

Mutationsanalyse im *KCNAB1*-Gen bei Rolando-Epilepsie

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

vorgelegt von Ludwig Abel
aus Celle

Gießen 2012

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,
Abteilung für Neuropädiatrie, Sozialpädiatrie und Epileptologie,
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Prof. Dr. med. B. A. Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. B. A. Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. M. Kaps

Tag der Disputation: 10.07.2013

Meinen Eltern und Großeltern.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epilepsie	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Klassifikation der Epilepsie	1
1.1.3 Ätiologie	2
1.1.4 Anfallsformen	2
1.1.5 Epilepsiesyndrome	3
1.1.6 Rolando-Epilepsie	3
1.1.7 Psychosoziale Bedeutung der Epilepsie	4
1.2 Ionenkanäle	5
1.2.1 Allgemeine Funktion	5
1.2.2 Kaliumkanäle	6
1.2.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle	7
1.2.4 Kv β 1- eine regulative Untereinheit spannungsabhängiger Kaliumkanäle	9
1.2.5 Genetik von Kv β 1	9
1.3 <i>KCNAB1</i> und Epilepsie	10
1.3.1 Bisherige Ergebnisse	10
1.3.2 Ziel dieser Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Zubehör	13
2.1.3 Chemikalien	14
2.1.4 Lösungen	16
2.1.5 Software	17
2.2 Studienkollektiv	17
2.3 Methoden	18
2.3.1 Die Extraktion der DNA	18
2.3.2 Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	20
2.3.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	21

2.3.4	Die Amplifikation von <i>KCNABI</i>	23
2.3.5	Die Agarose-Gelelektrophorese	24
2.3.6	Aufreinigen der PCR-Produkte	26
2.3.7	Die Sequenzierung	27
2.3.8	Der Sequenzansatz	28
2.3.9	Sequenzierung von <i>KCNABI</i> und Sequenzanalyse	30
3.	Ergebnisse	32
3.1	Das <i>KCNABI</i> -Gen	32
3.2	Polymorphismus RS 1551066	32
3.2.1	Der Polymorphismus RS 1551066	32
3.2.2	Splice-Site-Analyse	34
3.2.3	Statistische Untersuchung	34
3.3	Polymorphismus RS 2280031	35
3.3.1	Der Polymorphismus RS 2280031	35
3.3.2	Statistische Untersuchung	37
4.	Diskussion	38
4.1	Bisherige Studienlage	38
4.2	Eigene Ergebnisse	39
4.3	Weiterführende Untersuchungen	40
4.4	Ausblick	43
5.	Zusammenfassung/ Summary	44
6.	Abkürzungen	48
7.	Abbildungen und Tabellen	50
7.1	Abbildungsverzeichnis	50
7.2	Tabellenverzeichnis	51
8.	Literaturverzeichnis	52
9.	Anhang	60

10. Erklärung zur Dissertation	77
11. Danksagung	78

1. Einleitung

1.1 Epilepsie

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Weltweit leiden über 50 Millionen Menschen an Epilepsie (Cavalleri et al., 2007). Damit ist die Epilepsie eine der meistgestellten neurologischen Diagnosen und eine der häufigsten Krankheiten der Menschheit.

Der Terminus Epilepsie beschreibt das wiederholte Auftreten von unprovokierten epileptischen Anfällen als Folge plötzlicher synchroner Entladungen kortikaler Neuronengruppen. Epilepsien sind abzugrenzen von epileptischen Gelegenheitsanfällen, welche ausschließlich durch Provokation ausgelöst werden.

Klinisch kennzeichnen motorische Phänomene und oftmals Bewusstseinsstörungen das Anfallsgeschehen. Trat innerhalb der letzten fünf Jahre ein epileptischer Anfall auf, spricht man von einer aktiven Epilepsie, andernfalls handelt es sich definitionsgemäß um eine Epilepsie in Remission.

Rund ein Viertel der Neumanifestationen findet im Kindesalter statt (Neubauer et al., 2008a). In den Industrienationen erkranken Jahr für Jahr etwa 50 von 100 000 Kindern. Die Prävalenz beträgt ca. 0,5% (Hauser, 2008; Lagae, 2008).

1.1.2 Klassifikation der Epilepsie

Bis heute gilt die Klassifikation der epileptischen Anfälle und Epilepsiesyndrome als nicht endgültig gelöstes Problem und schwierige Herausforderung. So aktualisiert die internationale Fachgesellschaft *International League Against Epilepsy (ILAE)* laufend und zuletzt im Jahre 2010 ihr seit 1989 bestehendes Klassifikationsmodell. Jetzt organisiert das Modell Epilepsien und Epilepsiesyndrome nicht mehr in fixen dichotomen Klassifizierungen, sondern beschreibt die Pathologie anhand eines Diagnostikschemas, welches vier Instrumente nutzt:

Die Klassifikation von epileptischen Anfällen (1), die Beschreibung fokaler Anfälle in Hinblick auf die Bewusstseinslage (2), die Zuordnung zu einem „elektroklinischen Syndrom“ (3) und die Beschreibung des ictalen Geschehens anhand von Begriffen eines „Glossars einer deskriptiven Terminologie“ (4) (siehe Anhang, Tab. 9.1-9.4) (Berg et al., 2010).

1.1.3 Ätiologie

Ätiologisch lassen sich Epilepsien in symptomatische und idiopathische (genetische) Formen unterteilen. Bei ersteren ist das Anfallsgeschehen symptomatischer Ausdruck einer Läsion oder Vorerkrankung, welche mithilfe neurologischer oder bildgebender Verfahren diagnostiziert werden kann. Bei den idiopathischen Epilepsien unterscheidet man monogenetische Ursachen, die allein für das Auftreten einer Epilepsie verantwortlich sind, von genetischen Suszeptibilitätsfaktoren, die gemeinsam die Manifestation einer Epilepsie bedingen. Monogenetisch verursachte Epilepsien sind mit einem Anteil von 1-2% aller idiopathischer Epilepsien selten. Bei vielen Epilepsiesyndromen konnte ein Zusammenhang zu Defekten in Ionenkanalgenen hergestellt werden, sodass diese in einer Reihe mit anderen paroxysmalen Erkrankungen als Ionenkanalerkrankungen gelten (Weber et Lerche, 2008; Lagae, 2008).

Im Kindesalter ist der Anteil symptomatischer und idiopathischer Epilepsien annähernd gleich hoch.

1.1.4 Anfallsformen

Zerebrale Anfälle zeigen eine recht divergente Symptomatik, sodass sich nur schwer ein generelles Schema finden lässt. Üblicherweise werden *fokale* Anfälle von *generalisierten* Anfällen unterschieden:

Bei fokalen Anfällen ist das elektrophysiologische Geschehen zumindest zu Beginn des Anfalls auf umschriebene Regionen des Gehirns begrenzt. Fokale Anfälle können sekundär generalisieren. Von einem *komplexen* fokalen Anfall spricht man, wenn dieser mit Bewusstseins Einschränkungen einhergeht, bei einem *einfachen* fokalen Anfall besteht dieses Symptom nicht. Die weitere Symptomatik hängt ab von Entstehungsort und Ausbreitung des Anfalls.

Zu den generalisierten Anfällen zählen verschiedene Anfallsformen. Neben den *Absencen* sind dies *myoklonische*, *klonische*, *tonische* und *atone* Anfälle.

Unter dem Begriff der Absence wird eine kurze, meist nicht länger als 30 Sekunden andauernde Einschränkung des Bewusstseins verstanden. Beginn und Ende der Absence sind abrupt (Doose, 1965).

Myoklonische Anfälle sind einzelne kurze Kontraktionen mit einer Dauer von höchstens 200-400 Millisekunden (Noachtar, 1998). Häufig sind rumpfnähe Extremitätenabschnitte und die mimische Muskulatur betroffen.

Klonische Anfälle sind repetitive, meist rhythmische, myoklonische Anfälle einer fixen Muskelgruppe, die vorwiegend mit einer Frequenz von 0,2-5 Hz auftreten (ebd.).

Demgegenüber sind tonische Anfälle durch starre Kontraktionen der Stammes- und Gesichtsmuskulatur gekennzeichnet; gewöhnlicherweise dauern sie 5 bis 20 Sekunden (Sirven, 2002).

Sofern sie generalisiert auftreten, sind tonisch-klonische Anfälle Paradigma des großen epileptischen Anfalls (*Grand-mal-Anfall*): Mit einer kurzen tonischen Phase beginnend sind sie oft von Atemstillstand und Zyanose begleitet und gehen über in die regelhaft bis zu 5 Minuten, gelegentlich auch länger anhaltende klonische Phase. Es kann zu Verletzungen, Urin- und Stuhlabgang kommen. Postiktal fällt der Patient in den Terminalschlaf, der etwa zwei Stunden anhält. Einem großen Anfall geht häufig eine Prodromalphase voraus, in der sich der Anfall in Form von Verhaltensänderungen ankündigt (Chabolla, 2002; Noachtar, 1998).

Die atonen Anfälle sind gekennzeichnet durch den plötzlichen Verlust des Muskeltonus in einer Körperregion, bei betroffener unterer Extremitäten- oder Rumpfmuskulatur ist oft ein unkontrollierter Sturz des Patienten die Folge (ebd.).

1.1.5 Epilepsiesyndrome

Die klinische Charakteristik epileptischer Anfälle, das elektroenzephalographische Muster, Befunde bildgebender Verfahren, sowie Manifestationsalter und Erkrankungsverlauf erlauben in vielen Fällen die Zuordnung der Erkrankung zu einem Epilepsiesyndrom. So stehen die selbst-limitierenden (benignen) Syndrome, die weitgehend unabhängig von der Therapie spontan remittieren und abgesehen von der iktogenen Hirnschädigung im Status epilepticus keine bleibenden Schäden hinterlassen den epileptischen Enzephalopathien gegenüber, bei denen die Epilepsie zu einem progredienten kognitiven Abbau führt (Berg et al., 2008).

1.1.6 Rolando Epilepsie

Die benigne Rolando Epilepsie (Idiopathische Partialepilepsie mit zentrot temporalen Spikes) gehört zu den idiopathischen, fokalen Epilepsien und folgt einem komplexen (polygenen) Erbgang. Sie ist mit einem Anteil von etwa 10-15% eine der häufigsten Epilepsieformen des Kindesalters. Betroffen sind vor allem normal entwickelte Kinder zwischen dem 6. und 9. Lebensjahr. Charakteristisch sind sensomotorische Anfälle der Perioralregion mit Parästhesien von Lippe, Zunge und Gaumen, sowie periorale my-

oklonische, klonische und tonische Anfälle, die in der Mehrzahl der Fälle nachts aus dem Schlaf heraus auftreten. Da der Patient während des Anfalls nicht schlucken kann, kommt es zu Speichelfluss. Postiktal bleibt die Sprache für einige Zeit undeutlich. In etwa der Hälfte der Fälle kommt es zu einer sekundären Generalisation. Elektroenzephalographisch können die typischen zentrottemporalen Spikes und Sharp-Waves nachgewiesen werden (Panayiotopoulos et al., 2008). Rund ein Fünftel der Patienten erlebt nur einen Anfall, mit Beginn der Pubertät sind nahezu alle Betroffenen unabhängig von der Therapie anfallsfrei (ebd.). Bei typischem Verlauf beeinflusst die Rolando Epilepsie die kognitive Entwicklung nicht, ob sie mit Teilleistungsstörungen oder Verhaltensauffälligkeiten assoziiert ist, ist bislang nicht abschließend geklärt.

Die Indikation zur Therapie kann zurückhaltend gestellt werden und ist nur bei gehäuften oder schweren Anfällen erforderlich. Therapeutika der Wahl sind Sultiam, Gabapentin und Valproat. Carbamazepin sowie sein Derivat Oxcarbamazepin können die Anfallssituation und das Elektroenzephalogramm deutlich verschlechtern (Neubauer et al., 2008a; Panayiotopoulos et al., 2008).

Der selbstlimitierende Verlauf der Rolando Epilepsie ist bei einem kleinen Anteil der Patienten nicht gegeben. Hier kommt es zur nächtlichen Aktivierung des Spike- und Sharp-Wave-Musters bis hin zur Entwicklung eines bioelektrischen Status (*ESES, electrical status epilepticus during slow sleep*) (De Negri, 1997). Die Patienten entwickeln eine atypische idiopathische Partialepilepsie, das *Pseudo-Lennox-Syndrom* mit atonisch-astatischen Anfällen, generalisierten tonisch-klonischen Anfällen, atypischen Absencen und rolandischen Anfällen oder ein Landau-Kleffner-Syndrom mit erworbener Aphasie (Doose et al. 2001; Hahn et al., 2001).

Die Therapie des Pseudo-Lennox-Syndroms ist schwierig, neben Benzodiazepinen zur Anfallsunterbrechung haben sich Valproat und Sultiam in Kombination mit Kortikosteroiden als potentiell wirksam erwiesen (Bast, 2007). Trotz guter Prognose der Epilepsie muss die Entwicklungsprognose zurückhaltend gestellt werden (Neubauer et al., 2008a).

1.1.7 Psychosoziale Bedeutung der Epilepsie

Nicht selten ist die Diagnose Epilepsie mit einer Minderung an Lebensqualität, sozialer Benachteiligung, sowie Einschränkung in persönlichem und schulischem Erfolg verknüpft. Rund 2/3 aller Erkrankten sind normal intelligent, der Anteil derjenigen mit entsprechendem Schulabschluss hingegen liegt weit darunter. Zehn Prozent der durch-

schnittlich intelligenten Kinder besuchen eine Förderschule, unter durchschnittlich intelligenten Kindern mit der Diagnose Epilepsie sind es dreimal so viele. Teilleistungsstörungen und Aufmerksamkeitsdefizite auch durch die antikonvulsive Therapie sind hinsichtlich der kognitiven Nebenwirkungen ein wichtiger Faktor und nur schwer umgänglich. Das weit verbreitete Vorurteil hingegen, Epilepsie und regelhafte Schulleistung oder beruflicher und vor allem persönlicher Erfolg seien nicht miteinander vereinbar, nimmt den Patienten wichtige Perspektiven und Möglichkeiten, fördert Schulversagen, könnte aber durch stetig forcierte Aufklärung vermieden werden.

Ziel sollte es sein, Vorurteile abzubauen und der Erkrankung konsequent mit präziser Diagnostik, Therapie und umfassender Beratung zu begegnen, um den Erkrankten eine Chancengleichheit zu ermöglichen.

1.2 Ionenkanäle

1.2.1 Allgemeine Funktion

Jede Zelle ist von einer Lipiddoppelmembran umgeben, welche das Zytoplasma vom Extrazellularraum trennt. Aufgrund ihrer Architektur ist diese Zellmembran für polare Stoffe wie Ionen nahezu undurchlässig. Den insbesondere für Erhalt und Modulation des elektrochemischen Gradienten wichtigen transmembranösen Ionenaustausch vollbringen integrale Kanalproteine. Mittels einer basischen Glykoproteinkomponente durchspannen sie die Biomembran der Zelle und bilden eine dem Stoffaustausch dienende Pore.

Ionenkanäle verfügen über drei wichtige Eigenschaften: Zum einen leiten sie Ionen entlang des bestehenden elektrochemischen Gradienten in hoher Geschwindigkeit über Zellgrenzen hinweg, welches insbesondere für den schnellen Wechsel des Membranpotentials im Rahmen der Signalübertragung von Bedeutung ist. Gleichzeitig sind sie hochselektiv für eine Ionenart und öffnen und schließen sich nur in Abhängigkeit von spezifischen chemischen, elektrischen oder mechanischen Signalen. Letzteres Charakteristikum unterteilt Ionenkanäle in ligandengesteuerte-, spannungsgesteuerte und durch mechanische Reize gesteuerte Ionenkanäle.

Neben der Art der geschleusten Ionen und der Abhängigkeit von differenten Triggern unterscheiden sich Ionenkanäle zudem in Ihren Leitungseigenschaften: Einige Kanalproteine leiten Ionen direkt proportional zur treibenden Kraft, dem elektrochemischen Gradienten über der Zellmembran, und verhalten sich demnach wie ein einfacher ohm-

scher Widerstand. Die Leitfähigkeit ($\Delta i/\Delta V$) verhält sich hier unabhängig von der Potentialdifferenz konstant. In anderen Kanä-

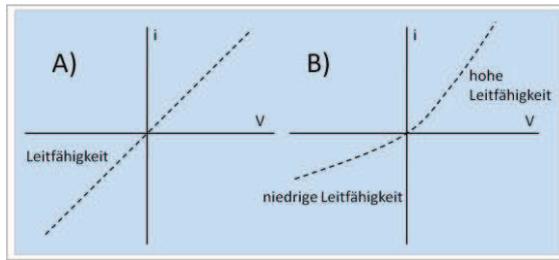


Abb. 1.1: Leitfähigkeiten eines ohmschen Ionenkanals (A) und eines Kanals vom Rectifier-Typ (B) im Vergleich. i entspricht dem Fluss von Ladungsträgern, V der Potentialdifferenz über einer Membran (nach Kandel, 2012).

len unterliegt der Ionenfluss einer nicht-linearen Funktion der treibenden Kraft, sie leiten Ionen vermehrt in die eine als in die andere Richtung. Die Leitfähigkeit verhält sich bei diesen sogenannten „Rectifying Channels“ in Abhängigkeit vom Membranpotential variabel (Abb.1.1) (Kandel, 2012).

1.2.2 Kaliumkanäle

Kanalproteine, welche eine Selektivität für die positiv geladenen Ionen des Kaliums aufweisen, werden als Kaliumkanäle (K^+ -Kanäle) bezeichnet. Die sowohl in eukaryotischen wie auch in prokaryotischen Zellen vorkommenden Kanäle stellen die vielfältigste Gruppe aller Ionenkanäle dar. Über 50 verschiedene Gene kodieren beim Menschen für Kaliumkanäle, die neben ihrer Funktion bei der Regulation der Elektrolythämostase, der Signaltransduktion oder bei sekretorischen Prozessen vor allem bei der Modulation des Membranpotentials eine wichtige Rolle spielen (Weber et Lerche, 2008).

Kalium besitzt neben Chlorid ein negatives Gleichgewichtspotential über der Zellmembran. Für diese Ionen spezifische Kanäle wirken als Exzitationshemmer: Die Diffusion von Kalium entlang des elektrochemischen Gradienten durch geöffnete Kanäle sichert das Ruhepotential einer Zelle durch Annäherung an das Gleichgewichtspotential für Kalium und Entfernung vom Schwellenpotential. Ferner wird das durch den Einstrom positiv geladener Natriumionen in das Zellsoma vermittelte Aktionspotential durch den zellulären Ausstrom von Kalium und dem damit verbundenen Verlust positiver Ladungsträger terminiert. Dieser Charakteristik verwandte Funktionen werden in erregbaren Zellen allen Kaliumkanälen zugeschrieben: Kaliumkanäle stabilisieren das Ruhepotential, verkürzen Aktionspotenziale, terminieren Zeiten erhöhter Exzitation, beeinflussen die Intervalle zwischen repetitiven Aktionspotentialen und senken im Allgemeinen die Effektivität von erregungsinduzierenden Impulsen.

Die für die verschiedenen Funktionen notwendige Vielfalt an Kaliumkanälen wird neben der Anzahl der Gene zusätzlich durch alternatives Spleißen der prä-mRNA im Rahmen der Prozessierung und der nachfolgenden Translation (England, 1995a) sowie durch Formation von multimerischen Kanalkomplexen und die Koexpression der Kanalporen mit zusätzlichen Untereinheiten gesichert: Ein funktionsfähiger Kaliumkanal wird gebildet durch das Zusammenlagern mehrerer Untereinheiten, welche sich untereinander gleichen (homooligomer) oder unterschiedlich strukturiert (heterooligomer) sein können. Bis zu vier dieser Untereinheiten bilden den porenformenden Ionenkanal, sie werden als α -Untereinheiten bezeichnet (Doyle et al., 1998). Ferner verfügen zahlreiche Ionenkanäle über akzessorische Untereinheiten, welche als β -Untereinheiten die Kanalfunktion modulieren (Abb.1.2) (Torres et al., 2007).

