Mutationen im SCN2A- und SCN3A-Gen bei Kindern mit Frühkindlicher Grand mal Epilepsie

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Alexandra Mignon aus Dortmund

> > Gießen 2015

Mutationen im SCN2A- und SCN3A-Gen bei Kindern mit Frühkindlicher Grand mal Epilepsie

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Alexandra Mignon aus Dortmund

> > Gießen 2015

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Abteilung Neuropädiatrie und Sozialpädiatrie Sozialpädiatrisches Zentrum der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. Bernd A. Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. Rosengarten

Tag der Disputation: 12.02.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitur	ıg	1
	1.1 Epilepsie		1
	1.1.1	Myoklonische Epilepsien	4
		Dravet-Syndrom (Schwere myoklonische Epilepsie des frühen	
		Kindesalters)	4
		Myoklonisch-astatische Epilepsie (MAE)	6
		Schwere frühkindliche Epilepsie mit generalisierten tonisch-kloni	schen
		Anfällen und alternierendem Hemi-Grand mal - sog. Frühkindlich	ne
		Grand mal Epilepsie (FKGM)	7
	1.1.2	Genetik epileptischer Anfälle und Syndrome	9
		Identifizierte Gendefekte, die eine Epilepsie verursachen	10
		Genetik der Fieberkrämpfe (FS)	11
		Genetik des GEFS+-Syndroms	12
		Genetik des Dravet-Syndroms	13
		Genetik der MAE	14
		Genetik der FKGM	15
	1.2 Spa	nnungsabhängige Natriumkanäle (SCN)	15
	1.2.1	SCN1A	17
	1.2.2	SCN2A	18
	1.2.3	SCN3A	21
	1.2.4	SCN8A	23
2	Material	ien und Methoden	26
	2.1 Mat	erialien	26
	2.1.1	Geräte	26
	2.1.2	Materialien	26
	2.1.3	Chemikalien	27
	2.1.4	Lösungen	
	2.1.5	Genbankverweise	29
	2.2 Met	hoden	31
	2.2.1	Extraktion der DNA	31
	2.2.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	34
	2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
		Auswahl der PCR-Oligonukleotide (sog. Primer)	35
	2.2.4	Gelelektrophorese	38
	2.2.5	Sequenzierung	38
	2.2.6	Sequenzauswertung	40
3	Studienp	opulation	42
	3.1 Exe	mplarische Fallgeschichte A	43
	3.2 Exe	mplarische Fallgeschichte B	44
4	Ergebnis	se	
	4.1 Erg	ebnisse SCN2A2	47
	4.1.1	Exone ohne Sequenzvariationen (SCN2A2)	47
	4.1.2	Exone mit Sequenzvariationen (SCN2A2)	47
		Exon 2	47
		Exon 12	
		Exon 13	48
		Exon 26	48
		Exon 27	48

4.1.3	Sequenzvariationen in den Intronabschnitten (SCN2A2)	49
	Intron 8	49
	Intron 17	49
	Intron 18	49
	Intron 19	49
	Intron 22	49
4.2 Erge	bnisse SCN3A	49
4.2.1	Exone ohne Sequenzvariationen (SCN3A)	49
4.2.2	Exone mit Sequenzvariationen (SCN3A)	50
	Exon 3	
	Exon 6	51
	Exon 12	51
	Exon 12	51
	Exon 14	51
	Exon 10	51
	Exon 29	52
123	Sequenzyariationan in dan Intronebachnittan (SCN34)	
4.2.3	Sequenzvariationen in den muonabschnitten (SCNSA)	52
	Introli 0	32
4.2 E	Intron IU	52
4.3 Erge		52
4.3.1	Exone ohne Sequenzvariationen (SCN8A)	53
4.3.2	Exone mit Sequenzvariationen (SCN8A)	53
	Exon 5	53
	Exon 7	54
	Exon 17	54
	Exon 25	54
	Exon 26	54
	Exon 27	55
4.3.3	Sequenzvariationen in den Intronabschnitten (SCN8A)	55
	Intron 14	55
	Intron 18	55
	Intron 23	55
5 Diskussic	n	56
5.1 Vari	ationen mit Aminosäureaustausch im SCN2A-, SCN3A- und	
SCN	8A-Gen	56
5.1.1	Variationen im SCN2A-Gen	57
5.1.2	Variationen im SCN3A-Gen	61
5.1.3	Variationen im SCN8A-Gen	64
5.2 Weit	terführende Untersuchungen	64
6 Zusamme	nfassung	67
7 Summarv		70
Abbildungsver	zeichnis	73
Tabellenverzei	chnis	74
Literaturverzei	chnis	
Anhang		
	Positives Votum der Ethikkommission (A7 03/11)	86
Erklärung zur	Dissertation	80
Danksagung		90
Junisugung	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	

1 <u>Einleitung</u>

Bei Epilepsie-Patienten mit so genanntem Dravet-Syndrom, Frühkindlicher Grand mal Epilepsie oder Myoklonisch-astatischer Epilepsie konnten in der Vergangenheit Mutationen in spannungsabhängigen Natriumkanalgenen, besonders im *SCN1A*-Gen, nachgewiesen werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob in diesem Patientenkollektiv, bei Patienten, die im *SCN1A*-Gen keine Mutation aufweisen, in anderen zentral exprimierten spannungsabhängigen Natriumkanalgenen dieser Genfamilie Variationen nachweisbar sind. Dazu wird die DNA von Patienten mit einem der oben genannten Syndrome, die im *SCN1A*-Gen keine Genveränderung aufweisen, im Bereich der Gene, die für die anderen zentral exprimierten spannungsabhängigen Natriumkanäle (*SCN2A*, *SCN3A* und *SCN8A*) kodieren, per Sequenzanalyse untersucht.

1.1 Epilepsie

Der Name Epilepsie leitet sich von dem griechischen Verb "epilambanein" ab, das soviel bedeutet wie "heftig ergreifen, zupacken". Diese Namensgebung zeigt, dass die Erkrankung – die schon in den frühesten schriftlichen Zeugnissen der Menschheitsgeschichte beschrieben wurde – als "von übernatürlichen Kräften gemacht" angesehen wurde. Dies bezeugt auch der seit dem 6. vorchristlichen Jahrhundert bekannte Begriff "heilige Krankheit", der die Krankheit als ein von Gott auferlegtes Leiden beschreibt.

Die Epilepsie ist kein in sich geschlossenes Krankheitsbild, sondern kann sehr unterschiedliche Ausdrucksformen annehmen.

Allen Epilepsietypen gemeinsam ist, dass es zu spontaner, synchroner Entladung von Neuronenverbänden im Gehirn kommt, was das klinische Bild eines Krampfanfalls auslöst.

Die Symptomatik des Anfalls ist abhängig von der Ausdehnung und der Lokalisation der involvierten Neuronenverbände. Der basale Mechanismus jeder epileptischen Reaktion ist die paroxysmale Depolarisation. Hierbei kommt es bei einem adäquaten Reiz am Neuron nicht wie normalerweise zu einer einzelnen Depolarisation, sondern es erfolgt eine hochfrequente Serie von Entladungen. Außerdem führt der Reiz nicht nur zu einem Aktionspotential im nachgeschalteten Neuron, sondern die Entladungen breiten sich synchron in Zellverbänden aus. Die paroxysmale Depolarisation einer Neuronengruppe kann zu einer explosionsartigen Ausbreitung über exzitatorische Synapsen führen. Dabei wird die normale Informationsverarbeitung unterbrochen und es erfolgt der epileptische Krampfanfall. Wenn sich die Entladungen über das gesamte Großhirn ausbreiten, kommt es zu einem generalisierten Anfall, welcher mit Bewusstlosigkeit einhergeht. Werden im Umkreis hingegen inhibitorische Mechanismen aktiviert, kommt es zu einem lokal begrenzten, also fokalen Anfall.

Ein einzelner Krampfanfall berechtigt noch nicht zu der Diagnose Epilepsie. Diese Diagnose kann gestellt werden, wenn es im Verlauf zu wiederkehrenden, unprovozierten epileptischen Krampfanfällen kommt. Unprovoziert bedeutet, dass der Krampfanfall nicht durch einen Reiz (von innen oder außen) hervorgerufen wird. Dazu ist wichtig zu wissen, dass auch in einem gesunden Gehirn epileptische Anfälle auslösbar sind, z.B. durch Elektroschocks, Analeptika oder andere Noxen. Bei einer erhöhten Anfallsbereitschaft reichen schon geringe Schwankungen des biologischen Gleichgewichts (Fieber, Schlafentzug etc) aus, um einen Krampfanfall auszulösen. Besonders im Kindesalter sind Krampfanfälle ein häufiges Ereignis. So erleiden ca. 4% aller Kinder im Laufe der Kindheit mindestens einen Krampfanfall, meist einen sog. Fieberkrampf [Doose, 1998].

Die Prävalenz der aktiven Epilepsien im Kindesalter hingegen beträgt ca. 0,5%. Von einer aktiven Epilepsie spricht man, wenn es zu mehreren unprovozierten Krampfanfällen gekommen ist, daher die Diagnose Epilepsie gestellt wurde und in den letzten fünf Jahren ein oder mehrere Anfälle aufgetreten sind. Kommt es zu einer Anfallsfreiheit von fünf Jahren oder mehr, befindet sich die Epilepsie in Remission, egal ob dieser Zustand mit oder ohne Medikation erreicht wurde [Doose, 1992].

Die Klassifikation der Epilepsien wird wegen ständiger Neuerkenntnisse in Forschung und Klinik immer wieder überarbeitet und verändert. Trotzdem scheinen Beschreibungen und Einteilungen der Epilepsien nie allen Aspekten dieser komplexen Krankheitsbilder gerecht werden zu können.

Die ILAE (International League Against Epilepsy) beschreibt ihr 2001 veröffentlichtes Diagnostikschema als "lernendes System". Das fünf Ebenen beinhaltende Schema nutzt zur Einteilung folgende Hauptaspekte:

- 1. iktale Semiologie (mit Hilfe eines standardisierten Glossars)
- 2. Anfallstyp(en)
- 3. Syndrom
- 4. Ätiologie

5. resultierende Einschränkungen

Die iktale Semiologie ist die Beschreibung des Anfallsgeschehens. Um eine einheitliche Sprache zu verwenden wird von der ILAE eine Liste von Fachausdrücken zur Verfügung gestellt, um den Anfall eindeutig zu beschreiben. Eine solche Beschreibung des Anfallsgeschehens kann sehr kurz gehalten werden oder sehr detailliert beschrieben werden. Besonders wichtig ist eine genaue Anfallsbeschreibung bei Patienten, bei denen eine chirurgische Behandlung in Erwägung gezogen wird. Die standardisierte Terminologie ist dabei Vorraussetzung einer reibungslosen Kommunikation zwischen Ärzten und Forschern etc..

Die Einteilung des Anfallstyps oder der Anfallstypen geschieht mit Hilfe einer Liste, in der alle Anfallstypen und Stimuli von Reflex-Anfällen aufgeführt sind. Die Anfallstypen werden unterteilt in *selbst-limitierend* und *kontinuierlich* und weiter in *generalisiert* und *fokal*.

Für die Einteilung in ein Epilepsiesyndrom kann eine Liste aller akzeptierten Epilepsiesyndrome benutzt werden, obwohl eine Einteilung in ein Syndrom natürlich nicht immer möglich ist. Außerdem werden einige der aufgeführten Syndrome noch diskutiert. Eine ständige Überarbeitung der Liste aufgrund neuer Erkenntnisse und Erfahrungen wird immer wieder nötig sein.

Die Atiologie kann zum Beispiel erklärt werden durch ein spezifisches pathologisches Substrat, einen genetischen Defekt oder durch eine Grunderkrankung, die mit epileptischen Anfällen oder Syndromen einhergeht. Von einer *genetischen* (früher *idiopathischen*) Epilepsie spricht man, wenn die Ursache der Epilepsie ein bekannter oder vermuteter Gendefekt ist und die Krampfanfälle das Hauptsymptom der Erkrankung darstellen. Besteht hingegen eine Hirnläsion oder eine genetische Grunderkrankung wie z.B. die tuberöse Sklerose, handelt es sich um eine so genannte *strukturell-metabolische* (früher *symptomatische*) Epilepsie.

Die Beschreibung des Grades der Behinderung ist ein optionaler Bestandteil der Klassifikation [Engel, 2001, Berg et al., 2010].

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einer Untergruppe der genetischen generalisierten Epilepsiesyndrome – den frühkindlichen myoklonischen Epilepsien.

1.1.1 <u>Myoklonische Epilepsien</u>

Myoklonische Anfälle sind in jeder Altersklasse ein häufiges Phänomen bei vielen Epilepsietypen und sind daher eine unspezifische Manifestation. Der Begriff Myoklonus umfasst eine Gruppe neurophysiologisch unterschiedlicher Phänomene mit heterogener Ätiologie. Myoklonien sind kurze ruckartige Zuckungen, die am häufigsten antagonistische Muskeln betreffen und in "epileptisch" oder "nicht-epileptisch" eingeteilt werden können. Als "nicht-epileptische" Myoklonien treten sie bei vielen Menschen in der Einschlaf- oder Aufwachphase auf. Von einigen Autoren werden Myoklonien als "epileptisch" beschrieben, wenn sie im Zusammenhang mit einer Epilepsie auftreten. Andere Autoren sprechen von "epileptischen" Myoklonien, wenn eine paroxysmale Depolarisation zugrunde liegt, unabhängig davon welche Neuronenpopulationen (cortical oder subcortical) hauptsächlich involviert sind. Findet man im EEG während des Myoklonus epilepsietypische Potentiale, so kann die epileptische Genese als gesichert gelten.

"Epileptische" Myoklonien können spontan auftreten oder zum Beispiel durch Photostimulation provoziert werden.

Typischerweise sind myoklonische Anfälle kurz und wiederholen sich mehrmals am Tag. Die einzelnen Zuckungen dauern weniger als 100 ms an und wiederholen sich mit einer Rate von 2-3 Hz [Arzimanoglou et al., 2004].

Bei den drei für die vorliegende Arbeit besonders wichtigen Epilepsiesyndromen (Dravet-Syndrom, Myoklonisch-astatische Epilepsie und Frühkindliche Grand mal Epilepsie) sind typischerweise Myoklonien zu beobachten. Die drei Syndrome sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

Dravet-Syndrom (Schwere myoklonische Epilepsie des frühen Kindesalters)

Die schwere myoklonische Epilepsie des frühen Kindesalters (SMEI = severe myoclonic epilepsy in infancy) wurde erstmals 1978 von C. Dravet beschrieben.

Seit der Erstbeschreibung wurde von vielen SMEI-Fällen weltweit, besonders aus Japan und Süd-Europa berichtet.

Die Erkrankung beginnt zumeist im ersten Lebensjahr mit generalisierten oder unilateral klonischen Anfällen, die typischerweise durch Fieber ausgelöst werden, bei bis dahin unauffälliger Entwicklung des Kindes. Die Fieberkrämpfe dauern häufig lange (> 20 min), treten am selben Tag gehäuft auf und neigen dazu in einen Status epilepticus überzugehen. Afebrile Anfälle werden im Zusammenhang mit Impfungen, einer infektiösen Episode oder nach einem Bad beschrieben. Manche Eltern berichten über isolierte Episoden von fokalen myoklonischen Zuckungen einige Wochen oder Tage vor dem ersten konvulsiven Anfall oder über repetitive solcher Zuckungen, in Verbindung mit Hyperthermie, in den Stunden vor dem ersten konvulsiven Anfall [Dravet et al., 2002, Dravet 2011a, Dravet 2011b].

Der erste Anfall wird häufig als Fieberkrampf angesehen. Wenige Untersuchungen werden gemacht und es wird keine weitere Behandlung eingeleitet. Doch kurz darauf (2 Wochen bis 2 Monate nach dem ersten Anfall) treten erneut Fieberkrämpfe auf und Anfälle ohne Fieber kommen hinzu (2 Monate bis 14 Monate nach dem ersten Anfall). Zwischen dem ersten und dem vierten Lebensjahr kommt es zu zahlreichen Anfällen unterschiedlicher Anfallstypen, mit zeitgleicher Verlangsamung der psychomotorischen Entwicklung. Die Anfälle sind extrem therapieresistent. Die Kinder lernen charakteristischerweise im normalen Alter laufen, zeigen aber für eine ungewöhnlich lange Zeit einen unsicheren Gang. Auch die Sprachentwicklung beginnt normal, verlangsamt sich dann aber drastisch. Nach dem zweiten Lebensjahr werden die Kinder häufig hyperkinetisch, mit aufmüpfigem Verhalten und großen Lernproblemen [Dravet et al., 2002, Dravet 2011b].

Die Prognose der SMEI ist ungünstig. Die betroffenen Patienten haben persistierende Anfälle und – häufig schwerwiegende – kognitive Beeinträchtigungen. Das weite Spektrum von einer – eher seltenen – nur geringen Entwicklungsretardierung mit der Möglichkeit einer regulären Einschulung, bis hin zu ausgeprägten und frühen Entwicklungsretardierungen, konnte in bisherigen Studien nicht mit der Schwere der Epilepsie korreliert werden [Dravet, 2011a].

Im Krankheitsverlauf werden die partialen Anfälle, die myoklonischen Anfälle und die atypischen Absencen zumeist weniger, jedoch persistieren die konvulsiven Anfälle. Der ataktische Gang, den ca. 60% der Kinder zeigen und die Pyramidenzeichen (ca. 20%) bilden sich meistens zurück, die Patienten bleiben aber unbeholfen, mit wenig koordinierten Bewegungen. Auffällig ist eine bleibende Fiebersensitivität, die – auch im Erwachsenenalter – einen Status epilepticus auslösen kann [Dravet 2011b].

Viele Autoren beschrieben sehr ähnliche Fälle, allerdings ohne Myoklonien. Diese wurden als borderline SME (SMEB) bezeichnet. Da diese Kinder den gleichen Verlauf und das gleiche outcome, wie Patienten mit Myoklonien haben, scheinen die beiden

Formen im gleichen Syndrom zusammengefasst werden zu können. Die ILAE schlägt als Namen daher Dravet-Syndrom anstatt SMEI (severe <u>myoclonic</u> epilepsy in infancy) vor [Engel, 2001, Dravet et al., 2002, Dravet, 2003].

Die Häufigkeit dieser schwerwiegenden Erkrankung variiert in den verschiedenen Publikationen zwischen 1:20.000 und 1:40.000. Die Mortalitätsrate ist hoch. Dravet et al. beschreiben in ihrer Studie 1992 eine Mortalitätsrate von knapp 16%, bei einer mittleren Beobachtungszeit von 11 Jahren und 4 Monaten [Dravet et al., 2002, Dravet 2011b]. In neuerer Literatur wird eine minimale Mortalitätsrate von 4,4% angegeben. Die häufigste Todesursache hierbei ist der sog. SUDEP (sudden unexpected death in epileptic patients), gefolgt von Status epilepticus [Dravet 2011a].

Ein großer Anteil der Fälle weist eine positive Familienanamnese hinsichtlich Epilepsie oder Fieberkrämpfen auf. Der Anteil wird meist mit ca. 25% angegeben, variiert aber stark (Ohki et al., 1997). Verwandte von Patienten mit Dravet-Syndrom haben Epilepsien mit Charakteristika von genetischen generalisierten Epilepsien. Einige Publikationen berichten über Anfälle im GEFS+-Spektrum (GEFS+ = generalized epilepsy with febrile seizures plus) in der Familienanamnese von Patienten mit Dravet-Syndrom [Ohki et al., 1997, Dravet et al., 2002].

Myoklonisch-astatische Epilepsie (MAE)

Die myoklonisch-astatische Epilepsie wurde als eigenständiges Syndrom 1970 von H. Doose beschrieben und wird daher zum Teil auch Doose-Syndrom genannt. Seit der ersten Beschreibung wurden die Kriterien des Syndroms immer weiter herausgearbeitet. Im Jahre 1989 wurde die MAE von der ILAE in ihr Diagnostikschema, als eine der symptomatischen generalisierten Epilepsien aufgenommen. Nach dem Diagnostikschema der ILAE treten die ersten Anfälle der MAE zwischen dem siebten Lebensmonat und dem sechsten Lebensjahr auf. Die Entwicklung der Kinder ist bis zu diesem Zeitpunkt in der Regel unauffällig [Kelley & Kossoff 2010].

Es handelt sich bei der MAE um ein generalisiertes Epilepsiesyndrom mit unterschiedlichen Anfallstypen. Am häufigsten finden sich myoklonische und myoklonisch-astatische Anfälle. Bei den myoklonischen Anfällen kommt es zu isolierten oder sich 2-3 mal wiederholenden generalisierten Zuckungen des Körpers, wobei die proximalen Muskeln stärker betroffen sind als die distalen Muskelgruppen. Es kommt zu einer plötzlichen Flexion des Kopfes und des Rumpfes und dadurch häufig auch zum Sturz. Insbesondere kommt es zu Stürzen, wenn nach der myoklonischen Phase ein Tonusverlust auftritt [Guerrini et al., 2002].

Tonisch-klonische Anfälle sind der zweithäufigste Anfallstyp. Anfangs treten diese Anfälle tagsüber auf, im Verlauf dann aber auch während des Nachtschlafs. Ferner treten Absencen, besonders atypische Absencen, febrile Anfälle und tonische Anfälle auf. Desweiteren können im Krankheitsverlauf Staten, die teils über mehrere Tage anhalten, auftreten. Hierbei kommt es z.B. zu Nickanfällen in dichter Folge, sowie zu geringen Myoklonien der mimischen Muskulatur und der Oberarme [Doose 1998, Guerrini et al., 2002].

Am Anfang der Erkrankung ist die Prognose der MAE schwierig einzuschätzen. Das Spektrum reicht von unauffälliger psychomotorischer Entwicklung, bis hin zu schweren kognitiven Einschränkungen; von Anfallsfreiheit, bis zu schweren, kaum therapierbaren Krampfanfällen. Als prognostisch ungünstig werden ein früher Krankheitsbeginn und der Beginn mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen angesehen. Kinder die nächtliche tonische Anfälle im Verlauf der Erkrankung entwickeln, haben ebenfalls eine schlechtere Prognose als Kinder, die diesen Anfallstyp nicht zeigen. Die Verwendung von ungeeigneten Medikamenten, insbesondere Carbamazepin und Phenytoin kann prolongierte Episoden von myoklonischen Staten sogar bei Kindern mit ansonsten gutem Verlauf und outcome auslösen [Doose 1998, Guerrini et al., 2002, Kelley & Kossoff 2010].

Auch bei der MAE scheinen genetische Faktoren in der Ätiologie eine große Rolle zu spielen. Häufig zeigt sich bei Kindern mit MAE eine positive Familienanamnese bezüglich Epilepsien oder Fieberkrämpfen. Ebenso wurden MAE-Fälle in Familien mit GEFS+-Syndrom beschrieben [Guerrini et al., 2002].

Schwere frühkindliche Epilepsie mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen und alternierendem Hemi-Grand mal – sog. Frühkindliche Grand mal Epilepsie (FKGM)

Die Frühkindliche Grand mal Epilepsie wurde bereits unter vielen Namen beschrieben: "polymorphous convulsive epilepsy beginning in infancy", "severe infantile epilepsy with generalized tonic-clonic seizures and alternating hemi-grand mal", "intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures", "severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures", "polymorphic epilepsy of infants" und "high-voltage slow-wave grand mal". Bisher ist diese Form der Epilepsie noch nicht in die Klassifikation der ILAE aufgenommen worden. Teilweise wird die FKGM als atypische Form des Dravet-Syndroms beschrieben [Arzimanoglou et al., 2004, Dravet 2011a].

Die Erkrankung zeigt ein weitgehend gleichförmiges klinisches Bild in den ersten Jahren nach Krankheitsbeginn. Es betrifft überwiegend bis dahin normal entwickelte Kinder, meist zwischen dem 5. und dem 8. Lebensmonat. Jungen und Mädchen sind ungefähr gleichhäufig betroffen. Der häufigste Anfallsauslöser ist Fieber. Einige Autoren beschreiben eine auffällige Assoziation mit Impfungen [Doose 1998, Doose et al., 1998].

Die Epilepsie beginnt mit häufigen und oft langanhaltenden febrilen oder afebrilen, generalisierten Anfällen. Diese Anfälle sind normalerweise klonisch, können aber auch einen tonisch-klonischen oder klonisch-tonisch-klonischen Verlauf haben [Doose 1998].

In der Studie von Doose et al., 1998 dauerten die Anfälle in 42% der Fälle über 30 Minuten. Die Anfälle sind häufig lateralisiert oder unilateral mit wechselnder Hemisphärenseite von Anfall zu Anfall oder sogar im Verlauf eines Anfalls. Bei einem Viertel der Patienten mit Hemi-Grand mal trat bei der Studie von Doose eine postiktale Parese (meist Hemiparese) auf [Doose et al., 1998].

Polytope Myoklonien sind für die FKGM besonders charakteristisch. Sie sind vor allem in Phasen häufiger generalisiert tonisch-klonischer Anfälle, während febrilen Infekten und unter Behandlung mit Carbamazepin zu beobachten. Ein weiteres Leitsymptom ist eine Beeinträchtigung der kognitiven Entwicklung bald nach Beginn der Erkrankung. Ungefähr zweidrittel der Patienten weisen eine schwere mentale Retardierung auf. Die Mortalitätsrate liegt nach Doose et al. bei ca. 9%, wobei ein früher Beginn der Epilepsie ein großer Risikofaktor zu sein scheint. Genetische Faktoren scheinen bei der FKGM eine große Rolle zu spielen. Bei 24% der Patienten von Doose et al. waren bei Verwandten ersten Grades hirnbedingte Krampfanfälle beschrieben worden. Nach Doose et al. ist ein gemeinsamer genetischer Hintergrund für die FKGM, SMEI, myoklonisch-astatische Epilepsie und die frühkindliche Absence Epilepsie wahrscheinlich. Allerdings scheint die Familienanamnese nicht ausreichend um einen genetischen Zusammenhang abzuschätzen, sondern diese Annahme basiert vor allem auf den durchgeführten EEG-Ableitungen von Patienten und Angehörigen. Initial ist das EEG der Patienten typischerweise normal, trotz häufiger Anfälle. Es zeigen sich aber EEG-Marker einer genetischen Prädisposition bei Patienten und Verwandten.

Eine große Überlappung mit anderen Formen von frühkindlicher genetischer Epilepsie ist erkennbar. Das Auftreten von myoklonischen oder myoklonisch-astatischen Anfällen stellt sogar einen Übergang zur schweren myoklonischen Epilepsie bzw. zur Myoklonisch-astatischen Epilepsie dar [Doose et al., 1998].

1.1.2 Genetik epileptischer Anfälle und Syndrome

Ungefähr 40% aller Epilepsiefälle sind genetische (früher: idiopathische) Epilepsien. Strukturell-metabolische und vermutlich strukturell-metabolische Epilepsien machen daher einen Anteil von ca. 60% aus. Ursachen der Epilepsien können dabei sein: Trauma, perinatale Schädigung, Schlaganfall, durch Infektionen hervorgerufene Läsionen, Tumore oder eine genetische Grunderkrankung die mit epileptischen Anfällen als begleitendes Symptom einhergeht (z.B. tuberöse Sklerose). Bei knapp der Hälfte aller Epilepsien sind keine spezifischen Ursachen bekannt, teils wegen ungenügender Nachforschungen, teils aber auch trotz genauer Untersuchungen.

Die genetischen Epilepsien bilden mit den Epilepsien, die ein Symptom einer übergeordneten genetischen Erkrankung darstellen, zusammen die "genetisch bedingten Epilepsien" mit einem Anteil von ca. 40% aller Fälle mit definierter Ursache. In einigen Fällen gibt es Hinweise auf eine Interaktion von genetischen und Umwelteinflüssen. So sind genetische Faktoren nur selten allein für die Pathogenese bestimmend, ebenso wie Läsionen nicht immer die alleinige Ursache einer Epilepsie darstellen. Häufig stellt sich bei Patienten deren Epilepsie als genetisch eingestuft wurde, bei näherer Untersuchung mit Hilfe von EEG und bildgebenden Verfahren heraus, dass hirnorganische Schäden nachweisbar sind. Ebenso zeigen sich bei EEG-Familienuntersuchungen, dass bei strukturell-metabolischen Epilepsien genetische Faktoren eine Rolle spielen können. Häufig sind nicht nur bei den Patienten selbst, sondern auch bei Angehörigen Merkmale einer genetischen Anfallsbereitschaft im EEG feststellbar. Generell scheint das noch unreife Gehirn anfälliger für Krampfanfälle zu sein. Einige Epilepsieformen beginnen im Kindesalter und die Anfallshäufigkeit wird geringer je älter die Kinder werden. Häufig sistieren die Anfälle bis zum Erwachsenenalter völlig. Bestimmte Epilepsieformen sind in ganz bestimmten Altersabschnitten zu beobachten. Es scheint, dass eine komplexe Wechselwirkung zwischen Ursache (genetisch und/oder umweltbedingt) und der dynamischen Reifung des Gehirns die vielen menschlichen Epilepsiephänotypen bedingt.

