen Mutationen im *COLQ*-Gen gleich häufig wie *CHAT* Mutationen (Diagramm 3).

Eine weitere, näher untersuchte Subgruppe waren die insgesamt 105 Patienten mit dem Phänotyp einer Gliedergürtelmyasthenie. Insgesamt 30 dieser Patienten entsprachen dem speziell für *GFPT1*-Mutationen charakterisierten Phänotyp einer Gliedergürtelbeteiligung mit gutem Ansprechen auf AChE-Inhibitoren bei gleichzeitigem Fehlen einer Ptose. Die Mutationsdetektionsrate in dieser Gruppe war mit 12 aus 30 Fällen besonders hoch. Darunter waren zwei Patienten mit *DOK7* Mutation und 10 Patienten mit *GFPT1* Mutationen.

Die Mutationsdetektionsrate in der Gruppe der Patienten mit hauptsächlich oder ausschließlich okulären Symptomen war ausgesprochen niedrig (Tabelle 30) Der größte Teil dieser Patienten wurde nur auf die häufigen Mutationen in *RAPSN*, *CHRNE* und *DOK7* getestet. Nur bei einem Patienten wurde aufgrund des Erkrankungsverlaufs eine erweiterte Mutationsanalyse gemacht und in diesem Rahmen eine Mutation in *CHRNBI* gefunden. Es handelte sich hierbei um einen jetzt 37 jährigen Mann der im Alter von 6 Jahren vorgestellt wurde. Damals litt er seit Geburt an einer Ptose und Ophthalmoparesen, die Erkrankung schritt progredient fort und es kam in Folge zu bulbärer Symptomatik und allgemeiner Muskelschwäche.

Die Mutationdetektionsrate bei primärer Einzelgentestung überstieg signifikant die gesamte Mutationsdetektionsrate in unserem Kollektiv. Dies ist natürlich auch dem Umstand geschuldet, dass die Mutationsanalyse bei nicht Nachweis auf die anderen Gene ausgeweitet

wurde. So war auch die mit 88% äußerst hohe Detektionsrate bei einem initialen Screening auf *CHNE* maßgeblich deswegen so hoch, weil eine Vorauswahl an Süd-ost-europäischen Patienten wegen des Verdachts auf c.1267delG getroffen wurde.

Eine gezielte Testung des *DOK7 exon7* wäre in Anbetracht der Tatsache, dass die große Mehrheit der für dieses Gen gefundenen Mutationen sich in genau diesem Exon befindet angemessen. Dies vor dem Hintergrund, dass Patienten mit *Dok7* Mutationen nicht gut auf Therapie mit Mestinon ansprechen und hier im Zweifel eine Verschlechterung der Situation provoziert wird. Die Mutationen für *CHNE* und *RAPSN* verteilen sich eher über das gesamte Gen.

Ähnlich wie bei einem gezielten Test auf *CHAT* war auch das gezielte Screening auf Mutationen für das *COLQ* mit 19 nachgewiesenen von 39 ausschließlich darauf getesteten Patienten sehr effizient.

Dies hebt noch einmal die Auffälligkeit des Phänotyps für *CHAT* (frühe Apnoe) und *COLQ* (schlechtes Ansprechen auf Mestinon, bzw. Verschlechterung der Symptome) hervor.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei Patienten die CMS typische Symptome zeigen auch hochsignifikant eine Mutation nachgewiesen werden kann.

Die Kenntnis über mögliche Genotyp / Phänotyp Korrelationen erweist sich zwar für die Strategieplanung bezüglich einer genetischen Testungsreihe als sehr hilfreich ( Diagramm 1 A, Anhang) es sollte jedoch bei nicht Nachweis des gezielt untersuchten Gens weitere Gene untersucht werden ohne sich um den möglicherweise irreführenden Phänotyp zu kümmern.

Leider konnte nicht in jedem Fall eine genetische Mutation bewiesen werden, dies sollte der Anlass sein die genetische Testung auszuweiten.

Der Nachweis einer krankheitsursächlichen genetischen Veränderung hat für einen Patienten mit CMS besondere Bedeutung. Ein erster wichtiger Aspekt ist die Sicherung der klinischen Verdachtsdiagnose. Andere klinisch ähnliche Erkrankungen, wie z.B. die autoimmune Myasthenia gravis, die unter Umständen ganz andere diagnostische und therapeutische Konsequenzen hätten, sind damit weitestgehend ausgeschlossen. Durch eine genetische Klärung können demnach auch unnötige diagnostische Untersuchungen oder Therapien vermieden werden, die teuer sind und den Patienten belasten können. Dies reicht von einer bei von CMS betroffenen Patienten unnötigen immunsuppressiven Therapie, bis hin zum operativen Eingriff einer Thyrektomie. Die Klärung der genetischen Ursache ermöglicht es,

den Patienten hinsichtlich des zu erwartenden Krankheitsverlaufs und möglicher assoziierter Komplikationen zu beraten. So ist es wichtig zu wissen, ob bei einem Patienten eine mit respiratorischen Komplikationen assoziierte CMS-Unterform vorliegt. Säuglinge müssen hier möglicherweise mit einem Heimmonitor versorgt werden, die Eltern benötigen eine Reanimationseinweisung. Nur bei gesicherter Diagnose kann darüber entschieden werden, ob im Krankheitsverlauf zusätzlich auftretende Symptome der Grunderkrankung zuzuordnen sind oder einer unabhängigen diagnostischen Einordnung oder Therapie bedürfen. Weitere Bedeutung hat die genetische Diagnose auch für die Beratung des Patienten oder seiner Familienmitglieder im Hinblick auf ein mögliches Vererbungsrisiko, das je nach zugrundeliegendem Erbgang ganz unterschiedlich hoch sein kann. Bei einem Wiederholungsrisiko für Eltern betroffener Kinder spielt die Prognose und Behandelbarkeit der Erkrankung eine große Rolle. Für diese Beratung von Bedeutung ist sicherlich auch die Frage, in welchem Land und/oder sozialem Umfeld ein erkranktes Kind geboren werden soll? Aus den Daten unseres internationalen Kollektivs deutet sich an, dass die Annahme einer guten Prognose und Behandelbarkeit betroffener Patienten nicht für alle Länder und sozialen Umstände gleichermaßen anzunehmen ist. Zum Diskussionsbeispiel der Fall eines Patienten mit einer homozygoten Frameshift-Mutation im Gen *CHRNE*. Der jetzt 30-jährige Patient, der selbst unter medikamentöser Therapie eher moderat mit Ptose und Ophthalmoparese betroffen ist, hatte 4 Geschwisterkinder, die im Säuglingsalter verstarben.

Ganz besonders hervorzuheben ist, dass bei den CMS, als einer der seltenen behandelbaren genetischen Erkrankungen, die molekulargenetische Diagnose auch direkte Konsequenzen für die Auswahl einer medikamentösen Therapie hat. Grundsätzlich ist die genetische Diagnose für den Patienten mit einer seltenen Erkrankung die Voraussetzung, sich zu Forschungsfortschritten auf dem entsprechenden Gebiet seiner Erkrankung zu informieren. Zunehmend ermöglicht sie auch eine Eintragung in Patientenregistern für seltene Erkrankungen oder sogar eine Teilnahme an klinischen Studien.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte Auswertung eines für eine seltene Erkrankung außerordentlich großen Patientenkollektivs bestätigte, dass einzelne phänotypische Merkmale wichtig sind, eine sinnvolle genetische Stufendiagnostik zu leiten. Auch wenn durch die Anwendung neuer Sequenziertechnologien eine Einzel-Gen Testung, wie in dem untersuchten Kollektiv, seltener wird, werden sorgfältige Genotyp-Phänotyp Korrelationen gerade in der genetischen Diagnostik seltener Erkrankungen weiterhin sehr wertvoll sein.