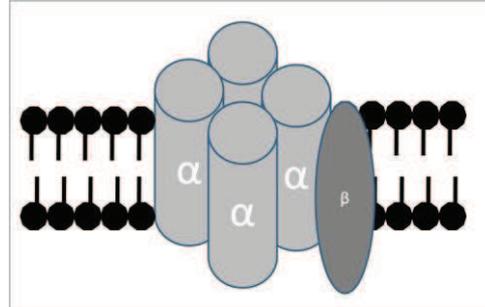


Abb. 1.2: Untereinheiten eines Ionenkanals (nach Kandel, 2012)

1.2.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Neurone und Muskelzellen bilden die große Gruppe der erregbaren Zellen. In diesen dienen spannungsabhängige Ionenkanäle der Generierung, Modulation und Fortleitung von Aktionspotentialen. Spannungssensitive Kaliumkanäle sind maßgeblich für die Repolarisation verschiedener Aktionspotentiale verantwortlich. Zu diesem Zweck verfügt die Zelle in erster Linie über spannungssensitive Kaliumionenkanäle vom verzögerten Rectifier-Typ (*Delayed Rectifier*). Diese Kanäle öffnen sich bei an der Zellmembran eingehender Depolarisation, aktivieren und inaktivieren sich aber wesentlich langsamer als die für die Depolarisation verantwortlichen Natriumkanäle und sorgen somit für eine langsame Repolarisation. Einige Gewebe verfügen über zusätzliche, schnell aktivierende und inaktivierende Kaliumkanäle, die sogenannten *A-Type-Channels*: Bei Erreichen des Schwellenpotentials öffnen und schließen sie sich außerordentlich rasch und bewirken so einen kurzfristigen repolarisierenden Kaliumaus-

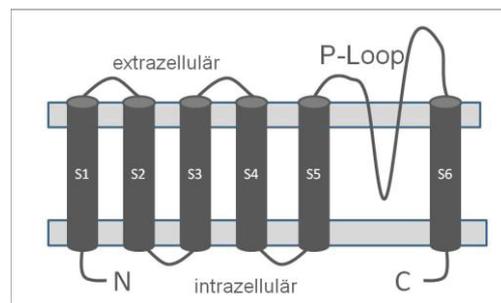


Abb. 1.3: Transmembrandomänen einer α -Untereinheit eines spannungsabhängigen K^+ -Kanals (nach Long, 2005)

strom aus dem Zellsoma. Dies ist besonders für Zellen mit schnell aufeinanderfolgenden Exzitationsphasen von Bedeutung (Hille, 2001).

Unter den spannungsgesteuerten Ionenkanälen sind die kaliumselektiven Kanäle die am einfachsten aufgebauten Proteine: Ihr Molekulargewicht entspricht in etwa nur einem Viertel der molekularen Masse anderer spannungsabhängiger Kanäle. Die Tertiärstruktur spannungssensitiver Kaliumkanäle setzt sich zusammen aus 4 α -Untereinheiten, die als Tetramer eine Funktionseinheit bilden (s.o.) (MacKinnon, 1991; Heginbotham & MacKinnon, 1992; Liman et al., 1992).

Jede α -Untereinheit wiederum besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6), die als Peptidkette die Biomembran durchspannen und durch Verbindungsdomänen, sogenannte *Linker*, miteinander verbunden sind. Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende der Peptidkette befinden sich auf zytoplasmatischer Seite. Die Transmembrandomänen S5 und S6 inklusive des diese verbindenden Linkers entsprechen einer prokaryotischen Kaliumkanaluntereinheit (Abb. 1.3) (Long et al., 2005).

Der durch die Segmente S5 und S6 flankierte Linker, auch *P-Loop* genannt, kleidet als Polypeptidkette im funktionsfähigen, in Tertiärstruktur organisierten und membranös integrierten Protein die Kanalpore aus und verjüngt insbesondere den Selektivitätsfilter des Kanals. Er trägt eine bei bisher allen identifizierten Kaliumkanälen zu findende Kaliumkanal-Erkennungssequenz (Heginbotham, 1994).

Das Transmembransegment S4 weist an jeder dritten Stelle positiv geladene Aminosäuren wie Lysin oder Arginin auf. Im Rahmen der Detektion von Spannungsänderungen über der Biomembran scheinen diese an Ladungsverschiebungen beteiligt und maßgeblich für das spannungsabhängige Öffnen der Kanalpore (*Gating*) verantwortlich zu sein (Bezanilla, 2000).

Entdeckt wurde der erste spannungsabhängige Kaliumkanal im Jahre 1987 im Gewebe der Taufliege *Drosophila melanogaster* und konnte anschließend auch bei Säugetieren nachgewiesen werden (Salkoff et al., 1992). Mithilfe der bekannten DNA-Sequenz dieses als *Shaker* bezeichneten Kanalproteins konnte man aufgrund von Sequenzähnlichkeiten weitere Kaliumkanalproteine entdecken (Roeper et Pongs, 1996; Sewing, et al., 1996).

Entsprechend der allgemein gültigen Nomenklatur *Kv n.m* zur Beschreibung und Identifikation der Proteine bezeichnet Kv die Zugehörigkeit zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen, n die Subfamilie und m das entsprechende Mitglied.

1.2.4 Kv β 1- eine regulative Untereinheit spannungsabhängiger Kaliumkanäle

Das Verhalten spannungsabhängiger Kaliumkanäle kann von akzessorischen Untereinheiten in erheblicher Weise beeinflusst werden. Die β -Untereinheiten der Ionenkanäle imponieren als hydrophile zytoplasmatische Proteine mit einer Masse von ca. 40 kDa und lagern sich tetramersch in einem Verhältnis von 1:1 den α -Untereinheiten an (Parcej et al., 1992; Long et al., 2005).

Die β -Untereinheit Kv β 1 ist in ihren drei Subtypen Kv β 1.1, Kv β 1.2 und Kv β 1.3 zu finden. Sie bindet an das N-terminale Ende der sechs Transmembrandomänen von spannungssensitiven Kaliumkanälen der Gruppe der Shaker (Kv1-Kanäle). Kv β 1.1 beeinflusst die Phase der Inaktivierung dieser Kanäle. In A-Typ Kanälen (s.o.) wie Kv1.4 (Stühmer et al., 1989) bewirkt die β -Untereinheit eine beschleunigte Inaktivierung, zeigt aber keinen Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit des Gatingvorgangs. In ähnlicher Weise beschleunigen Kv β 1.2 und Kv β 1.3 die Inaktivierung in Kv1.4 und induzieren die Inaktivierung der nicht-inaktivierenden delayed rectifier Kanälen (s.o.) wie Kv1.1 und Kv1.5. Sie konvertieren diese zu Kanälen mit schneller Inaktivierung (England et al., 1995b; Rettig et al., 1994; Wang et al., 1996). Zusätzlich verlangsamt die Untereinheit Kv β 1.3 die Inaktivierung von Kv1.5 und modifiziert das Ansprechen des Kanals auf die Aktivität der intrazellulären cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), ein Schlüsselenzym des Energiestoffwechsels. Zu diesem Zweck verfügt Kv β 1.3 über Molekülreste, die durch die Proteinkinase A phosphoryliert werden können und so eine Verlangsamung der schnellen Inaktivierung induzieren (McCormack et al., 1995).

Im Jahre 1996 wurde die mRNA von Kv β 1 in diversen Geweben des menschlichen Zentralnervensystems wie Amygdala, Nucleus Caudatus, Hippocampus und Thalamus nachgewiesen (Leicher et al., 1996).

1.2.5 Genetik von Kv β 1

Kv β 1 wird beim Menschen vom 418 kb großen Gen *KCNAB1* auf Chromosom 3 codiert. Die Subtypen Kv β 1.1, Kv β 1.2 und Kv β 1.3 unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz ihrer N-terminalen Domäne. Dies wird durch alternatives Spleißen der prä-mRNA im Rahmen der Prozessierung ermöglicht (England et al., 1995b). Die C-terminale Sequenz gleicht sich bei allen drei Spleißprodukten und sichert jeweils die Interaktion mit der N-terminalen Domäne der porenbildenden α -Untereinheit des spannungssensitiven Kaliumkanals (Yu et al., 1996).

Die codierende Basensequenz von *KCNAB1* imponiert in 17 Exonen, von denen sich eines als nicht proteinogen zeigt. Die unterschiedlichen N-terminalen Domänen werden durch jeweilige Translation der Exone 1, 2 oder 3 realisiert, die Produkte des alternativen Spleißvorganges sind (Leicher et al., 1996; NCBI, *Contig NT_005612.15*). Exon 7 stellt das nicht proteinogene Exon dar. Die Exone 1, 2 und 3 weisen das desoxyribonukleäre Startcodon ATG, Exon 17 das Stoppcodon TAA auf. Der offene Leserahmen (*open reading frame*) von *KCNAB1* erstreckt sich demnach zwischen dem Startcodon des ersten Exons (Exon 1 für Kv β 1.3, Exon 2 für Kv β 1.2 oder Exon 3 für Kv β 1.1) und dem Stoppcodon von Exon 17 (ebd.).

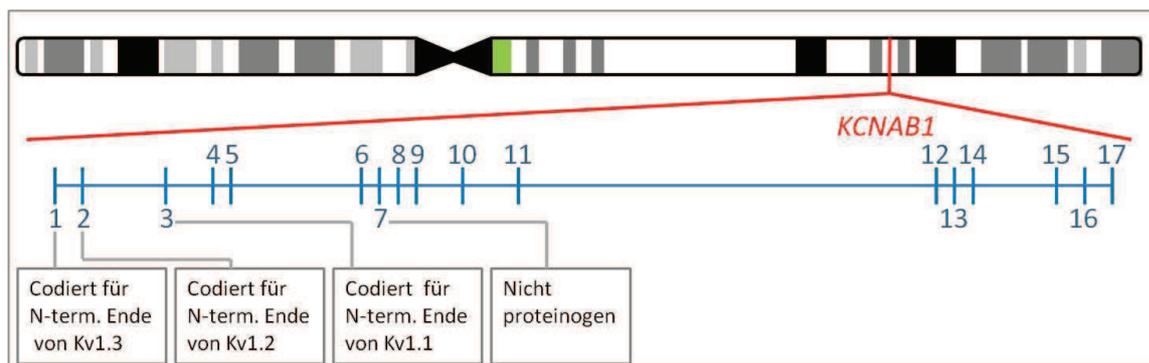


Abb. 1.4: Physische Karte von *KCNAB1* und seiner Exone auf Chromosom 3. Start- und Stoppcodon markieren den offenen Leserahmen. Modell nach Leicher et al., 1996 und ergänzt nach NCBI, *Contig NT_005612.15*

1.3 *KCNAB1* und Epilepsie

1.3.1 Bisherige Ergebnisse

Im Jahre 2007 führte das *Epilepsy Genetics Konsortium (EPIGEN)* unter der Leitung von Gianpiero Cavalleri die bislang größte Untersuchung zur Überprüfung der genetischen Suszeptibilität epileptischer Syndrome und Anfallsformen durch. In der multizentrisch angelegten Studie wurden Assoziationsanalysen an 279 für Ionenkanäle codierenden Genen an 2717 Fall und 1118 Kontrollpersonen durchgeführt. Auch wenn Cavalleri und seine Mitarbeiter keine eindeutigen genetischen Risikofaktoren für einzelne Formen der Epilepsie finden konnten, so wurden doch in fünf Genen Variationen (Polymorphismen) einzelner Basenpaare (*single nucleotide polymorphism, SNP*) gefunden, die mit dem Auftreten diverser Epilepsien assoziiert werden konnten (Cavalleri et al., 2007).

Zwei der identifizierten Polymorphismen, die eine starke Assoziation vor allem zu Partialepilepsien zeigten, markierten das für Kv β 1 kodierende Gen *KCNAB1*.

Dass Mutationen in den Kaliumkanalgenen *KCNQ2* und *KCNQ3* an der Pathogenese der Rolando-Epilepsie bei einigen Familien beteiligt sind, konnte kürzlich gezeigt werden (Neubauer et al., 2008b).

1.3.2 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Gen *KCNAB1* auf eine Beteiligung an der Pathogenese der Rolando-Epilepsie zu untersuchen.

Sämtliche Exone von *KCNAB1* wurden in einem 87 Patienten umfassenden Kollektiv von Indexpatienten aus Familien mit Rolando-Epilepsie sequenziert und auf Mutationen untersucht. Es wurde die Nullhypothese (H_0) aufgestellt, dass sich das untersuchte Kollektiv hinsichtlich der Genetik von *KCNAB1* nicht vom Vergleichskollektiv der Normalbevölkerung unterscheidet und keine für die Rolando-Epilepsie prädisponierenden genetischen Variationen zu finden sind.

2. Materialien und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Dri-Block® Techne DB-2A	Techne AG, Jahnsdorf, Germany
Electrophoresis Powersupply E844	Consort nv, Turnhout, Belgium
Elektronische Mehrkanalpipette EDP®-3 Plus	Rainin, Mettler Toledo Intl. Inc., Gießen, Germany
Gefrierschrank -20° C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Germany
Gefrierschrank -70° C	Heraeus GmbH, Hanau, Germany
Gelkammer Invitrogen™ Horizon 58	Invitrogen, Darmstadt, Germany
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P 10	Gilson Inc., Middletown, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P 20	Gilson Inc., Middletown, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P 200	Gilson Inc., Middletown, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P 1000	Gilson Inc., Middletown, USA
Mikrowelle LG MS 197H	LG Electronics Inc., Seoul, South Korea
Mobile Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Germany

Photometer Pharmacia Biotech Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Dübendorf, Suisse
ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Thermocycler T3000	Biometra GmbH, Göttingen, Germany
UV-Bestrahlungssystem Stratagene 2400	Stratagene AG, La Jolla, USA
UV-Kamera-System	Polaroid Ecommerce, Minnetonka, Minnesota, USA
Vortexer Vortex Genie® 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage Ohaus Navigator™	Ohaus Corp., New Jersey, USA
Wasserbad WB1	Köttermann Laborgeräte GmbH, Me- dingen, Germany
Wippschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Zentrifuge Hettich® Mikro 200R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany
Zentrifuge Hettich® Rotana 50	Hettich, GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany

2.1.2 Zubehör

Mikrotiterplatte PP , U-Form, 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhau- sen, Germany
---------------------------------------	---

PCR-Platte PP, natur, 96 Well	Nerbe plus GmbH, Winsen/ Luhe, Germany
Pipettenspitzen Filter-Tips PE oberflächenoptimiert 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Nerbe plus GmbH, Winsen/ Luhe, Germany
Pipettenspitzen LTS Tips 250 µl	Rainin, Mettler Toledo Intl. Inc., Gießen, Germany
Reaktionsgefäße 0,2 ml für die PCR PP	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany
Röhrchen 50 ml mit Schraubverschluss PP	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
2.1.3 Chemikalien	
Aqua ad iniectabilia	B.Braun, Melsungen, Germany
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich Co., München, Germany
EDTA Puffer 10x	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Ethanol absolute Riedel-de Haën	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Germany
Ethidiumbromid Lösung 1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
GeneRTM® DNA Ladder	MBI International, Lansing, MI, USA
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
HPLC-H ₂ O LiChrosolv®	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Loading Dye®	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Germany
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Co., München, Germany
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
PeqLab Universal Agarose	PEQLAB GmbH, Erlangen, Germany
Phenol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
POP6™ Polymer	Appl. Biosystems, Foster City, CA, USA

Proteinase K	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany
Qiagen® Multiplex PCR Kit 1000	Qiagen, Hilden, Germany
Quiaquick® PCR Purification Kit 250 mit Buffer PB®, Buffer PE®, Buffer EB®	Quiagen, Hilden, Germany
PCR-Oligonukleotidprimer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Co., München, Ger- many
TRIS (Trometamol)	Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Triton X-100 (4-Octylphenol Polyethoxylat)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Mün- chen

2.1.4 Lösungen

DNA-Extraktionspuffer, steril filtriert	40 ml 1 M TRIS pH 8,0 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 20 ml 5 M NaCl Ad 1000 ml H ₂ O
Kern-Extraktionspuffer, steril filtriert	109,5 g Saccharose 5 ml 1 M MgCl ₂ 10 ml Triton X-100 10 ml 1 M TRIS pH 8,0 Ad 1000 ml H ₂ O

TAE-Puffer 50-fach
242 g TRIS pH 8,0
57,1 ml Acetat
100 ml EDTA 0,5 M
Ad 1000 ml H₂O

TRIS-EDTA
50 mM TRIS pH 8,0
10 mM EDTA

2.1.5 Software

ABI PRISM® Data Collection
Software 3100
Applied Biosystems, Foster City, CA,
USA

mutationdiscovery.com
Transgenomic Ltd., Glasgow, United
Kingdom

NNSPLICE 0.9 by fruitfly.org
National Human Genome Research
Institute, Rockville Pike, USA

SeqScape® v2.1
Applied Biosystems, Foster City, CA,
USA

2.2 Studienkollektiv

Sämtliche 87 in dieser Arbeit genotypisierten Indexpatienten mit diagnostizierter Rolando-Epilepsie entstammen einem seit nunmehr über 20 Jahren in der Bundesrepublik aufgebauten Familienkollektiv (*BRE*-Kollektiv). Das Kollektiv umfasst überwiegend deutschstämmige und zu einem Anteil von etwa 5% türkischstämmige Familien.

Sämtliche Patienten gaben nach mündlicher Aufklärung ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Genanalyse der im Rahmen der Erstdiagnostik gewonnenen Blutprobe. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen begutachtet und in der Sitzung vom 13. Januar 2011 unter dem Aktenzeichen 03/11 genehmigt.

2.3 Methoden

2.3.1 Die Extraktion der DNA

Mittels Zentrifugation wurde die korpuskuläre Phase der als Ausgangsmaterial zur Verfügung stehenden EDTA-Vollblutproben der 87 Indexpatienten vom Blutplasma getrennt. Durch die Zugabe von Kern-Extraktionspuffer (s. 2.1.4) erfolgte im zellhaltigen Zentrifugat die Zellyse und Freigabe der Zellkerne.

Während dieses Lysevorganges verwahrten die Proben zur Blockade von enzymatischen Prozessen auf Eis bevor erneut zentrifugiert wurde und das Zentrifugat zum Freisetzen der DNA aus den Nuklei beginnend mit DNA-Extraktionspuffer (s. 2.1.4), anschließend mit DNA-Extraktionspuffer-SDS 1% und abschließend mit einer Spatelspitze Proteinase K versehen wurde.

Zur Trennung der gewonnenen DNA von Protein kam die Phenol-Chloroform-Methode zu Anwendung, bei der die Nukleinsäuresuspension nacheinander mit Phenol, einem Phenol/Chloroform-Gemisch 1:1 und schließlich mit reinem Chloroform mittels Wippeschüttler ausgeschüttelt wurde. Zwischen den Applikationsschritten erfolgte je eine Zentrifugation. Nur der Überstand wurde jeweils weiterbehandelt, sodass sich Verunreinigungen in der dichten organischen Phase und der Interphase ansammelten, während die hydrophile DNA in der wässrigen Phase in Lösung ging.

Zur Fällung der DNA wurde die wässrige Phase mit Natriumacetat-Ethanol (1:19) versehen, das mit der Hydrathülle der DNA interferiert und so die Hydrophilie der Doppelhelix aufhebt: Kurz nach der Durchmischung kam es zum sichtbaren Ausfall der DNA. Das Präzipitat wurde zentrifugiert und anschließend mittels Ethanol (70%) zur Befreiung vom Natriumacetat gereinigt. Die abschließende Zentrifugation diente der schlussendlichen Pelletierung der DNA. Zur Aufnahme der Pellets stand TRIS-EDTA (s. 2.1.4) zur Verfügung, dessen *Trometamol* der Stabilisierung der DNA im milden alkalischen Bereich dient. Neben dieser Alkalisierung, die der säurebedingten DNA-Degradation vorbeugt, konserviert das enthaltene EDTA die Probe durch Komplexbildung von Kationen und damit verbundener Inaktivierung zurückgebliebener enzymatischer Aktivitäten.