Die meisten genetischen Epilepsien folgen einem komplexen Vererbungsmuster.

Nur ca. 1% aller Epilepsiefälle weist eine monogene Vererbung auf. Trotzdem ist die Entdeckung von solchen monogen vererbten Epilepsien, oft ausgelöst durch Ionenkanalmutationen, einer der größten Fortschritte in der letzten Zeit. Sie können Anhaltspunkte für die Ursache der häufigeren genetischen familiären Epilepsien bilden, da die selben genetischen Mechanismen an der Entstehung dieser komplex vererbten Epilepsien beteiligt zu sein scheinen [Doose, 1998, Robinson & Gardiner, 2000, Berkovic et al., 2006, Poduri & Lowenstein 2011, Meisler & O'Brien 2012].

Identifizierte Gendefekte, die eine Epilepsie verursachen

In der Vergangenheit wurden einige Gendefekte als Ursache von Epilepsien beschrieben. Insbesondere handelte es sich hierbei um Defekte in Genen von Ionenkanälen. Mutationen wurden in spannungsabhängigen (besonders K⁺ und Na⁺-) Kanälen und in ligandenvermittelten Kanälen (besonders *GABA_A*-Rezeptor- und nikotinische ACh-Rezeptor-Kanälen) beschrieben. Das bis jetzt wichtigste entdeckte "Epilepsie-Gen" ist *SCN1A*, welches für eine Na⁺-Kanal-Untereinheit kodiert. Mehrere missense-Mutationen dieses Gens wurden in Familien mit GEFS+-Syndrom gefunden. Schwerere Mutationen im *SCN1A*-Gen – besonders solche, die zu einem Proteinabbruch führen – wurden bei Patienten mit Dravet-Syndrom gefunden [Berkovic et al., 2006]. Die Tabelle von Poduri und Lowenstein zeigt die Vielfalt der Gene mit den assoziierten Epilepsiesyndromen [Poduri & Lowenstein 2011].

Tabelle 1 aus Poduri & Lowenstein 2011		Genes associated with epilepsy syndromes.		
Gene	Associated epilepsy syndrome(s)			
ARX	Infantile spasms			
	Early infantile epileptic encephalopathy			
ATP1A2	Benign familial infantile convulsions			
	Familial hemiplegic migraine and epilepsy			
CACNA1A	Absence epilepsy and episodic ataxia			
CACNB4	Juvenile myoclonic epilepsy			
CDKL5	Infantile spasms			
(<i>STK9</i>)				
CHRNA4	Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy			
CHRNB2	Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy			
CHRNA7	Juvenile myoclonic epilepsy			

CLCN2	Childhood absence epilepsy
	Juvenile absence epilepsy
	Juvenile myoclonic epilepsy
EFHC1	Juvenile myoclonic epilepsy
GABRD	Genetic epilepsy with febrile seizures plus
GABRA1	Juvenile myoclonic epilepsy
GABRG2	Childhood absence epilepsy
	Genetic epilepsy with febrile seizures plus
KCNQ2	Benign familial neonatal convulsions
KCNQ3	Benign familial neonatal convulsions
KCNMA1	Generalized epilepsy with paroxysmal dyskinesia
LGI1	Autosomal dominant parial epilepsy with auditory features
PCDH19	Epilepsy in females with mental retardation
SCN1A	Genetic epilepsy with febrile seizures plus
	Severe myoclonic epilepsy of infancy (Dravet syndrome)
SCN1B	Genetic epilepsy with febrile seizures plus
SCN2A	Benign familial neonatal/infantile convulsions
	Genetic epilepsy with febrile seizures plus
SLC2A1	Early-onset absence epilepsy
	Epilepsy with paroxysmal exercise-induced dyskinesia
STXBP1	Early infantile epileptic encephalopathy
	Partial onset epilepsy with intellectual disability
TBC1D24	Familial infantile myoclonic epilepsy
	Focal epilesy with developmental disability

Im Folgenden sollen die genetischen Zusammenhänge der für diese Arbeit relevanten Anfallsformen und Syndrome beschrieben werden.

Genetik der Fieberkrämpfe (FS)

Fieberkrämpfe (FS = Febrile Seizure) sind die häufigsten epileptischen Anfälle im Kindesalter. 2-5% aller Kinder erleiden bis zu ihrem 5. Lebensjahr einen Fieberkrampf. Charakteristisch für diese Anfallsform ist, dass sie durch Fieber ausgelöst wird und zwischen dem 6. Lebensmonat und dem 6. Lebensjahr stattfindet. Die Prognose ist normalerweise sehr gut, allerdings haben Patienten, die einen Fieberkrampf hatten, ein etwas höheres Risiko einen afebrilen Anfall zu entwickeln.

Fieberkrämpfe treten sporadisch auf, aber auch ein genetischer Hintergrund spielt bei dem Auftreten von Fieberkrämpfen eine Rolle [Dubé et al., 2012].

Bei 25-40% der Patienten mit Fieberkrämpfen ist eine positive Familienanamnese eruierbar. Bei Stammbaumanalysen wird die genetische Komponente der Fieberkrämpfe sichtbar. So zeigen z.B. Zwillingsstudien eine höhere Konkordanz bei eineiigen Zwillingen, als bei zweieiigen Zwillingen. Ferner zeigt sich für ein Kind dessen Eltern beide Fieberkrämpfe hatten, im Gegensatz zu Fieberkrämpfen bei einem Elternteil, eine Verdopplung des Risikos selbst einen Fieberkrampf zu erleiden. Trotz dieser klaren Anzeichen einer genetischen Basis von Fieberkrämpfen, ist der Vererbungsmodus bisher ungeklärt. Es gibt verschiedene Ansätze von unterschiedlichen Autoren. Einige sprechen von polygener Vererbung – also einem multifaktoriellen Geschehen – andere von autosomal rezessiver Vererbung oder von autosomal dominanten Erbgängen mit unvollständiger Penetranz. Es gibt Hinweise darauf, dass in Familien von Probanden mit einem einzelnen febrilen Anfall die polygene Vererbung der wahrscheinlichste Vererbungsmodus sein könnte. Wohingegen in Familien mit wiederholten Fieberkrampfepisoden die autosomal dominante Vererbung die größte Rolle zu spielen scheint [Nakayama & Arinami, 2006].

Es wurden bereits mehrere Genloci beschrieben, die mit Fieberkrämpfen in Zusammenhang gebracht werden können (*FEB1 – FEB6*) [Nakayama & Arinami, 2006]. Auch Mutationen in Natriumkanalgenen und *GABA*-Rezeptorgenen, sowie in *HCN*-Kanalgenen wurden im Zusammenhang mit Fieberkrämpfen beschrieben [Dubé et al., 2012].

Genetik des GEFS+-Syndroms

Das GEFS+-Syndrom (GEFS+ = generalized epilepsy with febrile seizures plus) wurde erstmals 1997 von Scheffer und Berkovic [Scheffer und Berkovic, 1997] beschrieben. Das Spektrum dieses Syndroms beinhaltet Phänotypen von Fieberkrämpfen und Fieberkrämpfen plus (FS+) bis hin zur Myoklonisch-astatischen Epilepsie (MAE). Patienten mit FS+ haben in der Kindheit multiple Fieberkrämpfe und im Gegensatz zu den typischen Fieberkrämpfen persistieren diese bis über das 6. Lebensjahr hinaus oder es kommen afebrile Anfälle hinzu. Im GEFS+-Spektrum finden sich diese FS+ zusammen mit Absencen, myoklonischen Anfällen und atonischen Anfällen. Den schwerwiegendsten Phänotyp im GEFS+-Spektrum bildet die MAE. Die Beschreibung von Scheffer und Berkovic beruht auf den Informationen und Untersuchungen einer Familie mit 2000 Familienmitgliedern. Der Vererbungsmodus konnte hier klar als autosomal-dominant eingestuft werden. Bisher wurden Natriumkanal-Gene und *GABA*-Rezeptorgene mit GEFS+ in Verbindung gebracht: *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN1B* und *GABRG2*, sowie *GABRD* [Tan et al., 2012]. Zusätzlich wurde ein Locus im Chromosom 2q24 gefunden; das ursächliche Gen konnte jedoch noch nicht identifiziert werden [Audenaert et al., 2005]. Screenings dieser Gene als Kandidaten für die Ursache von GEFS+ oder FS wurden in verschiedenen Populationen durchgeführt. Die Ergebnisse beschreiben, dass Mutationen im *SCN1A*- und *SCN1B*-Gen für ca. 17% der familiären GEFS+-Fälle verantwortlich sind [Scheffer und Berkovic, 1997, Audenaert et al., 2005, Nakayama & Arinami, 2006, Tan et al., 2012].

Genetik des Dravet-Syndroms

Die Assoziation des Dravet-Syndroms mit febrilen Anfällen lässt einen genetischen Zusammenhang mit dem GEFS+-Syndrom vermuten. So wurden Untersuchungen des *SCNIA*-Gens auch bei Patienten mit Dravet-Syndrom durchgeführt. Die erste Studie diesbezüglich wurde 2001 von Claes et al. [Claes et al., 2001] an einer kleinen Gruppe von 7 Patienten mit Dravet-Syndrom durchgeführt. Dabei ergab sich, dass jeder Patient dieser Studiengruppe eine de novo-Mutation im *SCNIA*-Gen aufwies. In den folgenden Jahren wurden weitere Untersuchungen des *SCNIA*-Gens gemacht und mittlerweile sind über 500 verschiedene *SCNIA*-Mutationen bei Patienten mit Dravet-Syndrom beschrieben worden. Der Prozentsatz der Patienten mit Dravet-Syndrom, die eine *SCNIA*-Mutation aufweisen, variiert in den verschiedenen Studien zwischen 33% und 100% [Claes et al., 2001, Mulley et al., 2005, Nakayama & Arinami, 2006]. Aktuell wird die Häufigkeit von Veränderungen im *SCNIA*-Gen bei Patienten mit Dravet-Syndrom mit 70-80% angegeben [Marini et al., 2011]. Ungefähr 40% der Patienten weisen eine Mutation auf, welche zu einem Proteinabbruch führt. Diese Mutationen haben eine signifikante Korrelation mit einem frühen Beginn der Epilepsie.

Bei den meisten Mutationen handelt es sich um de novo-Mutationen. In 5-10% der Fälle ist auch bei anderen Familienmitgliedern eine Mutation nachweisbar. Diese Familienmitglieder haben in der Regel einen milden Phänotyp im Rahmen des GEFS+-Spektrums. Zum Teil lässt sich die Phänotypvariabilität durch Mosaikbildung erklären. Auch modifizierende Gene, Effekte des genetischen Hintergrunds und variable funktionale Effekte von *SCN1A*-Mutationen werden für die unterschiedliche Ausprägung des Krankheitsbildes verantwortlich gemacht [Marini et al., 2011]. Bei einem kleinen Anteil weiblicher Patienten mit einem Dravet-Syndrom-ähnlichem Krankheitsbild, wurden Mutationen im Protocadherin-19-Gen (*PCDH19*) gefunden. Die Vererbung dieser Erkrankung ("epilepsy limited to females with mental retardation") erfolgt x-chromosomal. Betroffen sind heterozygote Frauen; hemizygote Männer sind gesunde Überträger der Erkrankung. Der zugrundeliegende Pathomechanismus scheint eine sogenannte zelluläre Interferenz zu sein. Das heißt, dass die Störung nur klinisch wirksam wird, wenn im gleichen Patienten Zellen mit Mutation und Zellen ohne Mutation zu finden sind. Diese Hypothese wird unterstüzt durch den Nachweis einer *PCDH19*-Mutation als Mosaik bei einem klinisch betroffenen männlichen Patienten. Eine Mutation im *PCDH19*-Gen wird in ca. 5 % der Patienten mit Dravet-Syndrom für das Krankheitsbild verantwortlich gemacht [Marini et al., 2011, Depienne et al., 2009, Depienne et al., 2012].

Kürzlich konnte bei drei Patienten mit Dravet-Syndrom eine Mutation im *CHD2*-Gen nachgewiesen werden. Dieses Gen kodiert für das Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 2. Bei diesen drei Fällen handelt es sich um eine de novo-Mutation mit resultierendem Funktionsverlust [Suls et al., 2013].

Als sehr seltene Ursache des Dravet-Syndroms werden ferner Mutationen im *GABRG2*-Gen, sowie im *SCN1B*-Gen beschrieben [Marini et al., 2011].

In ca. 20% der Fälle bleibt die Ätiologie des Dravet-Syndroms ungeklärt und wahrscheinlich sind weitere Gene beteiligt [Marini et al., 2011].

Genetik der MAE

In der Erstbeschreibung von Doose et al. wird eine genetische Ätiologie als sehr wahrscheinlich angenommen. In dieser ersten Studie ergab sich eine positive Familienanamnese für Krampfanfälle bei 32% der Patienten. Besonders benigne Anfallsformen wie Fieberkrämpfe oder afebrile generalisierte tonisch-klonische Anfälle waren hierbei zu beobachten. In verschiedenen Studien wird von der MAE immer wieder als der schwersten Anfallsform im GEFS+-Spektrum gesprochen.

Bisher konnten nur selten Genveränderungen bei Patienten mit MAE nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um Mutationen in den Genen *SCN1A*, *SCN1B*, *SCN2A* und *GABRG2* [Scheffer et al., 2001, Guerrini et al., 2002, Ebach et al., 2005, Kelley & Kossoff 2010].

Da Gen-Mutationen bisher nur bei einem kleinen Anteil der MAE-Patienten gefunden werden konnten, sind diese bisher nicht als Hauptursache für die Entstehung einer MAE anzusehen [Kelley & Kossoff 2010].

Genetik der FKGM

Von einigen Autoren wird die Vermutung eines genetischen Zusammenhangs zwischen GEFS+ und FKGM beschrieben. So wurden Patienten mit FKGM molekulargenetisch untersucht und es fanden sich auch bei diesen Patienten Mutationen im *SCN1A*-Gen. Im Gegensatz zu den Patienten mit Dravet-Syndrom, bei denen frameshift-, nonsense- und missense-Mutationen beschrieben wurden, fanden sich bei den Patienten mit FKGM bisher lediglich missense-Mutationen. Die Positionen dieser Mutationen sind denen der Dravet-Syndrom-Patienten sehr ähnlich, was einen genetischen Zusammenhang zwischen dem Dravet-Syndrom und der FKGM andeutet [Fujiwara et al., 2003, Rhodes et al., 2005]. Diese Vermutung wird auch unterstützt durch eine ähnliche Häufigkeit von *SCN1A*-Mutationen bei Patienten mit Dravet-Syndrom und FKGM [Marini et al., 2011].

Im Folgenden sollen die für diese Arbeit wichtigen Natriumkanäle, mit ihren bisher bekannten Mutationen, näher beschrieben werden.

1.2 Spannungsabhängige Natriumkanäle (SCN)

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind essentiell für die Initiation und die Ausbreitung von Aktionspotentialen in Neuronen. Den Hauptteil des Natriumkanals bildet die alpha-Untereinheit, welche ein großes Transmembranprotein mit ca. 2000 Aminosäuren darstellt. Die alpha-Untereinheit besteht aus vier homologen Domänen, welche in der Membran eine natriumpermeable Pore bilden, durch die Natriumionen während der Ausbreitung eines Aktionspotentials in Richtung des Konzentrationsgefälles fließen. (Abbildung 1) Durch die Aktivierung von ATP-Natrium/Kalium-Pumpen anschließend abhängigen wird der transmembrane Natriumgradient wiederhergestellt.

Die porenbildende alpha-Untereinheit ist alleine funktionsfähig, wird aber in Bezug auf ihre Kinetik und Spannungsabhängigkeit von einer oder mehreren beta-Untereinheiten (beta 1 – beta 4) beeinflusst. Diese beta-Untereinheiten sind kleine

Transmembranproteine mit einer einzigen extrazellulären IgG-Schleife und einem kurzen intrazellulären C-Ende. (Abbildung 1)

Insgesamt sind 9 verschiedene alpha-Untereinheiten bekannt (SCN1A-SCN5A und SCN8A-SCN11A), wovon vier hauptsächlich im Zentralnervensystem exprimiert werden SCN3A. SCN8A). Die (SCN1A, SCN2A. Genabschnitte sind evolutionär hochkonserviert, sodass man bei unterschiedlichen Spezies nahezu identische Genabschnitte findet. Ebenso entsprechen sich bestimmte Genabschnitte der spannungsabhängigen Natriumkanäle untereinander, da sie während der Evolution durch Verdopplung entstanden sind. Die meisten Neurone des Zentralnervensystems scheinen alle vier Kanäle in unterschiedlichen Anteilen zu exprimieren. Obwohl die biochemische Kanalaktivität aller vier Kanäle in vitro sehr ähnlich ist, zeigen Mausmodelle dass in vivo auf keinen dieser Kanäle verzichtet werden kann. Mäuse die einen der Kanäle nicht exprimieren, sind nicht lebensfähig. Das heißt, dass die Kanäle obwohl sie sehr ähnlich funktionieren, im lebenden Organismus einen unterschiedlichen Aufgabenbereich haben müssen [Meisler et al., 2004, Meisler & Kearney, 2005, Oliva et al., 2012].



Abbildung 1: Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Natriumkanals (modifiziert nach Meisler & Kearney, 2005). Die 4 homologen Domänen der alpha-Untereinheit sind mit D1 bis D4 beschriftet. Innerhalb der einzelnen Domänen sind beispielhaft in D2 - die transmembranen Segmente mit S1 bis S6 gekennzeichnet. Jeweils mit der Schleife zwischen S5 und S6 wird die Pore gebildet. Der Spannungssensor ist mit + gekennzeichnet und liegt jeweils im Segment S4. Neben der alpha-Untereinheit ist eine beta-Unterheinheit mit einer extrazellulären IgG-Schleife und einem kurzen intrazellulären C-Ende dargestellt.

1.2.1 <u>SCN1A</u>

Das *SCN1A*-Gen befindet sich (wie *SCN2A* und *SCN3A*) auf dem Chromosom 2q24 und umfasst 26 Exone. Es ist das bisher bestuntersuchte und klinisch relevanteste Natriumkanalgen. Mutationen in diesem Gen wurden bei Patienten mit Dravet-Syndrom, MAE, FKGM und GEFS+-Syndrom gefunden. Während bei Patienten mit GEFS+-Syndrom vor allem missense-Mutationen gefunden wurden, waren bei Patienten mit Dravet-Syndrom besonders nonsense-Mutationen oder frameshift-Mutationen, die zu einem Proteinabbruch führen, festzustellen [Mulley et al., 2005]. Catterall spricht von einer Hypothese, nach der der Schweregrad der Erkrankung mit dem Schweregrad der Mutation zusammenhängt [Catterall, 2012]. Je mehr Funktionsverlust durch die Mutation auftritt, desto schwerer die Erkrankung. Nach seiner Meinung führen missense-Mutationen, die eine geringe Störung der Natriumkanalfunktion zur Folge haben zu Fieberkrämpfen. Eine moderate oder schwere Störung des Natriumkanals führt demnach zu Krankheitsbildern im Sinne des GEFS+-Syndroms und Mutationen, die einen kompletten Funktionsverlust zur Folge haben führen zum Dravet-Syndrom; jeweils mit fließendem Übergang [Catterall, 2012].

Die meisten beschriebenen Mutationen sind de novo entstanden. Dies zeigt die Wichtigkeit der Beachtung von Mutationen in der Ätiologie von neurologischen Erkrankungen sogar ohne positive Familienanamnese [Mulley et al., 2005].

Es wurden einige funktionelle Untersuchungen von *SCN1A*-Mutationen durchgeführt. Die funktionellen Analysen sind technisch schwierig und unterschiedliche Untersuchungsansätze haben verschiedene Ergebnisse erbracht. Zusätzlich ist fraglich, inwieweit solche Untersuchungen auf in vivo-Effekte übertragbar sind. Trotzdem sind einige interessante Aspekte auf Grundlage dieser funktionellen Untersuchungen beschrieben worden.

Ein beschriebener Effekt ist eine Störung der Kanalinaktivierung, was zu einem länger anhaltenden Ionenfluss führt. Normalerweise öffnen sich die spannungsabhängigen Natriumkanäle schnell als Antwort auf das veränderte Membranpotential und schließen schnell wieder, sodass innerhalb weniger Millisekunden der Fluss auf 1% des maximalen Flusses gesenkt wird.

Bei drei verschiedenen GEFS+-Mutationen wurde ein persistierender Fluss von 2-5% des maximalen Flusses gemessen. Dieser persistierende Fluss bewirkt im Neuron eine herabgesetzte Depolarisationsschwelle, was zu Hyperexzitabilität führt.

Ein anderer beschriebener funktioneller Effekt bei einer GEFS+-Mutation ist ein Mechanismus, bei dem der Kanal kürzer im inaktivierten Stadium bleibt. In diesem Fall kann der Kanal schneller wieder als Antwort auf eine Depolarisation geöffnet werden. Auch dieser Mechanismus führt zu Hyperexzitabilität.

Die beschriebenen Mechanismen deuten an, dass sowohl verstärkte *SCN1A*-Aktivität, als auch reduzierte Kanalaktivität hirnbedingte Krampfanfälle auslösen kann [Meisler & Kearney, 2005].

1.2.2 <u>SCN2A</u>

Das *SCN2A*-Gen befindet sich (wie *SCN1A* und *SCN3A*) auf dem Chromosom 2q24 und umfasst 27 Exone.

Dieses Gen kodiert für den spannungsabhängigen Natriumkanal $Na_v 1.2$. Der Kanal findet sich vor allem im Bereich unmyelinisierter Axone. Kommt es zur Demyelinisierung von Neuronen, z.B. infolge einer Multiplen Sklerose, sind neben den in myelinisierten Neuronen zu erwartenden $Na_v 1.6$, erstaunlicherweise auch $Na_v 1.2$ nachweisbar. Anscheinend wird dieser Kanal erneut exprimiert, wenn ein Nerv demyelinisiert wird [Craner et al., 2004].

Obwohl sich das *SCN1A*- und das *SCN2A*-Gen in Bezug auf Größe und Exonanordnung sehr ähnlich sind, wurden im *SCN2A*-Gen bisher nur sehr wenige Mutationen, die mit Epilepsie assoziiert sind, gefunden. Teilweise kann dieses Phänomen durch die Tatsache erklärt werden, dass eine größere Anzahl Patienten auf *SCN1A*-Mutationen hin untersucht wurde.

Die meisten Mutationen im *SCN2A*-Gen wurden bei Patienten mit benignen familiären neonatal-infantilen Anfällen (BFNIS) beobachtet [Heron et al., 2002, Berkovic et al., 2004, Herlenius et al., 2007, Shi et al., 2012]. Eine beschriebene *SCN2A*-Mutation bei einer Familie mit benignen familiären infantilen Anfällen (BFIS) legt einen Zusammenhang des genetischen Hintergrundes der beiden Syndrome nahe. Auch ist eine Überschneidung der klinischen Merkmale der beiden Syndrome feststellbar [Striano et al., 2006].

Bezüglich frühkindlicher myoklonischer Epilepsien, wurde bei einem Patienten mit einer dem Dravet-Syndrom ähnlichen Epilepsie eine Mutation, die zu einem Proteinabbruch führt, gefunden [Kamiya et al., 2004]. Ebenso wurde eine Genveränderung bei einem Patienten mit Fieberkrämpfen und afebrilen Anfällen beschrieben [Sugawara et al., 2001]. In einer Studie von Shi et al. 2009 wurden 3 neue Mutationen im SCN2A-Gen bei Patienten mit Dravet-Syndrom gefunden. Bei zwei dieser Patienten wurde zeitgleich eine Mutation im SCN1A-Gen gefunden [Shi et al., 2009]. Im Verlauf konnten Shi et al. erneut eine Mutation im SCN2A-Gen bei einem Patienten mit Dravet-Syndrom nachweisen [Shi et al., 2012]. Weitere Mutationen im SCN2A-Gen wurden bei Patienten mit Anfällen im GEFS+-Spektrum [Liao et al., 2010b, Shi et al., 2012], mit sporadischen infantilen Spasmen, mit epileptischer Enzephalopathie des Neugeborenen [Ogiwara et al., 2009], mit akuter Enzephalitis mit refraktären, repetitiven fokalen Anfällen [Kobayashi et al., 2012], sowie mit wandernden fokalen Anfällen im Kindesalter ("migrating focal seizures of infancy") [Dhamija et al., 2013] nachgewiesen. Liao et al. beschrieben ebenfalls eine Mutation im SCN2A-Gen, wobei das Krankheitsbild mit Anfällen mit Beginn in der Neonatalzeit, Episoden mit Ataxie, Myoklonien, Kopfund Rückenschmerzen, keinem Epilepsiesyndrom zugeordnet werden konnte [Liao et al., 2010a]. Eine weitere Studie analysierte das SCN2A-Gen bei Familien mit autistischen Familienmitgliedern. Auch hier konnte eine neue Mutation gefunden werden [Weiss et al., 2003].

Die Tabelle 2 zeigt alle zur Zeit bekannten Mutationen im SCN2A-Gen bzüglich Epilepsie.

Mittels Array-CGH, einem Verfahren, bei dem das Genom eines Menschen mit einer unauffälligen Referenzprobe verglichen wird, konnten ebenfalls Veränderungen im *SCN2A*-Gen bei Patienten mit Epilepsie festgestellt werden. Technisch bedingt können mittels Array-CGH nur Deletionen oder Duplikationen, nicht aber balancierte Stukturaberrationen, nachgewiesen werden.

So wurden Duplikationen im Chromosom 2q24 mit einer Größe von ca. 1.5 Mb bis zu 12 Mb gefunden, welche die Gene *SCN2A*, *SCN3A* und teilweise *SCN1A* umfassen. Klinisch zeigten die Patienten neonatale und frühkindliche Anfälle, geistige Behinderung, bis hin zu einem Epilepsietyp mit Charakteristika von BFNIS und Dravet-Syndrom [Heron et al., 2010, Raymond et al., 2011, Okumura et al., 2011, Vecchi et al., 2011, Lim et al., 2013]. Teils waren die beschriebenen Duplikationen de novo entstanden [Okumura et al., 2011, Vecchi et al., 2011], teils wurde die Veränderung an klinisch ebenfalls betroffene Kinder weitervererbt [Heron et al., 2010], oder es zeigte sich bei einem Elternteil ein Mosaikbild [Raymond et al., 2011], oder eine balancierte insertionelle Translokation [Lim et al., 2013].

Deletionen im Chromosom 2q24, welche die Gene *SCN2A*, *SCN3A* und teils *SCN1A* betreffen, wurden bei Patienten mit Autismus, Entwicklungsverzögerung, neurologischen und psychiatrischen Auffälligkeiten, Mikrozephalie, Gehirnanomalien, Ohrfehlbildungen, Mikrognathie, Brachysyndaktylie, neuromuskulärer Skoliose, sowie frühkindlichen Anfällen und Dravet-Syndrom, sowie Dravet-Syndrom-ähnlicher Epilepsie beschrieben [Davidsson et al., 2008, Chen et al., 2010, Krepischi et al., 2010, Bartnik et al., 2011, Nimmakayalu et al., 2012].