## G. LITERATURNACHWEIS

- (1) A. Chaouch, D. Beeson, D. Hantai et al. (2012) Workshop report, 186th ENMC International Workshop: Congenital myasthenic syndromes; 24–26 June 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* **22**: 566-576
- (2) A. Abicht, S. Kröger, B. Schoser et al. (2011) Neuromuskuläre Signalübertragung im Erwachsenenalter. Aktuelle Facetten erworbener und angeborener Störungen. *Der Nervenarzt*, Springer Verlag **6**: 707-711
- (3) D. Hantai, S. Nicole, B. Eymard (2013) Congenital myasthenic syndromes; an update. *Curr Opin Neurol.* **26**: 561-568
- (4) A. G. Engel (2012) Congenital Myasthenic Syndromes in 2012. *Nerve and Muscle, Curr Neurol Neurosci Rep.* **12**: 92-101
- (5) T. Hughes (2005) The early history of myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord.* **15**: 878-886
- (6) H.B. Rothbart (1937) Myasthenia gravis in children. *JAMA* **108**: 715-717
- (7) S. Bunday, D. Doniach, J. F. Soothill et al. (1972) Immunological studies in patients with juvenile-onset myasthenia gravis and in their relatives. *Clin Exp Immunol.* **11**: 321–332
- (8) J. P. Sieb, S. Kraner (2000) Myasthenia gravis und myasthene Syndrome. *Dtsch. Ärztebl.* **97**: A-3496 / B-2938 / C-2612
- (9) J. McConville, A. Vincent (2002) Diseases of the neuromuscular junction. *Curr Opin Pharmacol,* **2**: 296- 301
- (10) S. Burden (1998) The formation of neuromuscular synapses. *Genes and Development* **12**:133-148
- (11) J.R. Sanes, J.W. Lichtman (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* **22**: 389-442
- (12) H. Wu, W.C. Xiong, L. Mei (2010) To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Genes and Development* **137**: 1017–1033
- (13) H.C. Fertuck, M.M. Salpeter (1976) Quantitation of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors by electron microscope autoradiography after <sup>125</sup>I-alpha-bungarotoxin binding at mouse neuromuscular junctions. *J Cell Biol* **69**:144-158
- (14) PD Dr.S. Kröger (2012) Agrin: Die Rolle von Agrin an der neuromuskulären Endplatte und im Zentralnervensystem. *Molecular Brain* **5**: 7
- (15) N. Yumoto, N. Kim, S. J. Burden (2012) Lrp4 Is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature* **489**: 438-442

- (16) T.C. Sudhof (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**: 509-547
- (17) M. Smoluchowski (1906) Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen. *Annalen der Physik* **14**: 756–780
- (18) G. David, E.F. Barrett (2003) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol*. **548**: 425-38
- (19) K. Ohno, A. Engels (2003) Congenital myasthenic syndromes: gene mutations. *Neuromuscular Disorders* **13**: 854-857
- (20) K. Ohno, A. Tsujino, J.M. Brengman et al. (2001) Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2017–2022
- (21) C. Donger, E. Krejci, A.P. Serradell et al. (1998) Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet*. **63**: 967–975
- (22) S.M. Sine (2012) End-plate acetylcholinreceptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease. *Physiol Rev*. **92**: 1189- 1234
- (23) S.M. Sine, A.G. Engel (2006) Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* **440**: 448-455
- (24) R.M. Stroud, J. Finer-Moore (1985) Acetylcholine receptor structure, function, and evolution. *Annu Rev Cell Biol* **1**: 317-351
- (25) B.P. Vohra, J.S. Groshong, R.A. Maselli et al. (2004) Focal caspase activation underlies the endplate myopathy in slow-channel syndrome. *Ann Neurol* **55**: 347-352
- (26) P. Fatt, B. Katz (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* **117**: 109-128
- (27) A.G. Engel, S.M. Sine (2005) Current understanding of congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Pharmacol* **5**: 308-321
- (28) C.G. Faber, P.C. Molenaar, J.S.H. Vles et al. (2009) AChR deficiency due to e-subunit mutations: two common mutations in the Netherlands. *J Neurol* **256**:1719–1723
- (29) D. Beeson, R. Webster, J. Cossins et al. (2008) Congenital myasthenic syndromes and the formation of the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* **1132**: 99-103
- (30) Y. Lee, J. Rudell, M. Ferns et al. (2009) Rapsyn interacts with the muscle acetylcholine receptor via  $\alpha$ - helical domains in the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\epsilon$  subunit intracellular loops. *Neuroscience* **163**: 222–232

- (31) A.J. Denzer, T. Schulthess, C. Fauser et al. (1998) Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *EMBO J* **17**: 335–343
- (32) D.J. Glass, G.D. Yancopoulos (1997) Sequential roles of agrin, MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Curr. Opin. Neurobiol* **7**: 379-384
- (33) C.L. Smith, P. Mitternacht, E.D. Prescott et al. (2001) Src, Fyn and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilisation of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors. *J. Neurosci* **21**: 3151-3160
- (34) P.A. Marangi, J.R. Forsythe, P. Mitternacht et al. (2001) Acetylcholine receptors are required for agrin-induced clustering of postsynaptic proteins. *EMBO J* **20**: 7060–7073
- (35) C. Fuhrer, M. Gautam, J.E. Sugiyama et al. (1999) Roles of Rapsyn and agrin in interaction of postsynaptic proteins with acetylcholine receptors. *J. Neurosci* **19**: 6405-6416
- (36) C. Huzé, S. Bauché, P. Richard et al. (2009) Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet.* **85**: 155-167
- (37) R.A. Maselli, J.M. Fernandez, J. Arredondo et al. (2012) JLG2 agrin mutation causing severe congenital myasthenic syndrome mimics functional characteristics of non-neural (z-) agrin. *Hum Genet.* **131**: 1123-1135
- (38) E. Bergamin, P.T. Hallock, S.J. Burden et al. (2010) The cytoplasmic adaptor protein Dok7 activates the receptor tyrosine kinase MuSK via dimerization. *Mol Cell* **39**: 100-109
- (39) N. Kim, A.L. Stiegler, T.O. Cameron et al. (2008) Lrp4 is a receptor for agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* **135**: 334–342
- (40) T. Masaharu (2012) Structure of the neuromuscular junction: function and cooperative mechanisms in the synapse. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1274**: 14-23
- (41) D.J. Glass, T.M. De Chiara, T.N. Stitt et al. (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**: 435-444
- (42) F. Chevessier, B. Faraut, A. Ravel-Chapuis et al. (2004) MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet.* **13**: 3229-4320
- (43) D. Beeson, O. Higuchi, J. Palace et al. (2006) Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science* **313**: 1975-1978
- (44) M. Gautam, P.G. Noakes, J. Mudd et al. (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* **377**: 232-236
- (45) A. Buckel, D. Beeson, M. James et al. (1996) Cloning of cDNA encoding human rapsyn and mapping of the RAPSN gene locus to chromosome 11p11.2-p11.1. *Genomics* **35**: 613-616