Protokoll A: Extraktion und Reinigung der DNA

1. 5 ml der EDTA-Vollblutproben werden mit 40 ml Natriumchlorid (0,9%) versetzt.
2. Zentrifugation bei 4 °C und bei 1400 rpm (190 G) für 10 min.
3. Verwerfen des Überstandes und Versetzen des Zentrifugates mit 30 ml Kern-Extraktionspuffer (s. 2.1.4).
4. Halbstündige Lagerung der Proben auf Eis.
5. Anschließende zehnminütige Zentrifugation bei 2500 rpm (600 G) und Verwerfen des Überstandes.
6. Zugabe von 500 µl DNA-Extraktionspuffer (s. 2.1.4).
7. Zugabe von 500 µl DNA-Extraktionspuffer/SDS 1%.
8. Zugabe einer Spatelspitze Proteinase K mit anschließender Inkubation bei 50 °C für 3 h.
9. Zugabe von 1000 µl Phenol, Wippen für 30min und zehnminütige Zentrifugation bei 2500 rpm (600 G) und 4 °C.
10. Abschöpfen des Überstandes und Überführen in 500 µl Phenol, Wippen für 20 min, im Anschluss Zentrifugation bei 13000 rpm (160 G) und 4 °C für 10 min.
11. Überstand abnehmen und nun in 500 µl Phenol/Chloroform 1:1 geben, Wippen für 20min und zehnminütige Zentrifugation bei 1300 rpm (160 G) und 4 °C.
12. Erneute Abnahme des Überstandes und dessen Gabe in 500 µl Chloroform, Wippen für 20 min und Zentrifugation wiederholen.

Protokoll A (Fortsetzung): Extraktion und Reinigung der DNA

13. 10 min bei 13000 rpm (160 G) und 4 °C zentrifugieren, Überstand abschöpfen und in 1000 µl 3 M Natriumacetat pH 5 /Ethanol 100% (1:19) geben, manuell wippen.
14. Mindestens 30 min bei -20 °C lagern, anschließend 20 min bei 13000 rpm (160 G) und 4 °C zentrifugieren, Überstand verwerfen.
15. 200 µl Ethanol 70% zugeben, 10 min bei wiederum 160 G zentrifugieren, Überstand verwerfen.
16. Pellet antrocknen lassen und in 300 µl TRIS-EDTA (s. 2.1.4) aufnehmen.
17. Mindestens 8 h bei 50 °C im Wasserbad lagern.
18. Dauerhafte Lagerung bei 4 °C.

2.3.2 Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Der photometrischen Konzentrationsmessung liegt der Zusammenhang zwischen der Optischen Dichte (OD) einer Lösung und ihrer Konzentration (C) zugrunde.

$$C [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

Die Optische Dichte wird vom Photometer aus dem Logarithmus des Quotienten der Lichtintensitäten vor (I_0) und nach (I_d) Durchtritt durch die zu messende Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm berechnet.

$$\text{OD} = \log_{10} (I_0/I_d)$$

Der Verdünnungsfaktor (V) berücksichtigt die verwendete Verdünnung des Messansatzes, der Multiplikationsfaktor (F) beschreibt die stoffspezifische Abhängigkeit der Konzentration doppelsträngiger DNA von der Absorption.

Neben der Messung der Optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde mittels einer weiteren Absorptionsmessung bei 280 nm die Reinheit der DNA über die Bildung des Reinheitsindex (R) überprüft. Die Absorption ist der Quotient aus die Lösung durchtretender Intensität (I_d) und eingesetzter Intensität (I_0). Der ermittelte Index von 1,8 charakterisiert eine nahezu vollständige Proteinfreiheit der Probe.

$$R = A_{260} : A_{280}$$

Protokoll B: Photometrische Konzentrationsbestimmung

1. Versetzen von 5 μ l extrahierter DNA mit 95 μ l H_2O .
2. Photometrische Messung der Optischen Dichte (OD) bei $\lambda=260$ nm.
3. Berechnung der Konzentration mit $V=20$ und $F(dsDNA)=50$.
4. Bestimmung des Reinheitsindex (R) durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm.
5. Verdünnung eines jeden Messansatzes mit H_2O auf eine Konzentration von 10 ng/ μ l.

2.3.3 Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Seit die Polymerasekettenreaktion im Jahre 1985 von Mullis und seinen Mitarbeitern eingeführt wurde, etablierte sie sich zu einem der bedeutendsten Verfahren der molekularbiologischen Diagnostik. Seither ausschließlich im Detail modifiziert, stellt die PCR heute eine Routinemethode dar, die eine definierte Sequenz einer Vorlagen-DNA

(*Template-DNA*) in vitro zu amplifizieren vermag, um sie weiterführender Diagnostik zugänglich zu machen.

Im Reaktionsansatz der PCR befinden sich neben der Template-DNA industriell synthetisierte Oligonukleotide (sog. *Oligonukleotidprimer*), im Folgenden kurz *Primer* genannt, sowie Desoxynukleotidphosphate und die *Taq-Polymerase*, die als gentechnologisch hergestellte Polymerase des natürlicherweise in Geysiren lebenden Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Taq) wegen ihrer Hitzeresistenz die Reaktionstemperaturen unbeschadet übersteht. Die PCR gliedert sich in die drei Schritte *Denaturierung*, *Annealing* und *Elongation* (siehe Abb. 2.1).

Die Denaturierung (1) dient der Überführung der doppelsträngigen DNA durch Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen in ihre Einzelstränge. Hierzu wird das Reaktionsgemisch für 30 Sekunden auf 94 °C erhitzt.

In der sich anschließenden Annealingphase (2) senkt sich die Temperatur des Ansatzes für 60 Sekunden auf 55 °C, sodass es zu einer Hybridisierung der sich überschüssig im Ansatz befindlichen Oligonukleotidprimern an die Einzelstränge kommt, die damit die zu amplifizierende Sequenz flankieren.

Die Elongationsphase (3) dauert 10 Sekunden an: Bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, beginnt diese am 3'-Ende eines jeden Primers mit der Polymerisation eines zum Einzelstrang komplementären Gegenstranges, indem sie die im Reaktionsansatz befindlichen Desoxynukleotidphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP zusammensetzt.

Nach der Elongation ist der erste Synthese-Zyklus beendet und die entstandenen Doppelstränge werden im folgenden Zyklus wiederum denaturiert und dienen dann selbst als Matrize. So werden in jedem Zyklus die DNA-Moleküle verdoppelt. Nach 30 Zyklen ist die gewünschte Sequenz (ROI, Region of Interest) um den Faktor 10^5 amplifiziert worden. Die Probe verweilt während des ganzen Vorganges im Thermocycler, der die vorgewählten Temperaturen nacheinander einstellt.

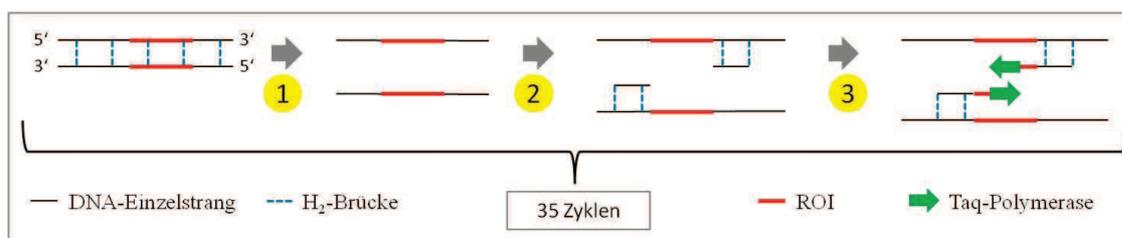


Abb. 2.1: Prinzip der PCR

2.3.4. Die Amplifikation von *KCNABI*

Sämtliche zur Amplifikation benötigten Primer wurden mithilfe der Software *mutation-discovery.com* entworfen und mittels Tris-EDTA (s. 2.1.4) in 100 μM -Aliquots überführt.

Die Amplifikation aller Exone von *KCNABI* erfolgte mithilfe der *Multiplex-PCR-Methode*, die in einem Reaktionsansatz nicht nur ein, sondern mehrere Exone amplifiziert und damit zeitsparend einzusetzen ist. In vorliegender Arbeit wurde das *Qiagen Multiplex Kit*[®] verwendet, welches neben der Polymerase die Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), Magnesiumchlorid (MgCl_2) und einen patentierten Puffer enthält und mit den Primern aller zu amplifizierenden Exone und der Template-DNA einen Reaktionsansatz bildet.

Der enthaltene Puffer stellt den pH-Wert des Reaktionsansatzes oberhalb von 8 und somit auf das Aktivitätsmaximum der Taq-Polymerase ein, das Magnesiumchlorid beeinflusst Denaturierung, Primerannealing sowie die Bildung von Primerdimeren. Es verringert so die Fehlerrate und erhöht die Produktspezifität.

Im vorliegenden Projekt wurden drei Exone pro Ansatz amplifiziert, sodass jeder Reaktionsansatz einen Satz aus 3 Primern enthielt. Ein Primersatz wurde verdünnt aus 2 μl jeweils dreier Primer und 87,6 μl H_2O .

Das Reaktionsgefäß durchlief anschließend im Thermocycler das PCR-Programm.

Die speziell im Qiagen Multiplex-Mix verwendete Taq-Polymerase, die *HotStarTaq*[®], wird durch initiale 95 °C aktiviert und zeigt verbesserte Ergebnisse beim Erweitern des Programmes um eine *Final Extension*-Phase, in der noch vereinzelt Nukleotide polymerisiert werden können.

Protokoll C: Amplifikation von *KCNAB1* via Multiplex-PCR

1. Pipettieren eines 50 μ l PCR-Ansatzes:

Multiplex Mix (MM)	25 μ l
1 Primersatz	5 μ l
Template-DNA 10 ng/ μ l	5 μ l
HPLC-H ₂ O	ad 50 μ l

2. Pipettieren einer Negativ-Kontrolle ohne Template-DNA.

3. Aufnahme des Ansatzes und der Negativkontrolle durch den Thermocycler und Programmierung wie folgt:

1.	95 °C	Initialisierung	15 min	
2.	94 °C	Denaturierung	30 sek	} 35 Zyklen
3.	52 °C	Annealing	60 sek	
4.	72 °C	Elongation	10 sek	
5.	72 °C	Final Extension	10 min	
6.	4 °C	Kühlung	∞	

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Hierbei wandern die Fragmente durch ein in einer ionischen Pufferlösung befindliches Gel, das in einem elektrischen Feld positioniert wird. Kleine Moleküle bewegen sich schneller als große in Richtung der elektropositiven Anode, sodass es im Gel zu einer Trennung der Fragmente kommt.

Bei der üblicherweise zur Auftrennung von PCR-Produkten angewandten *Agarose-Gelelektrophorese*, dient der Algenextrakt Agarose der Bildung eines recht großporigen Gels, in dem sich die mit dem patentierten Farbstoff *LoadingDye*® versetzten PCR-

Produkte auftrennen. Dem Größenvergleich der aufgetrennten Phasen dient der Größenmarker *GeneRTM® DNA Ladder*, der DNA-Fragmentgrößen in 100 kb-Schritten markiert.

Im Anschluss an die Elektrophorese werden die nun aufgetrennten Fragmente mittels des unter ultraviolettem Licht fluoreszierenden Ethidiumbromids (1%) angefärbt. Die Abschließende Photographie unter UV-Einstrahlung dient dem Nachweis der PCR-Produkte in den Proben sowie dem Ausschluss von in der Negativprobe befindlicher DNA, welche bei einer Kontamination der PCR-Reagenzien zu beobachten wäre.

Protokoll D: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

1. Herstellung von 2-fach TAE (TRIS-Acetat-EDTA)-Puffer. Hierzu 50-fach TAE-Puffer (s. 2.1.4) im Verhältnis von 2:50 mit H₂O verdünnen.
2. 2 g Agarose werden mit 100 ml des 2-fach TAE-Puffer im Becherglas verrührt.
3. Wiederholtes Aufkochen der Suspension unter Mikrowellenbestrahlung, intermittierendes gründliches Rühren.
4. Aufgießen der Lösung auf den Gelschlitten und Einbringen eines Geltaschen-Kamms, abkühlen lassen.
5. Befüllen der vom Transformator dekonnectierten Elektrophoresekammer mit 2-fach TAE-Puffer (s.o.).
6. Positionierung des polymerisierten Agarose-Gels in der Gelkammer.
7. Taschen befüllen mit 5 µl des PCR-Produktes und 2 µl Loading-Dye®.

Protokoll D (Fortsetzung): Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

8. Eine Tasche befüllen mit 10 µl GeneRTM® DNA Ladder, eine weitere Tasche erhält die Negativ-Kontrolle.
9. Anlegen einer Gleichspannung: 150 V bei 100 mA für 45 min.
10. Positionieren des Gels in 1%-iger Ethidiumbromidlösung für 10 min, anschließend Auswaschen ungebundenen Ethidiumbromids in H₂O für 10 min.
11. Sofortbildphotographie unter UV-Einstrahlung.

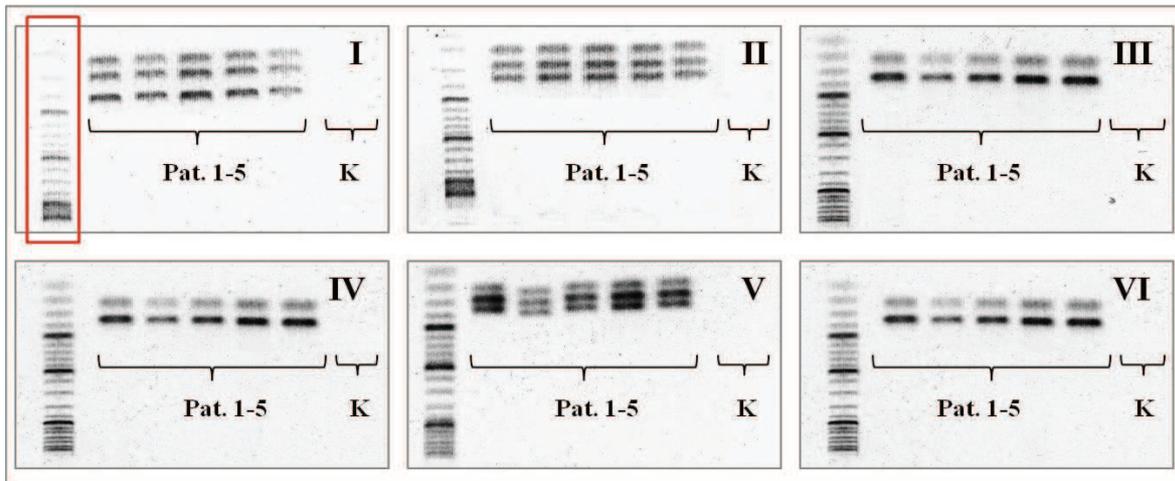


Abb. 2.2: Gelelektrophoretische Auftrennung aller amplifizierter Exone von *KCNABI* (hier exemplarisch die Patientenproben 1-5). Rechts jeweils die Negativ-Kontrolle (K). **Ansatz I** mit Exon 1a, 2 und 13: 266 bp, 339 bp und 467 bp. **Ansatz II** mit Exon 1b, 3 und 4: 189 bp, 262 bp und 331 bp. **Ansatz III** mit Exon 5, 10 und 15: 187 bp, 215 bp und 339 bp. **Ansatz IV** mit Exon 6, 8 und 16: 214 bp, 250 bp und 283 bp. **Ansatz V** mit Exon 9, 14 und 17: 220 bp, 337 bp und 373 bp. **Ansatz VI** mit Exon 7, 11 und 12: 223 bp, 229 bp und 387 bp. Bei der Abbildung ähnlich großer PCR-Produkte verschmelzen die Banden. Rot umrandet wurde der Größenmarker *GeneRTM® DNA-Ladder*; Fragmentgrößen werden in 100 kb-Schritten markiert.

2.3.6 Aufreinigen der PCR-Produkte

Zur Trennung der PCR-Produkte von Farbstoffen, Oligonukleotiden und anderen Reaktionsprodukten wurde jede Probe mittels des *QIAquick® PCR Purification Kits* gerei-

nigt. Im Ergebnis wurden 80 µl Eluat gereinigter PCR-Produkte pro PCR-Ansatz auf sechs PCR-Reaktionsgefäße verteilt.

Protokoll E: Aufreinigung der PCR-Produkte

1. Versetzen des PCR-Produktes mit Bindepuffer Buffer PB® in fünffachem Volumen.
2. Überführen der Emulsion in eine Zentrifugationssäule mit anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm für 60 sek.
3. Verwerfen des Zentrifugates und Befüllen der Säule mit 750 µl Waschpuffer Buffer PE®.
4. Zentrifugation bei 13.000 rpm (15.000 G) für 60 sek und verwerfen des Zentrifugates, erneute Zentrifugation für 60 sek.
5. Elution der gereinigten PCR-Produkte mittels Zugabe von 80 µl Elutionspuffer Buffer EB® auf die Membran der Säule und einminütige Abzentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß bei 13.000 rpm (15.000 G).
6. Verteilen des Eluats auf 6 PCR-Reaktionsgefäße.
7. Lagerung bei 4 °C.

2.3.7 Die Sequenzierung

Ziel der *Sequenzierung* ist die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge eines zu untersuchenden DNA-Fragments. Bei der in vorliegender Arbeit angewandten *Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger* wird ähnlich der Amplifikation ein zuvor hybridisierter Primer von einer Taq-Polymerase mittels Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) verlängert. Weil jedoch dem Reaktionsansatz zusätzlich fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs) beigelegt sind, erfolgt die Polymerisierung nicht in einem fort, sondern wird die Strangsynthese bei zufälligem Einbau eines

ddNTP aufgrund der hier fehlenden 3'-Hydroxylgruppe unterbunden. Prozessergebnis ist eine Gruppe neuer Moleküle unterschiedlicher Länge, von denen jedes mit einem der vier verschiedenen Didesoxyribonukleotide endet, die komplementär anzeigen, welches Nucleotid an entsprechender Position in der Template-DNA zu finden ist.

Zur Trennung der DNA-Moleküle entsprechend ihrer Länge wird vom automatisierten

Sequenzierer eine Kapillarelektrophorese durchgeführt bevor die Moleküle einen Fluoreszenzdetektor passieren, der die unterschiedlichen Markierungen der Didesoxynukleotide zu detektieren vermag und optisch auflöst.

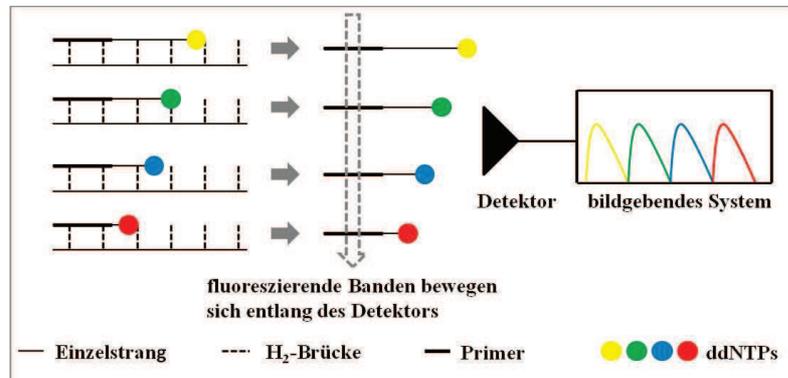


Abb. 2.3: Das Prinzip der Sequenzierung

2.3.8 Der Sequenzansatz

Entsprechend der enthaltenen amplifizierten Exone wurde jede Probe mit Oligonukleotidprimern sowie *BigDye® Buffer* und *BigDye® Terminator* aus dem *BigDye® Cycle Sequencing Kit v3.1* versehen. Letzteres Reagenz enthält die Didesoxynukleotide sowie eine patentierte Polymerase. Im Thermocycler durchliefen die Proben das zyklische Sequenzierungsprogramm, das dem Einbau der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide dient.

Anschließend wurde das Sequenzprodukt einer Ethanol-Natriumacetatfällung unterzogen: Sämtliche Proben wurden mit Natriumacetat und Ethanol absolut versetzt und dann auf eine Zentrifugalplatte übertragen. Nach 20-minütiger Zentrifugation hatte sich der Sequenzansatz am Boden eines jeden Wells niedergeschlagen und nach dem Verwerfen der flüssigen Phase konnte die Aufreinigung der Produkte mittels Ethanol (70%) erfolgen.