Tabelle 2:	Cabelle 2:Bekannte Mutationen im SCN2A-Gen bezüglich Epilepsie			
Mutation	Krankheitsbild	Vererbung	Referenz	
R102X	Dravet-Syndrom-ähnliche Epilepsie, mentale Retardierung, autistische Züge, moderate diffuse Hirnatrophie	De novo	Kamiya et al., 2004	
R188W	Fieberkrämpfe und afebrile Anfälle	Vater die gleiche <i>SCN2A</i> - Mutation	Sugawara et al., 2001	
R223Q	BFNIS	Insgesamt 11 Familienmitglieder (inkl. Mutter) die gleiche <i>SCN2A</i> - Mutation	Berkovic et al., 2004	
M252V	BFNIS	Mutter und Großvater die gleiche <i>SCN2A</i> -Mutation	Shi et al., 2012, Liao et al., 2010b	
V261M	BFNIS	De novo	Shi et al., 2012, Liao et al., 2010b	
A263V	Anfälle mit Beginn in der Neonatalzeit, Episoden mit Ataxie, Myoklonien, Kopf- und Rückenschmerzen	De novo	Liao et al., 2010a	
D322N	SMEI	Zusätzlich Mutation im SCN1A-Gen Mutter die gleiche SCN2A- Mutation	Shi et al., 2009	
F328V	SMEB	Zusätzlich Mutation im SCN1A-Gen Mutter die gleiche SCN2A- Mutation	Shi et al., 2009	
E430Q	BFNIS	Insgesamt 16 Familienmitglieder (inkl. Vater) die gleiche <i>SCN2A</i> - Mutation	Herlenius et al., 2007	
D649N	Dravet-Syndrom	Data not published	Shi et al., 2012	
V892I	BFNIS	Insgesamt 4 Familienmitglieder (inkl. Mutter) die gleiche SCN2A- Mutation (ursprüngliche Probandin keine Mutation)	Berkovic et al., 2004	
N1001K	BFIS	Vater die gleiche <i>SCN2A</i> - Mutation	Striano et al., 2006	

L1003I	BFNIS	Insgesamt 3 Familienmitglieder (inkl. Vater) die gleiche <i>SCN2A</i> - Mutation	Berkovic et al., 2004
M1128T	Akute Enzephalitis mit refraktären, repetitiven fokalen Anfällen	Eltern nicht getestet	Kobayashi et al., 2012
E1211K	Sporadische infantile Spasmen	De novo	Ogiwara et al., 2009
R1312T	SMEI	De novo	Shi et al., 2009
R1319Q	BFNIS	 3 Familien: 2 Familienmitglieder (inkl. Mutter) 5 Familienmitglieder (inkl. Mutter) 5 Familienmitglieder (inkl. Vater) die gleiche SCN2A-Mutation 	Berkovic et al., 2004
V1326D	Migrating focal seizures of infancy	De novo	Dhamija et al., 2013
L1330F	BFNIS	Insgesamt 4 Familienmitglieder (inkl. Mutter) die gleiche <i>SCN2A</i> - Mutation	Heron et al., 2002
I1473M	epileptische Enzephalopathie des Neugeborenen	De novo	Ogiwara et al., 2009
L1563V	BFNIS	Insgesamt 6 Familienmitglieder (inkl. Mutter) die gleiche <i>SCN2A</i> - Mutation	Heron et al., 2002
115965	BFNIS	Insgesamt 8 Familienmitglieder (inkl. Vater) die gleiche <i>SCN2A</i> - Mutation (ursprüngliche Probandin keine Mutation)	Herlenius et al., 2007
R1902C	Autismus	Vater die gleiche <i>SCN2A</i> - Mutation	Weiss et al., 2003
R1918H	GEFS+	Eltern bereits verstorben, erkrankte Nichte ohne Mutation	Shi et al., 2012, Haug et al., 2001

1.2.3 <u>SCN3A</u>

Das *SCN3A*-Gen befindet sich (wie *SCN1A* und *SCN2A*) auf dem Chromosom 2q24 und umfasst 28 Exone.

Das *SCN3A*-Gen ist bisher wenig untersucht. Es kodiert für den spannungsabhängigen Natriumkanal Na_v 1.3. Dieser Kanal wird hauptsächlich im Anfangsstadium der Entwicklung in verschiedenen Nervenzellen exprimiert und ist im erwachsenen Nervensystem kaum zu finden. Allerdings wird er nach verschiedenen Arten der Nervenverletzung erneut exprimiert und wurde daher in Bezug auf verschiedene neuropathische Schmerzmodelle untersucht [Cummins et al., 2001, Rogers et al., 2006, Siqueira et al., 2009]. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer vermehrten Expression von Na_v 1.3 bei unterschiedlichen Nervenschäden wie Spinalnerven-Ligatur, chronischer Konstriktionsverletzung, Einzelnervenverletzung, diabetischer Neuropathie und post-herpetischer Neuralgie kommt. Dabei ist interessant, dass Na_v 1.3 der einzige spannungsabhängige Natriumkanal ist, der nach Nervenschädigung vermehrt exprimiert wird. Alle anderen spannungsabhängigen Natriumkanäle werden vermindert exprimiert. Die Untersuchungen zeigen, dass es zu vermehrter Expression von Na_v 1.3 auf mehreren Ebenen kommt. Gefunden wurden diesbezüglich Nervenabschnitte mit erhöhter Na_v 1.3-Expression im Bereich der sensorischen Nervenbahnen, der weißen Substanz des Rückenmarks, der Hinterhornwurzel, tiefer Laminae des Vorder- und Hinterhorns und außerdem der lateralen und medialen Nuclei ventroposteriores des Thalamus. Dementsprechend wird angenommen, dass dieser Kanal eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Phantomschmerzen, Allodynie und Neuralgien spielt [Cummins et al., 2001, Rogers et al., 2006, Waxman & Hains, 2006].

Bezüglich Epilepsie wurde bisher nur eine Mutation im *SCN3A*-Gen bei einem Patienten mit kryptogener fokaler Epilepsie des Kindesalters beschrieben [Holland et al., 2008, Oliva et al., 2012]. Im Verlauf wurden funktionelle Untersuchungen dieser Mutation durchgeführt. Es zeigten sich ein persistierender und erhöhter Fluss, sowie eine erniedrigte Depolarisationsschwelle. Außerdem konnten spontane Depolaristationen nachgewiesen werden. Diese Mechanismen können erklären, warum die betreffende Mutation zu hirnbedingten Krampfanfällen führen kann [Estacion et al., 2010].

Yu et al beschreiben bei Patienten mit fokal koritkaler Dysplasie Typ IIb eine vermehrte Expression von Na_v 1.3, sowie eine spezifische Verteilung des Proteins in den Läsionen des Hirngewebes. Dadurch kann ein Zusammenhang zwischen Na_v 1.3 und der Generation von epileptischer Aktivität bei Patienten mit fokal-kortikaler Dysplasie Typ IIb vermutet werden [Yu et al., 2012].

Die beschriebenen Deletionen oder Duplikationen im Chromosom 2q24, die durch Untersuchung mittels Array-CGH gefunden wurden, betreffen meist das gesamte *SCN*-Gen-Cluster (siehe Kapitel *SCN2A*).

Tabelle 3:	Bekannte Mutationen im SCN3A-Gen bezüglich Epilepsie				
Mutation	Krankheitsbild Vererbung Referenz				
K354Q	kryptogene fokale Epilepsie des Kindesalters	Vater die gleiche <i>SCN3A</i> - Mutation	Holland et al., 2008		

1.2.4 <u>SCN8A</u>

Das SCN8A-Gen befindet sich auf dem Chromosom 12q13 und umfasst 27 Exone.

Auch das SCN8A-Gen ist, in Bezug auf Epilepsie, ein bisher wenig untersuchtes Gen eines spannungsabhängigen Natriumkanals. Es kodiert für den Kanal Nav 1.6. Dieser ist weit über das zentrale und periphere Nervensystem verteilt und ist dort der hauptsächliche Kanal der Ranvier' Schnürringe in myelinisierten Axonen. Ferner wurde dieser Kanal auch im Bereich von Dendriten, presynaptischen und postsynaptischen Membranen und nicht-myelinisierten Axonen gefunden. Da er sowohl im Bereich der Ranvier' Schnürringe als auch im Bereich der Synapsen gefunden wurde, scheint er Einfluss auf die axonale Weiterleitung und auch auf die synaptische Antwort nehmen zu können [Caldwell et al., 2000]. Versuche an Mäusen zeigen, dass eine Mutation im SCN8A-Gen zu neurologischen Störungen wie Ataxie, Tremor, Lähmungen und Dystonien führt [Plummer et al., 1998, Levin & Meisler, 2004, Meisler et al., 2004]. Mäuse ohne den Natriumkanal Nav 1.6 sind nicht lebensfähig. Es wurden Versuche gemacht, bei denen die Kanalaktivität variiert wurde, um zu testen, mit welcher Kanalaktivität die Mäuse lebensfähig sind, bzw. sich normal entwickeln. Es konnte festgestellt werden, dass eine Kanalaktivität zwischen 6% und 12% der normalen Aktivität ausreicht, um eine normale Lebenserwartung zu erreichen. Ab einer Aktivität zwischen 12% und 50% der normalen Kanalaktivität sind keine Bewegungsstörungen nachweisbar [Meisler et al., 2004]. Da die Aminosäuresequenz des SCN8A-Gens von Menschen zu 98,5% mit der von Mäusen übereinstimmt, kann davon ausgegangen werden, dass Untersuchungen an Mäusen zumindest ansatzweise auch für die Vorgänge im menschlichen Organismus einen Anhaltspunkt geben können [Plummer et al., 1998]. Tatsächlich wurde auch bei einer Studie beim Menschen eine Mutation im SCN8A-Gen bei einem Patienten mit Hirnatrophie, Ataxie und mentaler Retardierung gefunden. Bei der Untersuchung von Familienmitgliedern zeigte sich teils ebenfalls die Mutation klinische Zustand (jeweils heterozygot) wobei der von leichten Verhaltensauffälligkeiten im Sinne eines ADHS bis hin zu dem beschriebenen Patienten mit deutlicher neurologischer Auffälligkeit reichte. Krampfanfälle traten in dieser Familie nicht auf [Trudeau et al., 2006].

Anscheinend wird der Kanal Na_v 1.6 zur Reifung von Photorezeptorzellen benötigt. Wiederum eine Studie an Mäusen zeigte, dass der Ausfall des Kanals zwar nicht zur Degeneration, abnormer Zellausbreitung oder Deprivatation von Sauerstoff oder Nährstoffen führt, wohl aber – auch ohne erkennbares morphologisches Korrelat – die Zellreifung der Photorezeptoren hemmt. Dadurch kommt es bei den betreffenden Mäusen zu einer reduzierten Lichtsensitivität [Cote et al., 2005].

Bezüglich Epilepsie wurden in einer Studie bei Mäusen mit Mutation im *SCN8A*-Gen EEG-Auffälligkeiten gefunden, welche Hinweise auf das Vorliegen einer Absence-Epilepsie geben [Papale et al., 2009]. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie eine angehobene Krampfschwelle bei Mäusen mit Funktionsstörung im Kanal Nav 1.6 beobachtet. Es wurden Mäuse mit Mutation im *SCN1A*-Gen und dadurch aufgetretenem Dravet-Syndrom sowie gleichzeitiger Mutation im *SCN8A*-Gen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Mäuse mit beiden Mutationen eine höhere Krampfschwelle haben, als solche nur mit der *SCN1A*-Mutation. Das *SCN8A*-Gen wird hier als genetischer Modifizierer bei Patienten mit Dravet-Syndrom beschrieben [Martin et al., 2007].

Veeramah et al. gelang kürzlich der Nachweis einer Mutation im *SCN8A*-Gen bei einer Patientin mit schwerer epileptischer Enzephalopathie, mit frühkindlichen Krampfanfällen, autistischen Zügen, geistiger Behinderung, Ataxie und SUDEP (sudden unexplained death in epilepsy) [Veeramah et al., 2012].

Ebenfalls kürzlich wurden mehrere Mutationen im *SCN8A*-Gen bei Patienten mit epileptischer Enzephalopathie, Infantilen Spasmen und Lennox-Gastaut-Syndrom beschrieben [O'Brien & Meisler, 2013].

Tabelle 4:	abelle 4: Bekannte Mutationen im SCN8A-Gen bezüglich Epilepsie			
Mutation	Krankheitsbild	Vererbung	Referenz	
G214D	Infantile Spasmen	De novo	O'Brien & Meisler,	
			2013	
DIS4	Epileptische	De novo	O'Brien & Meisler,	
	Enzephalopathie		2013	
R662C	Epileptische	unbekannt	O'Brien & Meisler,	
	Enzephalopathie		2013	
DIIS1	Epileptische	De novo	O'Brien & Meisler,	
	Enzephalopathie		2013	
L875Q	Lennox-Gastaut-Syndrom	De novo	O'Brien & Meisler,	
			2013	
L1331V	Epileptische	Dominante Vererbung	O'Brien & Meisler,	
	Enzephalopathie	des Vaters mit	2013	
		somatischem Mosaik		
DIIIS6	Epileptische	De novo	O'Brien & Meisler,	
	Enzephalopathie		2013	
N1768D	Schwere epileptische	De novo	Veeramah et al., 2012	
	Enzephalopathie,			
	frühkindliche			
	Krampfanfälle, Autismus,			
	geistige Behinderung,			
	Ataxie, SUDEP			
R1872Q	Epileptische	Unbekannt	O'Brien & Meisler,	
	Enzephalopathie		2013	

2 <u>Materialien und Methoden</u>

Im Folgenden sollen die Materialien und Methoden, welche in dieser Arbeit Anwendung fanden, aufgelistet werden.

2.1 <u>Materialien</u>

Die verwendeten Materialien werden mit Art, Modell und Hersteller und gesonderten Angaben des Herstellers aufgeführt. Die Genbankverweise werden mit den zur Recherche genutzten Homepages angegeben.

2.1.1 <u>Geräte</u>

Gerät	Modell	Hersteller
Genetic Analyser	3100	ABI Prism
Thermocycler	Т 3000	Biometra
power supply	E844	Consort
Wasserbad	WB1	Medingen
Magnetrührer	Monotherm	Variomag
Zentrifuge	Hettich	Mikro 200R
Zentrifuge	Hettich	
PH-Meter	Hanna	PH 211
Mikrowelle	LG	MS-197H
Dry-Block	Techne	DB-2A
Vortexer	Scientific Industries	Vortex Genie 2
Elektronische Pipette	Rainin	EDP3-Plus
Pipetman	Gilson	P10
		P20
		P200
		P1000
Mobile Pipettierhilfe	IBS	Pipetboy acu
Autoklav	Wolf	HV-25
Photometer	Pharmacia-Biotech	Ultrospec1000
Waage	OHAUS	Navigator

2.1.2 <u>Materialien</u>

Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe	07.702.5360	10 µ1
		07.722.5360	10 µl

		07.712.5360	20 µl
		07.752.5360	200µ1
		07.762.5360	1000µ1
Tips LTS	Rainin	RC-L250, lose	250 µl
50 ml Röhrchen	Greiner	227285	
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner	060826-109	0,2 ml
2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt	72,695	2ml
Mikrotiterplatte, U-Form			
96 Vertiefungen	Greiner	650101	
PCR-Platten Natur	Nerbe	04.083.0540	0,2 ml
Verschlussfilm	Roth	H769.1	140X80mm

2.1.3 <u>Chemikalien</u>

Phenol Roti	Roth	38,1
Lichrosolv Wasser	Merck	1,15333
Hi_Di Formamid	ABI Prism	4311320
EtOH absolut	Riedel-de Haen	32205
Proteinkinase K	Sigma	P2308
3100 Pop 6	ABI Prism	4316357
Aqua ad iniectabilia	Braun	2351544
Qiagen Multiplex PCR Kit 1000	Qiagen	206145
10xEDTA Puffer	ABI Prism	402824
Qiaquick PCR Purifikation Kit 250	Qiagen	28106
Triton X-100	Fluka	93420
GeneRTM DNA Ladder	MBI	SM0333
Trichlormethan	Riedel de Häen	32211
Tris	Roth	4855,2
Sucrose	Sigma	S-9378-500G
Big Dye Terminator Cycle		
Sequenzing Kit 1000 Reactions	ABI Prism	4337456
Ethidiumbromid lsg 1%	Roth	2218,1
MgCl2	Sigma	M-8266
EDTA	Sigma	ED4SS
NaCl	Roth	3957,1
Lauryl Sulfate	Sigma	L4509
PeqLab Universal Agarose	PeqLab	35-1020
Natriumacetat	Roth	X891.1
Essigsäure 96%	Riedel de Haen	33206

DNA-Extraktion	Phenol Roti	Roth	38,1
	EtOH absolut	Riedel-de Haen	32205
	Proteinkinase K	Sigma	P2308
	Triton X-100	Fluka	93420
	Trichlormethan	Riedel de Haen	32211
	Tris	Roth	4855,2
	Sucrose	Sigma	S-9378-500G
	MgCl2	Sigma	M-8266
	EDTA	Sigma	ED4SS
	NaCl	Roth	3957,1
	Natriumacetat	Roth	X891.1
	Lauryl Sulfate	Sigma	L4509
PCR	Qiagen Multiplex PCR Kit 1000	Qiagen	206145
AgaroseGel	PeqLab Universal Agarose	PeqLab	35-1020
	Ethidiumbromidlsg 1%	Roth	2218,1
	Tris	Roth	4855,2
	EDTA	Sigma	ED4SS
	Essigsäure 96%	Riedel de Haen	33206
	GeneRTM DNA Ladder	MBI	SM0333
Aufreinigung	Qiaquick PCR	Qiagen	28106
	Lichrosolv Wasser	Merck	1,15333
Sequenzansatz	Big Dye Terminator		
	Cycle		
	Sequenzing Kit 1000	ABI Prism	4337456
	Reactions		1 15000
	Lichrosolv wasser	Merck	1,15333
Fällung	EtOH absolut	Riedel-de Haen	32205
- O	Natriumacetat	Roth	X891.1
Sequenzierung	Lichrosolv Wasser	Merck	1,15333

|--|

Hi_Di Formamid	ABI Prism	4311320
3100 Pop 6	ABI Prism	4316357
10xEDTA Puffer	ABI Prism	402824

2.1.5 Genbankverweise

www.mutationdiscovery.com

SCN2A2

SOURCE RECORD

GAP NT_005403 RefSeq NM_021007

<u>SCN3A</u>

SOURCE RECORD GAP NT_005403 GenBank AF035686 GenBank AF035685 GenBank AF225987 GenBank AJ251507 GenBank AJ277394 GenBank AF225986 GenBank S69887 RefSeq NM_006922

SCN8A

SOURCE RECORD
GAP NT_029419
GenBank AF225988
GenBank AB037525
GenBank AJ310885
GenBank AB027567
GenBank AJ277395
GenBank AJ276141
GenBank AF049618
GenBank AJ276142
GenBank AF225988
GenBank AJ310884
GenBank AJ310898
RefSeq NM_014191

UniProtKB/Swiss-Prot

www.expasy.org

|--|

SCN2A2	\rightarrow	Q99250
--------	---------------	--------

Sequ	Sequence databases		
\Box		M94055 mRNA. Translation: AAA18895.1.	
	EMBL	AF059683 Genomic DNA. Translation: AAC14574.1.	
Ο	GenBank	AF327246 AF327245 Genomic DNA. Translation: AAG53413.1.	
2 -2	OUIDUIR	AF327246 AF327245 Genomic DNA. Translation: AAG53412.1.	
	DDBJ	AC011303 Genomic DNA. Translation: AAY14971.1.	
		AC013438 Genomic DNA. No translation available.	
		X65361 mRNA. Translation: CAA46438.1. Sequence problems.	
		M91804 mRNA. No translation available.	
		M55662 Genomic DNA. Translation: AAB65854.2.	
IPI		IPI00220666.	
		IPI00305036.	
PIR		A46269.	
		I59194.	
Ref	Seq	NP_001035232.1. NM_001040142.1.	
		NP_001035233.1. NM_001040143.1.	
		NP_066287.2. NM_021007.2.	
Uni	Gene	Hs.93485.	

SCN3A \rightarrow Q9NY46

Sequence databases	
	AJ251507 mRNA. Translation: CAB85895.1.
EMBL	AF225987 mRNA. Translation: AAK00219.1.
ConBonk	AF330135 AF330134 Genomic DNA. Translation: AAG53414.1.
	AF330135 AF330134 Genomic DNA. Translation: AAG53415.1.
DDBJ	AC013463 Genomic DNA. Translation: AAY15072.1.
	AF035685 mRNA. Translation: AAC29514.1.
	AF035686 mRNA. Translation: AAC29515.1.
	S69887 Genomic DNA. Translation: AAB30530.1.
	AB037777 mRNA. Translation: BAA92594.1.
	AF239921 mRNA. Translation: AAF44690.1.
IPI	IPI00020692.
	IPI00218521.
	IPI00218522.
	IPI00397861
PIR	A54937.
RefSeq	NP_001075145.1. NM_001081676.1.
	NP_001075146.1. NM_001081677.1.
	NP_008853.3. NM_006922.3.
UniGene	Hs.435274.

SCN8A \rightarrow Q9UQD0

Seq	uence databases	
		AF050736 AF050735 Genomic DNA. Translation: AAD15789.1.
	EMBL	AF049618 Genomic DNA. Translation: AAD20439.1.
Ο	ConDonk	FJ611941 mRNA. Translation: ACM63162.1.
	GeliDalik	AB027567 mRNA. Translation: BAA78033.1.
\Box	DDBJ	AF225988 mRNA. Translation: AAF35390.1.
		AC013421 Genomic DNA. No translation available.
		AC025097 Genomic DNA. No translation available.
		AC068987 Genomic DNA. No translation available.
		AC140060 Genomic DNA. No translation available.
IPI		IPI00183041.
		IPI00337743.

	IPI00337744.
	IPI00337745.
	IPI00954952.
RefSeq	NP_001171455.1. NM_001177984.2.
-	NP_055006.1. NM_014191.3.
UniGene	Hs.436550.
	Hs.710638.

Ncbi-Datenbank

www.ncbi.nlm.nih.gov/

2.2 <u>Methoden</u>

Die zur DNA-Gewinnung, -Vervielfältigung und -Analyse verwendeten Methoden und die benötigten Verfahren zur Auswertung der Ergebnisse werden nachfolgend beschrieben.

2.2.1 Extraktion der DNA

Zur Extraktion der DNA werden EDTA-Vollblutproben der Patienten, der Eltern wenn verfügbar und der Kontrollpersonen gewonnen. Entweder erfolgt die DNA-Extraktion direkt oder die Blutproben werden zunächst bei -20°C eingefroren.

Um eine möglichst hohe Ausbeute an DNA zu gewährleisten, wird zur Extraktion die Phenol/Chloroform-Methode verwendet. Bei dieser Methode wird das Blut zunächst mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und dann werden die Zellen abzentrifugiert (die genauen Zeiten, Mengen und Konzentrationen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.). Daraufhin werden die Zellen im Kern-Extraktionspuffer lysiert und die Zellkerne freigelegt. Während der Lyse wird das Gemisch auf Eis gelagert um unerwünschte enzymatische Prozesse zu vermeiden. Bei der nun folgenden Zentrifugation werden die Zellkerne isoliert. DNA-Extraktionspuffer, DNA-Extraktionspuffer-SDS-Gemisch und Protease K werden zur Freilegung der DNA aus den Zellkernen hinzugefügt und die Probe im Wasserbad bei 50°C inkubiert.

Als nächstes folgt die Reinigung der DNA. Durch Hinzufügen von Phenol werden die lipophilen Bestandteile in eine untere Phase abgesondert und so kann die in der oberen, wässrigen Phase befindliche DNA von den lipophilen Bestandteilen getrennt abgenommen werden. Durch das Chloroform werden die ansonsten oxidativ wirkenden Phenolreste entfernt.
Als nächstes erfolgt die Fällung der DNA. Hierzu wird die DNA durch Zugabe von Natriumacetat und Ethanol wasserunlöslich gemacht. Dadurch kommt es zur Ausfällung der DNA welche bei der Lagerung bei -20°C weiterläuft. Bei der daraufhin folgenden Zentrifugation setzt sich die DNA am Boden des Gefäßes ab. Es folgt ein Waschgang mit 70% igem Ethanol um Natriumacetatreste zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wird das entstandene Pellet in Tris-EDTA aufgenommen. Eventuell noch in der Lösung befindliche Enzyme werden durch den Chelatbildner EDTA inaktiviert (durch Komplexierung von Kationen). Um einer säurebedingten Verschlechterung der DNA entgegenzuwirken, wird dem EDTA Tris(hydroxymethyl)-aminomethan zugefügt um einen leicht alkalischen pH-Wert zu gewährleisten.

Tabell	e 5: Protokoll zur Extraktion von DNA aus EDTA-Blut
٠	EDTA-Blut (5 – 7,5 ml) mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 40 ml auffüllen
•	Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C für 10 min
•	Überstand verwerfen
•	30 ml Nuclei-Extraction-Buffer hinzufügen
•	Vortexen 3 x 10 sec
•	Lagerung auf Eis für 30 min
•	Zentrifugation bei 2500 rpm und 4°C für 10 min
•	Überstand verwerfen
•	500 µl DNA-Extraction-Buffer hinzufügen (Möglichkeit der Lagerung in diesem
	Stadium bei -80°C)
•	500 µ1 DNA-Extraction-Buffer/SDS 1% hinzufügen
•	1 Spatelspitze Protease K hinzufügen
•	Lagerung im Wasserbad bei 50°C für 3 Stunden
•	1000 μl Phenol hinzufügen
•	Wippen für 30 min
•	Zentrifugation bei 2500 rpm und 4°C für 10 min
•	Überstand in 500µl Phenol überführen
•	Wippen für 20 min
•	Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min
•	Überstand in 500 µl Phenol/Chloroform überführen
•	Wippen für 20 min
٠	Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min
•	Überstand in 500 µl Chloroform überführen
•	Wippen für 20 min
•	Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min
•	Überstand in 1000 µl 3 M NaAc pH 5 + Ethanol 100% (1+19) überführen
•	Wippen manuell
•	Lagerung bei -20°C über Nacht (oder mindestens 30 min)
•	Zentrifugation bei 13000 rpm für 20 min
•	Überstand verwerfen
•	200µl Ethanol 70% hinzufügen
•	Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min
•	Überstand verwerfen
٠	Pellet antrocknen
٠	300 µ1 Tris-EDTA hinzufügen und mischen
٠	Lagerung im Wasserbad bei 50°C über Nacht (oder wenigstens über Tag)
•	Lagerung dauerhaft bei 4°C

Seite 34

2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wird mit Hilfe der Photometrie bestimmt. Bei diesem Verfahren wird die Schwächung der Strahlungsintensität beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz bestimmt. Dabei ist die Intensitätsschwächung von der Weglänge und der Konzentration der absorbierenden Substanz abhängig. Diese Zusammenhänge werden im Lambert-Beerschen Gesetz beschrieben.

Vor der eigentlichen Messung wird das Gerät mit H₂O geeicht. Zur Messung der DNA-Konzentration wird die gewonnene DNA um den Faktor 100 verdünnt und 100 μ l der Probe in die 1 cm dicke Küvette gefüllt. Die zur Messung genutzte Wellenlänge beträgt 260 nm. Der Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA beträgt 50 μ g/ml. Die Konzentration errechnet sich dann aus der Absorption bei 260 nm multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem vom Extinktionskoeffizienten abhängigen DNAspezifischen Multiplikationsfaktor (der Wert beträgt bei doppelsträngiger DNA 50).

Konzentration = Absorption x Verdünnungsfaktor x Multiplikationsfaktor

Neben der Messung der DNA-Konzentration wird zur Bestimmung der Proteinkonzentration und damit der Reinheit der DNA eine zusätzliche Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der bei 280 nm sollte sich dabei möglichst dem Wert 1,8 annähern und damit eine fast vollständige Proteinfreiheit anzeigen.

Nach der Bestimmung der Konzentration kann die DNA nun mit H₂O auf die benötigte Arbeitskonzentration verdünnt werden.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen.

Die PCR läuft in 3 sich wiederholenden Schritten ab. Als erster Schritt wird die DNA durch Erhitzung auf 94°C denaturiert (*Denaturierung*), es schließt sich der zweite Schritt (*Annealing*) an, der bei ca. 60°C stattfindet. Für diesen Schritt werden zwei Oligonukleotid-Primer benötigt, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden und dabei den interessierenden DNA-Abschnitt einfassen. Durch Verlängerung der Oligonukleotid-Primer, mit Hilfe von DNA-Polymerasen, welche Nukleotide an die

3'-OH-Primer-Enden heften, entstehen komplementäre DNA-Sequenzen, welche das Zielprodukt beinhalten und am 5'-Ende durch den Primer definiert sind. Diese Verlängerung (*Elongation*) stellt den dritten Schritt der PCR dar und findet bei ca. 70°C statt. Als nächstes schließt sich wieder ein Denaturierungsschritt an. Bei den nun folgenden Schritten (Annealing + Elongation), dient sowohl die Ausgangs-DNA als auch die neusynthetisierte DNA als Matrize. So entsteht beim zweiten Zyklus das an beiden Enden primerdefinierte Zielprodukt, das in den nächsten Schritten ebenfalls als Matrize dient. So können in 30 Zyklen etwa 10⁵ Kopien der Ziel-Sequenz hergestellt werden.