- (46) J. Senderek, J. S. Müller, M. Dusl et al. (2011) Hexosamine biosynthetic pathway mutations cause neuromuscular transmission defect. *Am J Hum Gen* **88**: 162–172
- (47) V. Guerguelcheva, J.S. Müller, M. Dusl et al. (2011) Congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates caused by GFPT1 mutations. *J Neurol* **259**: 838-850
- (48) R.F. Byring, H. Pihko, A. Tsujino et al. (2002) Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. *Neuromuscul Disord* **12**: 548–553
- (49) L. A. Mallory, J. G. Shaw, S.L. Burgess et al. (2009) A case of congenital myasthenic syndrome with episodic apnea. *Pediatr Neurol* **41**: 42–45
- (50) G. Burke, J. Cossins, S. Maxwell et al. (2003) Rapsyn mutations in hereditary myasthenia Distinct early- and late-onset phenotypes. *Neurology* **61**: 826–828
- (51) D. Selcen, M. Milone, X.M. Shen et al. (2008) Dok-7 Myasthenia: phenotypic and molecular genetic studies in 16 patient. *Ann Neurol*. **64**: 71–87
- (52) V. Mihaylova, J.S. Müller, J.J. Vilchez et al. (2008) Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain* **131**: 747-759
- (53) S.Y. Huh, H.S. Kim, K. H.J. Jang et al. (2012) Limb -girdle Myasthenia with tubular aggregates associated with novel GFPT1 Mutations. *Muscle Nerve* **46**: 600–604
- (54) B. Eymard, T. Stojkovic D. Sternberg et al. (2013) Congenital myasthenic syndromes: difficulties in the diagnosis, course and prognosis, and therapy. *The French national Congenital Myasthenic Syndrome network experience, Rev Neurol (Paris)* **169**: 45-55
- (55) A. Abicht, R. Stucka, V. Karcagi et al. (1999) A common mutation (epsilon 1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology* **53**: 1564–1569
- (56) A. Abicht, M. Dusl, C. Gallenmüller et al. (2012) Congenital myasthenic syndromes: achievements and limitations of phenotype-guided gene-after-gene sequencing in diagnostic practice: a study of 680 patients. *Hum Mutat* **33**: 1474-1484
- (57) A. G. Engel (2012) Current status of the congenital myasthenic syndromes. *Neuromuscular Disorders* **22**: 99–111
- (58) J. Senderek, J.S Müller, M Dusl et al. (2011) Hexosamine biosynthetic pathway mutations cause neuromuscular transmission defect. *Am J Hum Genet* **88**: 162–172
- (59) J. Morris, E. Alberman (2009) Trends in Down's syndrome live births and antenatal diagnoses in England and Wales from 1989 to 2008: analysis of data from the National Down Syndrome Cytogenetic Register. *British Medical Journal* **339**: 3794
- (60) B. Morar, D. Gresham, D. Angelicheva et al. (2004) Mutation history of the Roma/Gypsies. *Am J Hum Genet* **75**: 596–609

- (61) D. Gresham, B. Morar, P.A. Underhill et al. (2001) Origins and divergence of the Roma (gypsies). *Am J Hum Genet* 2001 **69**: 1314-1331
- (62) M. Kinali, D. Beeson, M.C. Pitt et al. (2008) Congenital myasthenic syndromes in childhood: diagnostic and management challenges. *J Neuroimmunol* **201-202**: 6-12
- (63) C.R. Slater, P.R. Fawcett, T.J. Walls et al. (2006) Pre- and post-synaptic abnormalities associated with impaired neuro- muscular transmission in a group of patients with 'limb-girdle myasthenia'. *Brain* **129**: 2061–2076
- (64) V. Mihaylova, M.A.M. Salih, M.M. Mukhtar et al. (2009) Refinement of the clinical phenotype in Musk-related congenital myasthenic. *Neurology* **73**: 1926-1928
- (65) J. Spillane, D.J. Beeson, D.M. Kullmann et al. (2010) Myasthenia and related disorders of the neuromuscular junction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**: 850-857
- (66) K. Okada, A. Inoue, M. Okada et al. (2006) The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* **312**: 1802-1805
- (67) Y. Yamanashi, O. Higuch, D.J. Beeson et al. (2008) Dok-7/MuSK signaling and a congenital myasthenic syndrome. *Acta Myol* **27**: 25-29
- (68) J. Palace, D.J. Beeson (2008) The congenital myasthenic syndromes. *J Neuroimmunol* **201-202**: 2-5
- (69) A.G. Engel, X.M. Shen, D. Selcen et al. (2010) What have we learned from the congenital myasthenic syndromes. *J Mol Neurosci* **40**: 143-153
- (70) K. Hoffmann, J. S. Müller, S.Stricker et al. (2006) Escobar syndrome is a prenatal myasthenia caused by disruption of the acetylcholine receptor fetal g subunit. *Am J Hum Gen* **79**: 303-312
- (71) A. Michalk, S. Stricker, J. Becker et al. (2008) Acetylcholine receptor pathway mutations explain various fetal akinesia deformation sequence disorders. *Am J Hum Gen* **82**: 464-476
- (72) A. G. Engel (2012) Congenital Myasthenic Syndromes in 2012. *Curr Neurol Neurosci Rep* **12**: 92-101
- (73) A.G. Engel, K. Ohno, S.M. Sine et al. (2003) Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade. *Muscle Nerve* **27**: 4-25
- (74) J.S. Müller, S.K. Baumeister, U. Schara et al. (2006) CHRND mutation causes a congenital myasthenic syndrome by impairing co-clustering of the acetylcholine receptor with rapsyn. *Brain* **129**: 2784-2793
- (75) A. Abicht, R. Stucka ,I.H. Song et al. (2000) Genetic analysis of the entire AChR e-subunit gene in 52 congenital myasthenic families. *Acta Myol* **19**: 23–28

- (76) J.S. Müller, G. Mildner, W. Müller-Felber et al. (2003) Rapsyn N88K is a frequent cause of congenital myasthenic syndromes in European patients. *Neurology* **60**: 1805-1810
- (77) P. Richard, K. Gaudon, F. Andreux et al. (2003) Possible founder effect of rapsyn N88K mutation and identification of novel rapsyn mutations in congenital myasthenic syndromes. *J Med Genet* **40**: 81
- (78) J.S. Müller, A. Abicht, G. Burke et al. (2004) The congenital myasthenic syndrome mutation RAPSN N88K derives from an ancient Indo-European founder. *J Med Genet* **41**:e104
- (79) W.L. Yeung, C.W. Lam, P.C. Ng (2010) Intra-familial variation in clinical manifestations and response to ephedrine in siblings with congenital myasthenic syndrome caused by novel COLQ mutations. *Developmental Medicine & Child Neurology* **52**: e243–e244
- (80) C.R. Slater, P.R. Fawcett, T.J. Walls et al. (2006) Pre- and post-synaptic abnormalities associated with impaired neuro- muscular transmission in a group of patients with ‘limb-girdle myasthenia’. *Brain* **129**: 2061–2076
- (81) J.S. Müller, A. Herczegfalvi, J.J. Vilchez et al. (2007) Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes. *Brain* **130**: 1497-1506
- (82) A. Herczegfalvi, A. Abicht, V. Karcagi et al. (2000) Case report: Congenital myasthenic syndrome in a gypsy family showing a pseudodominant pattern of inheritance. *Acta Myol* **19**: 49-51
- (83) J.S. Müller, A. Abicht, H.J. Christen et al. (2004) A newly identified chromosomal microdeletion of the rapsyn gene causes a congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord* **14**: 744-749
- (84) M. Milone, X.M. Shen, D. Selcen et al. (2009) Myasthenic syndrome due to defects in rapsyn: Clinical and molecular findings in 39 patients. *Neurology* **73**: 228-235
- (85) U. Schara, H.J. Christen, H. Durmus et al. (2010) Long-term follow-up in patients with congenital myasthenic syndrome due to CHAT mutations. *Eur J Paediatr Neurol* **14**: 326-333
- (86) C. Schmidt, A. Abicht, K. Krampfl et al. (2003) Congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation in the gene encoding choline acetyltransferase. *Neuromuscul Disord* **13**: 245-251
- (87) N. Barisic, J.S. Müller, E. Paucic-Kirincic et al. (2005) Clinical variability of CMS-EA (congenital myasthenic syndrome with episodic apnea) due to identical CHAT mutations in two infants. *Eur J Paediatr Neurol* **9**: 7-12