Die Sequenzprobe wurde zur Resuspension in *HiDi™ Formamide* gelöst, das neben konservierendem und antievaporativem Effekt die Menge der freien Ionen reduziert und die Probe damit auf die Kapillarelektrophorese vorbereitet.

Protokoll F: Der Sequenzansatz

1. Erstellen eines sechsfachen (s.o.) Sequenzansatzes pro PCR-Produkt: Zwei mit PCR-Produkt aus 2.3.6 gefüllte Reaktionsgefäße pro amplifiziertem Exon versetzen mit 1,5 µl Primer (1,6 µM). Ein Reaktionsgefäß erhält den Forward-, das jeweils weitere den Reverse-Primer. Jeder Ansatz wird durch die Zugabe von 4 µl BigDye® Buffer und 2µl BigDye® Terminator vervollständigt. In jedem Tube befinden sich anschließend:

Eluat aus der Aufreinigung:	11,5 µl
BigDye® Buffer:	4 µl
BigDye® Terminator:	2 µl
Primer (forward o. reverse):	1,5 µl

2. Aufnahme durch den Thermocycler und Programmierung wie folgt:

1.	96 °C	Denaturierung	10 sek	} 25 Zyklen
2.	50 °C	Annealing	5 sek	
3.	60 °C	Elongation	4 min	
4.	4 °C	Kühlung	∞	

Protokoll F (Fortsetzung): Der Sequenzansatz

3. Verwerfen des Überstandes und Auffüllen eines jeden Wells mit 20 μ l HiDi™ Formamide, nach kurzem Vortexen erfolgt der Übertrag auf eine Sequenzerplatte.
4. Zur Fällung jedes Reaktionsgefäß mit 50 μ l Ethanol (100%) und 2 μ l 3 M Natriumacetat versehen.
5. Überführen auf Zentrifugalplatte und Zentrifugation für 20 min bei 4000 rpm, anschließend Verwerfen des Überstandes.
6. Zum Aufreinigen des Sequenzansatzes jedes Well mit 150 μ l Ethanol (70%) versehen und 10 min bei 4000 rpm (1500 G) zentrifugieren.

2.3.9 Sequenzierung von *KCNAB1* und Sequenzanalyse

Das zur Verfügung stehende System ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer trennte die fluoreszenzmarkierten Fragmente mittels einer speziellen Polymermatrix (POP6™, *Performance Optimized Polymer*) über eine Strecke von 50 cm auf. Die Kombination aus Trennstrecke, Polymer und einer über Laufmodule (*Run Module*) festgesetzten Elektrophoresespannung ergibt erwünschte Trennleistungen und Leseweiten bei entsprechender Laufzeit. Die Detektion der mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotide erfolgt durch Anregung der Farbstoffe über zwei fokussierte Argonlaserstrahlen und die Auswertung der Emission nach spektraler Aufspaltung über eine hochauflösende CCD-Kamera. Mithilfe der gerätespezifischen *ABI PRISM® Data Collection Software* werden die detektierten Emissionspeaks übersetzt (*Basecalling*).

Die Sequenzanalyse erfolgte mit *SeqScape® 2.1*, einer Software, die den Vergleich genotypisierter Fragmente mit einer Referenzsequenz ermöglicht, die in vorliegender Arbeit vom NCBI Contig NT_005612.15 präsentiert wurde. Die in Abhängigkeit von zu sequenzierender Exonlänge, gegebener elektrophoretischer Trennstrecke, dem Polymer

sowie des für den Sequenzansatz verwendeten BigDye® Mixes verwendeten Einstellungen sind im Folgenden aufgeführt.

Tab. 2.1: Einstellungen am Sequenzierer ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer

Dye Set:	Z, abhängig vom verwendeten BigDye® Mix
Mobility File:	<i>DT3100POP6(BDv.3)v1.mob</i> , nivelliert kapillarelektrophoretische polymerabhängige Schwankungen
Analysis Module:	<i>BC-3100POP6SR</i> , Auswahl in Abhängigkeit von Polymer und Exonlänge
Run Module:	<i>StdSeq50_POP6D</i> , Auswahl abhängig von Polymer und Trennstrecke

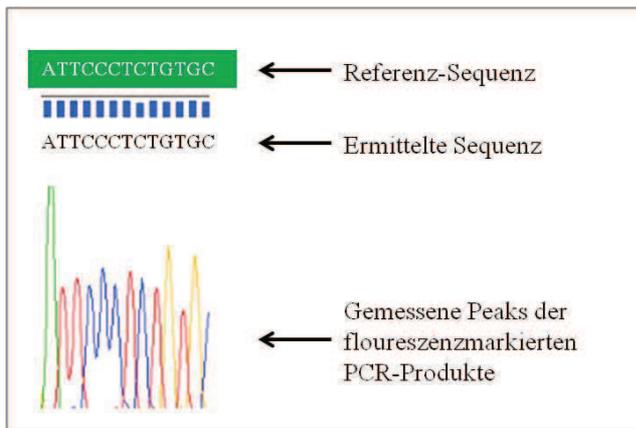


Abb. 2.4: Ansicht von Applied Biosystems SeqScape® 2.1

3. Ergebnisse

3.1 Das *KCNAB1*-Gen

Das bei 87 Indexpatienten sequenzierte Gen *KCNAB1* liegt auf dem 199 Millionen Basenpaaren umfassenden Chromosom 3. Mit Ausnahme zweier identifizierter Polymorphismen entspricht der Genotyp aller untersuchten Patienten hinsichtlich des Gens der Referenzdatengrundlage *Contig NT_005612.15*. Beide gefundenen Polymorphismen sind bereits im *Reference SNP Cluster Report* verzeichnet. Ein jeweiliger klinischer Effekt ist bislang unbekannt.

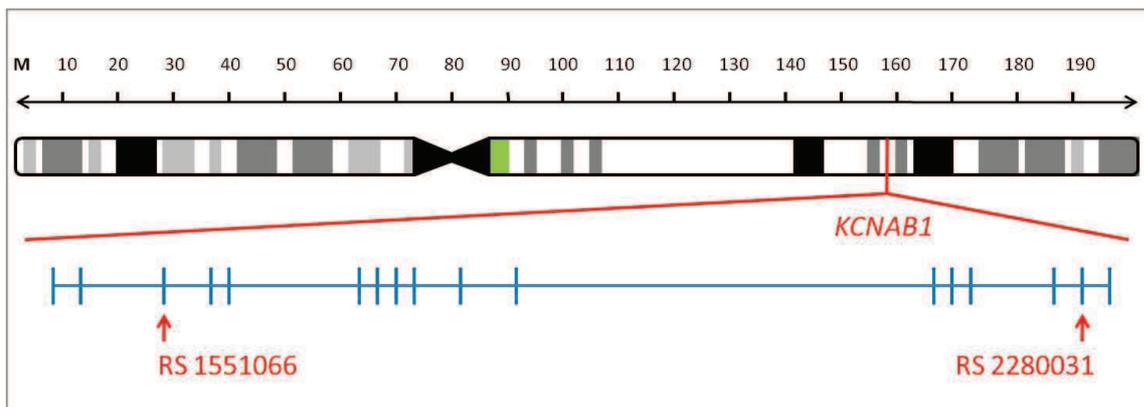


Abb. 3.1: Ideogramm des Chromosom 9 und das Gen *KCNAB1* mit den Orten der beiden gefundenen Polymorphismen RS 1551066 und RS 2280031 (nach Cavalleri et al., 2007).

3.2 Polymorphismus RS 1551066

3.2.1 Der Polymorphismus RS 1551066

Der Polymorphismus RS 1551066 wurde im untersuchten Kollektiv bei 40 Patienten gefunden. In 38 Fällen trat er heterozygot, in 12 Fällen homozygot auf. Bei RS 1551066 handelt es sich um einen Basenaustausch an Position 157492619, sieben Basenpaare nach Ende des Exon 3, bei welchem die Nukleinbase Cytosin durch Thymin ersetzt wird (C>T). Infolge der Position im Intron hat die Punktmutation keinen unmittelbaren Einfluss auf die Proteinbiosynthese.

Tab. 3.1: Frequenzen von RS 1551066

Genotyp	Absolut (n=87)	Frequenz
CC	37	0,43
TC	38	0,44
TT	12	0,14

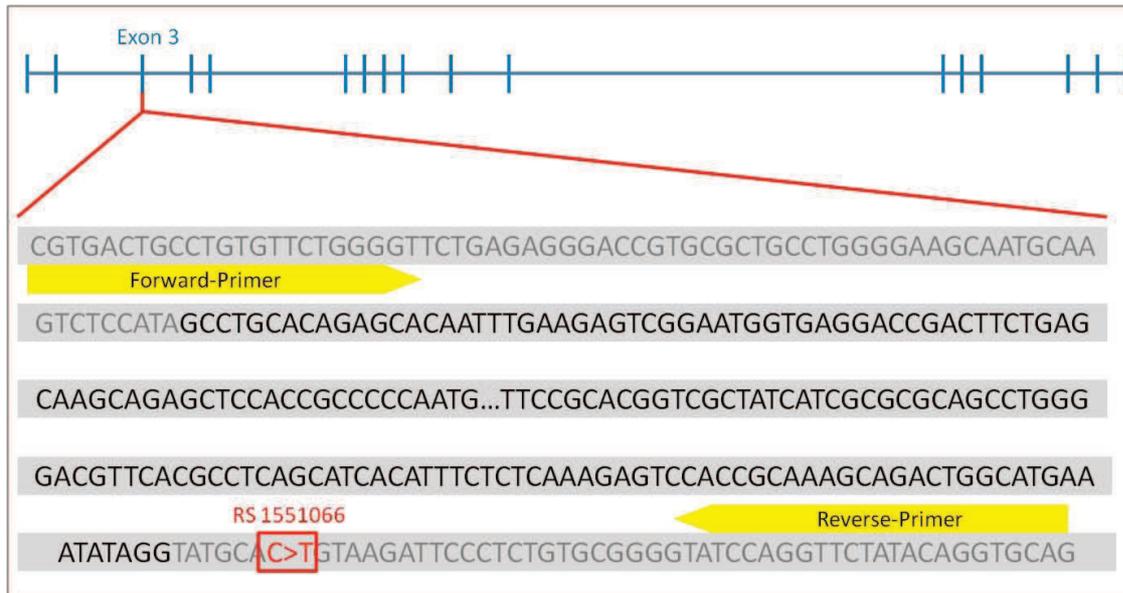
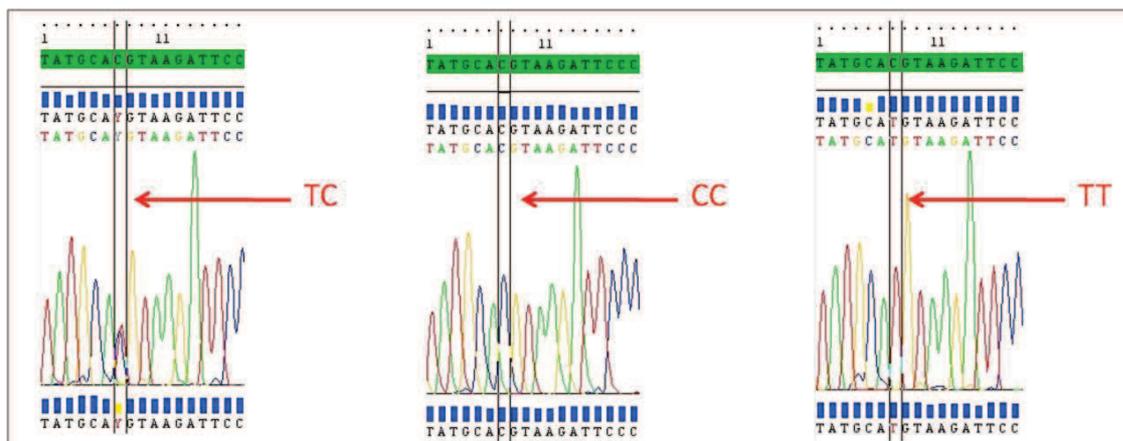
Abb. 3.2: Das Gen *KCNAB1* mit Auszug des Exon 3. Zu erkennen ist das Primerannealing sowie die Position des Polymorphismus 1551066.

Abb. 3.3: Die drei identifizierten genotypischen Varianten von RS 1551066. Ansicht der graphischen Auflösung durch Applied Biosystems Seqscape® 2.1.

3.2.2 Splice-Site-Analyse

Die obligate Splice-Site stellt die Grenze zwischen genomischem Intron und Exon dar. An ihr trennt ein Komplex aus Ribonukleinsäure und Protein, das *Spliceosom*, posttranskriptionell die Introns aus der prä-mRNA.

Aufgrund der exonnahen Position des Polymorphismus RS 1551066 wurde eine Splice-Site-Analyse durchgeführt, um ein möglicherweise durch den Polymorphismus bedingtes verändertes Spliceverhalten der Nukleinsäure zu untersuchen. Hierzu wurde das vom BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) unter www.fruitfly.org bereitgestellte Analyseprogramm NNSPLICE 0.9 verwendet. Sowohl im Falle der Wildtypsequenz als auch bei aufgetretenem Polymorphismus wird die Splice-Site identisch und mit gleicher Zuverlässigkeit (Wahrscheinlichkeits-Score= 0,99) erkannt, sodass eine Einflussnahme der Punktmutation auf das Spliceverhalten als sehr unwahrscheinlich gelten kann.

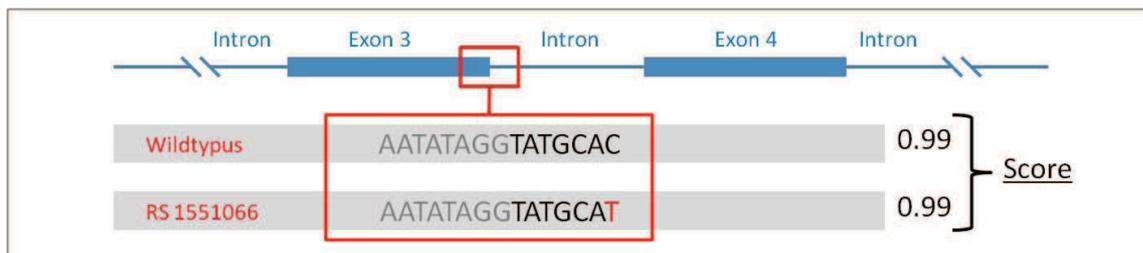


Abb. 3.4: Sowohl bei Vorliegen des Wildtypus als auch bei aufgetretenem Polymorphismus wird nach der Analyse von NNSPLICE 0.9 die Splice-Site mit gleich hoher Zuverlässigkeit (Wahrscheinlichkeits-Score=0,99) erkannt.

3.2.3 Statistische Untersuchung

Um eine Assoziation des Polymorphismus mit dem Auftreten der Rolando-Epilepsie auszuschließen, erfolgte die Untersuchung der im Kollektiv aufgetretenen Polymorphismusfrequenzen nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (*HWE=Hardy-Weinberg-Equilibrium*). Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beschreibt als Modell *unter Ausschluss jeglicher Selektionsfaktoren* das natürliche Auftreten unterschiedlicher Allelfrequenzen in einer Idealpopulation.

Im untersuchten Kollektiv wurden die Frequenzen für den homozygoten Wildtypus (CC) mit 0,43, für das heterozygote Auftreten des Polymorphismus (CT) mit 0,44 und für die homozygote Mutation (TT) mit 0,14 bestimmt. Der *Chi-Quadrat-Test nach Pearson* zeigt hinsichtlich der Allelfrequenzen mit einem P-Wert von 0,8114 keine Differenzierung des untersuchten Kollektives von der Frequenzverteilung nach Hardy und

Weinberg. Der *Exact test for Hardy-Weinberg Equilibrium* bestätigt das Testergebnis ($p=0,6449$) (Engels, 2009).

Die genotypisierten Frequenzen sind somit unabhängig vom untersuchten Kollektiv und der Polymorphismus RS 1551066 prädisponiert auch über möglicherweise unbekannte Mechanismen vermutlich nicht für das Auftreten der Rolando-Epilepsie.

3.3 Polymorphismus RS 2280031

3.3.1 Der Polymorphismus RS 2280031

Der Polymorphismus RS 2280031 wurde bei insgesamt 33 Patienten identifiziert. Davon stellte sich die Mutation in 28 Fällen heterozygot und in 5 homozygot dar. Bei RS 2280031 handelt es sich um den Austausch der Nukleinbase Thymin gegen Cytosin (T>C) innerhalb des Exon 16 an Position 157731909. Der Austausch der Base führt zur Bildung des Triplets AAC statt AAT. Im Rahmen der Transkription kommt es zur DNA-abhängigen Polymerisation der proteinogenen mRNA, bei der Thymin durch die Base Uracil ersetzt wird. Da sowohl das resultierende RNA-Triplet AAC wie auch AAU für die Aminosäure Asparagin (Asn, D) kodieren, kommt es im Rahmen der Proteinbiosynthese infolge der Translation nicht zum Austausch der synthetisierten Aminosäure und somit nicht zu einer etwaigen Proteinfehlfunktion. Bei RS 2280031 handelt es sich demnach um einen nicht kodierenden Polymorphismus, eine sogenannte *stille Mutation*.

Tab. 3.2: Frequenzen von RS 2280031

<u>Genotyp</u>	<u>Absolut (n=87)</u>	<u>Frequenz</u>
TT	54	0,62
TC	28	0,32
CC	5	0,06

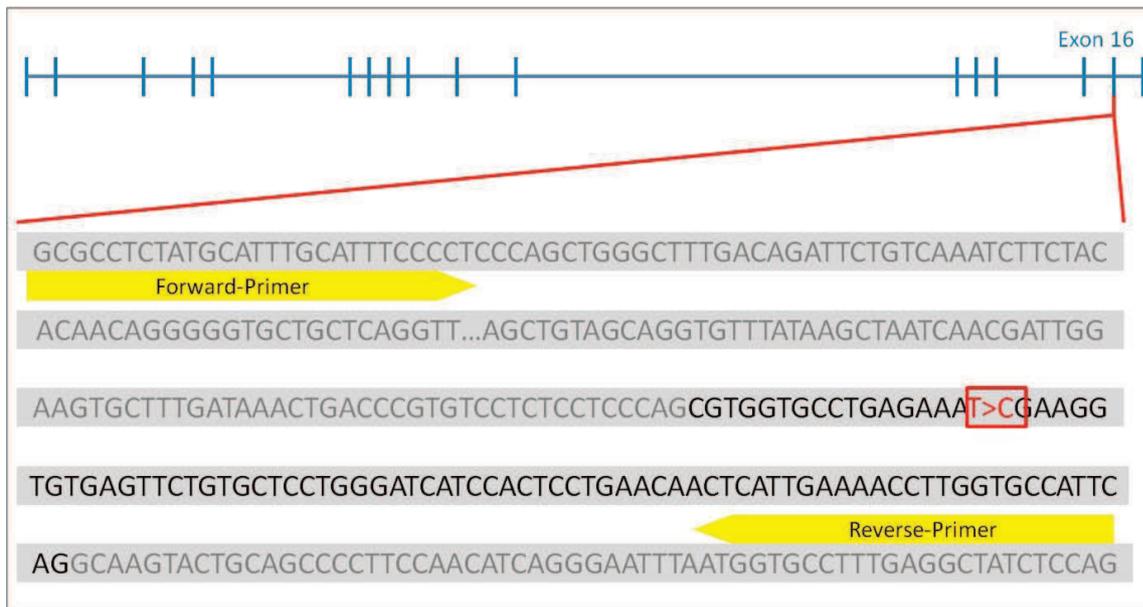


Abb. 3.5: Das Gen *KCNAB1* mit Auszug des Exon 16. Zu erkennen ist das Primerannealing sowie die Position des Polymorphismus 2280031.