Bereits 1986 wurde die Methode durch K.B. Mullis eingeführt, wobei zu dieser Zeit noch keine DNA-Polymerasen eingesetzt wurden, die eine Erhitzung auf 94°C aushielten. So musste nach jedem Denaturierungsschritt erneut Polymerase dem Ansatz hinzugefügt werden. Die Entdeckung thermostabiler DNA-Polymerasen, wie die Taq-Polymerase ursprünglich von *Thermus aquaticus*, einem thermophilen Bakterium das man in heißen Quellen findet, war entscheidend für die Automatisierung der Methode [Saiki et al., 1988].

Heute gehört die PCR zu den gängigen Methoden in der molekularbiologischen Forschung und Diagnostik [Strachan & Read, 1996].

Auswahl der PCR-Oligonukleotide (sog. Primer)

Entscheidend für den Erfolg der PCR ist die Auswahl passender Oligonukleotidpaare. Die Kriterien für die Auswahl gibt Tabelle 6 wieder.

Tabelle 6:	Kriterien zur Auswahl optimaler Oligonukleotidpaare
 Länge 	21-30 basenpaare
• GC-G	ehalt 40-60%
Schme	lztemperatur >60°C und für das Oligonukleotidpaar möglichst gleich
 Ausrei 	chender Abstand der Oligonukleotid-Primerbindestelle zur Zielregion
 Mögli 	chst spezifische Bindung an der Oligonukleotid-Primerbindestelle
 Komp 	lementarität von 2 oder 3 Basen am 3'-Ende der Oligonukleotid-Primer möglichst
verme	iden

Zur Auswahl der Oligonukleotid-Primer wird das online-Programm mutationdiscovery[®] genutzt. Bei diesem Programm wird die Zielsequenz vorausgewählt und dann die Bedingungen für die Oligonukleotidpaare bestimmt. So können wir Oligonukleotidpaare mit annähernd optimalen Bedingungen (wie in Tabelle 6 beschrieben) generieren. Um die PCR-Bedingungen ebenfalls möglichst optimal zu erhalten, wählen wir die Oligonukleotidpaare so, dass die Länge des entstehenden PCR-Produktes 650 bp nicht überschreitet. Daher müssen wir für verschiedene, besonders große Exone mehrere Oligonukleotidpaare, deren Zielsequenzen sich überlappen, auswählen. Die Bezeichnungen der Oligonukleotidpaare (Bsp. *SCN3A* Ex 18b F) setzen sich aus dem Namen des Gens plus die Nummer des Exons, mit eventuell einer Zusatzbezeichnung (Kleinbuchstaben) bei mehreren Oligonukleotidpaaren für ein Exon und F bzw. R für "forward" und "reverse", also die Leserichtung, zusammen. Die genaue Basenfolge der Oligonukleotidpaare ist der Tabelle 17 im Anhang zu entnehmen. Wir entscheiden uns nur Exone zu sequenzieren, die auch kodieren. So ergibt es sich, dass von *SCN3A* die ersten beiden und von *SCN2A2* und *SCN8A* jeweils das erste Exon nicht sequenziert werden, da sich das jeweilige Startcodon erst hinter diesen Exonen befindet.

Anhand der vom Hersteller mitgelieferten Schmelztemperaturen der Oligonukleotidpaare ergeben sich für die Amplifikation der verschiedenen Exone unterschiedliche Annealing-Temperaturen. Unter Berücksichtigung dieser verschiedenen Ansatzbedingungen wird dann jeweils ein Primermix mit zueinander passenden Oligonukleotidpaaren bestimmt. Dazu müssen die PCR-Produkt-Längen möglichst unterschiedlich sein, um auf dem Kontroll-Gel eine einzelne, gut sichtbare Bande für jedes PCR-Produkt zu bekommen. Die Austestung der Primermixe anhand von Kontrollprobanden-DNA ergibt für SCN3A sieben verschiedene Primermix-Ansätze, für SCN8A neun Primermixe und drei Einzel-PCRs und für SCN2A2 acht verschiedene Primermix-Ansätze. Die entstehenden Primermixe mit den jeweiligen Basenpaar-Längen des dazugehörigen PCR-Produktes können der Tabelle 7 entnommen werden. Der Primermix mit den meisten Oligonukleotidpaaren ergibt einen Ansatz bei dem 5 Exone zeitgleich amplifiziert werden können.

Die Auflistung der Ansatzbedingungen können der Tabelle 8 entnommen werden. Bei der Austestung der PCRs und Sequenzansätze mit ihren jeweiligen Oligonukleotidpaaren ergibt sich die Notwendigkeit beim Exon 12 im SCN8A-Gen dem PCR-Ansatz Q-Solution hinzuzufügen. Beim Exon 21 im SCN8A-Gen ist es nicht möglich die "forward" Richtung zu sequenzieren, obwohl die PCR funktioniert. So wird ein zweiter Oligonukleotid-Primer in "reverse"-Richtung bestellt um eine Auswertung dieses Exons zu ermöglichen. Sowohl die beiden R-Primer des Exons 21 als auch die Primer des Exons 23 (ebenfalls im SCN8A-Gen) werden dem Sequenzansatz (siehe Kapitel Sequenzansatz Tabelle 9) in doppelter Konzentration zugefügt.

Tabelle 7 Oligonukleotid-Primer-Kombinationen im PCR-Ansatz								
Primermixe SCN2A2			Primermixe SCN3A			Primermi	xe SCN8A	
Primer-		Bp-	Primer-		Bp-	Primer-		Bp-
mix	Exon	Länge	mix	Exon	Länge	mix	Exon	Länge
1	4	251	1	14	241	1	8	259
	5	295		20	343		10	335
	2	460		27	414		27c	411
	3	562		10	484	2	6	187
2	8	197		15	572		5	267
	6	216	2	19	263		17b	339
	9	341		16	353		15	413
	7	464		21	430	3	18	219
3	10	382		28c	498		20	316
	13	475	3	9	272		2b	349
	12	529		26	379	4	13	279
	11	599		3	450		16a	352
4	16b	382		17	507		27d	461
	27c	443	4	25	299	5	3	223
	15	595		11	384		2a	310
	14	627		18a	450		26	395
5	27d	338		28b	515	6	24	244
	17a	411	5	18b	317		17a	330
	18	433		6	386		14	409
	19	548		7	458	7	19	258
6	21	276		13	527		7	331
	20	345	6	5	319		27b	411
	22	518		8	406		11	518
	23	650		24	468	8	9	283
7	27a	483		12	566		16b	316
	25	490	7	22	342		22	390
	26	553		4	411	9	25	269
	24	588		23	471		4	301
8	16a	314		28a	571		27a	474
	27b	438				Einzel-PC	'R	
	17b	513					12	475
			I				21	297
							23	156

Tabelle 8	PCR: Ansatzbedingung und Programm im Thermocycler			
PCR-Ansatz ohne O-	Solution [®] .	1	95°C	15 min
(Gesamtansatz in ul y	x = 0.5 ul Multiplex	2	94°C	30 s
+ (Gesamtansatz in u	1×0.3 µ1 RNase freies Wasser	3	60°C/61°C/63°C/65°C	90 s
+ (Gesamtansatz in μ	1×0.1 µ1 Primermix	<i>J</i> .	72°C	20 3 45 s
+ (Oesamtansatz in μ	$1 \times 0,1$) μ 1 Findermix	4.	72 C 72°C	43 S
+ (Gesamiansaiz in μ	$(1 \times 0, 1) \mu I DNA, bzw. H_2O (Iur)$	5.	/2°C	10 min
Negativkontrolle)		6.	4°C	5 min
	R	7.	4°C	Pause
PCR-Ansatz mit Q-S	olution [®] :		Schritt 2. – 4. 35 x wiede	rholen
(Gesamtansatz in µ1	x 0,5) µl Multiplex			
+ (Gesamtansatz in µ	$1 \ge 0,1$ µl Q-Solution [®]	zu 3.:		
+ (Gesamtansatz in µ	1 x 0,2) µ1 RNase freies Wasser	$60^{\circ}C \rightarrow SCN2A2$		
+ (Gesamtansatz in u	l x 0,1) µl Primermix	$61^{\circ}C \rightarrow SCN8A$, Primermix 1-7		
+ (Gesamtansatz in u	$1 \ge 0.1$ µl DNA, bzw. H ₂ O (für	63°C	$\rightarrow SCN3A$	
Negativkontrolle)		$65^{\circ}C \rightarrow SCN8A$, Primermix 8 und 9		
r (egua (kona one)		00 0		, und)
Gesamtansätze:				
bai 5 Drimarnaaran ir	n Drimarmiy 100 ul Angotz			
	n Finnermix 100 µl Ansatz,			
bei 4 Primerpaaren ir	n Primermix 80 µ1 Ansatz;			
bei 3 Primerpaaren ir	bei 3 Primerpaaren im PM 60 µl Ansatz;			
Einzel-PCR 25 µl Ansatz				
	0			
PCR-Ansatz ohne Q-	Solution [®] \rightarrow <i>SCN2A2</i> , <i>SCN3A</i>			
und SCN8A außer Ex	ton 12			
PCR-Ansatz mit Q-S	olution [®] \rightarrow Exon 12 (SCN8A)			

2.2.4 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle des PCR-Erfolgs überführen wir jeweils 5 µl PCR-Produkt auf ein 2%iges Agarosegel. Zuvor wird das PCR-Produkt zur Visualisierung der Probenbewegung auf dem Gel und als optische Hilfe beim Einfüllen der Proben in die Geltaschen, mit 2 µl Loading dye vermischt. In die erste Gel-Tasche wird ein DNA-Längenstandard (10 µl gene ruler[®]) gefüllt, welcher als Größenstandard alle 100 bp eine Markierung ausbildet und somit beim gefärbten Gel die Beurteilung der Größe des entstandenen PCR-Produktes zulässt. Dann wird eine Spannung von 125V an die Elektrophoresekammer, welche mit dem Elektrolyt 1 x TAE gefüllt ist, angelegt. Wenn sich die Proben dem unteren Gelrand nähern, wird das Gel in Ethidiumbromid 1% für 10 Minuten gefärbt. Die durch die Färbung und mit Hilfe einer UV-Licht-Quelle fluoreszierenden Banden können nun zur Dokumentation fotografiert werden.

2.2.5 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wird das jeweilige PCR-Produkt aufgereinigt und anschließend in einen Sequenzansatz mit jeweils einem Oligonukleotid-Primer, Big dye[®] und sequenzing buffer[®] eingesetzt. Zur Aufreinigung entscheiden wir uns für das Qiaquick PCR Purifikation Kit 250. Bei diesem Verfahren wird das PCR-Produkt mit einem Puffer versehen und in eine Säule mit einer Silica-Membran überführt. Die DNA wird durch einen hohen Salzgehalt und einen pH \leq 7,5 an die Membran gebunden. Die sonstigen Bestandteile werden bei der Zentrifugation ausgewaschen und verworfen. Nach einem erneuten Waschschritt, dem erneuten Verwerfen der eluierten Flüssigkeit und einem zusätzlichem Zentrifugationsschritt um das restliche Ethanol zu entfernen, wird die nun aufgereinigte DNA mit einem Puffer, der einerseits den Salzgehalt herabsetzt und andererseits den pH über 7,5 anhebt in ein sauberes Gefäß eluiert.

Nach der Aufreinigung erfolgt die zyklische Sequenzierung. (Schema siehe Tabelle 9) Dabei wird erneut eine Art PCR durchgeführt, mit dem Unterschied, dass nur ein Oligonukleotid-Primer pro Ansatz und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs), neben den um ein Vielfaches mehr vorhandenen, für den Einbau bei der Elongation benötigten dNTPs, verwendet werden. Die ddNTPs unterscheiden sich von den normalen dNTPs dadurch, dass ihnen nicht nur am 2'-Kohlenstoff, sondern auch am 3'-Kohlenstoff eine Hydroxylgruppe fehlt. So können sie keine Phosphodiesterbindung zum nächsten Nukleotid mehr ausbilden und damit wird die Synthese der DNA-Kette abgebrochen. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die durch ihre Fluoreszenzmarkierung, nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung über eine spezielle Polymermatrix, von dem von uns genutzten System (ABI Prism 3100, Genetic Analyser) automatisch abgelesen werden kann. Da dieser letzte, automatisch ablaufende Schritt sehr lange braucht, müssen die Proben zuvor, nach einem Fällungsschritt, durch Zusetzen von Formamid vor Verdunstung geschützt werden. Nach der Bestimmung der Basensequenz durch das Gerät, wird sie in einem Elektropherogramm dargestellt und nun kann die soeben bestimmte Basenabfolge mit der des Wildtyps bzw. der Referenz verglichen werden.

Tabelle 9Sequenzansatz und Pro	ogramm im Thermocycler		
11,5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt	1. 96°C (Denaturierung)	10s	
folgendes hinzufügen:	2. 60°C (Annealing)	5s	
1,5 μl Primer (1,6 μM bzw 3,2 μM)	3. 60°C (Elongation)	4min	
3 µl Big dye	4. 4°C	10min	
4 μl 5x Sequenzing buffer	5. 4°C	Pause	
und in den Thermocycler stellen	Schritt 1. – 3. 24-mal wiederholen		
doppelte Primerkonzentration (3,2 µM) bei			
folgenden Primern:			
SCN8A Ex 21 R			
SCN8A Ex 21 NEU			
SCN8A Ex 23 F			
SCN8A Ex 23 R			

2.2.6 Sequenzauswertung

Zur Auswertung der durchgeführten Sequenzierung nutzen wir das Programm SeqScape. Dieses Programm ermöglicht den Vergleich des ermittelten Elektropherogramms mit der Basenabfolge einer Referenz und das gleichzeitige Betrachten mehrerer Elektropherogramme von unterschiedlichen Probanden (siehe Abbildung 2).



Abbildung 2: Auszug aus dem Programm SeqScape. Dargestellt sind die Auswertungen zweier Test-Sequenzierungen. Von der ersten Test-DNA sind der "forward" und "reverse" Strang dargestellt, von der zweiten Test-DNA nur der eine Strang.

Durch den Vergleich des "forward" Strangs mit dem "reverse" Strang kann entschieden werden, ob eine Veränderung eine Variation darstellt oder nur ein erhöhtes Hintergrundrauschen. Im nachfolgend dargestellten Bild zeigt sich links im Bild mit Pfeilen markiert auf beiden Strängen die Darstellung von sowohl einem grünen, für ein A stehenden Peak, als auch einem schwarzen, für ein G stehenden Peak. Hierbei scheint es sich um eine heterozygote Variation zu handeln. Rechts im Bild dagegen, ebenfalls mit Pfeilen markiert, zeigt sich im oberen Strang ein schwarzer und ein grüner Peak, wohingegen im Gegenstrang nur ein schwarzer Peak ausgebildet ist. Diese Stelle scheint verfahrens- oder strukturbedingt nicht einwandfrei lesbar zu sein.



Abbildung 3: Darstellung eines Elektropherogramms einer heterozygoten Variation (linke Pfeile) und einer dem Hintergrundrauschen zuzuordnenden Veränderung in einem Strang (rechte Pfeile).

3 <u>Studienpopulation</u>

In der vorliegenden Studie werden – nach üblicher Aufklärung und Einverständniserklärung der Patienten und Eltern – die DNA-Proben von 40 verschiedenen Patienten genutzt, die zuvor in unserem Labor in Bezug auf das *SCN1A*-Gen untersucht wurden und bei denen keine Variationen im *SCN1A*-Gen festgestellt wurden.

Die schriftliche Einwilligung der Eltern und ein positives Votum der Ethikkommission (AZ 03/11) liegen vor (s. Anhang).

Im Patientenkollektiv wiesen 19 Patienten die Diagnose Frühkindliche Grand mal Epilepsie auf, 17 Patienten litten an einem Dravet-Syndrom und 3 Patienten hatten eine myoklonisch-astatische Epilepsie. Eine Patientin bildete eine Ausnahme, sie hatte eine frühkindliche myoklonische Epilepsie mit zunehmendem degenerativem Abbau und ausgeprägter Photosensibilität. Die Geschlechterverteilung zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10	Patientenkollektiv mit Geschlechterverteilung				
Epilepsieform	Patienten insgesamt	weiblich	Männlich		
FKGM	19	10	9		
Dravet-Syndrom	17	5	12		
MAE	3	2	1		
Sonstige	1	1	0		

Im FKGM-Kollektiv zeigte ein Patient und eine Patientin Neugeborenenkrämpfe und ein Patient entwickelte eine Rolando-Epilepsie.

Einer der Patienten mit Dravet-Syndrom zeigte zusätzlich autistische Züge und ein anderer Patient mit Dravet-Syndrom stammt aus einer so genannten GEFS+-Familie (Die Mutter und die beiden zweieiigen Zwillingsschwestern des Patienten zeigten epileptische Anfälle).

Eine der Patientinnen mit MAE verstarb plötzlich und unerwartet (SUDEP = sudden unexpected death in epilepsy), ebenso die eineiige Zwillingsschwester der anderen MAE-Patientin.

Im Laufe der Studie wurden zeitgleich weitere Untersuchungen mit neuen Methoden in Bezug auf das *SCN1A*-Gen gemacht. Dabei wurden bei 3 Patienten mit Dravet-Syndrom, deren DNA auch in dieser Studie genutzt wurden, Variationen im *SCN1A*-Gen gefunden.

3.1 Exemplarische Fallgeschichte A

Im Folgenden wird die Falldarstellung einer Patientin beschrieben, bei der wir eine DNA-Variation im *SCN3A*-Gen gefunden haben.

Die Patientin wurde im Jahre 1987 als erstes Kind gesunder Eltern in der 28.-29. SSW geboren. Der Schwangerschaftsverlauf wurde durch vorzeitige Wehentätigkeit und Zervixinsuffizienz kompliziert. Der Erwerb der Meilensteine war zeitgerecht. An Kinderkrankheiten wurden die Windpocken durchgemacht. Im Alter von 1 1/2 Jahren trat, bei einer Körpertemperatur von 39°C, ein lang anhaltender, dann aber spontan sistierender Krampfanfall auf. Mit 15 Jahren kam es nach einem vorausgegangenen unspezifischen Infekt, während einer USA-Reise, zu einem 10 minütigen epileptischen Anfall, der spontan sistierte. Einen Monat nach diesem Anfall wurde die Patientin tonisch-klonisch zuckend aufgefunden. Auch dieser Anfall sistierte spontan, bei unbekannter Dauer. Erneut 5 Monate später kam es in der Schule zu einem 5 Minuten anhaltenden primär generalisierten, tonisch-klonischen Anfall. Daraufhin wurde eine antikonvulsive Therapie mit Lamotrigin begonnen. Der körperliche Untersuchungsbefund zeigte zu diesem Zeitpunkt ein 16 Jahre altes Mädchen in gutem Allgemeinzustand. Ein weißer Fleck am rechten Oberschenkel, kein Anhalt für tuberöse Sklerose. Kein neurologisches Defizit. Der EEG-Befund zeigte primär generalisierte, irreguläre Spike-Waves, auch rechts frontal zusätzliche fokale Sharp-Waves.

Kurz darauf ereignete sich ein erneuter Grand mal-Anfall, woraufhin die Medikation auf 100-0-150mg Lamotrigin pro Tag bei guter Verträglichkeit festgesetzt wurde. Darunter war die Patientin 2 ½ Jahre anfallsfrei, wobei zwischenzeitlich eine erste Migräneattacke auftrat. Beim Auftreten eines erneuten Grand mal-Anfalls wurde die Therapie auf 150-0-300mg Lamotrigin erhöht. Seitdem besteht Anfallsfreiheit. Das letzte EEG zeigt ein gut strukturiertes Alpha-Wach-EEG ohne richtungsweisende Pathologie. Bei der Labordiagnostik waren die Schilddrüsenparameter, sowie das rote und weiße Blutbild und die Leberwerte unauffällig. Der Lamotrigin-Serumspiegel lag mit 12,59µg/ml im guten therapeutischen Bereich. Die weitere Entwicklung ergab einen guten unauffälligen Gesamtverlauf. Die Patientin besucht das Gymnasium und zeigt hier keine Defizite.

Die Familienanamnese zeigt väterlicherseits eine familiäre Migräne. Die Großmutter mütterlicherseits leidet seit dem 15. Lebensjahr unter epileptischen Anfällen. Sie lebt in

Brasilien und wird dort zur Zeit mit Tegretal, behandelt, wobei sie trotz Therapie etwa 6 Anfälle pro Jahr hat. Die Patientin hat keine Geschwister.

3.2 Exemplarische Fallgeschichte B

Bei der folgenden Fallgeschichte handelt es sich um eine Patientin, bei der wir im *SCN2A*-Gen eine DNA-Variation gefunden haben.

Das Mädchen wurde im Jahr 2004 als 2. Kind der Eltern geboren. Das ältere Geschwisterkind ist gesund. Bei der Mutter besteht eine periodische Ataxie.

Bei der Patientin selbst besteht seit dem 2. Lebensjahr eine Frühkindliche Grand mal Epilepsie, die initial durch Fieber-assoziierte epileptische Staten, die schwer unterdrückbar waren, begonnen hat. Die antikonvulsive Therapie gestaltete sich nicht einfach. Unter einer Monotherapie mit Topiramat morgens und abends je 100mg ist das Mädchen seit dem 02.04.09 anfallsfrei. Der letzte Anfall dauerte erneut 30 Minuten. Es bestand kein Fieber. Das zuletzt abgeleitete EEG ist das EEG eines gut 5 Jahre alten Mädchens, die Hintergrundaktivität ist bei fehlendem Augenschluss nicht beurteilbar. Es zeigt eine generalisierte 6Hz-Theta-Aktivität um 50-70µVolt, ohne epilepsietypische Potentiale. Die Patientin ist 5 Jahre alt. Sie zeigt eine globale Retardierung, ohne ein spezifisches Retardierungsbild. Unter konsequenter Förderung macht sie marginale Forschritte. Die expressive Sprache ist so gut wie nicht vorhanden. Sie spricht einige wenige Worte. Im August 2010 wird sie in eine Schule für geistig behinderte Kinder eingeschult werden. Die intensiv durchgeführte Stoffwechseldiagnostik ist negativ. In der cerebralen Kernspintomographie zeigt sich bei dem Mädchen eine Volumenminderung des rechtsseitigen Hippocampus mit Verdacht auf Vorliegen einer Hipposcampussklerose. Dieser Befund ist über die Jahre konstant geblieben. Die hippocampalen Veränderungen sind mutmaßlich als Folge der seit dem 2. Lebensjahr rezidivierend auftretenden Status epileptice, zum Teil mit aber auch ohne Fieber, zu sehen.

Zusammenstellung der bislang erfolglos eingesetzten Antikonvulsiva: Valproat ausdosiert bis Spiegel um 110mg/l, Phenobarbital auswärts eingesetzt, ohne Erfolg, Brom mindestens 1 Jahr ohne Erfolg, bewusst weggelassen da frühzeitig der Verdacht auf eine Frühkindliche Grand mal Epilepsie bestand. Interessant ist der derzeit gute Erfolg unter der Topiramat-Monotherapie.

4 Ergebnisse

Wir haben die DNA von 40 Patienten mit einer frühkindlichen myoklonischen Epilepsie auf Variationen in den Genen *SCN2A2*, *SCN3A* und *SCN8A* untersucht. Dafür sequenzierten wir von jedem Patienten alle kodierenden Exone dieser drei Gene und verglichen sie mit einer Referenz, die den "Wildtyp" darstellt. Die zusammenfassenden Tabellen 11, 12 und 13 beschreiben die gewonnen Ergebnisse. Die Beschreibung der Positionen der jeweiligen Variationen ergibt sich aus der Nummerierung der Basenabfolge in mutationdiscovery (s. Genbankverweis).

Tabelle 11In unserer Studie festgestellte Variationen im SCN2A2-Gen					
Exon	Abweichung vom Wildtyp	Exon	Abweichung vom Wildtyp		
2	Missense-Variation 6798G>A,	15	Keine		
	Arg19Lys (rs17183814)				
3	Keine	16	Keine		
4	Keine	17	Keine		
5	Keine	18	Deletion im Intron 17 \rightarrow 75988G>-		
			(rs3835933) und		
			Deletion im Intron 18 \rightarrow 76367T>-		
			(rs3835935)		
6	Keine	19	Punktvariation im Intron 19 \rightarrow		
			78309A>G		
7	Keine	20	Keine		
8	Keine	21	Keine		
9	Polymorphismus im Intron 8 \rightarrow	22	Keine		
	24536T>C (rs2121371)				
10	Keine	23	Polymorphismus im Intron 22 \rightarrow		
			88485A>G (rs1864885)		
11	Keine	24	Keine		
12	Synonyme Punktvariation 34128G>C	25	Keine		
13	Synonyme Punktvariation 37788A>G	26	Missense-Variation 97765A>C,		
			Glu1551Ala		
14	Keine	27	Synonymer Polymorphismus		
			99639T>A (rs2060198)		

Tabel	Tabelle 12In unserer Studie festgestellte Variationen im SCN3A-Gen					
Exon	Abweichung vom Wildtyp	Exon	Abweichung vom Wildtyp			
3	Deletion 32776-32778AAT>-	16	Synonymer Polymorphismus			
			77782A>C (rs62174900)			
4	Keine	17	Keine			
5	Keine	18	Keine			
6	Synonyme Punktvariation 44602G>A	19	Keine			
	und Punktvariation im Intron 6 \rightarrow					
	44661C>T (rs7579000)					
7	Keine	20	Keine			
8	Keine	21	Keine			
9	Keine	22	Keine			
10	Polymorphismus im Intron 10 \rightarrow	23	Missense-Variation 111667A>G,			
	53351G>A (rs3731760)		Met1372Val			
11	Keine	24	Keine			
12	Synonymer Polymorphismus	25	Keine			
	62075C>T (rs16850131)					
13	Keine	26	Keine			
14	Synonymer Polymorphismus	27	Keine			
	69447A>T (rs1946892)					
15	Keine	28	Missense-Variation 118475G>T			
			(rs41265137)			

Tabel	Tabelle 13In unserer Studie festgestellte Variationen im SCN8A-Gen				
Exon	Abweichung vom Wildtyp	Exon	Abweichung vom Wildtyp		
2	Keine	15	Polymorphismus im Intron 14 \rightarrow		
			176236A>C (rs303767)		
3	Keine	16	Keine		
4	Keine	17	Synonyme Punktvariation		
			182803G>A		
5	Synonymer Polymorphismus	18	Polymorphismus im Intron 18 \rightarrow		
	100946C>T (rs4761829)		183770G>A (rs303808)		
6	Keine	19	Keine		
7	Synonyme Punktvariation 113486A>T	20	Keine		
8	Keine	21	Keine		
9	Keine	22	Keine		
10	Keine	23	Polymorphismus im Intron 23 \rightarrow		
			202526A>G (rs9943809)		
11	Keine	24	Keine		
12	Keine	25	Synonymer Polymorphismus		
			204252T>C (rs303815)		
13	Keine	26	Synonyme Punktvariation		
			208390C>T (rs12301486)		
14	Keine	27	Synonymer Polymorphismus		
			220723C>A (rs60637)		

Die beschriebenen vorbekannten Polymorphismen, Mutationen und Variationen fanden sich in unserem Kollektiv in ähnlicher Häufigkeit wie in der europäischen Normalbevölkerung (siehe Tabelle 14, 15 und 16). Dies lässt darauf schließen, dass unsere Analysetechnik hinreichend genau und unser Kollektiv im genetischen Hintergrund mit der beschriebenen Normalbevölkerung vergleichbar ist.

4.1 Ergebnisse SCN2A2

Nachfolgend sind die bei unserem Patientenkollektiv (40 Patienten insgesamt) gefundenen Abweichungen im *SCN2A2*-Gen gegenüber dem Wildtyp beschrieben.

4.1.1 Exone ohne Sequenzvariationen (SCN2A2)

Die Analyse der Exone 3-11 und 14-25 des *SCN2A2*-Gens ergab bei unseren 40 Patienten keine Änderung der Basenabfolge gegenüber dem Wildtyp.