- (88) P. Richard, K. Gaudon, H. Haddad et al. (2008) The CHRNE 1293insG founder mutation is a frequent cause of congenital myasthenia in North Africa. *Neurology* **71**: 1967-1972
- (89) J.S. Müller, S. Petrova, R. Kiefer et al. (2004) Synaptic congenital myasthenic syndrome in three patients due to a novel missense mutation (T441A) of the COLQ gene. *Neuropediatrics* **35**: 183-189
- (90) F. Schreiner, M. Hoppenz, R. Klaeren et al. (2007) Novel COLQ mutation 950delC in synaptic congenital myasthenic syndrome and symptomatic heterozygous relatives. *Neuromuscul Disord* **17**: 262-265
- (91) K. Ohno, A.G. Engel, J.M. Brengman et al. (2000) The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol* **47**: 162-170
- (92) [www.mindmaps.srsoftware.de/media/n/nikotinischer%2520Acetylcholinrezeptor.png&imgrefur](http://www.mindmaps.srsoftware.de/media/n/nikotinischer%2520Acetylcholinrezeptor.png&imgrefur)

## H. ANHANG

### 1. Tabellen

Tabelle 1 A, Mutationen im Gen *CHRNE*

n	1. Allel	2. Allel	Erbgang
84	low-expressor Mutation c.1267del	low-expressor Mutation c.1267del	a.r.
4	low-expressor Mutation c.1267del	low-expressor Mutation p.A271V* (n=2), c.-155G>A, IVS7-2A>G	a.r.
1	low-expressor Mutation c.1267del	Zweite Mutation fehlt	a.r.
51	low-expressor Mutationen diverse	low-expressor Mutationen, diverse	a.r.
5	fast-channel Mutationen p.P121L, p.A411P, p.N436del	low-expressor Mutationen, diverse	a.r.
3	slow-channel Mutationen p.V259L, p.L269F	-	a.d.

\* vermutete Konsequenz, kein Beweis durch funktionelle Studien

Tabelle 2 A Mutationen in *CHRNA1*: 5 Patienten

n	1. Allel	2. Allel	Erbgang
1	slow-channel Mutation* p.T274N	-	a.d. - sporadisch
1	slow-channel Mutation* p.T281N	-	a.d.
3	slow-channel Mutation p.G153S	-	a.d.

\*vermutete Konsequenz, kein Beweis durch funktionelle Studien;

Tabelle 3 A Mutationen in *CHRN1*: 3 Patienten

n	1. Allel	2. Allel	Erbgang
1	slow-channel Mutation p.T265S	-	a.d.
1	slow-channel Mutation p.V266M	-	a.d.
1	low-expressor Mutation p. R220C	keine funktionellen Studien p.Y149X	a.r.

Tabelle 4 A Mutationen in *CHRND1*: 3 Patienten

n	1. Allel	2. Allel	Erbgang
1	low-expressor Mutation* p.S268Y	-	a.d.
1	low-expressor Mutation p.E381K	microdeletion	a.r.
1	keine funktionellen Studien p.P286L	keine funktionellen Studien p.P286L	a.r.

Tabelle 5 A Mutationen in *RAPSN*: 43 Patienten

n	1. Allel	2. Allel
18	c.264C>A; p.N88K	p.N88K; c.264C>A
20	c.264C>A; p.N88K	Verschiedene missense/frame-shift/stopp/splice Mutationen: c.7C>A; p.Q3K c.1169G>A; p.C390Y c.61C>T; p.Q21X ; p.V45M c.280G>A; p.E94K c.493G>A; p.V165M (2x) c.737C>T; p.A246V (3x) c.869T>C; p.L290P c.872G>A; p.G291D c.990_993delTCTG; p.C330X c.1119delGAA; p.K373del c.1177delAA; p.N393QfsX83 (3x) c.1185delG; p.T396PfsX12 IVS4+1G>T microdeletion
4	c.490C>T; p.R164C c.493G>A; p.V165M c.848T>C; p.L283P c.271C>T; p.R91C	c.490C>T; p.R164C c.726G>A; p.R242W <sup>45</sup> IVS1-15C>A c.271C>T; p.R91C
1	c.264C>A; p.N88K	keine zweite Mutation

Tabelle 6 A Mutationen in *COLQ*: 37 Patienten

<b>n</b>	<b>1. Allel</b>		<b>2. Allel</b>	
5	c.1082delC	T360fsX64?	c.1082delC	T360fsX64?
4	c.1289A>C	p.Y430S	c.1289A>C	p.Y430S
3	c.1321A>G	p.T441A	c.1321A>G	p.T441A
1	c.1321A>G	p.T441A	c.1318T>C	p.C440R
2	c.1250G>A	p.C417Y	c.1250G>A	p.C417Y
2	c.444G>A	p.W148X	c.444G>A	p.W148X
2	c.893del	p.Asn298MetfsX2	c.893del	p.Asn298MetfsX2
2	c.943C>T	p.R315X	c.943C>T	p.R315X
1	c.1021A>G	p.R341G	c.1021A>G	p.R341G
1	c.109delC	T360fsX64?	c.1324_1326del	p.Gln442del
1	c.1257del	p.Ser420LeufsX6	c.1257del	p.Ser420LeufsX6
1	c.158_159insC	p.Leu54AlafsX80	c.158_159insC	p.Leu54AlafsX80
1	c.158_159insC	p.Leu54AlafsX80	c.631C>T	p.Q211X
1	c.279C>A	p.C93X	c.279C>A	p.C93X
1	c.338del	p.Pro113LeufsX51	c.1111C>T	p.Q371X
1	c.377del	p.Gly126AlafsX38	IVS15+15G>A	
1	c.444G>A	p.W148X	c.1157G>C	p.C386S
1	c.631C>T	p.Q211X	IVS15+1G>T	
1	c.631C>T	p.Q211X	c.631C>T	p.Q211X
1	c.738del	p.Val247LeufsX29	c.738del	p.Val247LeufsX29
1	c.797dup	p.Gly267ArgfsX35	c.710G>A	p.G237D
1	c.679C>T	p.R227X	c.679C>T	p.R227X
1	c.706C>T	p.R236X	c.706C>T	p.R236X
1	IVS1-1G>A		c.950del	p.Pro317LeufsX2
1	IVS2+1G>C		IVS2+1G>C	