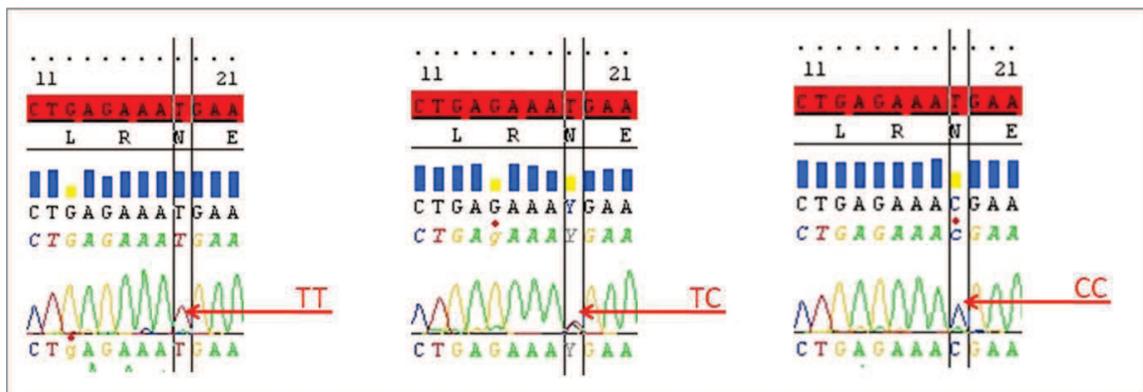


Abb. 3.6: Die drei identifizierten genotypischen Varianten des RS 2280031. Ansicht der graphischen Auflösung durch Applied Biosystems Seqscape® 2.1.

	U	C	A	G
U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } UGG } Trp
C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }
A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thy ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }
G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }

Phe	Phenylalanin
Leu	Leucin
Ile	Isoleucin
Met	Methionin
Val	Valin
Ser	Serin
Pro	Prolin
Thy	Threonin
Ala	Alanin
His	Histidin
Gln	Glutamin
Asn	Asparagin
Lys	Lysin
Glu	Glutaminsre.
Cys	Cystein
Trp	Tryptophan
Arg	Arginin
Gly	Glycin

Abb. 3.7: Wie aus der Codontabelle ersichtlich führt RS 2280031 im Rahmen der Proteinbiosynthese nicht zu einem Austausch der Aminosäure.

3.3.2 Statistische Untersuchung

Auch für die im untersuchten Kollektiv gefundenen Frequenzen von RS 2280031 wurde ein statistischer Vergleich mit der Hardy-Weinberg-Verteilung vorgenommen, um etwaige unbekannte Assoziationsmechanismen des Polymorphismus mit dem Auftreten der Rolando-Epilepsie zu detektieren.

Für die angetroffenen Frequenzen des Wildtypus TT (0,62), der heterozygoten Mutation TC (0,32) und der homozygoten Mutation CC (0,06) ergibt der *Chi-Quadrat-Test nach Pearson* bei einem Vergleich mit dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht einen P-Wert von 0,7532. Der *Exact Test for Hardy-Weinberg Equilibrium* zeigt einen P-Wert von 0,5406.

Somit treten die genotypisierten Frequenzen von RS 2280031 unabhängig vom untersuchten Kollektiv auf und der Polymorphismus prädisponiert nicht für das Auftreten der Rolando-Epilepsie.

4. Diskussion

4.1 Bisherige Studienlage

Die im Jahre 2007 durch das Epilepsy Genetics Consortium (EPIGEN) unternommene multizentrische Untersuchung zur Überprüfung der genetischen Suszeptibilität epileptischer Syndrome und Anfallsformen zeigte sich als die bis dahin größte Studie dieser Art. In den hier angefertigten Kopplungsanalysen wurden zwei Polymorphismen mit starker Assoziation zu Partialepilepsien identifiziert, die das für die Kaliumkanal-Untereinheit Kv β 1 kodierende Gen *KCNAB1* markierten (s. Tab. 4.1; Cavalleri et al., 2007). Kv β 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung spannungssensitiver *delayed rectifier* Kaliumionenkanäle aus der Gruppe der Kv1.1-Kanäle (*Shaker*) im Rahmen des neuronalen Aktionspotentials (s. 1.2.4).

	Test phenotype	Population	SNP number	Gene	Set-association p value	N‡
1	SGTCS	Finland	rs16826199	<i>KCNAB1</i>	$4,57 \times 10^{-7}$	685
2	SGTCS	Finland	rs3755631	<i>KCNAB1</i>	$6,45 \times 10^{-7}$	697
3	All epilepsy	Finland	rs3755631	<i>KCNAB1</i>	$5,23 \times 10^{-6}$	782
4	All epilepsy	Finland	rs16826199	<i>KCNAB1</i>	$5,40 \times 10^{-6}$	773
5	Other	Finland	rs3755631	<i>KCNAB1</i>	$1,01 \times 10^{-5}$	698
6	Partial	Finland	rs16826199	<i>KCNAB1</i>	$1,25 \times 10^{-5}$	750
7	Myoclonic	Ireland	rs9362632	<i>GABRR2</i>	$1,28 \times 10^{-5}$	422
8	Myoclonic	Ireland	rs7762767	<i>GABRR2</i>	$1,75 \times 10^{-5}$	429
9	Other	Finland	rs16826199	<i>KCNAB1</i>	$2,06 \times 10^{-5}$	690
10	MTLE-HS	Ireland	rs398702	<i>KCNMB4</i>	$2,19 \times 10^{-5}$	483
11	Partial	Finland	rs3755631	<i>KCNAB1</i>	$2,49 \times 10^{-5}$	761

Tab. 4.1: Ergebnisliste der EPIGEN Studie von 2007; SGTCS=Sekundär generalisierende tonisch-klonische Krämpfe; MTLE-HS= Mesiale Temporallappenepilepsie, N‡= Gesamtzahl der Probanden. Auszug modifiziert nach Cavalleri et al., 2007.

Der Empfehlung des EPIGEN Consortiums, die Genetik von *KCNAB1* im Hinblick auf die Suszeptibilität von Partialepilepsien weiter zu explorieren (Cavalleri et al., 2007), wurde in vorliegender Arbeit Rechnung getragen. Es wurde die Beteiligung des Gens an der komplex-genetischen Pathogenese der Rolando-Epilepsie untersucht, die zu den häufigsten Partialepilepsien des Kindesalters zählt. Dass Mutationen in den Kaliumka-

nalgenen *KCNQ2* und *KCNQ3* an der Pathogenese der Rolando Epilepsie bei einigen Familien beteiligt sind, konnte kürzlich bereits gezeigt werden (Neubauer et al., 2008b; Hahn et Neubauer 2009). *KCNQ2* und *KCNQ3* kodieren für die spannungssensitiven Kaliumkanäle Kv7.2 und Kv7.3 vom M-Typ (*slow-delayed-rectifier*) (Maljevic et Wuttke, 2010).

4.2 Eigene Ergebnisse

Im Rahmen der erfolgten DNA-Sequenzierung von *KCNAB1* bei 87 Indexpatienten aus 87 Multiplexfamilien mit diagnostizierter Rolando Epilepsie wurden keine krankheitsauslösenden Mutationen gefunden. Es konnten lediglich zwei bereits bekannte Polymorphismen identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die intronische Mutation RS 1551066 (C>T) sowie die exonische stille Mutation RS 2280031 (T>C) ohne Aminosäureaustausch.

Beide Polymorphismen traten im untersuchten Kollektiv mit Frequenzen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht auf, sodass Assoziationsmechanismen zwischen den Polymorphismen und dem Auftreten der Rolando Epilepsie als überaus unwahrscheinlich angesehen werden können (s. 3.2-3.3).

Wenngleich die Studienergebnisse des EPIGEN Consortiums eine Beteiligung von *KCNAB1* an der Genese partialepileptischer Syndrome und sekundär generalisierter tonisch-klonischer Anfallsformen vermuten lassen (Cavalleri et al., 2007) und *KCNQ2* wieauch *KCNQ3* bei einigen Familien an der Pathogenese beteiligt sind, so konnte doch in der vorliegenden Untersuchung *keine* Beteiligung des Gens *KCNAB1* an der Pathogenese der Rolando Epilepsie nachgewiesen werden.

Funktionell unterscheiden sich die 2008 bereits identifizierten Genprodukte von *KCNQ2* und *KCNQ3* von den in vorliegender Arbeit untersuchten Kv1 (*Shaker*)-Kanälen. Kv β 1 bildet als β -Untereinheit zusammen mit den porenbildenden α -Untereinheiten (Kv1) spannungsabhängige A-Typ- oder delayed-rectifier-Kanäle (s. 1.2). Im Rahmen des Ablaufes eines Aktionspotentials vermitteln diese Kanäle die sich der Depolarisation durch das schnelle Natrium-System anschließende Repolarisation (s. 1.2.3; Hille, 2001). Slow-delayed-rectifier-Kanäle (Kv7-Kanäle) hingegen wie die Genprodukte von *KCNQ2* und *KCNQ3* verfügen über keinen unmittelbaren Einfluss auf den Progress des Aktionspotentials, sie begrenzen lediglich eine wiederholte Depolarisation

des Neurons und senken somit die Aktionspotentialfrequenz. Sie werden deutlich langsamer aktiviert als Kv1-Kanäle und öffnen sich ausschließlich im Grenzbereich zwischen Aktionspotential und Ruhepotential. Da sie sich nicht potentialgesteuert inaktivieren, generieren sie einen fortwährenden spannungsabhängigen zellulären Kaliumionenstrom, der das Membranpotential stabilisiert und die Erregbarkeitsschwelle des Neurons anhebt. Weil der Ionenfluss der slow-delayed-rectifier-Kanäle nebst verschiedenen Neurotransmittern ebenso durch Muskarin inhibiert werden kann, werden sie auch M-Typ-Kanäle und ihr Ionenfluss *M-Strom* genannt (Hille, 2001; Wyllie, 2010).

Dass sich Kv1-Kanäle (Shaker) in ihrer Funktion grundsätzlich von Kv7-Kanälen unterscheiden, könnte die Beteiligung von *KCNQ2* und *KCNQ3* an der Pathogenese der Rolando-Epilepsie bei gleichzeitig negativem Befund für *KCNAB1* in vorliegender Arbeit erklären. Eine Beteiligung von *KCNQ5* an der Genese der Rolando Epilepsie gilt als unwahrscheinlich (Neubauer et al., 2008b).

Die mRNA des M-Typ-Kanals Kv7.4 wurde bisher nicht im humanen Neokortex gefunden (Robbins, 2001) ebenso wie Kv7.1, der zudem keinen M-Strom zu vermittelt vermag (Brown et Passmore, 2009).

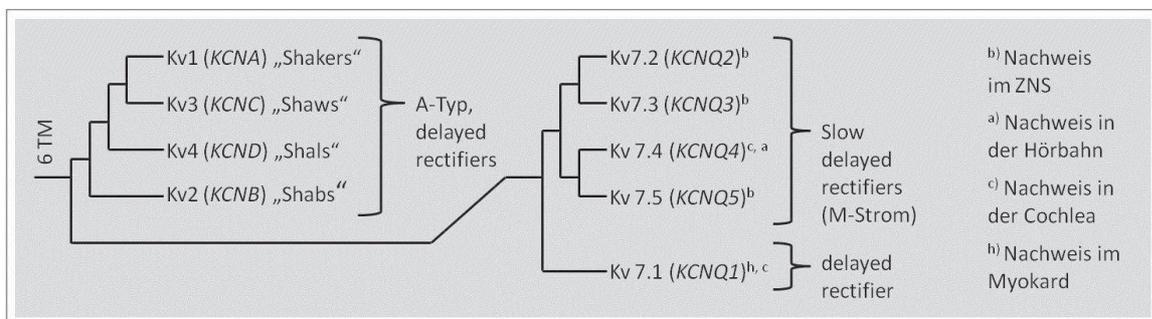


Abb. 4.1: Auszug aus dem Dendrogramm der sechs Transmembrandomänen (6 TM) umfassenden Kaliumionenkanäle (modifiziert nach Hille, 2001; Robbins, 2001).

4.3 Weiterführende Untersuchungen

Bei bestehenden Hinweisen für *KCNAB1* als möglicherweise pathogenetisch bedeutsamem Faktor aus den Assoziationsanalysen von 2007 könnte eine Vergrößerung des untersuchten Kollektives an Indexpatienten auf deutlich höhere Werte als n=87 mit einer Erhöhung der statistischen Teststärke zu exakteren und damit repräsentativeren Ergeb-

nissen führen. In Anbetracht unserer Ergebnisse erscheint dies jedoch unwahrscheinlich. Es wäre sinnvoll, die Untersuchung mit der Anwendung eines internationalen und dem der EPIGEN Studie ähnelnden Kollektives zu modifizieren.

Die Genetik von *KCNAB1* kann ferner auf die Suszeptibilität weiterer Partialepilepsien wie etwa der *Benignen Familiären Anfälle (BFS)* oder des recht häufigen *Panayiotopoulos-Syndroms* in entsprechend phänotypisierten Kollektiven untersucht werden. Bei ersteren konnten bereits Defekte in *KCNQ2* und *KCNQ3* gefunden werden (Hahn et Neubauer, 2009).

Bei weiterhin negativem Befund für *KCNAB1* allerdings steht zur Untersuchung der Pathogenese der Rolando Epilepsie die Überprüfung zusätzlicher Gene an.

Schon seit längerem ist bekannt, dass die zentrottemporalen Spikes, der neurobiologische Marker der Rolando Epilepsie, bei Migränepatienten eine gegenüber der Normalbevölkerung erhöhte Prävalenz zeigen (Ziegler et Wong, 1967; Kinast et al., 1982). Die Autoren mutmaßten schon damals eine gemeinsame genetische oder auch vaskuläre Pathogenese beider Erkrankungen (ebd.). Als 2007 gezeigt wurde, dass das Auftreten dieses EEG-Musters einem autosomal-dominanten Erbgang folgt (Bali et al., 2007), stellten Clarke, Pal und Mitarbeiter im Jahre 2009 die Hypothese der gemeinsamen genetischen Risikofaktoren für Migräne und Rolando Epilepsie auf (Clarke, Pal et al., 2009). Sie untersuchten mittels einer Kohortenstudie die Prävalenz der Migräne bei 72 Rolando Patienten und deren 88 Zwillingen sowie bei 150 Nichtepileptikern mit 188 Zwillingsgeschwistern.

Bei einer etwa doppelt so hohen Prävalenz der Migräne unter den Rolando Epilepsie Probanden wie auch einer dreifach erhöhten Prävalenz unter deren Zwillingen gegenüber den Nichtepileptikern gehen die Autoren von einer gemeinsamen Suszeptibilität der Erkrankungen aus, die nicht durch die Anfälle selbst, sondern vielmehr durch eine genetisch vermittelte „neuronalen Hyperexzitabilität“ vermittelt wird (ebd.). Dass Mutationen diverser Ionenkanalgene auch an der Pathogenese der Migräne beteiligt sind, konnte in der Vergangenheit gezeigt werden (Lafreniere, 2010 et 2011; Segall et al., 2005; Van den Maagdenberg, 2010; Vanmolkot et al., 2006). Bei der zukünftigen Untersuchung der genetischen Suszeptibilität der Rolando Epilepsie sollten demnach auch die für Migräne disponierenden Genvarianten in Augenschein genommen werden. Bisher wurden hier das Natriumkanalgen *SCN1A*, das für einen Kalziumkanal codierende *CACNA1A*, das Kaliumkanalgen *KCNK18*, sowie die Natrium-Kalium-ATPase *ATP1A2*

identifiziert. Für *KCNQ2* fehlt der Nachweis bislang, es wird jedoch eine Teilhabe des M-Typ-Kanals an der Pathogenese der Migräne angenommen, da eine pharmakotherapeutische Inhibition von *KCNQ2* die Anzahl der im Rahmen der Migräne pathophysiologisch bedeutsamen kortikalen Streudepolarisation (*CSD= cortical spread depression*) signifikant senkt (Lafreniere 2011, Wu et al., 2003).

Migräne	BRE		BRE- Probanden	Nichtepilepsie-Prob.
<i>SCN1A</i>	?	Probanden mit Migräne	n=11 (15%)	n=11 (7%)
<i>CACNA1A</i>	?	Zwillinge mit Migräne	n=12 (14%)	n=8 (4%)
<i>KCNQ2</i> *	<i>KCNQ2</i>			
<i>KCNK18</i>	?			
<i>ATP1A2</i>	?			

Tab. 4.2: links: Ionenkanalgene mit nachgewiesener Rolle in der Pathogenese von Migräne und Rolando Epilepsie (nach Lafreniere, 2010; Neubauer, 2008b, Segall et al., 2005; Vanmolkot et al., 2006); *) Vermutete Beteiligung an der Pathogenese der Migräne; rechts: Ergebnisse Clarkes und Pals Studie aus dem Jahre 2009: Prävalenzen der Migräne bei Rolando-Patienten und deren Zwillingen (nach Clarke et al., 2009). BRE= Benigne Rolando Epilepsie.

In Anbetracht der Funktion und des positiven Befundes für *KCNQ*-Kanäle (s.o.) für die Pathogenese der Rolando Epilepsie scheint eine Untersuchung des Kaliumkanalgens *KCNK18* sinnvoll.

KCNK18 codiert für TRESK (*TWIK-Related-Spinal-Cord-K⁺-Channel*), einen von Calcineurin abhängigen Kaliumionenkanal. Den Kv7-Kanälen (*KCNQ*) ähnelnd spielen TRESK-Kanäle keine unmittelbare Rolle im Progress des neuronalen Aktionspotentials, sondern dienen vielmehr der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials. TRESK-Kanäle generieren einen transmembranösen auswärtsgerichteten Hintergrund-Strom positiver Valenzen, der dem Aktionspotential als Regulativ dient und fortwährend die zelluläre Erregbarkeitsschwelle anhebt (Enyedi et al., 2010; Rajan, 2005).

Wie auch für *KCNQ2* angenommen (Wu et al., 2003) scheint *KCNK18* bei der Generierung der im Rahmen der Migräne zentralen Streudepolarisation des Kortex eine Rolle zu spielen (Lafreniere, 2010). Da eine pharmakotherapeutische Beeinflussung beider Kaliumionenkanäle die Anzahl der Depolarisationen (*CSD*) senkt und die Erregbarkeitsschwelle anhebt, (Lafreniere et al., 2010; Wu et al., 2003), liegt es nahe für

KCNK18 eine sich *KCNQ2* ähnelnde Funktion und Einflussnahme auf die neuronale Hyperexzitabilität anzunehmen. Das Genprodukt von *KCNK18* ist in weiten Teilen des humanen Gehirns nachweisbar (Lafreniere, 2010).

Der aktuelle Befund zeigt eine Koinzidenz von Rolando Epilepsie und familiärer Migräne bei Hinweisen für eine Beteiligung von *KCNQ2* an der Pathogenese beider Erkrankungen.

Bei scheinbar gesicherter Beteiligung von *KCNK18* an der Ätiologie der Migräne, steht die Überprüfung der Rolle von *KCNK18* auch in der Pathogenese der Rolando Epilepsie jetzt aus.

4.4 Ausblick

Im Rahmen der Suszeptibilitätsprüfung epileptischer Syndrome und Anfallsformen konnte in der Vergangenheit die pathogenetische Beteiligung diverser Ionenkanalgene gezeigt werden. Die betroffenen Gene wurden strukturiert gelistet und gelten bei Nachweis einer entsprechenden Genmutation als sogenannte für epileptische Syndrome prädisponierende Kandidatengene (Ottman, 2010).

Die Vervollständigung einer solchen Liste und damit die Erfassung weiterer Kandidatengene und zugeordneter Syndrome wie der häufigen Rolando-Epilepsie stellt das unbedingte Ziel aktueller epilepsiegenetischer Anstrengungen dar, um in Zukunft im Rahmen der epileptologischen Diagnostik genanalytische Methoden verfügbar zu wissen. Diese ließen einerseits eine solide Syndromzuordnung sowie eine verlässlichere Prognosestellung erwarten, andererseits darf unter Voraussetzung einer genauen Zuordnung der Erkrankung zum Gendefekt auf Fortschritte der pharmakotherapeutischen und gentechnologischen Therapie ebensolcher Ionenkanalerkrankungen (*Kanalopathien*) gehofft werden.