4.1.2 Exone mit Sequenzvariationen (SCN2A2)

Die in der Basenabfolge veränderten Exone des *SCN2A2*-Gens werden im Folgenden genauer beschrieben. Eine Übersicht über die gefundenen Veränderungen und den Vergleich der Häufigkeit in unserem Kollektiv und in der Literatur gibt die Tabelle 14.

Tabelle 14	Tabelle 14Relative Häufigkeit von Variationen im SCN2A-Gen				
Variation	Exon	Frequenz (Normalbevölkerung aus NCBI)	Frequenz (unser Kollektiv)		
Missense-Variation	2	Homozygot: 0,017	Homozygot: 0		
6798G>A,		Heterozygot: 0,136	Heterozygot: 0,125		
Arg19Lys		(rs17183814, HapMap-CEU)			
		Homozygot: 0,083 Heterozygot: 0,125 (rs17183814, AFD EUR PANEL)			
Synonyme	12	Bisher nicht beschriebene Variation	Homozygot: 0		
Punktvariation			Heterozygot: 0,025		
34128G>C					
Synonyme	13	Bisher nicht beschriebene Variation	Homozygot: 0		
Punktvariation			Heterozygot: 0,05		
37788A>G					
Missense-Variation	26	Bisher nicht beschriebene Variation	Homozygot: 0		
97765A>C,			Heterozygot: 0,025		
Glu1551Ala					
Synonymer	27	Homozygot : 0,517	Homozygot: 0,05		
Polymorphismus		Heterozygot : 0,417	Heterozygot: 0,225		
99639T>A		(rs2060198, HapMap-CEU)			

Exon 2

Im Exon 2 fand sich bei 5 Patienten ein heterozygoter Basenaustausch an Position 6798 von G nach A. Dieser Basenaustausch führt zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz. Es wird anstelle eines Arginins ein Lysin codiert (Arg19Lys, 6798G>A, rs17183814). In der Normalbevölkerung wurde eine ähnliche Häufigkeit wie in unserem Kollektiv gefunden, sodass davon auszugehen ist, dass die Veränderung keine funktionelle Relevanz hat.

Exon 12

Bei einer Patientin fanden wir im Exon 12 an Position 34128 einen heterozygoten Basenaustausch von G nach C. Diese Punktvariation führt nicht zu einer Veränderung der Aminosäureabfolge (34128G>C). Es handelt sich um eine bisher nicht beschriebene Variation, sodass keine Häufigkeit für die Normalbevölkerung bekannt ist. Da es aber durch die Punktvariation nicht zu einer Änderung der Aminosäureabfolge kommt, ist eine funktionelle Relevanz nicht anzunehmen.

Exon 13

An Position 37788 des Exon 13 fanden wir bei 2 Patienten einen heterozygoten Basenaustausch von A nach G. Auf die Aminosäuresequenz hat diese Punktvariation keinen Einfluss (37788A>G). Auch diese Variation wurde zuvor nicht beschrieben und hat augenscheinlich keine pathogenetische Bedeutung.

Exon 26

Bei der Analyse des Exons 26 war bei der Patientin der exemplarischen Fallgeschichte B eine Punktvariation mit heterozygotem Basenaustausch von A nach C feststellbar. Diese Veränderung der Basenabfolge führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Anstelle einer Glutaminsäure wird an der betreffenden Stelle ein Alanin eingebaut (Glu1551Ala, 97765A>C). Diese Variation ist bisher nicht bekannt. Zur Klärung, ob es sich um eine Neuvariation handelt, wurde die DNA der Mutter, Großmutter und der Schwester ebenfalls untersucht. Bei der Schwester und der Großmutter war die Variation nicht nachweisbar. Die Mutter weist die beschriebene Variation ebenfalls heterozygot auf.

Eine Probe des Vaters stand leider nicht zur Verfügung. Ebenso sequenzierten wir die DNA von 60 gesunden Kontrollprobanden, um die Häufigkeit dieser Variation in der Allgemeinbevölkerung abzuschätzen. Diese waren alle negativ.

Exon 27

Im Exon 27 kam es an Position 99639 bei 2 Patienten zu einem homozygoten und bei 9 Patienten zu einem heterozygoten Basenaustausch von T nach A. Eine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz hat diese Veränderung nicht (99639T>A, rs2060198). In der Allgemeinbevölkerung zeigte sich ein häufigeres Auftreten der beschriebenen Variation als in unserem Kollektiv. Durch die Kodierung der selben Aminosäuresequenz ist anzunehmen, dass der Variation keine funktionelle Bedeutung zukommt.

4.1.3 Sequenzvariationen in den Intronabschnitten (SCN2A2)

Im folgenden werden die Sequenzabweichungen in den mitsequenzierten Intronabschnitten aufgeführt.

Intron 8

Im mitsequenzierten Intron 8 fanden wir einen Basenaustausch von T nach C bei Position 24536. Dieser Polymorphismus war bei 31 Patienten homozygot und bei 7 Patienten heterozygot nachweisbar (24536T>C, rs2121371).

Intron 17

Bei 18 Patienten fand sich im Intron 17 eine Ein-Basen-Deletion an Position 75988 (75988G>-, rs3835933).

Intron 18

Im Intron 18 war ebenfalls eine Ein-Basen-Deletion sichtbar. Diese Deletion an Position 76367 trat bei 17 der gemessenen Patienten auf (76367T>-, rs3835935).

Intron 19

Bei einer Patientin fand sich im Intron 19 eine Punktvariation an Position 78309. Dabei kam es zu einem heterozygoten Basenaustausch von A nach G (78309A>G).

Intron 22

Einen weiteren Polymorphismus fanden wir im Intron 22 an Position 88485. Hierbei kam es bei 14 Patienten heterozygot und bei 5 Patienten homozygot zu einem Basenaustausch von A nach G (88485A>G, rs1864885).

4.2 Ergebnisse SCN3A

Die bei der Analyse des *SCN3A*-Gens bei unseren Patienten gefundenen Ergebnisse, sind im folgenden aufgeführt.

4.2.1 Exone ohne Sequenzvariationen (SCN3A)

Bei der Sequenzierung der folgenden Exone des *SCN3A*-Gens haben wir keine Abweichungen vom Wildtyp in unserem Patientenkollektiv feststellen können. Exon 4, 5, 7-11, 13, 15, 17-22 und 24-27.

4.2.2 Exone mit Sequenzvariationen (SCN3A)

Nachfolgend werden die im *SCN3A*-Gen gefundenen Veränderungen der Basensequenz im Bezug auf den Wildtyp genauer dargestellt. Die Häufigkeit der gefundenen Veränderungen im Vergleich zur Normalbevölkerung wird in der Tabelle 15 wiedergegeben.

Tabelle 15Relative Häufigkeit von Variationen im SCN3A-Ge				
Variation	Exon	Frequenz (Normalbevölkerung aus NCBI)	Frequenz (unser Kollektiv)	
Deletion	3	In SwissProt als natürliche Variante	Homozygot: 0,075	
32776-		angegeben (Var_029743) ohne Angabe der	Heterozygot: 0	
32778AAT>-		Häufigkeit in der Bevölkerung		
			Kontrollprobanden: 0,23	
Synonyme	6	Bisher nicht beschriebene Variation	Homozygot: 0	
Punktvariation			Heterozygot: 0,1	
44602G>A				
-				
Synonymer	12	Homozygot: 0,017	Homozygot: 0,05	
Polymorphismus		Heterozygot: 0,333	Heterozygot: 0,325	
620/5C>T		(rs16850131, HapMap-CEU)		
		11 (0.125		
		Homozygot: 0,125		
		Helefozygol: $0,3/5$		
Cup on time on	1.4	(IS10630151, AFD EUK PANEL)	Hemogyanti 0 175	
Delumer	14	Homozygol: 0,135	Homozygol: 0,175	
Forymorphismus		(re1046802 HereMan CEU)	Helefozygol: 0,5	
0944/A>1		(181940892, HapMap-CEO)		
		Homozygot: 0 292		
		Heterozygot 0 333		
		(rs1946892, AFD EUR PANEL)		
Synonymer	16	Bisher keine Daten	Homozygot: 0,05	
Polymorphismus		(rs62174900)	Heterozygot: 0,325	
77782A>C				
Missense-Variation	23	Bisher nicht beschriebene Variation	Homozygot: 0,025	
111667A>G,			Heterozygot: 0	
Met1372Val				
			Kontrollprobanden: 0	
Missense-Variation	28	Bisher keine Daten	Homozygot: 0	
118475G>T		(rs41265137)	Heterozygot: 0,025	
Gly1862Cys				

Exon 3

Bei 3 Patienten wurde eine homozygote Deletion von 3 Basen im Exon 3 an Position 32776-32778 gefunden. Durch den Verlust der 3 Basen kommt es zum Wegfall einer Aminosäure in der Sequenz (Asn43Del, 32776-32778AAT>-). Diese Variation wird in SwissProt als natürliche Variante beschrieben (Var_029743), eine Häufigkeit der Variation wird aber nicht angegeben. Wir testeten 100 gesunden Kontrollprobanden, um die Häufigkeit in der Normalbevölkerung abschätzen zu können. Bei 23 der 100 Personen konnte die Variation an betreffender Stelle nachgewiesen werden.

Exon 6

Bei der Sequenzierung des Exons 6 wurde bei 4 Patienten ein heterozygoter Basenaustausch an Position 44602 von G nach A festgestellt. Diese Veränderung führt nicht zu einer Abweichung der Aminosäuresequenz (44602G>A). Diese Variation wurde bisher nicht beschrieben. Da es zu keinem Einfluss auf die Aminosäuresequenz kommt, hat diese Variation sicherlich keine funktionelle Bedeutung.

Exon 12

Im Exon 12 ergab sich bei 13 Patienten ein heterozygoter und bei 2 Patienten ein homozygoter Basenaustausch von C nach T bei Position 62075. Dieser Basenaustausch führt nicht zur Veränderung der Aminosäuresequenz (62075C>T, rs16850131). In der Allgemeinbevölkerung wurde diese Variation in ähnlicher Häufigkeit gefunden, wie in unserem Kollektiv.

<u>Exon 14</u>

Bei der Analyse des Exons 14 ergab sich ein Basenaustausch an Position 69447 von A nach T. Bei 7 Patienten trat dieser Polymorphismus homozygot und bei 20 Patienten trat er heterozygot auf. Eine Veränderung der Aminosäureabfolge hat diese Variation nicht zur Folge (69447A>T, rs1946892). Auch in der Allgemeinbevölkerung zeigte sich diese Variation in ähnlicher Häufigkeit, wie in unserem Kollektiv beschrieben.

Exon 16

Bei 15 Patienten trat ein Basenaustausch von A nach C im Exon 16 an Position 77782 auf. Bei 13 dieser Patienten war die Variation heterozygot, wobei die Aminosäuresequenz davon nicht beeinflusst wird (77782A>C, rs62174900). Diese Variation wurde zwar beschrieben, aber bisher noch nicht in einer großen Studie in der Normalbevölkerung ausgetestet. Da es zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz durch die Variation kommt, ist davon auszugehen, dass die Änderung der Basenabfolge keine funktionelle Relevanz hat.

Exon 23

Im Exon 23 fand sich an Position 111667 bei der Patientin der exemplarischen Fallgeschichte A ein heterozygoter Basenaustausch von A nach G. Dieser Basenaustausch führt zur Veränderung der Aminosäuresequenz, indem anstatt eines Methionins ein Valin in die Aminosäurefolge eingebaut wird (Met1372Val,

111667A>G). Diese Variation wurde bisher nicht beschrieben. Um zu testen, ob es sich bei der Patientin um eine Neuvariation handelt wurden auch die Eltern sequenziert. Der Vater weist die selbe Variation auf. Bei der Mutter findet sich keine Basenabweichung in Bezug auf den Wildtyp in diesem Exon. Wir sequenzierten das Exon 23 bei 100 nichterkrankten Kontrollprobanden. Keiner der Kontrollprobanden wies die Variation an betreffender Stelle auf.

<u>Exon 28</u>

Eine Patientin wies bei der Sequenzierung des Exons 28 einen heterozygoten Basenaustausch an der Position 118475 von G nach T auf. Hierbei handelt es sich um die Patientin der exemplarischen Fallgeschichte B. Auch diese Punktvariation führt zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz. Es wird an der betreffenden Stelle ein Cystein anstelle eines Glycins eingebaut (Gly1862Cys, 118475G>T, rs41265137). Die Variation wurde zwar schon beschrieben aber bisher gibt es keine Daten für die Häufigkeit dieser Variation in der Normalbevölkerung.

4.2.3 Sequenzvariationen in den Intronabschnitten (SCN3A)

Die in den mitsequenzierten Intronabschnitten aufgetretenen Basenveränderungen sind im folgenden beschrieben.

Intron 6

Bei 5 Patienten wurde im Intron 6 an Position 44661, also 8 Basenpaarungen nach dem Exon, ein heterozygoter Basenaustausch von C nach T festgestellt (44661C>T, rs7579000).

Intron 10

Bei der Sequenzauswertung des Exons 10 fiel im Intron 10 bei 13 Patienten heterozygot und bei 13 Patienten homozygot ein Polymorphismus an Position 53351 mit Basenaustausch von G nach A auf (53351G>A, rs3731760).

4.3 Ergebnisse SCN8A

Die im *SCN8A* gefundenen Auffälligkeiten der von uns gemessenen Patienten sind nachfolgend beschrieben.

4.3.1 Exone ohne Sequenzvariationen (SCN8A)

Bei der Untersuchung unserer 40 Patienten in Bezug auf Abweichungen vom Wildtyp im *SCN8A*-Gen wurde in den Exonen 2-4, 6, 8-16, und 18-24 keine Abweichungen festgestellt.

4.3.2 Exone mit Sequenzvariationen (SCN8A)

Im Folgenden werden die Exone im *SCN8A*-Gen näher beschrieben, bei denen wir in unserem Patientenkollektiv Abweichungen der Basensequenz gegenüber dem Wildtyp festgestellt haben. Die Tabelle 16 zeigt die Häufigkeit der gefundenen Variationen in unserem Kollektiv und im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung.

Tabelle 16Relative Häufigkeit von Variationen im SCN8A-			onen im SCN8A-Gen
Variation	Exon	Frequenz (Normalbevölkerung aus NCBI)	Frequenz (unser Kollektiv)
Synonymer	5	Homozygot: 0,724	Homozygot: 0,575
Polymorphismus		Heterozygot: 0,259	Heterozygot: 0,425
100946C>T		(rs4761829, HapMap-CEU)	
Synonyme	7	Bisher nicht beschriebene Variation	Homozygot: 0
Punktvariation			Heterozygot: 0,025
113486A>T			
Synonyme	17	Bisher nicht beschriebene Variation	Homozygot: 0
Punktvariation			Heterozygot: 0,025
182803G>A			
Synonymer	25	Homozygot: 0,550	Homozygot: 0,375
Polymorphismus		Heterozygot: 0,4	Heterozygot: 0,525
204252T>C		(rs303815, HapMap-CEU)	
Synonyme	26	Homozygot: 0	Homozygot: 0
Punktvariation		Heterozygot: 0	Heterozygot: 0,025
208390C>T		(rs12301486, HapMap-CEU)	
		Homozygot: 0	
		Heterozygot: 0	
~		(rs12301486, AFD EUR PANEL)	
Synonymer	27	Homozygot: 0,552	Homozygot: 0,375
Polymorphismus		Heterozygot: 0,397	Heterozygot: 0,525
220/23C>A		(rs60637, HapMap-CEU)	
		II 0.714	
		Homozygot: 0,/14	
		Heterozygot: 0,286	
	1	(rs60637, SC_12_C)	

Exon 5

Bei der Sequenzierung des Exons 5 zeigte sich ein Polymorphismus an Position 100946. Bei 17 Patienten war ein heterozygoter und bei 23 Patienten ein homozygoter Basenaustausch von C nach T (100946C>T, rs4761829) feststellbar. Dieser Basenaustausch führt nicht zur Veränderung der Aminosäuresequenz und ist damit funktionell wahrscheinlich nicht relevant. In der Allgemeinbevölkerung wurde diese Variation in ähnlicher Häufigkeit gefunden wie in unserem Kollektiv, wobei das Verhältnis von homozygoter zu heterozygoter Variation bei uns zugunsten der heterozygoten Veränderung verschoben war.

<u>Exon 7</u>

Im Exon 7 fanden wir bei einem Patienten eine heterozygote Punktvariation an Position 113486, die zu einem Basenaustausch von A nach T führt. Diese Variation verändert die Aminosäureabfolge nicht (113486A>T). Diese Variation wurde bisher noch nicht beschrieben. Eine pathogenetische Bedeutung dieser Variation ist aufgrund der fehlenden Änderung der Aminosäuresequenz unwahrscheinlich.

Exon 17

Bei einer Patientin fanden wir im Exon 17 einen heterozygoten Basenaustausch an Position 182803 von G nach A. Eine Auswirkung auf die Aminosäurenabfolge hat diese Veränderung nicht (182803G>A). Bei der Patientin handelt es sich um die Patientin der exemplarischen Fallgeschichte A. Auch diese Variation wurde bisher nicht beschrieben. Da die Aminosäuresequenz von der Variation nicht beeinflusst wird, hat diese Veränderung der Basenabfolge augenscheinlich keine funktionelle Relevanz.

Exon 25

Desweiteren konnten wir einen Polymorphismus an Position 204252 des Exons 25 finden. Hier kam es bei 21 Patienten zu einem heterozygoten und bei 15 Patienten zu einem homozygoten Basenaustausch von T nach C. Diese Variation hat keine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge (204252T>C, rs303815). In der Allgemeinbevölkerung wurde diese Veränderung der Basenabfolge in ähnlicher Häufigkeit gefunden, wie in unserem Kollektiv, wobei der Anteil der homozygoten Variation in der Allgemeinbevölkerung höher war, als in unserer Studie.

<u>Exon 26</u>

Bei der Patientin der exemplarischen Fallgeschichte A ist ferner eine heterozygote Punktvariation im Exon 26 an Position 208390, mit einem Basenaustausch von C nach T aufgefallen. Auch diese Variation hat keine Auswirkung auf die Aminosäureabfolge (208390C>T, rs12301486). Die Variation wurde in der europäischen Allgemeinbevölkerung sowohl homozygot als auch heterozygot mit der Häufigkeit 0 angegeben.

Exon 27

Bei der Untersuchung des Exons 27 war ein Polymorphismus an Position 220723 feststellbar, bei dem es bei 21 Patienten zu einem heterozygoten und bei 15 Patienten zu einem homozygoten Basenaustausch von C nach A kam. Durch diesen Basenaustausch kommt es zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz (220723C>A, rs60637). In der Allgemeinbevölkerung wurde eine ähnliche Häufigkeit der Variation gefunden, wie in unserem Kollektiv, wobei der Anteil an heterozygotem Basenaustausch höher war als in unserer Studie.

4.3.3 Sequenzvariationen in den Intronabschnitten (SCN8A)

Die beobachteten Veränderungen in den mitsequenzierten Intronabschnitten sind im folgenden aufgeführt.

Intron 14

Bei der Untersuchung des Exons 15 fand sich im mitsequenzierten Intron 14 bei Position 176236 bei 12 Patienten ein heterozygoter und bei 26 Patienten ein homozygoter Basenaustausch von A nach C (rs303767).

Intron 18

Bei der Sequenzierung des Exons 18 fiel bei 38 Patienten ein Basenaustausch von G nach A bei Position 183770 im Intron 18 auf. Dabei war bei 14 Patienten ein heterozygoter und bei 24 Patienten ein homozygoter Austausch feststellbar (rs303808).

Intron 23

Auch im Intron 23 war ein Basenaustausch bei Position 202526 zu sehen. Bei 7 Patienten war ein heterozygoter und bei 1 Patient ein homozygoter Austausch von A nach G festzustellen (rs303815).

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Variationen im *SCN2A*-, *SCN3A*- oder *SCN8A*-Gen als Ursache einer frühkindlichen myoklonischen Epilepsie in Frage kommen.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein solcher Zusammenhang für das *SCN1A*-Gen besteht. Dieses Gen scheint das klinisch wichtigste "Epilepsie-Gen" zu sein. Bei mehreren kindlichen Epilepsie-Syndromen konnte ein Zusammenhang mit *SCN1A*-Varianten und Mutationen belegt werden. Die Mehrzahl der bekannten Mutationen wurde bei Patienten mit Dravet-Syndrom (schwere myoklonische Epilepsie des frühen Kindesalters), Frühkindlicher Grand mal Epilepsie mit alternierendem Hemi-Grand Mal (FKGM) und der familiären generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+-Syndrom) gefunden [Mulley et al., 2005]. Mutationen bei Patienten mit einer myoklonisch-astatischen Epilepsie (MAE) wurden überwiegend im Rahmen von GEFS+-Familien gefunden, konnten aber auch bei sporadischer myoklonisch-astatischer Epilepsie nachgewiesen werden [Ebach et al., 2005].

Da das *SCN1A*-Gen eines von mindestens vier im Gehirn exprimierten Genen eines spannungsabhängigen Natriumkanals ist, stellte sich uns nun die Frage, ob auch bei einem der drei anderen Gene ein Zusammenhang mit einer frühkindlichen myoklonischen Epilepsie gefunden werden kann.

Wir führten Gen-Analysen bei Patienten mit Dravet-Syndrom, FKGM und MAE durch, bei denen zuvor bereits eine Mutation im *SCN1A*-Gen ausgeschlossen wurde. Wir prüften per Sequenzanalyse ob bei den Patienten eine Mutation in einem der anderen spannungsabhängigen Natriumkanäle, welche im Gehirn exprimiert werden, zu finden sind (*SCN2A*, *SCN3A* und *SCN8A*).

5.1 Variationen mit Aminosäureaustausch im SCN2A-, SCN3A- und SCN8A-Gen

Die Tabellen 14a und 15a zeigen die in unserem Kollektiv gefundenen Variationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Es wird dabei die Häufigkeit in unserem Kollektiv und in der europäischen Normalbevölkerung verglichen. Im *SCN8A*-Gen waren in unserem Kollektiv keine Variationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, zu finden.

Tabelle 14a	Relative Häufigkeit von Variationen mit Aminosäureaustausch				
im SCN2A-Gen					
Variation	Exon	Frequenz (Normalbevölkerung aus NCBI)	Frequenz (unser Kollektiv)		
Missense-Variation	2	Homozygot: 0,017	Homozygot: 0		
6798G>A,		Heterozygot: 0,136	Heterozygot: 0,125		
Arg19Lys		(rs17183814, HapMap-CEU)			
		Homozygot: 0,083			
		Heterozygot: 0,125			
		(rs17183814, AFD EUR PANEL)			
Missense-Variation	26	Bisher nicht beschriebene Variation	Homozygot: 0		
97765A>C,			Heterozygot: 0,025		
Glu1551Ala					

Tabelle 15a	Relative Häufigkeit von Variationen mit Aminosäureaustausch			
	im SCN3A-Gen			
Variation	Exon	Frequenz (Normalbevölkerung aus NCBI)	Frequenz (unser Kollektiv)	
Deletion	3	In SwissProt als natürliche Variante	Homozygot: 0,075	
32776-		angegeben (Var_029743) ohne Angabe der	Heterozygot: 0	
32778AAT>-		Häufigkeit in der Bevölkerung		
			Kontrollprobanden: 0,23	
Missense-Variation	23	Bisher nicht beschriebene Variation	Homozygot: 0,025	
111667A>G,			Heterozygot: 0	
Met1372Val				
			Kontrollprobanden: 0	
Missense-Variation	28	Bisher keine Daten	Homozygot: 0	
118475G>T		(rs41265137)	Heterozygot: 0,025	
Gly1862Cys				

5.1.1 Variationen im SCN2A-Gen

Im *SCN2A*-Gen zeigte sich im Exon 2 eine Missense-Variation. Diese wurde in der Normalbevölkerung in ähnlicher Häufigkeit beschrieben, wie in unserem Kollektiv. Daher scheint sich keine funktionelle Relevanz aus dieser Punktvariation zu ergeben.

Ebenfalls im *SCN2A*-Gen zeigte sich im Exon 26 eine Missense-Variation, welche zum heterozygoten Einbau von Alanin anstatt Glutaminsäure führt (Glu1551Ala; Patientin der exemplarischen Fallgeschichte B). Bei dieser Variation handelt es sich um eine bisher nicht beschriebene Veränderung im *SCN2A*-Gen. Eine durchgeführte Kontrolle an 60 gesunden Probanden zeigte keine Variation. Bei der Schwester und der Großmutter war die Variation ebenfalls nicht nachweisbar. Die Mutter weist die beschriebene Variation heterozygot auf. Klinisch zeigt sich bei der Mutter eine periodische Ataxie.

Im *SCN2A*-Gen konnten, wie auch im *SCN1A*-Gen, in der Vergangenheit Mutationen als Ursache von Epilepsiesyndromen, gefunden werden, allerdings deutlich weniger als im *SCN1A*-Gen. Die Patienten waren überwiegend Patienten mit benignen familiären neonatal-infantilen Anfällen (BFNIS) [Heron et al., 2002, Berkovic et al., 2004, Herlenius et al., 2007, Shi et al., 2012]. Zusätzlich waren Mutationen im *SCN2A*-Gen bei Patienten mit Dravet-Syndrom [Shi et al., 2009, Shi et al., 2012], einem Epilepsie-Typ, ähnlich dem Dravet-Syndrom [Kamiya et al., 2004], sowie bei sporadisch, infantilen Spasmen, epileptischer Enzephalopahtie des Neugeborenen [Ogiwara et al., 2009], akuter Enzephalitis mit refraktären, repetitiven fokalen Anfällen [Kobayashi et al., 2012], wandernden fokalen Anfällen im Kindesalter ("migrating focal seizures of infancy") [Dhamija et al., 2013], Autismus [Weiss et al., 2003] und Anfällen im GEFS+-Spektrum [Haug et al., 2001, Sugawara et al., 2001, Shi et al., 2012], nachweisbar.

Die Patientin, bei der in unserem Kollektiv eine Variation im SCN2A-Gen gefunden werden konnte, weist klinisch eine Frühkindliche Grand mal Epilepsie (FKGM) auf (Exemplarische Fallgeschichte B). Dies ist der erste Nachweis einer Variation im bei einer Patientin mit FKGM. Die SCN2A-Gen zuvor beschriebenen Genveränderungen bei dieser Erkrankung waren im SCN1A-Gen zu finden. Die Positionen dieser zuvor beschriebenen SCNIA-Mutationen, sowie die Häufigkeit sind bei Patienten mit FKGM ähnlich wie bei Patienten mit Dravet-Syndrom. Dadurch wird ein genetischer Zusammenhang zwischen dem Dravet-Syndrom und der FKGM angedeutet [Fujiwara et al., 2003, Marini et al., 2011]. Die von uns beschriebene Variation bekräftigt diesen Zusammenhang. Wie beim Dravet-Syndrom sind auch bei der FKGM vorwiegend Mutationen im SCN1A-Gen zu finden. Uns gelang nun der Nachweis einer SCN2A-Variation bei einer Patientin mit FKGM, welche ja auch beim Dravet-Syndrom seltener nachweisbar sind.

Bei der Mutter der Patientin, welche die Variation ebenfalls heterozygot aufweist, zeigt sich klinisch eine periodische Ataxie. Bezüglich diese Krankheitsbildes konnten bisher Mutationen in vier verschiedenen Genen nachgewiesen werden: *KCNA1*, *CACNA1A*, *CACNB4* und *SLC1A3*. Diese Gene kodieren für die alpha-Untereinheit eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (*KCNA1*), die alpha-Untereinheit eines spannungsabhängigen Calciumkanals (*CACNA1A*), die beta-Untereinheit eines

spannungsabhängigen Calciumkanals (*CACNB4*), sowie einen Glutamat-Transporter (*SLC1A3*). In Genen, die für einen spannungsabhängigen Natriumkanal kodieren, wurden bisher keine Mutationen bei Patienten mit periodischer Ataxie beschrieben [Hu et al., 2013]. Wenn bei der Mutter der Patientin die selbe Variation nachweisbar ist, ohne dass bei ihr Krampfanfälle feststellbar sind, ist möglicherweise von einer inkompletten Penetranz auszugehen. Die Wahrscheinlichkeit dass es sich um eine inkomplette Penetranz handelt erscheint zusätzlich hoch, da auch bei den bisher beschriebenen Mutationen und Variationen im *SCN2A*-Gen in 14 von 20 Fällen die Genveränderung auch bei einem gesunden Elternteil nachweisbar waren.