Tabelle 7 A Mutationen in *DOK7*: 31 Patienten

<b>n</b>	<b>1. Allel</b>	<b>2. Allel</b>
5	Common duplication exon 7 c.1124_1127dupTGCC	Common duplication exon 7 c.1124_1127dupTGCC
8	Common duplication exon 7 c.1124_1127dupTGCC	Missense Mutationen c.7G>A, p.E3K exon 1 (2 patients) c.98G>A, p.A33V exon 2 c.134C>T, p.S45L exon 3 (2 patients) c.190G>A, p.G64R exon 3 (2 patients) c.396C>G, p.H132Q exon 4
5	Common duplication exon 7 c.1124_1127dupTGCC	Frame-shift/stopp Mutationen c.601C>T, p.R201X <sup>34</sup> exon 5 c.1357_1370del14, p.R452RfsX61 <sup>34</sup> exon 7 c.1263insC, p.S422LfsX94 <sup>34</sup> exon 7 (2 pat.) IVS2-1G>T <sup>34</sup> intron 2
1	Missense Mutation c.134C>T, p.S45L exon 1	Missense Mutation c.1406C>A, p.P469H <sup>34</sup> exon 7
4	Frame-shift Mutationen, diverser Exons	Frame-shift Mutationen, diverser Exons
7	Common duplication exon 7 c.1124_1127dupTGCC	keine zweite Mutation
1	c.1378insC, p.E460PfsX58 exon 7	keine zweite Mutation

Tabelle 8 A Mutationen in *CHAT*: 15 Patienten

n	1. Allel	2. Allel
6	c.T1007C; p.I336T	c.T1007C; p.I336T
2	c.2081C>G; p.S694C	c.1061C>T; p.T354M
1	c.1516G>T; p.V506L	c.1657_1659dupACC; p.Thr553dup
1	c.2078T>G; p.I693S	c.678_684delTGGCACC; c.Gly227MetfsX4
1	c.1249G>A; p.G417R	c.1249G>A; p.G417R
1	c.1444A>G; p.R482G	c.1444A>G; R482G
1	c.1493C>T; p.S498L	c.629T>C;
1	c.406G>A; p.V136M	c.1669G>A; p.A557T
1	c.1516G>T; p.V506L	c.1321G>A; p.E441K