50 Millionen an Epilepsie erkrankte Menschen weltweit sollen unser immerwährender Antrieb sein.

5. Zusammenfassung

Epilepsien gehören zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Ätiologisch unterscheidet man *symptomatische* Epilepsien, bei denen das Anfallsgeschehen Ausdruck einer Läsion oder Vorerkrankung des Zentralnervensystems ist, von den *idiopathischen* (genetischen) Epilepsien, denen eine polygene genetische Disposition zugrunde liegt. In exemplarischen Großfamilien konnten vielfach Defekte in Ionenkanalgenen gefunden werden. Die klinische Charakteristik epileptischer Anfälle und der elektroenzephalographische Befund erlauben in den meisten Fällen die sichere Zuordnung der Erkrankung zu einem bestimmten Epilepsiesyndrom.

Mit einem Anteil von ca. 15% macht die idiopathische *Rolando-Epilepsie* einen Großteil der Epilepsiesyndrome des Kindesalters aus. Charakteristisch sind fokale, periorale myoklonische, klonische und tonische Anfälle, die begleitet von Speichelfluss nachts aus dem Schlaf heraus auftreten und in der Hälfte der Fälle sekundär generalisieren. Ein Großteil der Betroffenen ist mit Beginn der Pubertät anfallsfrei.

Untersuchungen identifizierten bei Familien mit Rolando-Epilepsie verschiedene Genmutationen in den Kaliumkanalgenen *KCNQ2* und *KCNQ3*, sodass ein ätiologischer Zusammenhang denkbar ist.

Im Jahre 2007 führte die EPIGEN die bislang größte Untersuchung zur genetischen Suszeptibilität epileptischer Syndrome und Anfallsformen durch. In der multizentrisch angelegten Studie wurden mittels Assoziationsanalysen in fünf Genen Polymorphismen (SNPs) gefunden, die mit dem Auftreten diverser idiopathischer Epilepsien assoziiert waren. Zwei der Polymorphismen befanden sich in dem für die Kaliumkanaluntereinheit Kv β 1 kodierenden Gen *KCNAB1* (*KCNA1B*) und zeigten eine starke Assoziation vor allem zu Partialepilepsien.

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Exone von *KCNAB1* in einem 87 Patienten umfassenden Kollektiv von Indexpatienten aus Familien mit Rolando-Epilepsie sequenziert und auf Mutationen untersucht. Es wurde die Nullhypothese (H_0) aufgestellt, dass sich das untersuchte Kollektiv hinsichtlich der Genetik von *KCNAB1* nicht vom Vergleichskollektiv der Normalbevölkerung unterscheidet und keine für die Rolando-Epilepsie prädisponierenden genetischen Variationen zu finden sind.

Im untersuchten Studienkollektiv wurden lediglich zwei bekannte Polymorphismen gefunden. Der Exon 3 flankierende intronische Polymorphismus (RS 1551066) zeigt

keine Auswirkungen auf den Spleißvorgang. Die in Exon 16 gefundene Variation (RS 2280031) führt nicht zum Austausch der kodierten Aminosäure. Sowohl die gefundene Heterozygotenfrequenz als auch die Homozygotenfrequenz im Bezug auf beide gefundenen Polymorphismen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die im untersuchten Kollektiv gefundenen Frequenzen beider Polymorphismen unterscheiden sich nicht von den bereits publizierten Häufigkeiten bei Kontrollpersonen. Folglich prädisponieren die beiden Polymorphismen nicht für die Rolando-Epilepsie. Weitere Mutationen konnten nicht identifiziert werden. Im untersuchten Kollektiv scheint *KCNABI* daher nicht an der Pathogenese der Rolando Epilepsie beteiligt zu sein. Zur Exploration der Genetik der Rolando-Epilepsie sind weitere Untersuchungen an anderen Kandidatengenen nötig.

Bei seit wenigen Jahren vermuteter gemeinsamer Suszeptibilität von Rolando Epilepsie und Migräne im Sinne einer genetisch vermittelten neuronalen Hyperexzitabilität sollte den für Migräne prädisponierenden Genvarianten Achtung geschenkt werden. Neben *SCN1A*, *CACNA1A* und *ATP1A2* scheint hier vor allem *KCNK18* bedeutsam zu sein, da das entsprechende Genprodukt TRESK eine den epileptogenetisch bedeutsamen *KCNQ*-Kanälen ähnelnde Funktion der kaliumvermittelten Stabilisierung des Membranpotentials ausübt. Eine Untersuchung der Genetik von *KCNK18* im Hinblick auf die Genese der Rolando Epilepsie könnte ein nächster Schritt sein.

5. Summary

Epilepsy is one of the most frequent neurological diseases. From an etiological point of view there are *symptomatic* and *idiopathic* epilepsies. While symptomatic epilepsies are caused by a lesion or a pre-existing condition of the central nervous system, idiopathic epilepsies are genetic in nature with an underlying polygenetic predisposition. In exemplary families with idiopathic epilepsy different defects in ion channel genes were demonstrated. In most cases the clinical characteristics of epileptical seizures and the electroencephalographic findings allow a definite allocation of the ailment to a certain epileptic syndrome.

Idiopathic rolandic epilepsy accounts for 15% - and thus for the majority - of childhood epilepsy syndromes. This epilepsy is characterized by perioral, myoclonic or tonic focal mostly nocturnal seizures accompanied by salivary flow with a tendency to generalize in approximately half of the cases. Most affected patients present without any seizures at the outset of puberty.

Concerning families with rolandic epilepsy research results show different gene mutations of the potassium-channel genes *KCNQ2* and *KCNQ3* in some families, whereas for most pedigrees the etiology remains unknown.

In 2007 the EPIGEN consortium carried out the so far largest investigation of genetic susceptibility concerning epileptic syndromes and their forms of occurrence. By the usage of association analyses this multicentric survey identified polymorphisms (SNPs) in five genes, which were associated with the incidence of different idiopathic epilepsies. Two of the polymorphisms were located in the *KCNAB1* (*KCNA1B*) gene coding for the potassium-channel subunit $Kv\beta 1$ and show a strong association particularly with partial epilepsies.

In this study all exons of *KCNAB1* were sequenced within a group totaling 87 patients from families with rolandic epilepsy and then analyzed for genetic mutations. The null hypothesis states that concerning the *KCNAB1* genetics the analyzed collective does not show any variation in relation to the comparative collective of the average population. Consequently it does not identify any genetic variations predisposing the rolandic epilepsy.

The research collective showed merely two known polymorphisms. The RS 1551066 intronic polymorphism, which flanks exon 3, does not appear to have any impact on the

splicing. The RS 2280031 variation found in exon 16 does not result in an exchange of coded amino acids. Both the heterozygous frequency and the homozygous frequency referring to the found polymorphisms are in agreement with the Hardy-Weinberg-Equilibrium. The frequencies of either polymorphism taken from the analyzed collective do not differ from control peer data published earlier. It is safe to state that said polymorphisms are irrelevant in regards to the rolandic epilepsy predisposition. The study does not reveal any other mutation. Within the analyzed collective *KCNABI* does not appear to play a role in the pathogenesis of rolandic epilepsy. A further exploration of the rolandic epilepsy genetics would necessitate more research work regarding further candidate genes.

A common susceptibility of rolandic epilepsy and migraine is suspected since the past few years. In terms of genetically mediated neuronal hyperexcitability in both cases, migraine gene variants should be given predisposing respect. Besides *SCN1A*, *CACN1A1A* and *ATP1A2* it appears that above all *KCNK18* is of considerable importance. Its corresponding gene product TRESK exercises a function of potassium-mediated stabilization of the membrane potential similar to the epileptogenetic significant *KCNQ* channels. This field has not been analyzed yet, however.

6. Abkürzungen

Asn	Asparagin
BDGP	Berkeley Drosophila Genome Project
bp	Basenpaar, Basenpaare
BRE	Benigne Rolando Epilepsie
CSD	cortical spread depression, kortikale Streudepolarisation
D	Asparagin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPIGEN	Epilepsy Genetics Consortium
HPLC	high performance liquid chromatography
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
ILAE	International League Against Epilepsy
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kv	K ⁺ -Kanal, voltage gated
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
POP	Performance Optimized Polymer
Primer	Oligonukleotidprimer
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
rpm	revolutions per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat

SGTCS	Sekundär Generalisierte Tonisch Klonische Krämpfe
SNP	single nucleotide polymorphism
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TM	Transmembrandomäne(n)
TRESK	TWIK-Related Spinal Cord K ⁺ Channel
TRIS	Tris (hydroxymethyl) -aminomethan
TWIK	Weakly-Inward-Rectifying-K ⁺ Channel, larger outwards than inward currents

7. Abbildungen und Tabellen

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Leitfähigkeiten eines ohmschen Ionenkanals und eines Kanals vom Rectifier-Typ im Vergleich (nach Kandel, 2012)	S. 6
Abb. 1.2	Untereinheiten eines Ionenkanals (nach Kandel, 2012)	S. 7
Abb. 1.3	Transmembrandomänen einer α -Untereinheit eines spannungsabhängigen K^+ -Kanals (nach Long, 2005)	S. 7
Abb. 1.4	Physische Karte von <i>KCNABI</i> auf Chromosom 3 (nach Leicher et al., 1996 und ergänzt nach NCBI, Contig NT_005612.15)	S. 10
Abb. 2.1	Das Prinzip der PCR	S. 22
Abb. 2.2	Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Exone von <i>KCNABI</i>	S. 26
Abb. 2.3	Das Prinzip der Sequenzierung	S. 28
Abb. 2.4	Ansicht von Applied Biosystems Seqscape® 2.1	S. 31
Abb. 3.1	Ideogramm des Chromosom 9 (nach Cavalleri et al., 2007)	S. 32
Abb. 3.2	<i>KCNABI</i> mit Auszug des Exon 3	S. 33
Abb. 3.3	Varianten des RS 1551066	S. 33
Abb. 3.4	NNSPLICE 0.9-Analyse	S. 34
Abb. 3.5	<i>KCNABI</i> mit Auszug des Exon 16	S. 36

Abb. 3.6	Varianten des RS 2280031	S. 36
Abb. 3.7	Codontabelle	S. 37
Abb. 4.1	Dendrogramm der Kaliumionenkanäle (modifiziert nach Hille, 2001; Robbins, 2001)	S. 40

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Einstellungen am Sequenzierer ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	S. 31
Tab. 3.1	Gefundene Frequenzen von RS 1551066	S. 33
Tab. 3.2:	Gefundene Frequenzen von RS 2280031	S. 35
Tab. 4.1	Ergebnisliste der EPIGEN Studie von 2007	S. 38
Tab. 4.2:	Ionenkanalgene mit Bedeutung für die Pathogenese von Migräne und RE sowie Prävalenzen der Migräne bei Rolando-Patienten und deren Zwillingen (nach Clarke et al., 2009; Lafreniere, 2010; Neubauer, 2008b, Segall et al., 2005; Vanmolkot et al., 2006)	S. 42

8. Literaturverzeichnis

- Bali, Bhavna; Kull, Lewis L.; Strug, Lisa J.; Clarke, Tara; Murphy, Peregrine L.; Akman, Cigdem I. et al. (2007): Autosomal dominant inheritance of centrotemporal sharp waves in rolandic epilepsy families. In: *Epilepsia* 48 (12), S. 2266–2272.
- Bast, T. (2007): Therapie schwer behandelbarer Epilepsien bei Kindern und Jugendlichen. In: *Monatsschrift Kinderheilkunde* 156 (1), S. 67–78.
- Berg, A. et al. (2008): Report of the Commission on Classification and Terminology: Update and Recommendations. Illinois: Northern Illinois University, USA.
- Berg, A. et al. (2010): Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. In: *Epilepsia* 51 (4), S. 676–85.
- Bezanilla, F. (2000): The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. In: *Physiol. Rev.* 80 (2), S. 555–592.
- Blume et al. (2001): Glossar einer deskriptiven Terminologie für die ictale Semiologie. In: *Aktuelle Neurologie* 28 (10), S. 448-454.
- Brown, David A.; Passmore, Gayle M. (2009): Neural *KCNQ* (Kv7) channels. In: *Br. J. Pharmacol* 156 (8), S. 1185–1195.
- Cavalleri, G. et al. (2007): Multicentre search for genetic susceptibility loci in sporadic epilepsy syndrome and seizure types: a case control study. In: *Lancet Neurol* 6, S. 970–980.

Chabolla R. (2002): Characteristics of the Epilepsies. In: *Mayo Clinic Proceedings* 77, S. 981–990.

Clarke, Tara; Baskurt, Zeynep; Strug, Lisa J.; Pal, Deb K. (2009): Evidence of shared genetic risk factors for migraine and rolandic epilepsy. In: *Epilepsia* 50 (11), S. 2428–2433.

Doose, H. (1965): Verlaufsformen kindlicher Epilepsien mit Spike-Wave-Absencen. In: *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 207 (4), S. 394–415.

Doose, H.; Hahn, A.; Neubauer, B. A.; Pistohl, J.; Stephani, U. (2001): Atypical "benign" partial epilepsy of childhood or pseudo-lennox syndrome. Part II: Family study. In: *Neuropediatrics* 32 (1), S. 9–13.

Doyle, D. et al. (1998): The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. In: *Science* 280, S. 69–77.

Engel, J. (2001): A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. In: *Epilepsia* 42 (6), S. 796–803.

Engels, William (2009): Exact Test for Hardy-Weinberg Proportions. In: *Genetics* 183, S. 1431–1441.

England, S. K. et al. (1995a): A Novel K⁺ Channel β -Subunit (hKv β 1.3) Is Produced via Alternative mRNA Splicing. In: *Journal of Biological Chemistry* 270, S. 28531–28534.

England, S. K. et al. (1995b): Characterization of a voltage-gated K⁺ channel β subunit expressed in human heart. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, S. 6309–6313.

Enyedi, Péter; Czirják, Gábor (2010): Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. In: *Physiol. Rev* 90 (2), S. 559–605.

Hahn, Andreas; Neubauer, Bernd A. (2009): Sodium and potassium channel dysfunctions in rare and common idiopathic epilepsy syndromes. In: *Brain Dev* 31 (7), S. 515–520.

Hahn A. et al. (2001): Atypical "benign" partial epilepsy or pseudo-Lennox syndrome. Part I: symptomatology and long-term prognosis. In: *Neuropediatrics* 32 (1), S. 1–8.

Hauser, W. A. (2008): First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. In: *Epilepsia* 49 (Suppl. 1), S. 8–12.

Heginbotham L. et al. (1994): Mutations in the K⁺ Channel Signature Sequence. In: *Biophysical Journal* 66, S. 1061–1067.

Heginbotham L. et MacKinnon, R. (1992): The Aromatic Binding Site for Tetraethylammonium Ion on Potassium Channels. In: *Neuron* 8 (3), S. 483–491.

Hille, B. (2001): Ion channels of excitable membranes. 3rd ed. Sunderland, Mass: Sinauer.

Kandel, E. (Hg.) (2012): Principles of neural science. Internat. ed., 5. ed. New York, NY: McGraw-Hill.

Kinast, M.; Lueders, H.; Rothner, A. D.; Erenberg, G. (1982): Benign focal epileptiform discharges in childhood migraine (BFEDC). In: *Neurology* 32 (11), S. 1309–1311.

Lafrenière, Ronald G.; Cader, M. Zameel; Poulin, Jean-François; Andres-Enguix, Isabelle; Simoneau, Maryse; Gupta, Namrata et al. (2010): A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. In: *Nat. Med* 16 (10), S. 1157–1160.

Lafrenière, Ronald G.; Rouleau, Guy A. (2011): Migraine: Role of the TRESK two-pore potassium channel. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol* 43 (11), S. 1533–1536.

Lagae, L. (2008): What's new in: "Genetics in childhood epilepsy". In: *European Journal of Pediatrics* 167, S. 715–722.

Leicher, T. et al. (1996): Structural and functional characterization of human potassium channel subunit beta 1 (*KCNA1B*). In: *Neuropharmacology* 35 (7), S. 787–795.

Liman, E. R. (1992): Subunit Stoichiometry of a Mammalian K⁺ Channel Determined by Construction of Multimeric cDNAs. In: *Neuron* 9, S. 861–871.

Long, S. B. et al. (2005): Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. In: *Science* 309, S. 897–903.

Maagdenberg Van den et. al. (2010): Genetics of headache. In: *Handb Clin Neurol* 97, 2010, S. 85–97.

MacDonald, Robert L.; Kang, Jing-Qiong; Gallagher, Martin J. (2010): Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. In: *J. Physiol. (Lond.)* 588 (11), S. 1861-1869.

MacKinnon, R. (1991): Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. In: *Nature* 350, S. 232–235.

Maljevic, Snezana; Wuttke, Thomas V.; Seebohm, Guiscard; Lerche, Holger (2010): KV7 channelopathies. In: *Pflugers Arch* 460 (2), S. 277–288.

McCormack, K. (1995): Alternative splicing of the human Shaker K⁺ channel β 1 gene and functional expression of the β 2 gene product. In: *Federation of European Biochemical Societies* 370, S. 32–36.

Meisler, Miriam H.; O'Brien, Janelle E.; Sharkey, Lisa M. (2010): Sodium channel gene family: epilepsy mutations, gene interactions and modifier effects. In: *J. Physiol. (Lond.)* 588 (11), S. 1841–1848.

Negri, M. de (1997): Electrical status epilepticus during sleep (ESES). Different clinical syndromes: towards a unifying view? In: *Brain Dev.* 19 (7), S. 447–451.

Neubauer B. A. et al. (2008a): Epilepsie im Kindes- und Jugendalter. In: *Deutsches Ärzteblatt* 105 (17), S. 319–327.

Neubauer B. A. et al. (2008b): *KCNQ2* and *KCNQ3* mutations contribute to different idiopathic epilepsy syndromes. In: *Neurology* 71 (3), S. 177–183.

Noachtar, S. et al. (1998): Die semiologische Klassifikation epileptischer Anfälle. In: *Der Nervenarzt* 69, S. 117–126.

Ottman, Ruth; Hirose, Shinichi; Jain, Satish; Lerche, Holger; Lopes-Cendes, Iscia; Noebels, Jeffrey L. et al. (2010): Genetic testing in the epilepsies--report of the ILAE Genetics Commission. In: *Epilepsia* 51 (4), S. 655–670.

Panayiotopoulos, Chrysostomos P.; Michael, Michael; Sanders, Sue; Valeta, Thalia; Koutroumanidis, Michael (2008): Benign childhood focal epilepsies: assessment of established and newly recognized syndromes. In: *Brain* 131 (Pt 9), S. 2264–2286.

Parcej, D. N. et al. (1992): Oligomeric properties of alpha-dendrotoxin-sensitive potassium ion channels purified from bovine brain. In: *Biochemistry* 45 (31), S. 11084–11088.

Rajan, Sindhu; Plant, Leigh D.; Rabin, Michael L.; Butler, Margaret H.; Goldstein, Steve A. N. (2005): Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1. In: *Cell* 121 (1), S. 37–47.

Rettig, J. et al. (1994): Inactivation properties of voltage gated K⁺ Channels altered by presence of beta subunits. In: *Nature* 369 (6478), S. 289–294.

Robbins, J. (2001): *KCNQ* potassium channels: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. In: *Pharmacol. Ther* 90 (1), S. 1–19.

Roeper, J. et Pongs O. (1996): Presynaptic potassium channels. In: *Current Opinion in Neurobiology* 6, S. 338–341.

Salkoff, L. et al (1992): An essential 'set' of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans. In: *Trends Neuroscience* 15 (5), S. 161–166.

Segall, Laura; Mezzetti, Alessandra; Scanzano, Rosemarie; Gargus, J. Jay; Purisima, Enrico; Blostein, Rhoda (2005): Alterations in the alpha2 isoform of Na-K-ATPase associated with familial hemiplegic migraine type 2. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102 (31), S. 11106–11111.

Sewing, S. et al. (1996): Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. In: *Neuron* 16 (2), S. 455–463.

Sirven, J. (2002): Classifying Seizures and Epilepsy: A Synopsis. In: *Seminars in Neurology* 22 (3), S. 237–246.

Stühmer, W. et al (1989): Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. In: *European Molecular Biology Organisation Journal* 8 (11), S. 3235–3244.