Zur Abschätzung der funktionellen Relevanz der von uns gefundenen Variation wurde die Aminosäureabfolge der Patientin mit der äquivalenten Aminosäureabfolge der entsprechenden Stelle unterschiedlicher Spezies und Unterformen der spannungsabhängigen Natriumkanäle verglichen.



Abbildung 4: Vergleich der äquivalenten Aminosäuresequenzen von verschiedenen Spezies und der entsprechenden Abschnitte der anderen spannungsabhängigen Natriumkanäle in dem Bereich wo die Variation im Exon 26 des *SCN2A*-Gens zu finden ist. A=Alanin, R=Arginin, N=Asparagin, D=Asparaginsäure, C=Cystein, Q=Glutamin, E=Glutaminsäure, G=Glycin, H=Histidin, I=Isoleucin, L=Leucin, K=Lysin, M=Methionin, F=Phenylalanin, P=Prolin, S=Serin, T=Threonin, W=Tryptophan, Y=Tyrosin, V=Valin

Die Abbildung zeigt, dass sich die Variation in einer hoch konservierten Aminosäure-Position befindet. Dieser Umstand lässt vermuten, dass eine Variation in diesem Bereich eine große funktionelle Bedeutung haben könnte. Die verschiedenen Unterformen der spannungsabhängigen Natriumkanäle sind durch Verdopplung entstanden. Dabei entstehen bekanntermaßen Abweichungen in der Aminosäureabfolge. Wenn es in dem betreffenden Areal nicht zu einer Veränderung gekommen ist, kann dies bedeuten, dass es sich um eine wichtige Position handelt und diese nicht ohne Funktionseinbußen verändert werden kann. Das Gleiche gilt für die evolutionsbiologische Konservierung des Bereichs bei der Ausdifferenzierung unterschiedlicher Spezies. Wenn bei der Evolution die Aminosäureabfolge in diesem Bereich trotz ansonsten massiver Veränderungen des Erbguts erhalten blieb, scheint eine Veränderung in diesem Bereich funktionelle Auswirkungen zu haben.

Ein weiterer Faktor für die klinische Relevanz der gefundenen Variation ergibt sich aus der Position im Protein. Diese ist in der Abbildung 5 eingezeichnet.



Abbildung 5: Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Natriumkanals (modifiziert nach Meisler & Kearney, 2005). Die 4 homologen Domänen der alpha-Untereinheit sind mit D1 bis D4 beschriftet. Innerhalb der einzelnen Domänen sind beispielhaft in D2 - die transmembranen Segmente mit S1 bis S6 gekennzeichnet. Jeweils mit der Schleife zwischen S5 und S6 wird die Pore gebildet. Der Spannungssensor ist mit + gekennzeichnet und liegt jeweils im Segment S4. Neben der alpha-Untereinheit ist eine beta-Unterheinheit mit einer extrazellulären IgG-Schleife und einem kurzen intrazellulären C-Ende dargestellt.

Die Variation im *SCN2A*-Gen im Exon 26 (Glu 1551 Ala) befindet sich eine Aminosäure hinter der transmembranen Region S1 der Domäne 4.

Wenn man die Position im Protein betrachtet, wäre eine Veränderung im Bereich der Pore oder im Bereich des Spannungssensors als besonders ungünstig anzusehen. Die hier beschriebene Variation befindet sich nicht in einem dieser Bereiche, sondern im Anschluss an das Segment 1 der vierten Domäne. Um eine aussagekräftige Einschätzung der funktionellen Beeinträchtigung des Kanals durch die Variation zu erhalten, müssten sich funktionelle Untersuchungen anschließen.

5.1.2 Variationen im SCN3A-Gen

Bei der Sequenzierung des Exons 3 im *SCN3A*-Gen wurde eine Deletion von drei Aminosäuren mit einer relativen Häufigkeit von 0,075 gefunden. Die Deletion wird in SwissProt als natürliche Variante (Var_029743) angegeben, ohne dass dabei die Häufigkeit in der Bevölkerung angegeben wird. Die Untersuchung von 100 gesunden Kontrollprobanden ergab eine Häufigkeit der Deletion von 0,23. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Deletion keinen funktionellen Zusammenhang mit den beschriebenen Krankheitsbildern unseres Kollektivs hat. Eine funktionelle Relevanz der Deletion erscheint damit unwahrscheinlich.

Des Weiteren zeigte sich im *SCN3A*-Gen im Exon 23 eine Missense-Variation, welche zum Einbau der Aminosäure Valin, anstatt Methionin führt (Met1372Val, Patientin der exemplarischen Fallgeschichte A). Diese Variation wurde bisher nicht beschrieben. Wir untersuchten 100 gesunde Kontrollprobanden, wobei keiner die beschriebene Variation aufwies. Um zu überprüfen ob es sich um eine de novo entstandene Veränderung handelt, wurden die Eltern ebenfalls sequenziert. Dabei ergab sich, dass der gesunde Vater die selbe Variation aufweist. Bei der Mutter konnte keine Veränderung der Basenabfolge im Exon 23 festgestellt werden.

Bisher wurde das *SCN3A*-Gen vor allem im Zusammenhang mit Phantomschmerz, Allodynie und Neuralgie genannt, wobei es ein insgesamt wenig untersuchtes Gen darstellt [Cummins et al., 2001, Rogers et al., 2006, Waxman & Hains, 2006, Siqueira et al., 2009]. In einem Fall konnte eine Mutation bei einem Patienten mit kryptogener fokaler Epilepsie des Kindesalters beschrieben werden [Holland et al., 2008, Oliva et al., 2012]. Zusätzlich wird ein Zusammenhang mit der Generation von epileptischer Aktivität bei Patienten mit fokal-kortikaler Dysplasie Typ IIb vermutet [Yu et al., 2012].

Die bei uns nachgewiesene Variation im *SCN3A*-Gen findet sich bei einer Patientin mit Frühkindlicher Grand mal Epilepsie (FKGM) (Exemplarische Fallgeschichte A). Bei diesem Krankheitsbild wurden bisher Mutationen im SCNIA-Gen, nicht jedoch im SCN3A-Gen, gefunden. Die in der Literatur beschriebene Gegebenheit, sowie unsere Daten zeigen, dass möglicherweise eine Mutation im SCN3A-Gen als epilepsieauslösende Ursache in Frage kommt, wenn auch seltener als Mutationen im SCN1A- oder SCN2A-Gen. Da in unserer Analyse beim gesunden Vater die selbe Variation wie bei der Patientin nachweisbar ist, scheint es sich um eine inkomplette Penetranz zu handeln oder die Variation hat keine maßgebliche Bedeutung bei der Entstehung der Epilepsie. Bei dem einzigen zuvor beschriebenen Fall einer Mutation im SCN3A-Gen bei einem Epilepsiepatienten war die nachgewiesene DNA-Veränderung beim gesunden Vater des Patienten ebenfalls nachweisbar. Auch hier ist möglicherweise von inkompletter Penetranz auszugehen.

Um die funktionelle Relevanz der Variation im *SCN3A*-Gen in unserem Kollektiv abschätzen zu können, wurde die äquivalente Aminosäureabfolge der anderen Unterformen spannungsabhängiger Natriumkanäle, sowie die entsprechende Position bei anderen Spezies betrachtet.



Abbildung 6: Vergleich der äquivalenten Aminosäuresequenzen von verschiedenen Spezies und der entsprechenden Abschnitte der anderen spannungsabhängigen Natriumkanäle in dem Bereich wo die Variation im Exon 23 des *SCN3A*-Gens zu finden ist. A=Alanin, R=Arginin, N=Asparagin, D=Asparaginsäure, C=Cystein, Q=Glutamin, E=Glutaminsäure, G=Glycin, H=Histidin, I=Isoleucin, L=Leucin, K=Lysin, M=Methionin, F=Phenylalanin, P=Prolin, S=Serin, T=Threonin, W=Tryptophan, Y=Tyrosin, V=Valin

Die Abbildung zeigt, dass die betreffende Aminosäure im *SCN3A*-Gen verschiedener Spezies überwiegend identisch und damit konserviert ist. Bei den anderen Unterformen spannungsabhängiger Natriumkanäle sieht man nur beim *SCN2A*-Gen die selbe Aminosäure an der betreffenden Stelle. Allerdings ist auffällig, dass bei keiner der Unterformen ein Valin (wie bei der gefunden Variation) an der betreffenden Stelle eingebaut wird.

Weiterhin ist die Funktionsfähigkeit des Kanals davon abhängig an welcher Position im Protein die Variation auftritt. Diese ist in Abbildung 7 eingezeichnet.



Abbildung 7: Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Natriumkanals (modifiziert nach Meisler & Kearney, 2005). Die 4 homologen Domänen der alpha-Untereinheit sind mit D1 bis D4 beschriftet. Innerhalb der einzelnen Domänen sind beispielhaft in D2 - die transmembranen Segmente mit S1 bis S6 gekennzeichnet. Jeweils mit der Schleife zwischen S5 und S6 wird die Pore gebildet. Der Spannungssensor ist mit + gekennzeichnet und liegt jeweils im Segment S4. Neben der alpha-Untereinheit ist eine beta-Unterheinheit mit einer extrazellulären IgG-Schleife und einem kurzen intrazellulären C-Ende dargestellt.

Die Variation im *SCN3A*-Gen im Exon 23 befindet sich in der porenbildenden Schleife der Domäne 3

Die Abbildung zeigt, dass die gefundene Variation im Bereich der porenbildenden Schleife zwischen Segment 5 und 6 der dritten Domäne liegt. In funktionellen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Variationen im Bereich der Pore zu gravierenden Störungen der Kanalfunktion führen. Die von uns beschriebene Variation schein damit einen hohen funktionellen Stellenwert zu haben. Auch hier wären weitere funktionelle Untersuchungen aufschlussreich.

5.1.3 Variationen im SCN8A-Gen

In unserem Kollektiv konnte keine neue Variation im SCN8A-Gen gefunden werden. Das SCN8A-Gen wurde bisher wenig untersucht. Untersuchungen an Mäusen zeigen einen Zusammenhang mit Ataxie, Tremor, Lähmungen und Dystonie [Plummer et al., 1998, Levin & Meisler, 2004, Meisler et al., 2004], sowie reduzierter Lichtsensitivität [Cote et al., 2005]. In einer Studie konnten bei Mäusen mit SCN8A-Mutationen EEG-Veränderungen nachgewiesen werden, welche auf das Vorliegen einer Absence-Epilepsie hinweisen [Papale et al., 2009]. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie eine angehobene Krampfschwelle bei Mäusen mit Dravet-Syndrom und gleichzeitiger SCN8A-Mutation beschrieben und das SCN8A-Gen als genetischer Modifizierer dieses Syndroms bezeichnet [Martin et al., 2007]. Bei Menschen wurde in einem Fall bei einem Patienten mit Hirnatrophie, Ataxie und mentaler Retardierung eine Mutation im SCN8A-Gen beschrieben [Trudeau et al., 2006]. In Bezug auf Epilepsie gelang der Nachweis einer Mutation im SCN8A-Gen bei einer Patientin mit schwerer epileptischer Enzephalopathie, mit frühkindlichen Krampfanfällen, autistischen Zügen, geistiger Behinderung, Ataxie und SUDEP (sudden unexplained death in epilepsy) [Veeramah et al., 2012]. Erst kürzlich wurden Mutationen im SCN8A-Gen bei Patienten mit epileptischer Enzephalopathie, Infantilen Spasmen und Lennox-Gastaut-Syndrom beschrieben [O'Brien & Meisler, 2013].

In unserer Untersuchung konnte ein möglicher Zusammenhang mit frühkindlichen myoklonischen Epilepsien nicht weiter bekräftigt werden.

5.2 Weiterführende Untersuchungen

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Mutationen in den Genen *SCN2A*, *SCN3A* und *SCN8A* mit frühkindlichen myoklonischen Epilepsien in Zusammenhang stehen. Bei dem überwiegenden Anteil der von uns untersuchten Patienten konnte keine Variation nachgewiesen werden. Obwohl bei Patienten mit frühkindlicher myoklonischer Epilepsie im *SCN1A*-Gen häufig Variationen zu finden sind, lassen sich, trotz des theoretisch erklärbaren Zusammenhangs mit den anderen im Gehirn exprimierten spannungsabhängigen Natriumkanälen, nicht in dieser Häufigkeit Variationen nachweisen. Jedoch konnte in unserer Untersuchung zumindest im *SCN2A*-

und im *SCN3A*-Gen jeweils eine Variation bei Patienten mit einer frühkindlichen myoklonischen Epilepsie nachgewiesen werden. In der Genese frühkindlicher myoklonischer Epilepsien spielen DNA-Variationen in diesen Genen also möglicherweise eine Rolle, jedoch deutlich geringer als Variationen im *SCN1A*-Gen.

Das wichtigste "Epilepsie-Gen" ist nach wie vor das *SCN1A*-Gen. Mehr als 650 Mutationen wurden in diesem Gen bei Patienten mit Dravet-Syndrom, GEFS+ und einigen anderen Epilepsie-Syndromen beschrieben [Oliva et al., 2012]. Als erster Ansatzpunkt bei der genetischen Diagnostik von Patienten mit frühkindlicher myoklonischer Epilepsie, steht daher die Analyse des *SCN1A*-Gens.

Bei weiblichen Patienten schließt sich daran die Analyse des *PCDH19*-Gens an, bzw. die Untersuchung mittels Epilepsie-Gen-Panel zur Untersuchung mehrerer Gene gleichzeitig (*PCDH19* und die weiter unten beschriebenen Gene). Depienne et al. fanden bei Patienten mit Dravet-Syndrom und negativer *SCN1A*-Analyse 9 verschiedene Mutationen im *PCDH19*-Gen [Depienne et al., 2009]. Diese x-chromosomal vererbte Störung betrifft fast ausschließlich weibliche Patienten. Der zugrundeliegende pathogene Mechanismus scheint eine sogenannte zelluläre Interferenz zu sein. Das bedeutet, dass die Störung erst klinisch wirksam wird, wenn Zellen mit Mutation und Zellen ohne Mutation gemeinsam in einem Individuum auftreten. Diese Hypothese wird unterstützt durch den Nachweis eines klinisch betroffenen männlichen Patienten, welcher eine *PCDH19*-Gen sind symptomlose Überträger der Erkrankung. Es wird vermutet, dass ca. 5% der Patienten mit Dravet-Syndrom eine Mutation im *PCDH19*-Gen aufweisen [Depienne et al., 2009].

Im *CHD2*-Gen wurden kürzlich bei drei Patienten mit Dravet-Syndrom Mutationen nachgewiesen. Dieses Gen sollte ebenfalls in das Epilepsie-Gen-Panel einbezogen werden [Suls et al., 2013].

Auch im *SCN2A*-Gen konnten einige Mutationen gefunden werden, insbesondere bei Patienten mit BFNIS, GEFS+ und Dravet-Syndrom oder einem Syndrom, welches dem Dravet-Syndrom ähnelt [Oliva et al., 2012]. In unserem Kollektiv war eine Variation im *SCN2A*-Gen bei einer Patientin mit Frühkindlicher Grand mal Epilepsie nachweisbar. Das *SCN2A*-Gen ist damit in Bezug auf die spannungsabhängigen Natriumkanäle das zweitwichtigste "Epilepsie-Gen". Darauf folgt das *SCN3A*-Gen, bei welchem bisher bei einem Patienten mit kryptogener fokaler Epilepsie des Kindesalters [Holland et al., 2008] und in unserer Studie bei einer Patientin mit Frühkindlicher Grand mal Epilespie eine Variation nachgewiesen wurde. Zusätzlich wird beim *SCN3A*-Gen ein Zusammenhang mit epileptischen Anfällen bei Patienten mit fokal-kortikaler Dysplasie Typ IIb vermutet [Yu et al., 2012].

Das SCN8A-Gen betreffend konnten in unserer Studie keine neuen Erkenntnisse erzielt werden. Bisher sind bezüglich Epilepsie Mutationen im SCN8A-Gen beschrieben worden, bei einer Patientin mit schwerer epileptischer Enzephalopathie, mit frühkindlichen Krampfanfällen, autistischen Zügen, geistiger Behinderung, Ataxie und SUDEP (sudden unexplained death in epilepsy) [Veeramah et al., 2012], sowie bei Patienten mit epileptischer Enzephalopathie, Infantilen Spasmen und Lennox-Gastaut-Syndrom [O'Brien & Meisler, 2013]. Das Gen scheint in Bezug auf frühkindliche myoklonische Epilepsien wenn eine untergeordnete Rolle zu spielen. Daher scheint eine Untersuchung des SCN8A-Gens nach aktueller Datenlage eher bei Patienten mit Bewegungsstörungen wie Ataxie und Tremor, sowie bei Patienten mit den oben genannten Erkrankungsbildern (epileptische Enzephalopathie, infantile Spasmen, Lennox-Gastaut-Syndrom) sinnvoll.

Da insbesondere im *SCN2A-* und *SCN3A-*Gen Variationen bei Patienten mit frühkindlicher Epilepsie nachgewiesen werden konnten, wenn auch deutlich seltener als im *SCN1A-*Gen, ist es sicherlich sinnvoll diese Gene in ein Epilepsie-Gen-Panel mit einzubeziehen.

Wir haben uns in der vorliegenden Arbeit darauf beschränkt die alpha-Untereinheit der spannungsabhängigen Natriumkanäle zu untersuchen. Bei möglichen weiteren Untersuchungen könnte auch die beta-Untereinheit der spannungsabhängigen Natriumkanäle Berücksichtigung finden. Bisher wurden vier Mutationen im *SCN1B*-Gen bei Patienten im GEFS+-Spektrum identifiziert [Oliva et al., 2012], sowie eine Mutation bei einem Patienten mit Dravet-Syndrom [Marini et al., 2011].

Shi et al. wiesen in einer Analyse bei Patienten mit frühkindlicher Epilepsie eine missense-Mutation im *GABRG2*-Gen nach [Shi et al., 2010]. Auch dieses Gen sollte in das Epilepsie-Gen-Panel einbezogen werden.

6 Zusammenfassung

Das Dravet-Syndrom, die Frühkindliche Grand mal Epilepsie und die myoklonischastatische Epilepsie gehören zu den frühkindlichen myoklonischen Epilepsien. In der Vergangenheit wurde bei diesen Epilepsie-Syndromen immer wieder ein gemeinsamer genetischer Hintergrund vermutet, zumal sie in Multiplexfamilien nebeneinander auftreten. In früheren Arbeiten wurden zahlreiche verschiedene Mutationen im SCN1A-Gen bei Patienten mit schwerer frühkindlicher myoklonischer Epilepsie (Dravet-Syndrom) beschrieben. Dieses Gen ist das bisher mit Abstand wichtigste "Epilepsie-Gen" des Menschen und kodiert die alpha-Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals. Dieser ist von entscheidender Bedeutung für die Initiation und Ausbreitung von Aktionspotentialen in Interneuronen. Im Gehirn werden vier verschiedene dieser spannungsabhängigen Natriumkanäle exprimiert (SCN1A, SCN2A, SCN3A und SCN8A). Da der Aufbau, die Funktion und zum Teil auch die Lokalisation der anderen im Gehirn exprimierten spannungsabhängigen Natriumkanäle denen des SCN1A sehr ähnlich sind, stellte sich uns die Frage, ob auch Mutationen im SCN2A-, SCN3A- oder SCN8A-Gen als Ursache einer frühkindlichen myoklonischen Epilepsie in Frage kommen.

Wir führten Gen-Analysen bei insgesamt 40 Patienten mit Dravet-Syndrom, Frühkindlicher Grand mal Epilepsie und myoklonisch-astatischer Epilepsie durch, bei denen zuvor bereits eine Mutation im *SCN1A*-Gen ausgeschlossen wurde. Wir prüften mittels DNA-Sequenzanalyse, ob bei den Patienten eine Variation in einem der anderen spannungsabhängigen Natriumkanäle, die im Gehirn exprimiert werden, zu finden sind (*SCN2A*, *SCN3A* und *SCN8A*).

Es konnten dabei zwei bisher nicht beschriebene DNA-Variationen gefunden werden. Die erste Variation findet sich im *SCN2A*-Gen im Exon 26. Es handelt sich um eine missense-Variante bei einer Patientin mit Frühkindlicher Grand mal Epilepsie. Die Punktvariation führt zum Austausch einer Aminosäure in einem hoch konservierten Bereich im Anschluss an das Segment 1 der vierten Domäne des Kanalproteins (Glu1551Ala). Die Untersuchung von 60 gesunden Kontrollprobanden zeigte keine Veränderungen in diesem Bereich. Die Mutter der Patientin, bei der eine periodische Ataxie aber keine Krampfanfälle bestehen, weist die beschriebene Variation ebenfalls
heterozygot auf. Man muss daher entweder von inkompletter Penetranz ausgehen oder annehmen, dass diese DNA-Variation keine maßgebliche Bedeutung für die Entstehung der Epilepsie hat. Bei den bisher bekannten Variationen im *SCN2A*-Gen ist in 14 von 20 Fällen die Variation ebenfalls bei einem gesunden Elternteil nachweisbar.

Die zweite Variation wurde im SCN3A-Gen im Exon 23 bei einer Patientin mit Frühkindlicher Grand mal Epilepsie gefunden. Auch hierbei handelt es sich um eine missense-Variante. Diese befindet sich im Protein im Bereich einer porenbildenden Schleife (Met1372Val). Die äquivalente Aminosäureposition anderer Spezies zeigt überwiegend dieselbe Aminosäure. Dies weist darauf hin, dass es sich um einen konservierten Bereich handelt. Im Vergleich mit der äquivalenten Position der anderen spannungsabhängigen Natriumkanäle zeigt sich jedoch, dass nur das SCN2A-Gen die selbe Aminosäure in diesem Bereich aufweist, es sich also nicht um einen hochkonservierten Abschnitt handelt. Die Untersuchung von 100 gesunden Kontrollprobanden erbrachte keine Variation in diesem Bereich. Beim gesunden Vater der Patientin konnte die Variation ebenfalls nachgewiesen werden. Auch hier ist von inkompletter Penetranz auszugehen. In der Literatur ist bisher nur eine Mutation im SCN3A-Gen bezüglich Epilepsie nachgewiesen worden. Diese war bei einem Patienten mit kryptogen fokaler Epilepsie des Kindesalters. In diesem Fall wies der gesunde Vater die gleiche Mutation auf. Beim Großvater, der nicht getestet wurde, bestand eine Absence-Epilepsie des Kindesalters.

Durch die durchgeführte Analyse konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit frühkindlicher myoklonischer Epilepsie DNA-Variationen im *SCN2A-* und *SCN3A-*Gen nachweisbar sind, allerdings in deutlich geringerer Häufigkeit als im *SCN1A-*Gen. Da in beiden Genen keine deletären Mutationen gefunden wurden, bleibt die Bedeutung beider Gene für die Entstehung der Epilepsie im untersuchten Kollektiv fraglich. Die Segregation der gefundenen DNA-Varianten erlaubt allenfalls die Vermutung einer geringen pathogenetischen Bedeutung im Rahmen eines komplexen Vererbungsmusters mit reduzierter Penetranz.

Ein Zusammenhang zwischen *SCN8A*-Mutationen und frühkindlichen myoklonischen Epilepsien konnte in unserer Arbeit nicht nachgewiesen werden. Eine weiterführende Überprüfung in einem größeren Patientenkollektiv ist sicherlich möglich, es erscheint aber nicht wahrscheinlich, dass sich dadurch eine veränderte Aussage ergeben würde. Nach der aktuellen Literatur scheint die Untersuchung des *SCN8A*-Gens bei Patienten mit Bewegungsstörungen wie Ataxie und Tremor, sowie bei Patienten mit epileptischer Enzephalopathie, Infantilen Spasmen und Lennox-Gastaut-Syndrom sinnvoll.

Da in unserer Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen Epilepsien und Mutationen im *SCN2A*- und *SCN3A*-Gen in Ausnahmefällen gezeigt werden konnte, wäre es sinnvoll diese Gene in ein sogenanntes Epilepsie-Gen-Panel einzubeziehen, bei welchem mehrere Gene gleichzeitig untersucht werden können. Aus heutiger Sicht sollte solch ein Panel zur Untersuchung von frühkindlichen myoklonischen Epilepsien mindestens folgende Gene beinhalten: *SCN1A*, *PCDH19*, *SCN2A*, *CHD2*, *SCN3A*, *SCN1B*, *GABRG2*.

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit mittels Array-CGH, einem Verfahren, bei dem das Genom eines Menschen mit einer unauffälligen Referenzprobe verglichen wird, Deletionen oder Duplikationen zum Beispiel im *SCN*-Gen-Cluster nachzuweisen. Balancierte Strukturaberrationen sind mit diesem Verfahren nicht nachweisbar. In der Literatur wurden Duplikationen und Deletionen im Chromosom 2q24, welche die Gene *SCN2A*, *SCN3A* und teilweise *SCN1A* umfassen, unter anderem bei Patienten mit Dravet-Syndrom beschrieben.

7 <u>Summary</u>

Dravet syndrome, severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures and myoclonic-astatic epilepsy are affiliated to early childhood myoclonic epilepsy. In the past, a common genetic background was assumed for these types of epilepsy syndromes, particularly because they are found in multiplex families. Previous studies showed numerous different mutations of the gene *SCN1A* in patients with severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome). This gene appears to be the "epilepsy-gene" with the most clinical relevance, encoding the alpha sub-unit of a voltage-gated sodium channel. This channel determines the initiation and expansion of action potentials in neurons. Four voltage-gated sodium channels are expressed in the brain (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* and *SCN8A*). Configuration, function and partly also localisation of the other brain-expressed voltage-gated sodium channels are very similar to *SCN1A*. The question was whether mutations in *SCN2A*, *SCN3A* or *SCN8A* genes could also be the cause of early childhood myoclonic epilepsy.

We performed gene analysis of 40 patients with Dravet syndrome, severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures and myoclonic-astatic epilepsy. The presence of a mutation of *SCN1A* gene was excluded from these patients beforehand. Using DNA sequence analysis we searched for mutations in other brain-expressed voltage-gated sodium channels (*SCN2A*, *SCN3A* and *SCN8A*).

Two variations of DNA were found, which have not been previously described. The first variation was found in exon 26 of *SCN2A*, being a missense variation in a female patient with severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonicclonic seizures. This point variation results in amino acid exchange in a highly conserved area with attachment to Segment 1 of the fourth domain of channel protein (Glu 1551Ala). The analysis of 60 unaffected probands did not show any abnormality in this area. Heterozygous variation was found in the patient's mother, who suffered from periodic ataxia but no seizures. Either incomplete penetrance has to be assumed, or the variation of DNA has no relevant significance for the development of the epilepsy. In the hitherto identified variants of *SCN2A* the variation was detected in an unaffected parent in 14 out of 20 cases. The second variation was found in exon 23 of *SCN3A* in a female patient with severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures. This is also a missense-variation, located in the protein's pore building loop (Met1372Val). The equivalent position of the amino acid in other species shows predominantly the same amino acid, suggesting a conserved area. In comparison with the equivalent position of the other voltage-gated sodium channels, it does not seem to be a highly conserved area, as only *SCN2A* shows the same amino acid in this position. The analysis of 100 unaffected probands did not show any variation in this area. The unaffected patient's father shows the same variation, so it seems to be incomplete penetrance. Only one mutation of *SCN3A* relating to epilepsy was previously described in the literature. This was a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy. In this case the healthy father showed the same mutation. The grandfather, who has not been tested, was diagnosed with childhood absence epilepsy.

In performing this analysis we showed that mutations of *SCN2A* and *SCN3A* genes are detectable in patients with early childhood myoclonic epilepsy, however less frequently than in the *SCN1A* gene. No deletion mutation was found in these two genes. Consequently, the relevance of the two genes in the appearance of epilepsy in our analyzed collective remains questionable. The identified segregation of the DNA variations only seems to have a small pathogenic significance in a complex pattern of heredity with incomplete penetrance.

A correlation between *SCN8A* mutations and early childhood myoclonic epilepsy could not be demonstrated in this study. Futher analysis in a greater patient sample could be done but it is unlikely that it would generate a different conclusion. Considering the current literature it seems reasonable to analyze *SCN8A* in patients with movement disorders such as ataxia and tremor as well as in patients with epileptic encephalopathies, infantile spasms and Lennox-Gastaut syndrome.