## 2. Abbildungen

Abbildung 1A, Abstammung der Patienten im Kollektiv

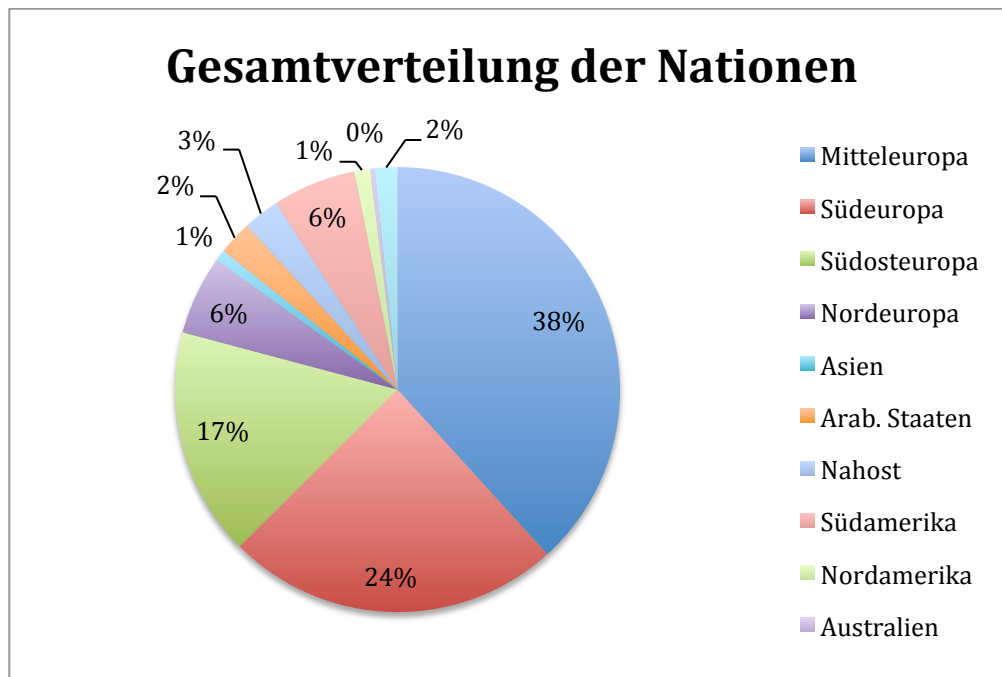




Abbildung 2 A, Differenzierte Abstammung der mitteleuropäischen Patienten

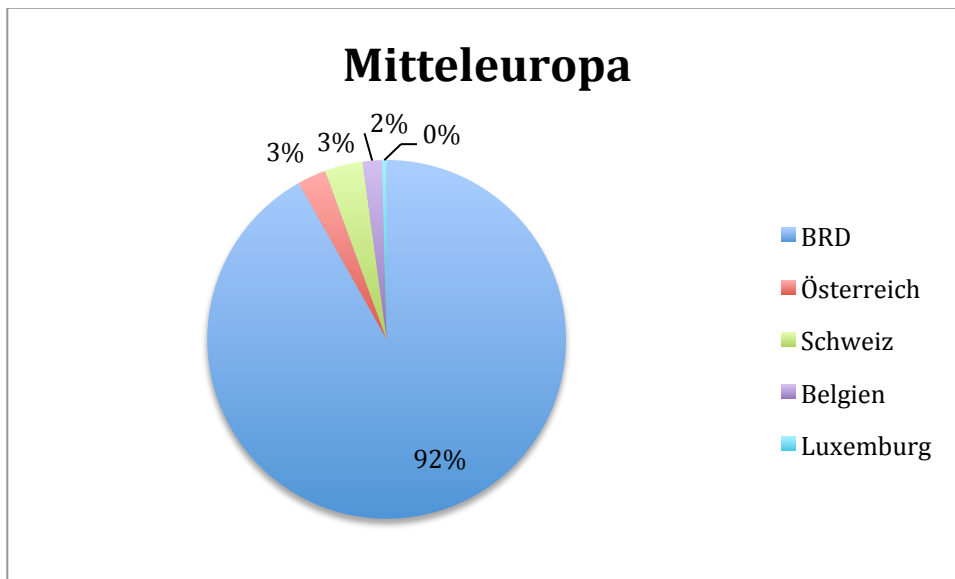


Abbildung 3 A, Differenzierte Abstammung der südeuropäischen Patienten

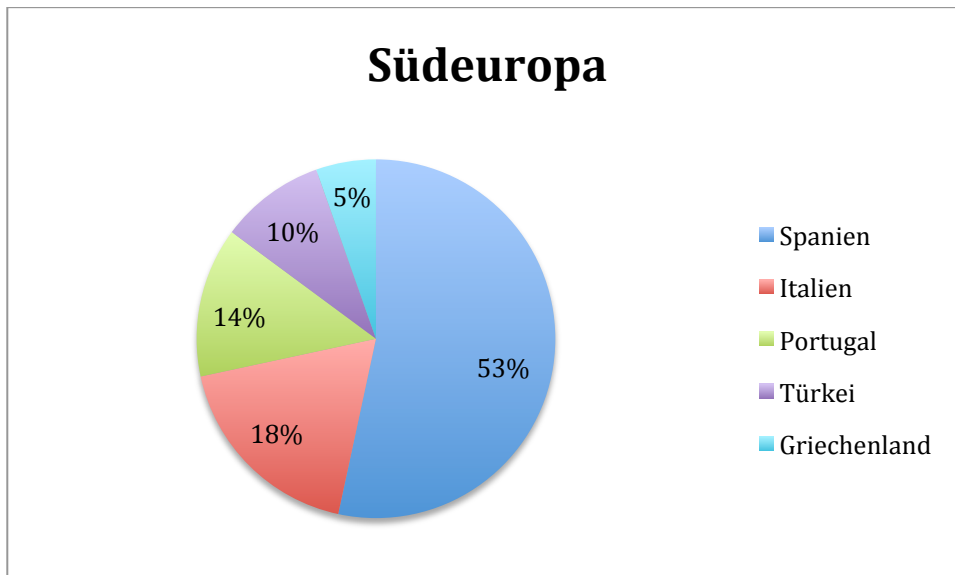


Abbildung 4 A, Differenzierte Abstammung der südosteuropäischen Patienten

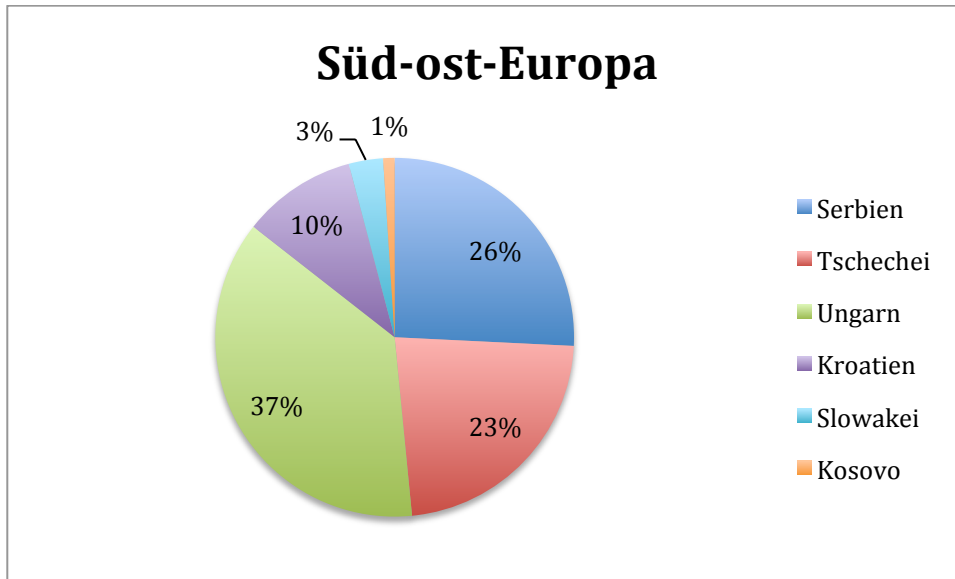


Abbildung 5 A, Differenzierte Abstammung der nordeuropäischen Patienten

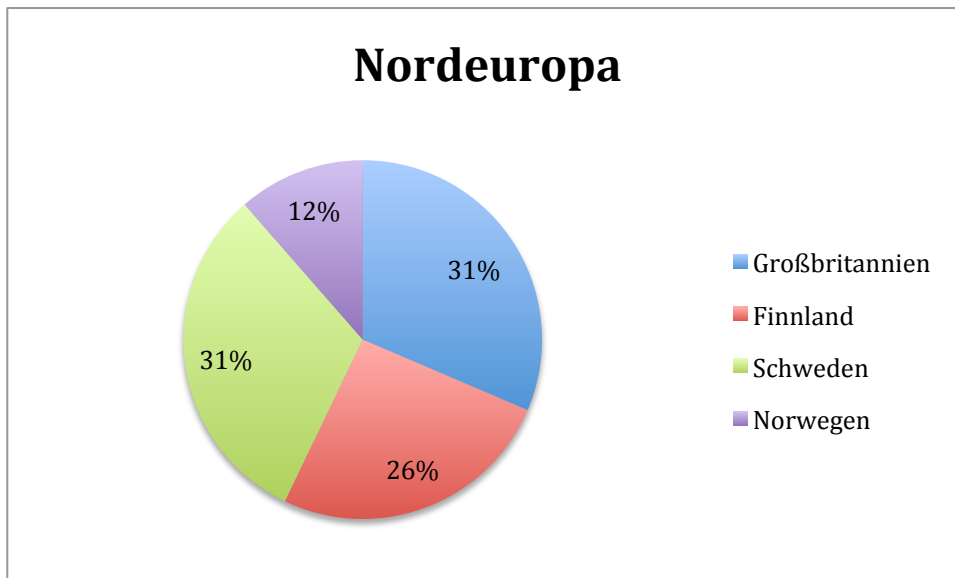


Abbildung 6 A, Differenzierte Abstammung der Patienten aus dem asiatischen Raum

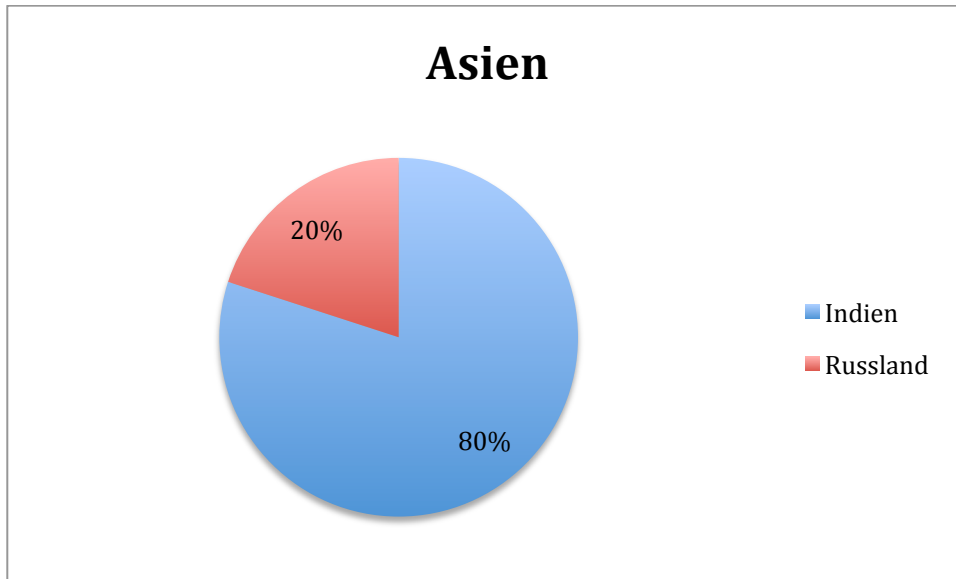


Abbildung 7 A, Differenzierte Abstammung der Patienten aus den arabischen Staaten