Torres, Y. P. et al (2007): A Marriage of convenience: Beta Subunits and Voltage-dependent K⁺ Channels. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (34), S. 24485–24489.

Vanmolkot, Kaate R. J.; Kors, Esther E.; Turk, Ulku; Turkdogan, Dylsad; Keyser, Antoine; Broos, Ludo A. M. et al. (2006): Two de novo mutations in the Na,K-ATPase gene ATP1A2 associated with pure familial hemiplegic migraine. In: *Eur. J. Hum. Genet* 14 (5), S. 555–560.

Wang, Z. et al (1996): Comparison of Binding and Block Produced by Alternatively Spliced Kvβ1 Subunits. In: *The Journal of Biological Chemistry* 271 (45), S. 28311–28317.

Weber, Yvonne G.; Lerche, Holger (2008): Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. In: *Dev Med Child Neurol* 50 (9), S. 648–654.

Wu, Yong-Jin; Boissard, Christopher G.; Greco, Corinne; Gribkoff, Valentin K.; Harden, David G.; He, Huan et al. (2003): (S)-N-[1-(3-morpholin-4-ylphenyl)ethyl]-3-phenylacrylamide: An orally bioavailable *KCNQ2* opener with significant activity in a cortical spreading depression model of migraine. In: *J. Med. Chem* 46 (15), S. 3197–3200.

Wyllie, Elaine (2010): *The Treatment of Epilepsy. Principles and Practice*. 5. Aufl.: Lippincott Williams & Wilkins.

Yu, W. et al (1996): NAB Domain Is Essential for the Subunit Assembly of both α - α and α - β Complexes of Shaker-like Potassium Channels. In: *Neuron* 16, S. 441–453.

Ziegler, D. K.; Wong, G. (1967): Migraine in children: clinical and electroencephalographic study of families. The possible relation to epilepsy. In: *Epilepsia* 8 (3), S. 171–187.

9. Anhang

Tab. 9.1: Klassifikation von epileptischen Anfällen (nach Berg et al., 2010)

1. Generalisierte Anfälle
1.1 tonisch-klonisch (in jeder Kombination)
1.2 Absence
1.2.1 typisch
1.2.2 atypisch
1.2.3 mit speziellen Merkmalen
1.2.3.1 myoklonische Absence
1.2.3.2 Lidmyoklonien mit Absence
1.3 myoklonisch
1.3.1 myoklonisch
1.3.2 myoklonisch-atonisch
1.3.3 myoklonisch-tonisch
1.4 klonisch
1.5 tonisch
1.6 atonisch
2. Fokale Anfälle
3. Unbekannt
4. Epileptische Spasmen

Tab. 9.2: Merkmale fokaler Anfälle in Abhängigkeit von der Beeinträchtigung (nach Berg et al., 2010)

A) ohne Einschränkung des Bewusstseins oder der Aufmerksamkeit
– mit beobachtbaren motorischen oder autonomen Komponenten.
– mit nur subjektiven sensiblen / sensorischen oder psychischen Phänomenen.
B) mit Einschränkung des Bewusstseins oder der Aufmerksamkeit.
C) mit Entwicklung zu einem bilateralen, konvulsiven Anfall (mit tonischen, klonischen oder tonischen und klonischen Komponenten. Dieser Ausdruck ersetzt den Begriff „sekundär generalisierter Anfall“).

Tab. 9.3: Klassifikation elektroklinischer Syndrome und Epilepsien nach dem Manifestationsalter (nach Berg et al., 2010)

Neugeborenenzeit

Benigne Familiäre Neonatale Epilepsie (BFNE)

Frühe Myoklonische Enzephalopathie (FME)

Ohtahara-Syndrom (OS)

Säuglings- und Kleinkindalter

Epilepsie der frühen Kindheit mit migratorischen fokalen Anfällen

West-Syndrom (WS)

Myoklonische Epilepsie der frühen Kindheit (MEI)

Benigne frühkindliche Epilepsie (BFE)

Benigne Familiäre Frühkindliche Epilepsie (BFFE)

Dravet-Syndrom (DS)

Myoklonische Enzephalopathie bei nicht-progredienten Störungen

Kindheit

Fiebergebundene Anfälle plus (FA+)

Panayiotopoulos-Syndrom

Epilepsie mit myoklonisch-atonischen Anfällen

Benigne Epilepsie mit zentrotemporalen Spikes (Rolando-Epilepsie)

Autosomal-Dominante Nächtliche Frontallappenepilepsie (ADNFLE)

Spät beginnende kindliche Okzipitallappenepilepsie (Gastaut-Typ)

Epilepsie mit myoklonischen Absencen

Lennox-Gastaut-Syndrom (LGS)

Epileptische Enzephalopathie mit kontinuierlichen Spike-und-Wave-Entladungen im Schlaf (CSWS)

Landau-Kleffner-Syndrom (LKS)

Kindliche Absencenepilepsie (KAE)

Tab. 9.3 (Fortsetzung): Klassifikation elektroklinischer Syndrome und Epilepsien (nach Berg et al., 2010)**Adoleszenz – Erwachsenenalter**

Juvenile Absencenepilepsie (JAE)

Juvenile Myoklonische Epilepsie (JME)

Epilepsie mit nur generalisierten tonisch-klonischen Anfällen

Progressive Myoklonusepilepsien (PME)

Autosomal-Dominante Fokale Epilepsie mit Akustischen Merkmalen (ADFEAM)

Andere familiäre Temporallappenepilepsien

Weniger spezifische Altersbeziehung

Familiäre fokale Epilepsie mit variablen Herden (Kindheit bis Erwachsenenalter)

Reflexepilepsien

Zustände mit epileptischen Anfällen, die traditionell nicht als eine Epilepsieform per se betrachtet werden

Benigne neonatale Anfälle (BNA)

Fiebergebundene Anfälle (FA, „Fieberkrämpfe“)

Unverwechselbare Konstellationen

Mesiale Temporallappenepilepsie mit Hippokampussklerose (MTLE mit HS)

Rasmussen-Syndrom

Gelastische Anfälle bei hypothalamischen Hamartomen

Hemikonvulsions-Hemiplegie-Epilepsie (-Syndrom)

Epilepsien aufgrund von und eingeteilt nach strukturell-metabolischen Ursachen

Malformationen der kortik. Entwicklung

Neurokutane Syndrome, Tumoren, Angiome, Infektionen, Traumen, Insulte

Epilepsien unbekannter Ursache

Tab. 9.4: Glossar einer deskriptiven Terminologie für die iktale Semiologie (gekürzt und modifiziert nach Blume et al., 2001)

Allgemeine Begriffe

Semiologie: Zweig der Linguistik, der sich mit Befunden und Symptomen beschäftigt.

Epileptischer Anfall: Manifestation(en) epileptischer üblicherweise spontan aufhörender Aktivität von Nervenzellen des Gehirns.

Iktus: Ein plötzliches neurologisches Ereignis, wie ein Schlaganfall oder ein epileptischer Anfall.

Epilepsie: a) Epileptische Störung: Ein chronischer neurologischer Zustand, der durch rezidivierende epileptische Anfälle gekennzeichnet ist; b) Epilepsien: Diejenigen Zustände mit chronisch rezidivierenden epileptischen Anfällen, die als epileptische Störungen betrachtet werden können.

Fokal: Ein Anfall, dessen initiale Semiologie auf eine initiale Aktivierung nur eines Teils einer Großhirnhemisphäre hindeutet oder damit vereinbar ist.

Generalisiert: Ein Anfall, dessen initiale Semiologie auf eine mehr als minimale Beteiligung beider Großhirnhemisphären hindeutet oder damit vereinbar ist.

Konvulsion: Vorwiegend ein Laienausdruck. Episoden exzessiver, abnormer und meist bilateraler Muskelkontraktionen, die anhaltend oder unterbrochen sein können.

Die Motorik beschreibende Begriffe

Motorisch: Betrifft die Muskulatur. Das motorische Ereignis kann auf einer Zunahme (positiv) oder Abnahme (negativ) der Muskelkontraktion beruhen, die eine Bewegung zur Folge hat.

Elementar-motorisch: Eine einzelne Form der Kontraktion eines Muskels oder einer Muskelgruppe, die üblicherweise gleichbleibend und nicht in verschiedene Phasen zerlegbar ist.

Tonisch: Eine für einige Sekunden bis Minuten anhaltende Zunahme einer Muskelkontraktion.

Epileptischer Spasmus: Eine plötzliche Flexion, Extension oder gemischte Extension-Flexion vorwiegend proximaler und Rumpfmuskeln, die im Vergleich zu einer Myoklonie meist länger anhält, aber nicht so lange dauert wie ein tonischer Anfall (d. h. etwa 1 s). Umschriebene Formen wie Grimassieren oder Kopfnicken können vorkommen. Epileptische Spasmen treten häufig in Clustern auf.

Postural: Einnahme einer Haltung, die bilateral-symmetrisch oder asymmetrisch sein kann (wie z.B. eine Fechterstellung).

Versiv: Eine langandauernde, forcierte konjugierte Drehbewegung der Augen, des Kopfes und/oder Rumpfes nach einer Seite oder seitliche Abweichung aus der Mittellinie.

Dyston: Lang anhaltende Kontraktionen sowohl agonistischer als auch antagonistischer Muskeln, was athetoide oder schraubende Bewegungen zur Folge haben und die bei längerer Dauer auch zu abnormen Haltungen führen kann.

Myoklonus: Plötzliche, kurze (< 100 ms) unwillkürliche einzelne oder multiple Kontraktion(en) von Muskeln oder Muskelgruppen variabler Topographie (axial, proximale Extremitäten, distal).

Negativ myoklonisch: Unterbrechung tonischer Muskelaktivität für < 500ms ohne Anhalt für vorausgegangene Myoklonien.

Klonus: Regelmäßiger, repetitiver und prolongierter Myoklonus gleich bleibender Muskelgruppen mit einer Frequenz von etwa 2-3 c/s. Synonym: Rhythmischer Myoklonus.

Jackson-Marsch: Traditionelle Bezeichnung für die einseitige Ausbreitung klonischer Bewegungen auf benachbarte Körperabschnitte.

Tonisch-klonisch: Eine aus einer tonischen und nachfolgenden klonischen Phase bestehende Abfolge.

Generalisierter tonisch-klonischer Anfall (früher: Grand-mal-Anfall): Bilateral-symmetrische tonische Kontraktion mit nachfolgenden bilateral-klonischen Kontraktionen der Willkürmuskulatur, die üblicherweise von autonomen Phänomenen begleitet werden.

Atonisch: Plötzlicher Verlust oder plötzliche Abnahme des Muskeltonus ohne offensichtlich vorangehendes myoklonisches oder tonisches Ereignis, der 1-2 s oder auch länger dauert und Kopf-, Rumpf-, Kiefer- oder Extremitätenmuskulatur beteiligt.

Astatisch: Verlust der aufrechten Haltung aufgrund eines atonischen, myoklonischen oder tonischen Mechanismus.

Synchron (asynchron): In bestimmten Körperabschnitten (nicht) gleichzeitig oder mit derselben Häufigkeit auftretende motorische Ereignisse.

Automatismus: Eine mehr oder weniger koordinierte, repetitive motorische Aktivität, die meist bei gestörtem Bewusstsein auftritt und für die Betroffene hinterher eine Amnesie haben. Gleicht oft einer Willkürbewegung und kann aus der unangemessenen Fortsetzung einer präiktalen motorischen Aktivität bestehen.

Die Nichtmotorik beschreibende Begriffe

Aura: Ein subjektives iktales Phänomen, das einem beobachtbaren Anfall bei einem Patienten vorausgehen kann; bei isoliertem Auftreten handelt es sich um einen sensorischen Anfall.

Elementar: Ein einzelnes, nicht ausgeformtes Phänomen, das nur eine primäre sensorische Modalität betrifft, z. B. somatosensorisch, visuell, auditorisch, olfaktorisch, gustatorisch, epigastrisch oder zephal.

Somatosensorisch: Beinhaltet Kribbeln, Taubheit, Elektrisierungsgefühl, Schmerz, Bewegungsempfinden, Bewegungsdrang.

Visuell: Blitzende oder flackernde Lampen, Flecken, einfache Muster, Skotome oder Amaurose.

Auditorisch: Brummende, klopfende Geräusche oder einzelne Töne.

Olfaktorisch: Geruch, meist unangenehm.

Gustatorisch: Geschmacksempfindungen einschließlich sauer, bitter, salzig, süß oder metallisch.

Epigastrisch: Unangenehmes Gefühl im Bauch einschließlich Übelkeit, Leeregefühl, Anspannungsgefühl, Schwirren, flaes Gefühl, Unbehagen, Schmerz und Hunger; die Empfindung kann zur Brust oder zum Schlund hin aufsteigen.

Zephal: Empfindung im Kopf wie Leeregefühl, Kribbeln oder Kopfschmerz.

Autonom: Eine mit einer Beteiligung des autonomen Nervensystems vereinbare Empfindung einschließlich kardiovaskulärer, gastrointestinaler, sudomotorischer, vasomotorischer und thermoregulatorischer Funktionen.

Affektiv: Komponenten schließen Angst, Depression, Freude und (selten)Wut ein.

Das Gedächtnis betreffend: Komponenten, die iktale Gedächtnisstörungen darstellen, wie z. B. Gefühle der Vertrautheit (dejà-vu) oder fehlender Vertrautheit (jamais-vu).

Halluzinatorisch: Eine Neuschöpfung zusammengesetzter Wahrnehmungen ohne dazugehörenden äußeren Reiz einschließlich visueller, auditorischer, somatosensorischer, olfaktorischer oder gustatorischer Phänomene.

Illusionär: Eine Veränderung real existierender Wahrnehmungen.

Dyskognitiv: Der Begriff beschreibt Ereignisse, bei denen kognitive Störungen im Vordergrund stehen oder am auffälligsten sind.

Autonome Ereignisse Beschreibende Begriffe

Autonome Aura: Eine auf einer Beteiligung des autonomen Nervensystems beruhende Empfindung einschließlich kardiovaskulärer, gastrointestinaler, sudomotorischer, vasomotorischer und thermoregulatorischer Funktionen.

Autonomer Anfall: Eine objektiv dokumentierte und eindeutige Änderung der Tätigkeit des autonomen Nervensystems einschließlich kardiovaskulärer, pupillärer, gastrointestinaler, sudomotorischer, vasomotorischer und thermoregulatorischer Funktionen.



Abb. 9.1: Primerannealing an den Exonen 1 bis 3. Schwarz gedruckt sind die Sequenzen der Exone.

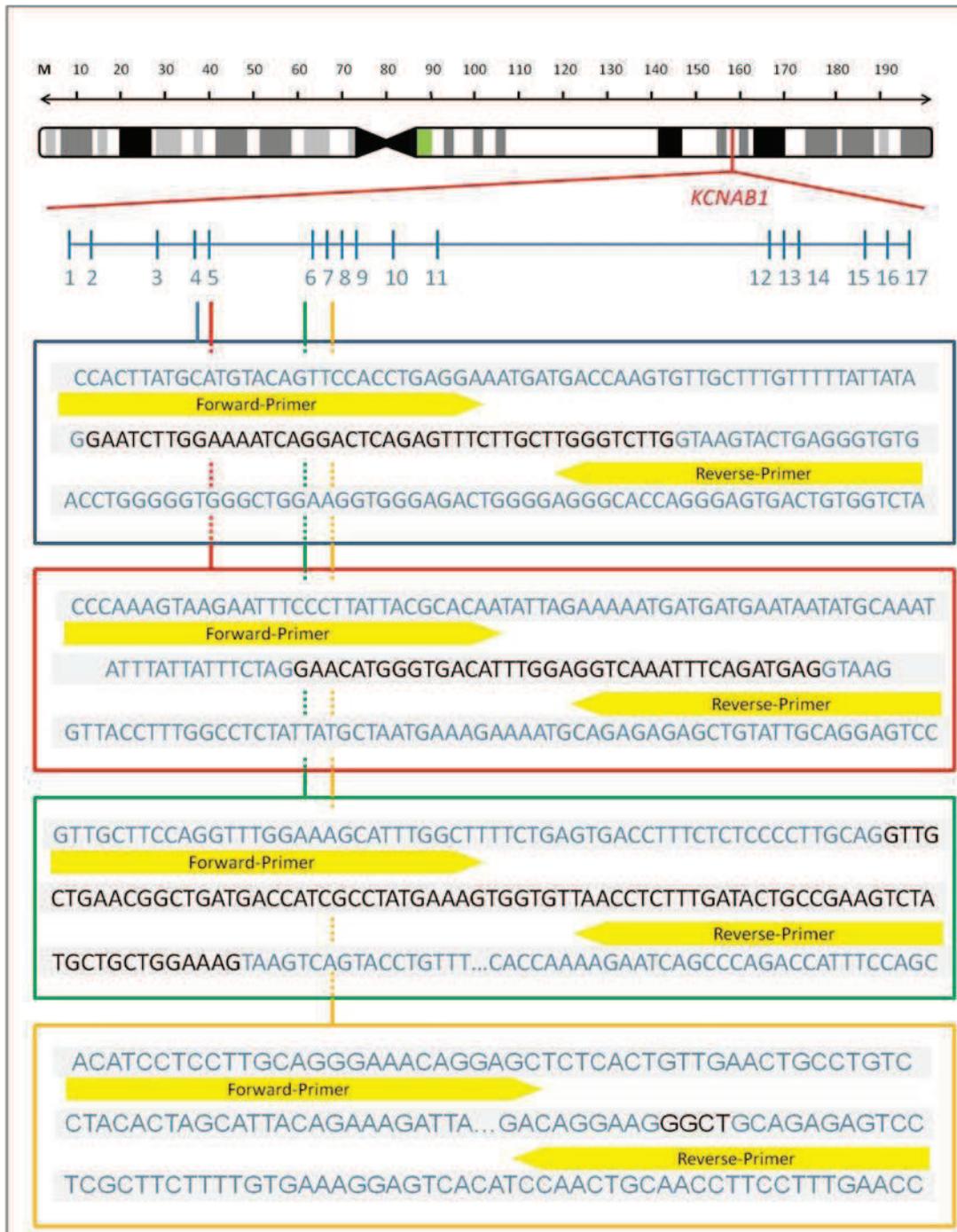


Abb. 9.2: Primerannealing an den Exonen 4-7. Schwarz gedruckt sind die Sequenzen der Exone.