We were able to show a possible correlation between epilepsies and mutations in *SCN2A* and *SCN3A* genes in exceptional cases. Therefore, it would make sense to iclude these genes in a so-called epilepsy gene panel. In this panel, up to several hundred genes could be analyzed at the same time. A panel to analyze early childhood myoclonic

epilepsies currently has to consider as a minimum the following genes: SCN1A, PCDH19, SCN2A, CHD2, SCN3A, SCN1B, GABRG2.

Furthermore, it is possible to detect deletions and duplications in for example the *SCN* gene cluster using array-CGH. This compares the genome of a person with a normal reference sample. Balanced structural aberrations cannot be detected with this method. The current literature describes duplications and deletions in chromosome 2q24, which involves *SCN2A*, *SCN3A* and partially *SCN1A*, in patients with Dravet syndrome amongst others.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen		
	Natriumkanals (modifiziert nach Meisler & Kearney, 2005)	Seite 16
Abbildung 2	Auszug aus dem Programm SecScape (Screen shot,	
	Alexandra Mignon)	Seite 40
Abbildung 3	Darstellung eines Elektropherogramms (Screen shot,	
	Alexandra Mignon)	Seite 41
Abbildung 4	Vergleich der äquivalenten Aminosäuresequenzen, Exon 26,	
	SCN2A (Alexandra Mignon)	Seite 59
Abbildung 5	Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen	
	Natriumkanals mit Variation im SCN2A-Gen (modifiziert	
	nach Meisler & Kearney, 2005, Alexandra Mignon)	Seite 60
Abbildung 6	Vergleich der äquivalenten Aminosäuresequenzen, Exon 23,	
	SCN3A (Alexandra Mignon)	Seite 62
Abbildung 7	Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen	
	Natriumkanals mit Variation im SCN3A-Gen (modifiziert	
	nach Meisler & Kearney, 2005, Alexandra Mignon)	Seite 63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Genes associated with epilepsy syndromes.	
	(aus Poduri & Lowenstein 2011)	Seite 10
Tabelle 2	Bekannte Mutationen im SCN2A-Gen bezüglich	
	Epilepsie	Seite 20
Tabelle 3	Bekannte Mutationen im SCN3A-Gen bezüglich	
	Epilepsie	Seite 23
Tabelle 4	Bekannte Mutationen im SCN8A-Gen bezüglich	
	Epilepsie	Seite 25
Tabelle 5	Protokoll zur Extraktion von DNA aus EDTA-Blut	Seite 33
Tabelle 6	Kriterien zur Auswahl optimaler Oligonukleotidpaare	Seite 35
Tabelle 7	Oligonukleotid-Primer-Kombinationen im PCR-	
	Ansatz	Seite 37
Tabelle 8	PCR: Ansatzbedingung und Programm im	
	Thermocycler	Seite 38
Tabelle 9	Sequenzansatz und Programm im Thermocycler	Seite 39
Tabelle 10	Patientenkollektiv mit Geschlechterverteilung	Seite 42
Tabelle 11	In unserer Studie festgestellte Variationen im	
	SCN2A2-Gen	Seite 45
Tabelle 12	In unserer Studie festgestellte Variationen im	
	SCN3A-Gen	Seite 46
Tabelle 13	In unserer Studie festgestellte Variationen im	
	SCN8A-Gen	Seite 46
Tabelle 14	Relative Häufigkeit von Variationen im SCN2A-Gen	Seite 47
Tabelle 14a	Relative Häufigkeit von Variationen mit	
	Aminosäureaustausch im SCN2A-Gen	Seite 57
Tabelle 15	Relative Häufigkeit von Variationen im SCN3A-Gen	Seite 50
Tabelle15a	Relative Häufigkeit von Variationen mit	
	Aminosäureaustausch im SCN3A-Gen	Seite 57
Tabelle 16	Relative Häufigkeit von Variationen im SCN8A-Gen	Seite 53
Tabelle 17	Basenabfolge der Oligonukleotid-Primerpaare	Seite 82

Literaturverzeichnis

- Audenaert D, Claes L, Claeys KG, Deprez L, Van Dyck T, Goossens D, Del-Favero J, Van Paesschen W, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. A novel susceptibility locus at 2p24 for generalised epilepsy with febrile seizures plus. J Med Genet. 2005 Dec;42(12):947-52. Epub 2005 Apr 12.
- Arzimanoglou A, Guerrini R, Aicardi J. Aicardi's Epilepsy in children. Third edition. Lippincott Williams & Wilkins 2004
- Bartnik M, Chun-Hui Tsai A, Xia Z, Cheung SW, Stankiewicz P. Disruption of the SCN2A and SCN3A genes in a patient with mental retardation, neurobehavioral and psychiatric abnormalities, and a history of infantile seizures. Clin Genet. 2011 Aug;80(2):191-5. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01526.x. Epub 2010 Aug 2.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia. 2010 Apr;51(4):676-85. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x. Epub 2010 Feb 26.
- Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, Gambardella A, Steinlein OK, Grinton BE, Dean JT, Bordo L, Hodgson BL, Yamamoto T, Mulley JC, Zara F, Scheffer IE. Benign familial neonatalinfantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. Ann Neurol. 2004 Apr;55(4):550-7.
- Berkovic SF, Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S. Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. Trends Neurosci. 2006 Jul;29(7):391-7
- Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 9;97(10):5616-20
- Catterall WA. Sodium Channel Mutations and Epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. Source Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
- Chen CP, Lin SP, Chern SR, Chen YJ, Tsai FJ, Wu PC, Wang W. Array-CGH detection of a de novo 2.8 Mb deletion in 2q24.2-->q24.3 in a girl with autistic features and developmental delay. Eur J Med Genet. 2010 Jul-Aug;53(4):217-20. doi: 10.1016/j.ejmg.2010.03.006. Epub 2010 Mar 24.
- Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P.
 De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. Am J Hum Genet. 2001 Jun;68(6):1327-32.
 Epub 2001 May 15
- Cote PD, De Repentigny Y, Coupland SG, Schwab Y, Roux MJ, Levinson SR, Kothary R. Physiological maturation of photoreceptors depends on the voltage-gated sodium channel NaV1.6 (*Scn8a*). J Neurosci. 2005 May 18;25(20):5046-50.
- Craner MJ, Newcombe J, Black JA, Hartle C, Cuzner ML, Waxman SG. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na+/Ca2+ exchanger. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 May 25;101(21):8168-73. Epub 2004 May 17

- Cummins TR, Aglieco F, Renganathan M, Herzog RI, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons. J Neurosci. 2001 Aug 15;21(16):5952-61
- Davidsson J, Collin A, Olsson ME, Lundgren J, Soller M. Deletion of the SCN gene cluster on 2q24.4 is associated with severe epilepsy: an array-based genotype-phenotype correlation and a comprehensive review of previously published cases. Epilepsy Res. 2008 Sep;81(1):69-79. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2008.04.018. Epub 2008 Jun 9.
- Depienne C, Bouteiller D, Keren B, Cheuret E, Poirier K, Trouillard O, Benyahia B, Quelin C, Carpentier W, Julia S, Afenjar A, Gautier A, Rivier F, Meyer S, Berquin P, Hélias M, Py I, Rivera S, Bahi-Buisson N, Gourfinkel-An I, Cazeneuve C, Ruberg M, Brice A, Nabbout R, Leguern E. Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. PLoS Genet. 2009 Feb;5(2):e1000381. doi: 10.1371/journal.pgen.1000381. Epub 2009 Feb 13.
- Depienne C, Gourfinkel-An I, Baulac S, LeGuern E. Genes in infantile epileptic encephalopathies. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. Source Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
- Dhamija R, Wirrell E, Falcao G, Kirmani S, Wong-Kisiel LC. Novel de novoSCN2A Mutation in a Child With Migrating Focal Seizures of Infancy.PediatrNeurol.2013Dec;49(6):486-8.10.1016/j.pediatrneurol.2013.07.004. Epub 2013 Aug 26.
- Doose H. [Pathogenesis of epilepsy in childhood and adolescence] [Article in German]. Monatsschr Kinderheilkd. 1992 Jul;140(7):385-90
- Doose H. Epilepsien im Kindes- und Jugendalter. 11. Auflage. Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg 1998
- Doose H, Lunau H, Castiglione E, Waltz S. Severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures. Neuropediatrics. 1998 Oct;29(5):229-38
- Dravet, Charlotte. Dravet's syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy). www.ilae-epilepsy.org/Visitors/Centre/ctf/dravet.cfm. Stand März 2003, gefunden am 18.12.06
- Dravet C, Bureau M, Oguni H, Fukuyama Y, Cokar O Severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome). In: Roger J, Bureau M, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P. Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence. Third edition. John Libbey &Co Ltd. 81-103 (2002)
- Dravet C. Dravet syndrome history. (2011a) Dev Med Child Neurol. Apr;53 Suppl 2:1-6. doi: 10.1111/j.1469-8749.2011.03964.x.
- Dravet C.The core Dravet syndrome phenotype. (2011b) Epilepsia. Apr;52 Suppl 2: 3-9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.02994.x.
- Dubé CM, McClelland S, Choy MK, Brewster AL, Noam Y, Baram TZ. Fever, febrile seizures and epileptogenesis. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
- Ebach K, Joos H, Doose H, Stephani U, Kurlemann G, Fiedler B, Hahn A, Hauser E, Hundt K, Holthausen H, Muller U, Neubauer BA. *SCN1A* mutation

analysis in myoclonic astatic epilepsy and severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures. Neuropediatrics. 2005 Jun;36(3):210-3.

- Engel J Jr; International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. Epilepsia. 2001 Jun;42(6):796-803
- Estacion M, Gasser A, Dib-Hajj SD, Waxman SG. A sodium channel mutation linked to epilepsy increases ramp and persistent current of Nav1.3 and induces hyperexcitability in hippocampal neurons. Exp Neurol. 2010 Aug;224(2):362-8. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.04.012. Epub 2010 Apr 24.
- Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Takahashi Y, Fukushima K, Watanabe M, Hara K, Morikawa T, Yagi K, Yamakawa K, Inoue Y. Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. Brain. 2003 Mar;126(Pt 3):531-46
- Guerrini R, Parmeggiani L, Kaminska A, Dulac O. Myoclonic astatic epilepsy. In: Roger J, Bureau M, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P. Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence. Third edition. John Libbey &Co Ltd. 105-112 (2002)
- Haug K, Hallmann K, Rebstock J, Dullinger J, Muth S, Haverkamp F, Pfeiffer H, Rau B, Elger CE, Propping P, Heils A. The voltage-gated sodium channel gene SCN2A and idiopathic generalized epilepsy. Epilepsy Res. 2001 Dec;47(3):243-6.
- Herlenius E, Heron SE, Grinton BE, Keay D, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. *SCN2A* mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: the phenotypic spectrum. Epilepsia. 2007 Jun;48(6):1138-42. Epub 2007 Mar 26.
- Heron SE, Crossland KM, Andermann E, Phillips HA, Hall AJ, Bleasel A, Shevell M, Mercho S, Seni MH, Guiot MC, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE. Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. Lancet. 2002 Sep 14;360(9336):851-2.
- Heron SE, Scheffer IE, Grinton BE, Eyre H, Oliver KL, Bain S, Berkovic SF, Mulley JC. Familial neonatal seizures with intellectual disability caused by a microduplication of chromosome 2q24.3. Epilepsia. 2010 Sep;51(9):1865-9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02558.x.
- Holland KD, Kearney JA, Glauser TA, Buck G, Keddache M, Blankston JR, Glaaser IW, Kass RS, Meisler MH. Mutation of sodium channel *SCN3A* in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy. Neurosci Lett. 2008 Mar 5;433(1):65-70. Epub 2008 Jan 11.
- Hu Y, Jiang H, Wang Q, Xie Z, Pan S. Identification of a Novel Nonsense Mutation p.Tyr1957Ter of CACNA1A in a Chinese Family with Episodic Ataxia 2. PLoS One. 2013;8(2):e56362. doi: 10.1371/journal.pone.0056362. Epub 2013 Feb 18.
- Kamiya K, Kaneda M, Sugawara T, Mazaki E, Okamura N, Montal M, Makita N, Tanaka M, Fukushima K, Fujiwara T, Inoue Y, Yamakawa K A nonsense mutation of the sodium channel gene *SCN2A* in a patient with intractable epilepsy and mental decline. J Neurosci. 2004 Mar 17;24(11):2690-8
- Kelley SA, Kossoff EH. Doose syndrome (myoclonic-astatic epilepsy): 40 years of

progress. Dev Med Child Neurol. 2010 Nov;52(11):988-93. doi:

10.1111/j.1469-8749.2010.03744.x. Epub 2010 Aug 16.

- Kobayashi K, Ohzono H, Shinohara M, Saitoh M, Ohmori I, Ohtsuka Y, Mizuguchi M. Acute encephalopathy with a novel point mutation in the SCN2A gene. Epilepsy Res. 2012 Nov;102(1-2):109-12. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2012.04.016. Epub 2012 May 14
- Krepischi AC, Knijnenburg J, Bertola DR, Kim CA, Pearson PL, Bijlsma E, Szuhai K, Kok F, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C. Two distinct regions in 2q24.2-q24.3 associated with idiopathic epilepsy. Epilepsia. 2010 Dec;51(12):2457-60. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02742.x. Epub 2010 Sep 30.
- Levin SI, Meisler MH. Floxed allele for conditional inactivation of the voltagegated sodium channel *Scn8a* (NaV1.6). Genesis. 2004 Aug;39(4):234-9
- Liao Y, Anttonen AK, Liukkonen E, Gaily E, Maljevic S, Schubert S, Bellan-Koch A, Petrou S, Ahonen VE, Lerche H, Lehesjoki AE. SCN2A mutation associated with neonatal epilepsy, late-onset episodic ataxia, myoclonus, and pain. (2010a) Neurology. 2010 Oct 19;75(16):1454-8. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181f8812e.
- Liao Y, Deprez L, Maljevic S, Pitsch J, Claes L, Hristova D, Jordanova A, Ala-Mello S, Bellan-Koch A, Blazevic D, Schubert S, Thomas EA, Petrou S, Becker AJ, De Jonghe P, Lerche H. Molecular correlates of age-dependent seizures in an inherited neonatal-infantile epilepsy. (2010b) Brain. 2010 May;133(Pt 5):1403-14. doi: 10.1093/brain/awq057. Epub 2010 Apr 5
- Lim BC, Min BJ, Park WY, Oh SK, Woo MJ, Choi JS, Kim KJ, Hwang YS, Chae JH. A Unique Phenotype of 2q24.3-2q32.1 Duplication: Early Infantile Epileptic Encephalopathy Without Mesomelic Dysplasia. J Child Neurol. 2013 Mar 1. [Epub ahead of print]
- Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, Suls A, De Jonghe P, Zara F, Guerrini R. The genetics of Dravet syndrome. Epilepsia. 2011 Apr;52 Suppl 2:24-9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.02997.x.
- Martin MS, Tang B, Papale LA, Yu FH, Catterall WA, Escayg A. The voltage-gated sodium channel *Scn8a* is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. Hum Mol Genet. 2007 Dec 1;16(23):2892-9. Epub 2007 Sep 19.
- Meisler MH, O'Brien JE. Gene Interactions and Modifiers in Epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. Source Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
- Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. J Clin Invest. 2005 Aug;115(8):2010-7
- Meisler MH, Plummer NW, Burgess DL, Buchner DA, Sprunger LK. Allelic mutations of the sodium channel *SCN8A* reveal multiple cellular and physiological functions. Genetica. 2004 Sep;122(1):37-45
- Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, Dibbens LM, Berkovic SF, Harkin LA. *SCN1A* mutations and epilepsy. Hum Mutat. 2005 Jun;25(6):535-42
- Nakayama J, Arinami T. Molecular genetics of febrile seizures. Epilepsy Res. 2006 Aug;70 Suppl 1:S190-8. Epub 2006 Aug 2
- Nimmakayalu M, Noble N, Horton VK, Willing M, Copeland S, Sheffield V, Nagy PL, Wassink T, Patil S, Shchelochkov OA. 2q24 deletions: further characterization of clinical findings and their relation to the SCN cluster. Am J Med Genet A. 2012 Nov;158A(11):2767-74. doi: 10.1002/ajmg.a.35362.

Epub 2012 Sep 28.

- O'Brien JE, Meisler MH. Sodium channel SCN8A (Nav1.6): properties and de novo mutations in epileptic encephalopathy and intellectual disability. Front Genet. 2013 Oct 28;4:213
- Ogiwara I, Ito K, Sawaishi Y, Osaka H, Mazaki E, Inoue I, Montal M, Hashikawa T, Shike T, Fujiwara T, Inoue Y, Kaneda M, Yamakawa K. De novo mutations of voltage-gated sodium channel alphaII gene *SCN2A* in intractable epilepsies. Neurology. 2009 Sep 29;73(13):1046-53.
- Ohki T, Watanabe K, Negoro T, Aso K, Haga Y, Kasai K, Kito M, Maeda N. Severe myoclonic epilepsy in infancy: evolution of seizures. Seizure. 1997 Jun;6(3):219-24
- Okumura A, Yamamoto T, Shimojima K, Honda Y, Abe S, Ikeno M, Shimizu T. Refractory neonatal epilepsy with a de novo duplication of chromosome 2q24.2q24.3. Epilepsia. 2011 Jul;52(7):e66-9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03139.x. Epub 2011 Jun 21.
- Oliva M, Berkovic SF, Petrou S. Sodium channels and the neurobiology of epilepsy. Epilepsia. 2012 Nov;53(11):1849-59. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03631.x. Epub 2012 Aug 20.
- Papale LA, Beyer B, Jones JM, Sharkey LM, Tufik S, Epstein M, Letts VA, Meisler MH, Frankel WN, Escayg A. Heterozygous mutations of the voltage-gated sodium channel SCN8A are associated with spike-wave discharges and absence epilepsy in mice. Hum Mol Genet. 2009 May 1;18(9):1633-41. Epub 2009 Mar 2.
- Plummer NW, Galt J, Jones JM, Burgess DL, Sprunger LK, Kohrman DC, Meisler MH. Exon organization, coding sequence, physical mapping, and polymorphic intragenic markers for the human neuronal sodium channel gene SCN8A. Genomics. 1998 Dec 1;54(2):287-96
- Poduri A, Lowenstein D. Epilepsy genetics--past, present, and future. Curr Opin Genet Dev. 2011 Jun;21(3):325-32. doi: 10.1016/j.gde.2011.01.005. Epub 2011 Jan 27.
- Raymond G, Wohler E, Dinsmore C, Cox J, Johnston M, Batista D, Wang T. An interstitial duplication at 2q24.3 involving the SCN1A, SCN2A, SCN3A genes associated with infantile epilepsy. Am J Med Genet A. 2011 Apr;155A(4):920-3. doi: 10.1002/ajmg.a.33929. Epub 2011 Mar 17.
- Rhodes TH, Vanoye CG, Ohmori I, Ogiwara I, Yamakawa K, George AL Jr. Sodium channel dysfunction in intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures. J Physiol. 2005 Dec 1;569(Pt 2):433-45. Epub 2005 Oct 6
- Robinson R, Gardiner M. Genetics of childhood epilepsy. Arch Dis Child. 2000 Feb;82(2):121-5
- Roger J, Bureau M, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P. Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence. Third edition. John Libbey &Co Ltd. 2002
- Rogers M, Tang L, Madge DJ, Stevens EB. The role of sodium channels in neuropathic pain. Semin Cell Dev Biol. 2006 Oct;17(5):571-81. Epub 2006 Oct 28
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic

disorder with heterogeneous clinical phenotypes. Brain. 1997 Mar;120 (Pt 3):479-90

- Scheffer IE, Wallace R, Mulley JC, Berkovic SF. Clinical and molecular genetics of myoclonic-astatic epilepsy and severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome). Brain Dev. 2001 Nov;23(7):732-5
- Shi X, Yasumoto S, Nakagawa E, Fukasawa T, Uchiya S, Hirose S. Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome. Brain Dev. 2009 Nov;31(10):758-62. Epub 2009 Sep 23.
- Shi X, Huang MC, Ishii A, Yoshida S, Okada M, Morita K, Nagafuji H, Yasumoto S, Kaneko S, Kojima T, Hirose S. Mutational analysis of *GABRG2* in a Japanese cohort with childhood epilepsies. J Hum Genet. 2010 May 20
- Shi X, Yasumoto S, Kurahashi H, Nakagawa E, Fukasawa T, Uchiya S, Hirose S. Clinical spectrum of SCN2A mutations. Brain Dev. 2012 Aug;34(7):541-5. doi: 10.1016/j.braindev.2011.09.016. Epub 2011 Oct 24.
- Siqueira SR, Alves B, Malpartida HM, Teixeira MJ, Siqueira JT. Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. Neuroscience. 2009 Dec 1;164(2):573-7. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.037. Epub 2009 Aug 21.
- Strachan T, Read AP. Molekulare Humangenetik. 1996 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford
- Striano P, Bordo L, Lispi ML, Specchio N, Minetti C, Vigevano F, Zara F. A novel SCN2A mutation in family with benign familial infantile seizures. Epilepsia. 2006 Jan;47(1):218-20
- Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, Ito M, Fukuma G, Mazaki-Miyazaki E, Nagafuji H, Noda M, Imoto K, Wada K, Mitsudome A, Kaneko S, Montal M, Nagata K, Hirose S, Yamakawa K A missense mutation of the Na+ channel alpha II subunit gene Na(v)1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 22;98(11):6384-9
- Suls A, Jaehn JA, Kecskés A, Weber Y, Weckhuysen S, Craiu DC, Siekierska A, Djémié T, Afrikanova T, Gormley P, von Spiczak S, Kluger G, Iliescu CM, Talvik T, Talvik I, Meral C, Caglayan HS, Giraldez BG, Serratosa J, Lemke JR, Hoffman-Zacharska D, Szczepanik E, Barisic N, Komarek V, Hjalgrim H, Møller RS, Linnankivi T, Dimova P, Striano P, Zara F, Marini C, Guerrini R, Depienne C, Baulac S, Kuhlenbäumer G, Crawford AD, Lehesjoki AE, de Witte PA, Palotie A, Lerche H, Esguerra CV, De Jonghe P, Helbig I; EuroEPINOMICS RES Consortium. De Novo Loss-of-Function Mutations in CHD2 Cause a Fever-Sensitive Myoclonic Epileptic Encephalopathy Sharing Features with Dravet Syndrome. Am J Hum Genet. 2013 Nov 7;93(5):967-75. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.09.017. Epub 2013 Oct 24.
- Tan EH, Yusoff AA, Abdullah JM, Razak SA. Generalized epilepsy with febrile seizure plus (GEFS+) spectrum: Novel de novo mutation of SCN1A detected in a Malaysian patient. J Pediatr Neurosci. 2012 May;7(2):123-5. doi: 10.4103/1817-1745.102575.
- Trudeau MM, Dalton JC, Day JW, Ranum LP, Meisler MH. Heterozygosity for a protein truncation mutation of sodium channel *SCN8A* in a patient with cerebellar atrophy, ataxia, and mental retardation. J Med Genet. 2006 Jun;43(6):527-30. Epub 2005 Oct 19.
- Vecchi M, Cassina M, Casarin A, Rigon C, Drigo P, De Palma L, Clementi M.

Seite 81

Infantile epilepsy associated with mosaic 2q24 duplication including SCN2A and SCN3A. Seizure. 2011 Dec;20(10):813-6. doi: 10.1016/j.seizure.2011.07.008. Epub 2011 Sep 3.

- Veeramah KR, O'Brien JE, Meisler MH, Cheng X, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Talwar D, Girirajan S, Eichler EE, Restifo LL, Erickson RP, Hammer MF. De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. Am J Hum Genet. 2012 Mar 9;90(3):502-10. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.01.006. Epub 2012 Feb 23.
- Waxman SG, Hains BC. Fire and phantoms after spinal cord injury: Na+ channels and central pain. Trends Neurosci. 2006 Apr;29(4):207-15. Epub 2006 Feb 21
- Weiss LA, Escayg A, Kearney JA, Trudeau M, MacDonald BT, Mori M, Reichert J, Buxbaum JD, Meisler MH. Sodium channels *SCN1A*, *SCN2A* and *SCN3A* in familial autism. Mol Psychiatry. 2003 Feb;8(2):186-94.
- Yu S, Li S, Shu H, Zhang C, He J, Fan X, Yang H. Upregulated expression of voltagegated sodium channel Nav1.3 in cortical lesions of patients with focal cortical dysplasia type IIb. Neuroreport. 2012 May 9;23(7):407-11. doi: 10.1097/WNR.0b013e328351db48.