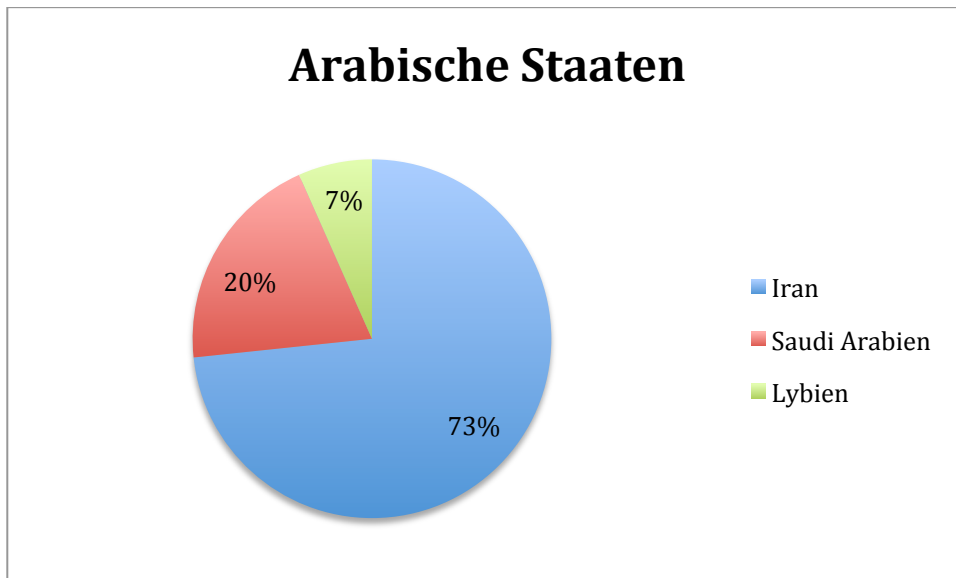


Abbildung 8 A, Differenzierte Abstammung der Patienten aus dem nahen Osten

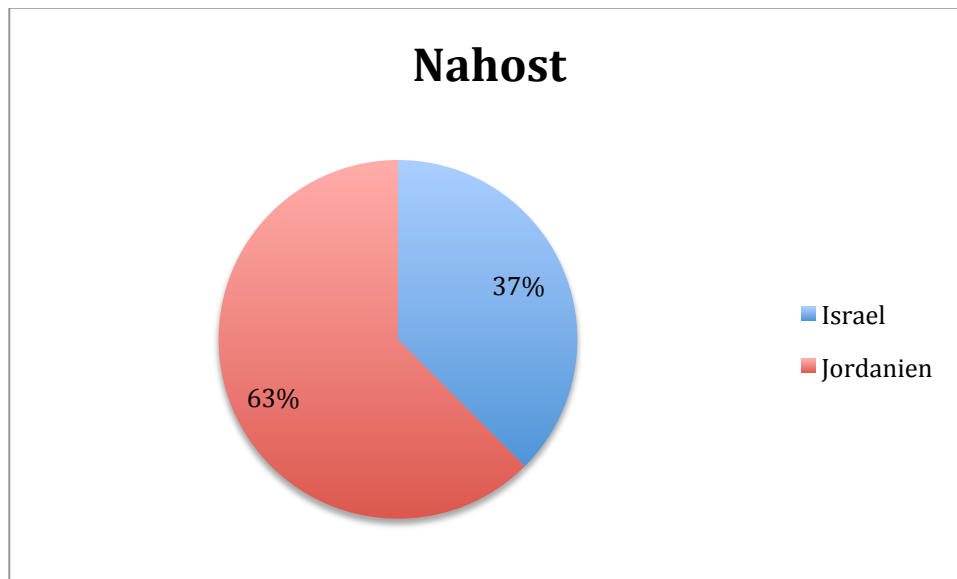


Abbildung 9 A, Differenzierte Abstammung der Patienten aus Südamerika

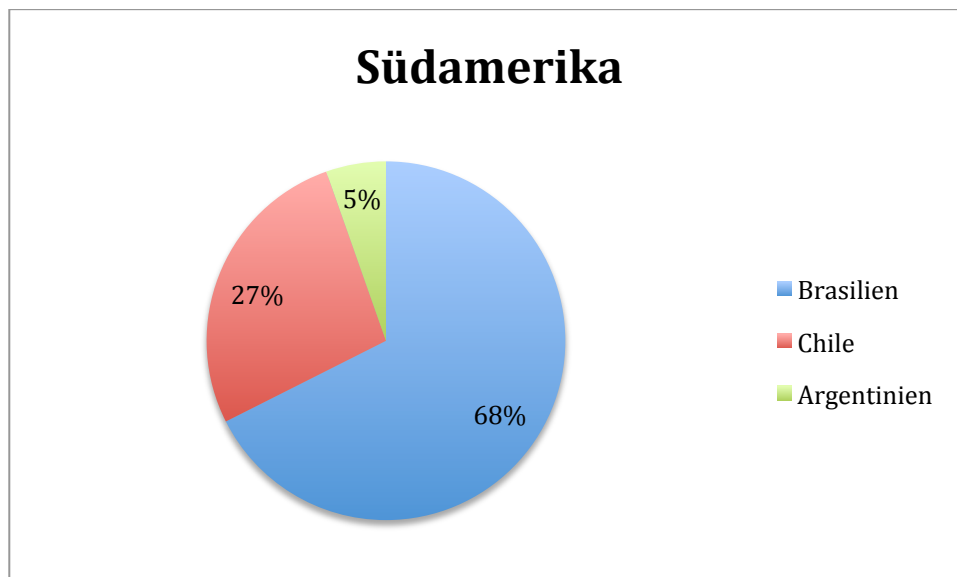
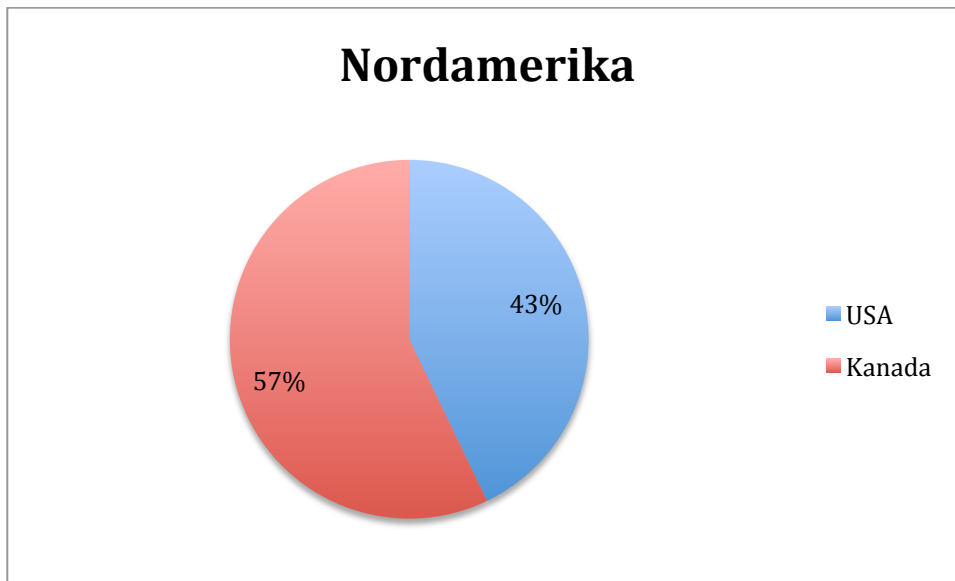
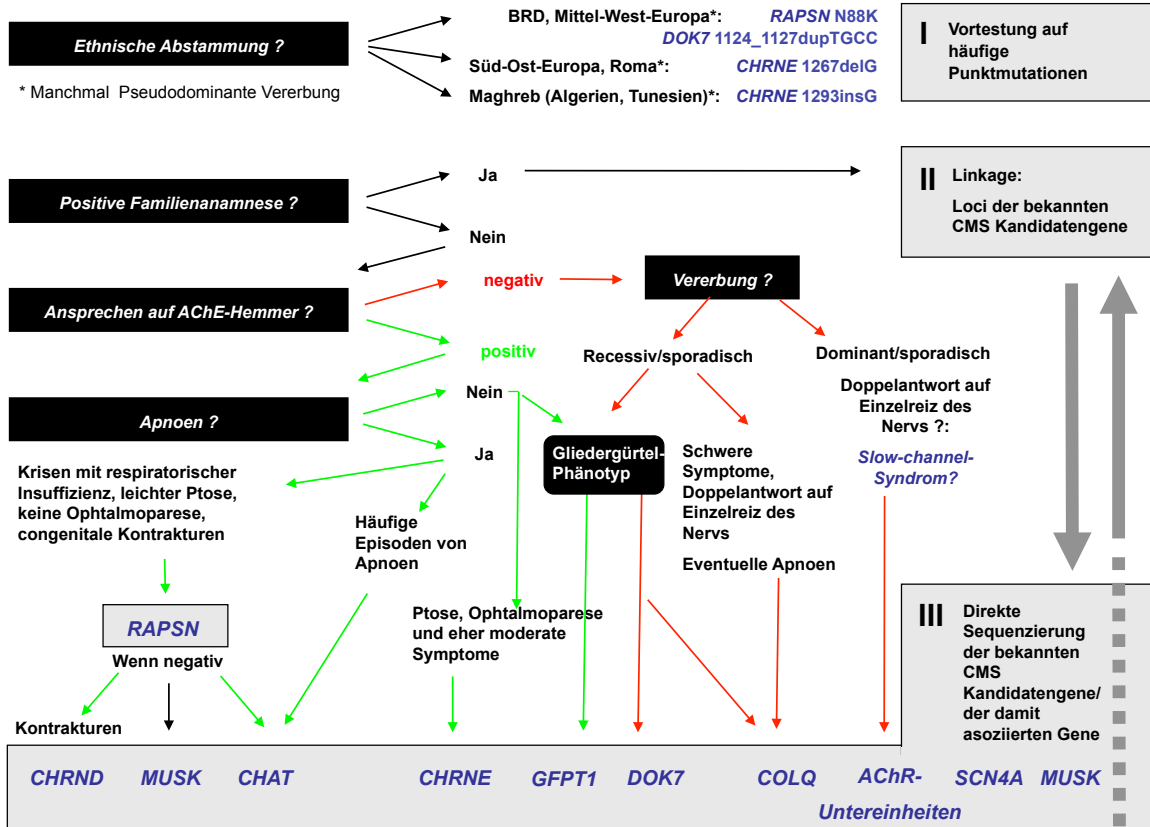