Anhang

Tabelle 17	Basenabfolge der Oligonukleotid-Primerpaare
SCN2A2 Ex 2 F	GCT GTA TCT CAG TGC TCA GTG TCA TGT
SCN2A2 Ex 2 R	GCC CAG AAC CAA TTA GTA AAT AGG CAG TG
SCN2A2 Ex 3 F	GCT AAG AAT TCC TAT GGC ATT GAT CAC AA
SCN2A2 Ex 3 R	GAG AAG AAA CAC TTA GAA GAC GGG
SCN2A2 Ex 4 F	GGT GGT GAA GGC ATG GTA GTG C
SCN2A2 Ex 4 R	TGT TAA AGA AAT TGA GGA GGT CTC AAG TGT
SCN2A2 Ex 5 F	GGG ACC AAC CTG GAA GTG TCT AA
SCN2A2 Ex 5 R	GGC TCC CAC CAG TGA TTT ACT CT
SCN2A2 Ex 6 F	CCC TTA TAT CTC CAA CTG TTT CTT GTG TTC
SCN2A2 Ex 6 R	GCT GTG ATT GTA GCA CCA CTG TAG
SCN2A2 Ex 7 F	TTT CCA GGA CAA GCT CAT GAT A
SCN2A2 Ex 7 R	GTC TAA GTC ACT TGA TTC ACA TC
SCN2A2 Ex 8 F	CCA CCT AAA CAG GGT GGC TGA AG
SCN2A2 Ex 8 R	GGC AGG TTA TTG ACA CTG ATG GAG C
SCN2A2 Ex 9 F	CTG GGT AAG GTG AGA GAA ATC GGC
SCN2A2 Ex 9 R	TCT ACA GCA ATT CTC TTG AGT TCG GTG TTT
SCN2A2 Ex 10 F	CAC CGA ACT CAA GAG AAT TGC TG
SCN2A2 Ex 10 R	GCC ACT GAC CTC AAC ATT TAG GTT AAA GAA
SCN2A2 Ex 11 F	TCG TAT GTA TCA TCT TCC ATA TGA ATG CCC
SCN2A2 Ex 11 R	CTG AAA GCA TTG TGC CAT CCA GGT G
SCN2A2 Ex 12 F	CCA CAT GTC CAA TGA CTT ATC CTT GAG TAA
SCN2A2 Ex 12 R	CTG CCT GCA CCA GTC ACA ACT CT
SCN2A2 Ex 13 F	GCT TTG GGC TTT GCT GCT TTC AA
SCN2A2 Ex 13 R	CAA CGT CAT GCA CAC AAG TTT CAA TGT
SCN2A2 Ex 14 F	CCT CCA GCA GAT TAA CCC ATA ATA TC
SCN2A2 Ex 14 R	GTC CTT GGA GGA CAA TTC AGA ATC A
SCN2A2 Ex 15 F	GAT CAC AAT GAG TCA GTT GCA CCT TTC ATA
SCN2A2 Ex 15 R	CTA CCA TTT GGT GGT ATG GCA ATC CAA TTT
SCN2A2 Ex 16a F	CTT CCT GTG TCC ATG TGA CTA ACC
SCN2A2 Ex 16a R	GCT GCA TGC CGA CCA CAG CAA
SCN2A2 Ex 16b F	GGT ATT GGC CAT CAT CGT CTT CA
SCN2A2 Ex 16b R	GTA ATA GAC AAT AGG AAG TGG CCT TG
SCN2A2 Ex 17a F	GAA TAG TGT ATC ATG AAT TAG CAG AAA TGC
SCN2A2 Ex 17a R	GGT CTT TGC CTA TTT CTA TGG TGG
SCN2A2 Ex 17b F	GCT TTA GAT GAA ATT AAA CCG CTT GAA GA
SCN2A2 Ex 17b R	CAG TAT TGG AAA CAT AAG TCA GCA TAT TGT
SCN2A2 Ex 18 F	CCA AAG CGG ATT GGC ATT ATG TTT AAG
SCN2A2 Ex 18 R	CAG TTG GAT AGG TAT AGA TGA TTA CT
SCN2A2 Ex 19 F	GGA TAA GGA CAG GAT GGA AAT ACC AAC TTT
SCN2A2 Ex 19 R	GGT AAT ATG AGT TGA TTG AAG GGA AAG GGA
SCN2A2 Ex 20 F	GGC ACC TGA TAA GAG CTT GCA TCG
SCN2A2 Ex 20 R	CTG TGT CAG GCA CCA TTG CTA GAA C
SCN2A2 Ex 21 F	GAA TTA CTG ATT CAT TGC ATA GAG CAA GGC
SCN2A2 Ex 21 R	TGG TAC AAA GTG TCA GTC TGC TCT CAA TAA
SCN2A2 Ex 22 F	CTA CCA GAG TCT AGT TTC TAC CC
SCN2A2 Ex 22 R	GCC ATT CTA ACA GGT GGA TAT CTC ATT
SCN2A2 Ex 23 F	CTT GTC TCA TGC TGC TAC TAT ACA C
SCN2A2 Ex 23 R	GTC AGG TGC CTT GCT AAA TAC TAG A
SCN2A2 Ex 24 F	CTT CAA TAA GCA TGT GAG ATT TGA AGG TT
SCN2A2 Ex 24 R	AAT TGG CTC CCA CAT TTC ATT CTA TTG TT

SCN2A2 Ex 25 E	ΑΤΤ ΤΟΑ ΤΑΟ ΤΟΤ ΤΤΟ ΟΤΤ ΤΑΘ ΟΟΤ ΟΟΑ ΑΑ
SCN2A2 Ex 25 P	AGA AAT TCG GGC TGT GAA ACG GT
SCN2A2 Ex 25 R SCN2A2 Ex 26 E	
SCN2A2 Ex 26 P	GGG AGT TTG GGA TGA ATG AGA AAG
$\frac{SCN2A2}{SCN2A2} = \frac{27}{5} = \frac{27}{5} = \frac{1}{5}$	
$\frac{SCN2A2}{SCN2A2} = \frac{Ex}{27a} \frac{27a}{P}$	
SCN2A2 Ex 27a K SCN2A2 Ex 27b E	
SCN2A2 EX 270 F	
SCN2A2 Ex 270 K	
SCN2A2 Ex 27c F	
SCN2A2 Ex 270 K	
SCN2A2 EX 270 F	
SCN2A2 EX 270 K	CAC ATC ACC ATC ACO OOC TOT AAA C
SCN3A Ex 3 F	
SCN3A Ex 3 R	TGT GAT GCT GTA TAT AAG GCC CAG AAA
SCN3A Ex 4 F	GTA TGT AAG CTC TTT AAA TAA GCC CAT GTC
SCN3A Ex 4 R	GCA CAT TCA CTA TCA TGG TTG GTT ACA
SCN3A Ex 5 F	GCA CCA AGG CCA TAT CAC AGG CT
SCN3A Ex 5 R	GGA GAT TGC TAG AGA ATT TGA GTG TGC ATT
SCN3A Ex 6 F	CAG TIT AAC TCT TIG CIC AGG CIT GTA
SCN3A Ex 6 R	GAC ACA AAG ACC TTG TTT GTA CTA TGA C
SCN3A Ex 7 F	GTG CCA AAC CCA GCA TTA AGT CC
SCN3A Ex 7 R	GGG ATG AAC TGT AAT AAT AAG CAA CAA GGC
SCN3A Ex 8 F	CAT GAT TTC TGG CAC TCT TCC TCA GGT
SCN3A Ex 8 R	GGC TGT ACA CCC ACA GTC TCA AC
SCN3A Ex 9 F	GGT GTA CAG CCA CCT TTG TAA ATA ACT GAA
SCN3A Ex 9 R	GGT AAG GCT ACA CAT ATA ACC ATG TAG TTG
SCN3A Ex 10 F	CGT CAC AGA TAG CAG CTT TGG GTT
SCN3A Ex 10 R	CTT GTA GCT AGG GCT ACA GAT GG
SCN3A Ex 11 F	GTC TAC TGA CTA TCT AAC TGT GGT AAT C
SCN3A Ex 11 R	GTT CCA ATC TAC CCT CTA TAG TAT AAC AC
SCN3A Ex 12 F	GGT CAT TGT TAA GTA AAC TCT TGT GGT GAG
SCN3A Ex 12 R	GTT CCC TGT CCC TCA CTG AAG TC
SCN3A Ex 13 F	AGA GCA AGA GTA TAC TAA CTC CAA AGA AA
SCN3A Ex 13 R	CCA GGC TTT GAT TAT TTC AAA TTG GTG AA
SCN3A Ex 14 F	GGT GTT GTA TTA CTT ATT GGG AAG AGT GGT
SCN3A Ex 14 R	TCA CAA AGC ACA TAA TCA CAG AAA GTT GGC
SCN3A Ex 15 F	CAG CAC TTT AAT CAA TCA TAA CCT AGT CA
SCN3A Ex 15 R	CTA TCT CTC CCA CAT CTA CCA AAG
SCN3A Ex 16 F	GAC TTG AAT TGA TTT GTC ACA TTC TCT CAC
SCN3A Ex 16 R	AAT GTT GTG CCA ATG AGC GAC AG
SCN3A Ex 17 F	CTA CCA CGT GTG GTT CTA TGA TAC
SCN3A Ex 17 R	CTA GCT ACT GTC TGC TCT TGT TC
SCN3A Ex 18a F	GTG TGT GAC TTA GAC ATG GCA TCT GAA ATA
SCN3A Ex 18a R	CCA CTG GTG GTT CCA TTC CCA TC
SCN3A Ex 18b F	AAT AAG ATA GAC AGC TGC ATG TCC AAT AA
SCN3A Ex 18b R	GTA CAT GGT TAT CAT AGG AAA TGG AAC AAA
SCN3A Ex 19 F	CAC ACA ATG ACA CAG TAT TTC CCA GTT AGT
SCN3A Ex 19 R	GCA TAT TCA GTC TCC GTA AAG AAC AAG GG
SCN3A Ex 20 F	GAA ATG ATT ACC TGG AAG TGG AGT GGG
SCN3A Ex 20 R	CTG AAG CTC AGT GTT TGC ATC TGG TAA TTT
SCN3A Ex 21 F	CAT GAC GTT TCC CTG CCA GCA TT
SCN3A Ex 21 R	CAG AAA CAT ATG AAA TGT CAA ACT TGC CTC
SCN3A Ex 22 F	CCT TCA GTC AAC AGT TTA TTT CTT GGT G

I	
SCN3A Ex 22 R	AAC TCC AGT TTC AGA AGG CTA GG
SCN3A Ex 23 F	TAG AAG AAA CAA CTT GTC CAC CTA GAT TT
SCN3A Ex 23 R	GGG AAA TAA TCT TCC TTG AAA CAT CTT GA
SCN3A Ex 24 F	GAT GGC AGT TTC ATG AAT AAA GTC TTT CAC
SCN3A Ex 24 R	CAA GCA TCA TCT ATA TTG AAG CAG ACT GT
SCN3A Ex 25 F	GTA GCA CTG TAT TAA GTA ACA GCA CTC AA
SCN3A Ex 25 R	ATT TGG CTG TAT TAA CAG ACA GAA CCC
SCN3A Ex 26 F	AAT CAA ATT AGG ATC CTG TAG CGA TCA GAG
SCN3A Ex 26 R	CCA TAT GGA CGC ATG GCT TTG GAA C
SCN3A Ex 27 F	CCC GTA TGT GGA AGG GCT TTA TCT AC
SCN3A Ex 27 R	GGG CAA CTG TTT CTC TGT AAC TAT ACC TC
SCN3A Ex 28a F	ATT GCT AAT GTC AGG GAG TGG ATC CAA ATA
SCN3A Ex 28a R	GGG TTC CCA CAG TCT CCC TTA AC
SCN3A Ex 28b F	AGT GCA CCA CCC GAC TGT GAC
SCN3A Ex 28b R	GTA ATA GGC TCA TAA GAG ACT TTG GAG GG
SCN3A Ex 28c F	GTG GAG AGA TGG ATG CCC TTC G
SCN3A Ex 28c R	CCT CCT CTT GAA GTC CAG TTG ACA C
SCINITEX 200 R	
SCN8A Ex 20 E	GAG TGA GAT GGT TTA GTC TGG CCT C
SCNOA Ex 2a P	CTT CCA GGT CGC TGT TTG GCT TG
SCINOA Ex 2h E	
SCINOA Ex 20 F	
SCINOA Ex 2 E	
SCINOA EX 3 F	
SCINOA EX 5 K	
SCN8A Ex 4 F	
SCN8A EX 4 R	
SCN8A EX 5 F	
SCN8A EX 5 K	
SCN8A Ex 6 F	
SCN8A Ex 6 R	
SCN8A Ex / F	GAG GGC TTT GAG GTG CCT CTG
SCN8A Ex 7 R	CIT CIG ACC AIG IGA ACT AGG AAT AGA CIT
SCN8A Ex 8 F	GGA ACA GTG TAA CCT TAT TCT CTC ATT CAC
SCN8A Ex 8 R	GAT GCA ATT GTA AGG TCT ACT ACT TGA GCA
SCN8A Ex 9 F	GGT CAT GGC TGG GTG GAA TTA TGT TG
SCN8A Ex 9 R	CTA AAT GTC TCT CAC ACA GAA GGT CCC
SCN8A Ex 10 F	CAG AGG AAC TTG GCC CAT TAG CTG
SCN8A Ex 10 R	CAC CAT GAT CTG GCA GGA AGG TC
SCN8A Ex 11 F	CAG TTA ATT GCC CTG GTC TGG CTT C
SCN8A Ex 11 R	CTA GAG GCC AGG AAG AAG AGG G
SCN8A Ex 12 F	CCA CAC TCC CGT CTC ATT TCC C
SCN8A Ex 12 R	CGA TCT ATT TGT GTT CTT CCT TAC ACT GTC
SCN8A Ex 13 F	CAA GTA AGG CCC AGA TTT ACC TTT ATA GAC
SCN8A Ex 13 R	GGG ACA GGG ATT ATA TTT ACC ATG CAC ATT
SCN8A Ex 14 F	GAC TGA GAG TGA GTA GTG TGT CCC
SCN8A Ex 14 R	TTC AAA GAA ACT CCA CCT TTC AGT ACC AGA
SCN8A Ex 15 F	GTT AAC TCT TGA GGT TTC TTG GAC ATG TTG
SCN8A Ex 15 R	GCT AAG CCA AAT AAC TGG AAT TGG GAG TAA
SCN8A Ex 16a F	GAG ACA CTG TTA GAC AGT CCT GGG
SCN8A Ex 16a R	GAG GGA GTT CAC AGT CCT GGT TG
SCN8A Ex 16b F	GTC TTC ATC TTT GCC GTG GTG GG
SCN8A Ex 16b R	ACT TGG GCT TCT GGG CCA GGG
SCN8A Ex 17a F	CAG TTT GCA ACC CTG AGT TCG ATG G
SCN8A Ex 17a R	GGA TGT CTG CAC CGG TGT GAT TG

SCN8A Ex 17b F	GTG AGG CTG ATG AGG TGA AGC C
SCN8A Ex 17b R	GCT CTC ACA CAG GAT CAA GGC TG
SCN8A Ex 18 F	GCA TGT TGC CTC AGA GCT GCC T
SCN8A Ex 18 R	GTC TGT GAG CAA CAC GAG TGT CC
SCN8A Ex 19 F	GGG CAC GTT TCC ACG GTC TGA
SCN8A Ex 19 R	CTG GCT TCT CTA CAC CCT TCC C
SCN8A Ex 20 F	CCT GCT TGC CTT TAG GCA CTG TC
SCN8A Ex 20 R	GGG CCC AGG GCA GCT ACT
SCN8A Ex 21 F	GCT TTA TTC TAA CAC TCT GGA ACC TCT GTT
SCN8A Ex 21 R	GCT TAA ACA GTT TCC ACT GGC ATG CAG AA
SCN8A Ex 21 NEU	ATC TTT CCA CCA TGT GAT CAG TTC TAG CAT
SCN8A Ex 22 F	GCT TGC TCT CAT TTC CAC CCA ACA C
SCN8A Ex 22 R	GCT AGC TGC CTG AAT TTC ACA GAA CTG A
SCN8A Ex 23 F	CCA CTC CCT TTA TAG GCA CCG TC
SCN8A Ex 23 R	GCT GCT TGC TTT CCA GCC ATC TG
SCN8A Ex 24 F	TCA AAC TCC AAA CTA GGA GCT GAT TCT CTT
SCN8A Ex 24 R	GCC TCT TAT CTG GGC TGA CTT CC
SCN8A Ex 25 F	CCC ATA GCA TGT TGA GAG CCA GTT G
SCN8A Ex 25 R	GGC ACA AAG CAG CCA ATC ACT TAC C
SCN8A Ex 26 F	GCT TCC ATA GGT TGG CTT GGA AAG G
SCN8A Ex 26 R	CAT CCT CAC AAT CAG GCA GGT CCC
SCN8A Ex 27a F	GAG AAA GGG TGT CTC CCA TCT CAA TAA C
SCN8A Ex 27a R	GGT TCC CAC AAT CTC CCT TAA AGC C
SCN8A Ex 27b F	TGC TGC CCA TCC TAA ACC GCC
SCN8A Ex 27b R	GGA TGT CCA AGC AGT GGA TGC GA
SCN8A Ex 27c F	CAG ACT TTG CAG ATG CCT TGG AGC
SCN8A Ex 27c R	ACG GGA GGG AGG CTG TAG ATG
SCN8A Ex 27d F	GGG ACA TTT GGC AAG GCG GG
SCN8A Ex 27d R	GCA GTA ACC ACC TGC CCA AGC A

Positives Votum der Ethikkommission (AZ 03/11):

		FACHBERE	EICH 11
		A AND A	EDIZIN
	GIESSEN	SAKA "	
	~		
	Ethik-Kommission, Gaffkystr. 11c, D-35385 Gießen KOPIF		
		ETHIK-KOMMISSION	
Prof. Dr. B. Neubauer am Fachbereich Medi Zentrum für Kinderbeilkunde und hasse hans and State Vorsitz: Prof. H. Tillman		edizin	
	Abt. Neuropädiatrie und Sozialpädiatrie	-	ainis
	Sigen Eingegangen/Eineurg	Gaffkystr. 11c D-35385 Gießen	
	2 8, FEB. 2011	Tel.: (0641)99-42470 / 4	7660
		etnik.kommission@pharma.me	d.uni-giessen.de
		Gießen, 24. Februar 201	1
	AZ.: 03/11		
	Titel: Genomische Variationen hei Patienton mit isligent ist		
	Sitzung am 13.01.2011	epsien.	
	Sehr geehrte(r) Antragsteller/Antragstellerin,		
	wir bedanken uns für die Vorstellung Ihros Earsetuur		
	Votum der Gießener Ethik-Kommission zur oben genannten Studie:	m Folgenden erhalten Si	e das
	Es handelt sich um eine Erstbegutachtung für den Leiter in eine		
	Es handelt sich um eine Anschlussbegutachtung	Prüfung (LKP))D
	Dingesandte Unterlagen:		
	K EuroEpinomics Antrag IP3: Genomic Variation in Rolandic opidenese Di	D 11	
	Annex 2, Annex 3, Requestet Budget for IP3	Bernd A. Neubauer incl. An	nex 1,
	Studienplan zum Ethikantrag		
	Elterninformation		
	Patienteninformation (Kinder 14 bis 17 Jahre)		
	Einwilligungserklärung		
	A Übereignungsvertrag		
	2 . Weiningsietter hanpflicht		
	Der Antrag wurde unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und	rechtlichen Gosichtonum	let e
	des Good Clinical Practice for Trials on Madinial D	tokoll unter Berücksichtig	iuna
	erstellt. Es bezieht sich auf die vorgelegte Fassung des Antrags	opean Community (ICH-G	CP)
	Forderungen der Ethik-Kommission erweit die		
	Sie stimmt dem Vorhaben zu.	vischen erfüllt.	×
	Sie stimmt dem Vorhaben unter Auflagen zu (siehe S. 2).		×
	ole samma dem vornaben nicht zu (siehe S. 2).		
	Die Ethik-Kommission erwartet, dass ihr bis 3/ 12/15 ohne Aufforde		
	ob ethische medizinisch wird bermittelt wird. Er soll mitteilen, ob das Z	iel der Studie erreicht war	auf
	Ergebnis publiziert ist/wird. Unabhängig davon ist die Ettil k	ufgetreten sind, und ob	das
	Prüfplans zu unterrichten. Ihr sind alle schweren unerwünschten Wirkung	n über alle Anderungen (des
	sie auch dem LKP mitzuteilen	überregionalen Studien s	ind
	Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leitere des bit-	o contraction of a contraction of a	
	teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratunosfunktion der Eth	tung und der an der Prüfu	ing
	Stellungnahme unberührt.	aurch unse	ere

Auszug aus dem Protokoll der Kommissionsitzung vom 13.01.2011:

Herr Prof. Dr. B. A. Neubauer trägt vor. Hintergrund: Während genetische Untersuchungen in den letzten 10 bis 15 Jahren entscheidende Impulse für das pathophysiologische Verständnis von Epilepsien und ihre zukünftige Therapie geliefert haben, sind pharmakogenetische Untersuchungen noch im Anfangsstadium. Durch neue genetische Untersuchungstechniken, insbesondere durch den Einzug der Chip-Technologie und neuer Sequenziertechniken ist es heute möglich, häufige und seltene genetische Variationen in einer großen Anzahl von Kandidatengenen und genomweit aufzudecken. Im Rahmen des EuroEPINOMICS-PROJEKTES: "Complex genetics of idiopathic epilepsies" will die Arbeitsgruppe von Herm Prof. Neubauer Familien (meist Geschwisterpaare) und einzelne Patienten mit Rolando-Epilepsie genetisch untersuchen. Zum Einsatz sollen hier alle modernen Verfahren der Molekulargenetik kommen, wie GWAS (Genomweite Assoziations- und Kopplungsstudie), CNV-Analysen (Untersuchungen auf Mikrodeletionen und Mikroduplikationen der DNA, sowie sog. NGS (next generation sequencing, also eine Untersuchung der gesamten kodierenden DNA-Region). Geplant ist einerseits die Untersuchung eines Kollektivs von ca. 300 Betroffenen mit Rolando-Epilepsie und parallel hierzu die Rekrutierung anderer Patienten mit genetischen Epilepsien zur Untersuchung durch die kooperierenden Arbeitsgruppen. - Zur Durchführung des Projekts sollen Patienten mit Epilepsien und deren Verwandte (u.U. auch asymptomatische Familienmitglieder) klinisch inkl. EEG untersucht und klassifiziert werden. Von diesen Patienten soll genomische DNA aus Blutproben extrahiert werden. Die DNA soll mittels standardisierter genetischer Methoden, wie Kopplungsanalysen, Assoziationsstudien, Sequenzierung und Analyse struktureller genomischer Veränderungen analysiert werden. Werden neue Mutationen identifiziert, so sollen Funktionsuntersuchungen in heterologen Expressionssystemen, wie Säugerzelllinie oder Xenopus laevis-Oozyten und später auch in Nervenzellen durchgeführt werden, was im Falle von Ionenkanalmutationen mit elektrophysiologischen Methoden ("voltage-clamp", "patch-clamp") erfolgt. Es handelt sich im Einzelnen um folgende hereditäre Erkrankungen: 1) Idiopathisch generalisierte Epilepsien (= IGE: benigne familiäre neonatale und infantile Konvulsionen), frühkindliche IGE, jede Art von Absencen (frühkindliche, Schulafter, juvenile), juvenile myoklonische Epilepsie, Aufwach-Grand mal-Epilepsie, Fotosensibilität u.a.). 2) Benigne Partialepilepsie [mit zentrotemporalen sharp waves (Rolando-Epilepsie), Pseudo-Lennox-Syndrom, mit okzipitalen Foci, mit psychomotorischen Anfällen, Landau-Kleffner-Syndrom, biolektrischer Status epilepticus (ESES), asymptomatische zentro-temporale sharp waves]. 3) andere hereditäre Epilepsie-Syndrome (z.B. Frontallappen-Epilepsie, familiäre Enzephalopathien, wie das Dravet-Syndrom. - Hinsichtlich weiterer genetischer und vor allem auch pharmakogenetischer Untersuchungen sollen auch Patienten mit nicht primär genetisch bedingten Epilepsien untersucht werden. Es handelt sich dabei meist um Patienten mit symptomatischen oder kryptogen fokalen Epilepsien, bei denen also entweder eine Hirnläsion als Ursache für die Epilepsie nachgewiesen wurde (symptomatisch) oder aber man eine Läsion annimmt, die mit den bisherigen Methoden (vor allem MRT) nicht nachweisbar ist (kryptogen). Es sind für die Studien nahezu alle Patienten mit gesicherter Epilepsie (klinische und EEG-Kriterien) von Interesse, die in folgende Kategorien nach ihrer Antwort auf die Pharmakotherapie eingeteilt werden: 1) anfallsfrei; 2) > 90% Anfallsreduktion, aber nicht ganz anfallsfrei; 3) 35 - 90% Anfallsreduktion; 4) keine sicher messbare Änderung der Anfallsrequenz (0-35%), inkl. Verschlechterung der Anfallssituation. - Ziel der Studie ist die Aufklärung der genetischen Variabilität bei Patienten mit idiopathischen Epilepsien (Suche nach ursächlichen DNA-Variationen, z.B. Mutationen oder Polymorphismen bei einer genetisch bedingten Epilepsie des Kindesalters). Es handelt sich bei dem Vorhaben um eine multizentrische, explorative Studie der

Grundlagenforschung. Leiter der klinischen Prüfung ist Prof. Dr. B. A. Neubauer, Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Abt. Neuropädiatrie und Sozialpädiatrie, UKGM, Standort Gießen. Hiesige Prüfärzte sind Prof. Dr. B. A. Neubauer, Herr PD Dr. A. Hahn und Frau Dr. S. Groß, Abteilung Neuropädiatrie und Sozialpädiatrie, UKGM, Standort Gießen. Die biometrische Bearbeitung erfolgt durch Dr. Thomas Sander, Cologne Genome Center (Köln). Dieses Projekt wird öffentlich durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert. Das beantragte Projekt stellt ein Teilprojekt des "EuroEPINOMICS: Complex genetics of idopathic epilepsies"-Antrags dar. Der Beginn der Studie ist für April 2011 geplant, die Dauer der Studie beträgt voraussichtlich 3 Jahre. In die Studie sollen ca. 200 Geschwisterpaare und Familien, ferner 300 Trios (Eltern und Kind) multizentrisch eingeschlossen werden. Die eingeschlossenen Patienten und Probanden aus ganz Deutschland werden ambulant untersucht werden (mit Blutproben). Einschlusskriterien sind. Patienten bzw. Geschwisterpaare mit idiopathischer Epilepsie (inkl. typischem EEG-Befund). Ausschlusskriterien sind 1) falsche Diagnose und 2) untypisches EEG etc. Hauptzielkriterien sind: 1) Aufdeckung ursächlicher genetischer Variationen mittels einer Kombination aus genomweiter Kopplungs- und

2

Assoziationsanalyse (GWAS), 2) Untersuchungen auf Mikrodeletionen und -insertionen, sowie 3) Kandidaten-Gen-Sequenzierung (Next Generation Sequencing).

In der Diskussion berichtet Herr Prof. Dr. Neubauer, dass etwa 3% der Allgemeinbevölkerung im Laufe des Lebens eine Epilepsie entwickeln; damit gehören Epilepsien zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Von diesen 3% sind 50% genetisch bedingt, und 50% der Epileptiker weisen eine Himläsion auf. Er weist darauf hin, dass pharmakogenetische Untersuchungen ein großes Potential besitzen, die Ursachen für Unterschiede zwischen einzelnen Patienten mit Epilepsie bzgl. des Ansprechens auf antikonvulsiv wirksame Medikamente und auf deren Nebenwirkungen aufzuklären. Bisherige Untersuchungen hätten gezeigt, dass große und klinisch sehr gut charakterisierte Patientenkollektive notwendig seien, um vertrauenswürdige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Das EuroEPINOMICS-Pojekt ist ein deutschland- und europaweites Projekt, an dem Zentren in 5 Ländern teilnehmen. Der Projektleiter für die vorliegende Studie ist Herr Prof. Dr. B. A. Neubauer, Leiter der Abteilung Neuropädiatrie, UKGM, Standort Gießen. Geldgeber für die deutschen Zentren ist die DFG. Im Rahmen des europaweiten, von der DFG geförderten Verbundprojekts "Complex genetics of idopathic epilepsies" will die Arbeitsgruppe von Herm Prof. Neubauer Familien (meist Geschwisterpaare) und einzelne Patienten mit Rolando-Epilepsie genetisch untersuchen (Untersuchung der Veranlagung). Herr Prof. Neubauer führt aus, dass Blutproben (5-10 ml EDTA-Blut) von Patienten mit Epilepsie gewonnen und bis zur Genomsequenzierung bearbeitet werden, ggf. auch von deren Eltern. Bei ca. 50% der Patienten liegt bereits DNA vor. Im weiteren Verlauf der Diskussion werden die Eltem- und Patienten-Informationsbögen erörtert: Aufgeklärt werden alle Betroffenen, die Eltern müssen unterschreiben. Die Kommission bittet um Änderung des Passus "anonymisiert" in der Übereignungserklärung für die Proben, da die Proben pseudonymisiert weitergegeben werden. Ebenfalls moniert wird der Datenschutzpassus. Die Kommission stimmt dem Vorhaben nach Eingang der entsprechend geänderten Dokumente zu; die Mitglieder der Kommission gratulieren Herrn Prof. Neubauer zu dem Erfolg, an dem DFG-geförderten Verbundprojekt Epilepsiegenetik teilnehmen zu können, und sie wünschen dem Projekt gutes Gelingen.

Anmerkung:

Die Datenschutzpassagen wurden inzwischen korrigiert. 2

Die Ethik-Kommission bestätigt, dass auch die Dokumente des Eurocors-Antrag NE416/5-1 eingereicht wurden. Die Bestandteile des Eurocors-Antrages sind somit in Gänze durch

Wir wünschen Ihnen für Ihr Forschungsprojekt viel Erfolg.

Prof. Dr. H. Tillmanns Vorsitzender

Die Namen der bei dieser Sitzung anwessehen Mitglieder sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Mitglieder: Frau Dr. <u>Blütters-Sawatzki</u> (Pädiatrie); Dr. <u>Bödeker</u> (Informatik); Herr <u>Brumhard</u> (Pharmazie); Prof. Dr. Dr. <u>Dettmever</u> (Rechtsmedizin); Prof. Dr. <u>Padberg</u> (Chirurgie); Dr. Repp (Pharmakologie); Prof. <u>Schmidt</u>, (Rheumatologie), Prof. <u>Tillmanns</u>, Vorsitzender (Innere Med.); Frau Prof. Dr. <u>Wolfslast</u> (Rechtswissenschaften). Vertreter: Prof. <u>Drever</u> (Pharmakologie); Frau Prof. Kemkes-Matthes (Innere Medizin); Prof. Dr. N. Krämer (Zahnheilkunde); Frau Kreckel (Pharmazie); Prof. Künzel (Gynäkologie); Dr. Pons-Kühnemann (Informatik); Prof. Riße (Rechtsmedizin); Dr. <u>Röhrig</u> (Anästhesiologie); Frau Schneider (Rechtswissenschaften).

P.S.: Bitte informieren Sie die Ethik-Kommission unter Benutzung des beigefügten Formulars über den Beginn der Studie!

3

Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ohne die Unterstützung von einigen wichtigen Personen wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich für die erfahrene Unterstützung bedanken.

Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dr. Neubauer für die Überlassung des Themas, die dauerhafte Präsenz und die intensive Betreuung meiner Arbeit danken.

Bei der praktischen Durchführung, versuchstechnischen Problemen und vielen weiteren Fragestellungen war Frau Garkisch eine unschätzbare und immer ansprechbare Hilfe. Ebenso möchte ich mich bei den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die entgegengebrachte Geduld und Unterstützung bedanken.

Mein Dank geht außerdem an Herrn Prof. Dr. Kurlemann vom Universitätsklinikum Münster und alle anderen Kolleginnen und Kollegen, sowie die beteiligten Familien für die Zusendung von DNA- und Blut-Proben, sowie von Patientendaten.

Nicht zuletzt geht mein Dank an meine Familie und meine Freunde, die mich in allen Phasen der Doktorarbeit tatkräftig und mit anspornenden Kommentaren dauerhaft unterstützt und begleitet haben.