Abbildung 10 A, Differenzierte Abstammung der Patienten aus Nordamerika



### 3. Diagramm

Diagramm 1 A, Algorithmus der genetischen Testung von CMS- Patienten



Falls die direkte Sequenzierung des ausgewählten Gens negativ ist

#### 4. CMS Fragebogen

(für die Arbeit wegen der erforderlichen elektronischen Fassung in Word modifiziert)

# Congenital Myasthenic Syndromes - Clinical Data -

## SAMPLES FOR MOLECULAR GENETIC TESTINGS

### DNA / 10 ml EDTA-blood

to

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

München

Contact: Hanns Lochmüller (MD): Hanns.Lochmuller@newcastle.ac.uk

Angela Abicht (MD), Angela.Abicht@med.uni-muenchen.de Juliane Müller,

Juliane.Mueller@newcastle.ac.uk

phone: 49-89-2180-78180, fax: 49-89-2180-78184

included are samples of:

sample sent by :

**o patient**

name:

institute:

date of birth:

female

male

supervising  
physician:

relatives: .....

telephone/e-mail

.....

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

## CLINICAL DATA

### 1. FAMILY HISTORY

are there affected relatives?

no information

no

yes ...if yes, who is affected?

how many healthy siblings does the patient have?.....

consanguinity in the family?

no information

no

yes

ethnic origin of the  
family:

..if yes, please explain / show pedigree

## 2. HISTORY

**onset of disease:**

- at birth
- first year of life
- childhood
- adolescence
- adulthood

**at age:**  
**at age:**  
**at age:**

**motor milestones:**

- normal
- delayed

ability to walk at age:

**course of disease:**

- progressive
- no / slight progression
- tendency towards remission

### episodic crisis

no  
 yes

-->

- sudden severe weakness
- respiratory insufficiency
- precipitated by:
- frequency/age:

**muscle biopsy performed?**  no  yes, result:

## 3. CLINICAL SYMPTOMS

**weakness:**

- generalized
- selected muscle groups ->  ocular muscles
- others:
- exercise induced
- constant
- moderate weakness
- severe weakness
- >  ambulance not restricted
- restricted: walking distance
- loss of ambulance / wheelchair

### Involved muscle groups:

- ocular muscles
- ptosis
- extraocular muscles / limited eye movement
- bulbar muscles
- facial weakness
- nasal speech
- swallowing difficulties
- chewing difficulties
- extremities
- distal = proximal
- predominantly proximal muscle groups involved
- predominantly distal muscle groups involved
- limb girdle
- scapulae alatae
- waddling gait



- axial muscle involvement (scoliosis ?)
- respiratory muscles

**muscular atrophy:**  no  yes:

**abnormal tendon reflexes:**  no  yes:

#### 4. SPECIALS

**slow pupillary light response:**  no  yes:

**selectively severe weakness of cervical, wrist and finger extensor muscles:**

**congenital contractures:**  no  yes:  
 no  yes:

**congenital malformations**  no  yes

**others:**

#### 5. ELECTROPHYSIOLOGY

**EMG:**  not done  normal  
 neuropathic changes  myopathic changes  
 others:

##### **decremental response**

<input type="checkbox"/> distal muscle groups	<input type="checkbox"/> proximal muscle groups
<input type="checkbox"/> yes ( %)	<input type="checkbox"/> yes ( %)
<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> no
<input type="checkbox"/> not determined	<input type="checkbox"/> not determined

facial muscles

yes ( %)  
 no  
 not determined

##### **response to single nerve stimuli:**

single CMAP response  
 double CMAP response  
 not determined

##### **... further studies**

single fiber EMG

nerve conduction

#### 6. SERUM-CREATINEKINASE

no info  
 normal  
 elevated to:

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

### anti-AChR

- not present
- present
- not determined

### anti-MuSK

- not present
- present
- not determined

## 8. ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORS:

- positive effect
- no clear effect
- negative effect
- not done

## 9. FURTHER THERAPY:

**immunosuppressive treatment (steroids, immunoglobulins, etc....)**

- not done
- unsuccessful

**Successful treatment with**

Thank you !

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

**Allmaras, Sibylle**

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

**Phänotypen, Mutationsdetektionsrate und Mutationsspektrum in einem Kollektiv von Patienten mit kongenitalen myasthenen Syndromen (CMS)**

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

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

Boschhof, 26.04.2014