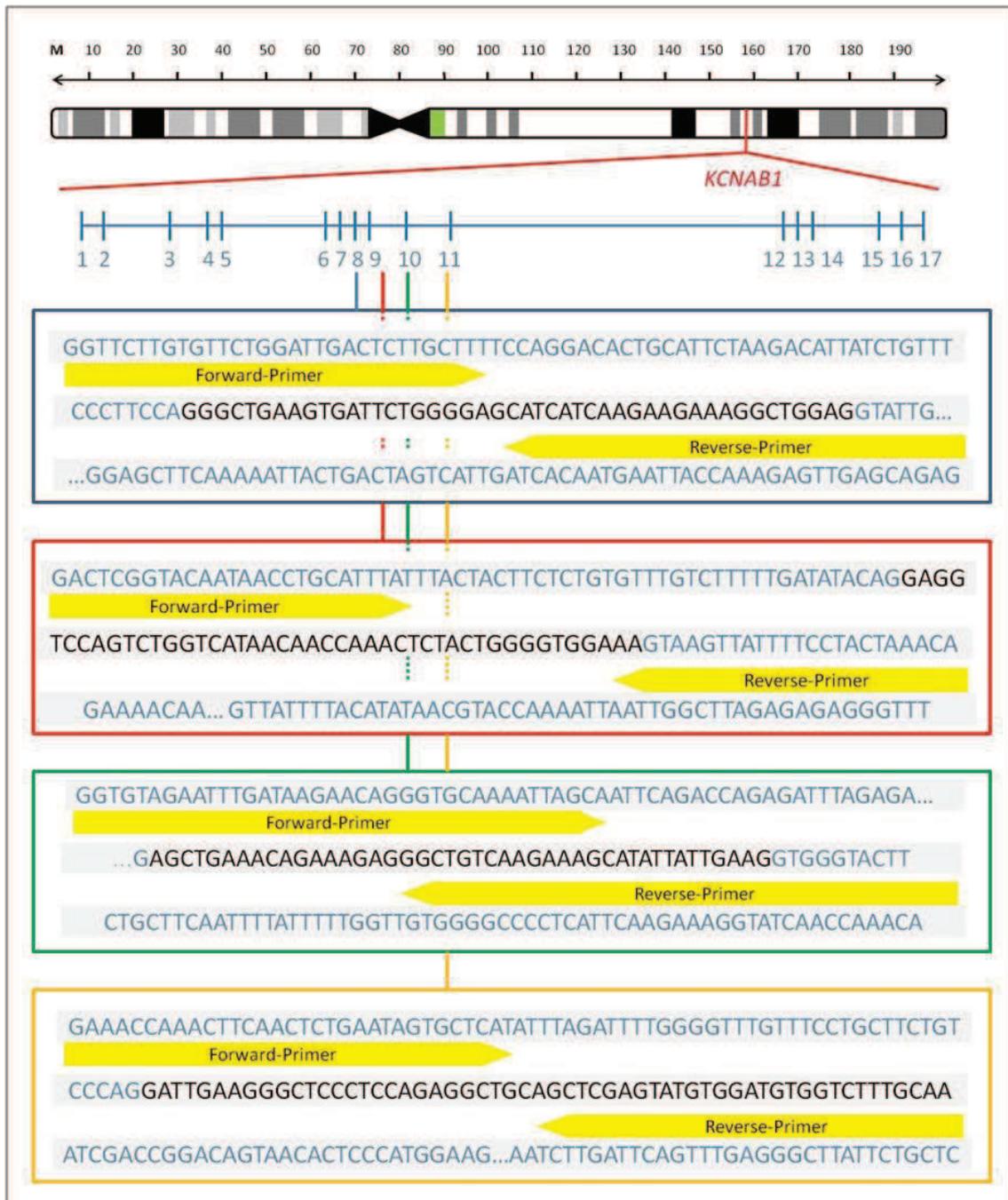


Abb. 9.3: Primerannealing an den Exonen 8 bis 11. Schwarz gedruckt sind die Sequenzen der Exone.

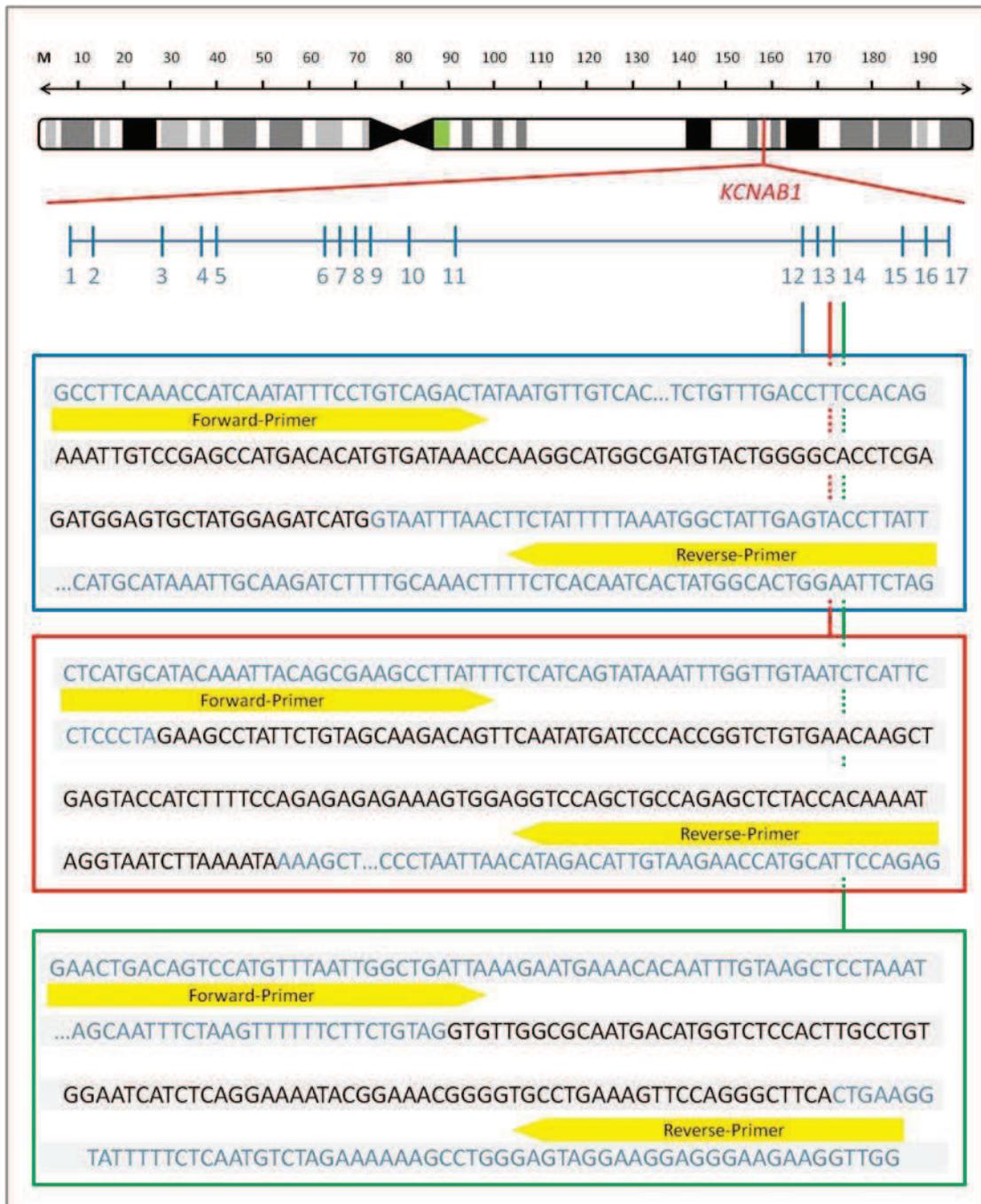


Abb. 9.4: Primerannealing an den Exonen 12 bis 14. Schwarz gedruckt sind die Sequenzen der Exone.

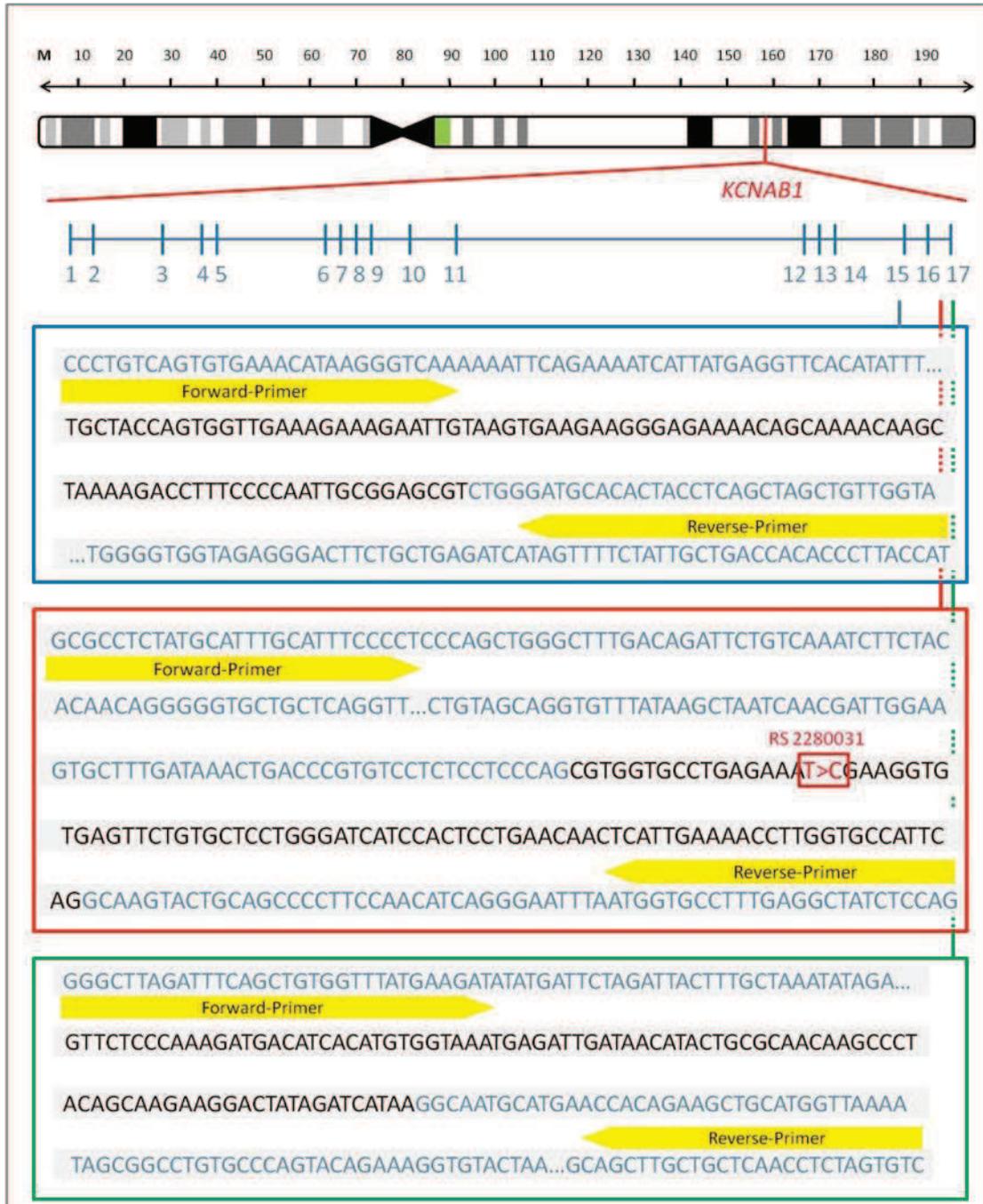


Abb. 9.5: Primerannealing an den Exonen 15-17. Schwarz gedruckt sind die Sequenzen der Exone.

Tab. 9.5: Verzeichnis der Sequenzen aller zur Amplifikation von *KCNAB1* verwendeten Primer

Exon	Sequenz des Forward-Primers	Sequenz des Reverse-Primers
Exon1a	GCAGGATAAGGTTAAGAGAGGTGGAG	GGACTAAGGCTGCTGTCTTTAGCG
Exon1b	CAGGGAAAGACAAATCTCCCAAGAAAGC	GAAATCAAAGCATTCTCCAGAGCACCTTC
Exon2	CCCAAGGTATTCACAGCAAGATACAGTG	TGCAACCCAAGAAGAGGGCTCAC
Exon3	CGTGACTGCCTGTGTTCTGGG	CTGCACCTGTATAGAACCTGGAT
Exon4	CCACTTATGCATGTACAGTTCCACCTGAG	TAGACCACAGTCACTCCCTGGTGCC
Exon5	CCCAAAGTAAGAATTTCCCTTATTACGCAC	GGACTCCTGCAATACAGCTCTCTC
Exon6	GTTGCTTCAGGTTTGAAAGCATTTGG	GCTGGAAATGGTCTGGGCTGATTC
Exon7	ACATCCTCCTGCAGGGAAACAG	GGTCAAAGGAAGGTTGCAGTTG
Exon8	GGTTCTTGTTCTGGATTGACTCTTGC	CTCTGCTCAACTCTTGGTAATTCATTGTG
Exon9	GACTCGGTACAATAACCTGCATT	AAACCCTCTCTAAGCCAATTA
Exon10	GGTGTAGAATTTGATAAGAACAGGGTGCAA	TGTTTGGTTGATACCTTTCTTGAATGAGGG
Exon11	GAAACCAAACCTTCAACTCTGAATAGTGCTC	GAGCAGAATAAGCCCTCAAACCTGAATCAAG
Exon12	GCCTTCAAACCATCAATATTTCTGTGAGA	CTAGAATTCAGTGCCATAGTGATTGTGAG
Exon13	CTCATGCATACAAATTACAGCGAAGCCTTA	CTCTGGAATGCATGGTTCTTACAATGTCTA
Exon14	GAAGTACAGTCCATGTTAATTGGCTGAT	CCAACCTTCTCCCTCCTCCTAC
Exon15	CCCTGTCAGTGTGAAACATAAGGGTC	CATGGTAAGGGTGTGGTCAGCAATAG
Exon16	GCGCCTCTATGCATTTGCATTTCCC	CTGGAGATAGCCTCAAAGGCACC
Exon17	GGGCTTAGATTTAGCTGTGGTTTATGAAG	GACACTAGAGGTTGAGCAGCAAGC

Tab. 9.6: Ungekürzte PCR-Produktsequenzen der Primerpaare 1 bis 7

PCR-Produkt der Primer 1aF und 1aR, sowie der Primer 1bF und 1bRR	GCAGGATAAGGTTAAGAGAGGTGGAGTGGGCAGGGACGAGGGAGGGAGGCAGAAG CAGAAAAATCAATTCAGATTACTTTGATGACAGTGACTTCCAGTCTTCTCTGAAAGATC TCCACGATGCTGGCAGCCCGACAGGGGACGCGGGAGTCAGATCTCAGAGGAGAA CACCAAGTTAAGGAGACAGTCTGGGTTTCTGTAG CAGGGAAAGACAAATCTCCAAAG AAAGCCTCAGAAAA CGCTAAAGACAGCAGCCTTAGTCCCTCAGGGGAAAGCCAGCTC AGGGCGCTCAACTGGCTCTGCTGCGCGAAGTGGAGATGAACTGGTACCTAAAGCTC TGCGACCTGTCCAGCGAGCACACCCTGTGCAACCACAGGCATGCCGCACAGGTAAG CTGCCCTGCTCTGCGGGGCTTTGGGAGACGCCGTT GAAGGTGCTCTGGAGAATGC TTGATTTT
PCR-Produkt der Primer 2F und 2R	CCCAAGGTATTCACAGCAAGATACAGTG AGTCTTAAAGTTAAGCACCGTGCAATTAGC TTTGCTTCTTGGGTTTTTGAACATGCATCTGTATAAACCTGCCTGTGCAGACATCCC GAGCCCCAAGCTGGGTCTGCCAAAATCCAGTGAATCGGCTCTAAAATGTAGATGGCAC CTAGCAGTGACCAAGACTCAGCCTCAGGCGCCTGCAAACCTGTGAGGCCAGTGGA GCAGCCGAACAGAAAATATGTGGAAAAGTTTCTACGTGTTTCAATGGAATTCGTTGCAGG AAACCACAGAGCAGAGACGGGCATGGCATAACAGGTAAGTCTGATTGCAAAGTCAATC CAACCAGGGCACTGCACTGATGTCAAAGTTGTTATTAAGAAAATAAGGACTGAAATA GCAAGACAAAACCTGTAAGAAAAAGAAGAAAAATGCA GTGAGCCCTCTTCTTGGG TTGCA
PCR-Produkt der Primer 3F und 3R	CGTGACTGCCTGTGTTCTGGG GTTCTGAGAGGGACCGTGCGCTGCCTGGGGAAGCAA TGCAAGTCTCCATAGCCTGCACAGAGCACAATTTGAAGAGTCGGAATGGTGAGGACC GACTTCTGAGCAAGCAGAGCTCCACCGCCCCAATGTGGTGAACGCAGCCCCGGCCA AATCCGCACGGTCGCTATCATCGCGCGCAGCCTGGGGACGTTACGCCTCAGCATCA CATTTCTCTCAAAGAGTCCACCGCAAAGCAGACTGGCATGAAATATAGGTATGCA C/T GTAAGATTCCTCTGTGCGGGGT ATCCAGGTTCTATACAGGTGCAG
PCR-Produkt der Primer 4F und 4R	CCACTTATGCATGTACAGTTCACCTGAG GAAATGATGACCAAGTGTGCTTTGTTTT ATTATAGGAATCTTGGAAAATCAGGACTCAGAGTTTCTTGTGTTGGGTCTTGTAAGTA CTGAGGGTGTGACCTGGGGTGGGCTGGAAGGTGGGAGACTGGGGAG GGCACCAG GGAGTGACTGTGGTCTA
PCR-Produkt der Primer 5F und 5R	CCCAAAGTAAGAATTTCCCTTATTACGCACA AATATTAGAAAAATGATGATGAATAATAT GCAAATATTTATTTTCTAGGAACATGGGTGACATTTGGAGGTCAAATTTAGATGA GGTAAGTTACCTTTGGCCTCTATTATGCTAATGAAAGAAAATGCAG GAGAGAGCTGTAT TGCAGGAGTCC
PCR-Produkt der Primer 6F und 6R	GTTGCTTCCAGGTTTGGAAAGCATTGG CTTTTCTGAGTGACCTTCTCTCCCCTTGCA GTTGCTGAACGGCTGATGACCATCGCCTATGAAAGTGGTGTTAACCTCTTTGATACTGC CGAAGTCTATGCTGCTGAAAGTAAGTCAGTACCTGTTTGTGCACTCAAATGGCATCT GTAGCACCAAAA GAATCAGCCAGACCATTTCAGC
PCR-Produkt der Primer 7F und 7R	ACATCCTCCTTGCAAGGAAACAGGAG CTCTCACTGTTGAACTGCCTGTCCCTACACTAG CATTACAGAAAGATTAGACGTCAAAGTCAGGATCCCCCAAGATGCCAAAGAATCTATC ATCTTTTGTAAAGGGGATCTCAGAGCCATTCTGAGGACAGGAAGGGCTGCAGAGA GTCCTCGCTTCTTTGTGAAAGGAGTCACAT CAACTGCAACCTTCTTTGAACC

Tab. 9.7: Ungekürzte PCR-Produktsequenzen der Primerpaare 8 bis 14

PCR-Produkt der Primer 8F und 8R	GGTTCTTGTTCTGGATTGACTCTTGCTTTTCCAGGACACTGCATTCTAAGACATT ATCTGTTTCCCCTCCAGGGCTGAAGTGATTCTGGGGAGCATCATCAAGAAGAAA GGCTGGAGGTATTGCATTCGCCATAATTATTTGTTTTAAAAAGGTATTATTTTGA CCAGAGAAGGAAAAATAAAATTATATGACACCTGACCAAAAGGCTGTCAAAAAA ATCAACTGTTTTAAAGCAATGATTATAGTGGCTTGAAAATAAATGCCGGCAAGT TCACTTCTGGAGCTTCAAAAATTACTGACTAGTCATTGATCACAATGAATTACCAA GAGTTGAGCAGAG
PCR-Produkt der Primer 9F und 9R	GACTCGGTACAATAACCTGCATTATTTACTACTTCTCTGTGTTTGTCTTTTTGATAT ACAGGAGGTCCAGTCTGGTCATAACAACCAAACTCTACTGGGGTGGAAAGTAAGT TATTTTTCTACTAAACAGAAAACAAGTAGTAGTTCATGCTTTTTTGTGTTAGGCA GTTATTTTACATATAACGTACCAAAATTAATTGGCTTAGAGAGAGGGTTT
PCR-Produkt der Primer 10F und 10R	GGTGTAGAATTTGATAAGAACAGGGTGCAAATTAGCAATTCAGACCAGAGATTT AGAGAAGAAAAGAAAGCACACTCTCATTCAAAGTTATTTGCTCTTTTTCTTGGA GAGCTGAAACAGAAAGAGGGCTGTCAAGAAAGCATATTATTGAAGTGGGTA CTGCTTCAATTTTATTTTTGTTGTGGGCCCTCATTCAAGAAAGGTATCAACCAA CA
PCR-Produkt der Primer 11F und 11R	GAAACCAAACCTCAACTCTGAATAGTGCTCATATTTAGATTTTGGGGTTTGTTCCT GCTTCTGCTCCAGGATTGAAGGGCTCCCTCCAGAGGCTGCAGCTCGAGTATGTG GATGTGGTCTTTGCAAATCGACCGGACAGTAACACTCCCATGGAAGGTAAGTTAA GAAAGCTAATAAAATACTCTAGAAATCTTGATTCAAGTTGAGGGCTTATTCTGCTC
PCR-Produkt der Primer 12F und 12R	GCCTTCAAACCATCAATATTTCTGTGCACTATAATGTTGTCACCAATATTAGGCT AATTTTATTAATCAAACAACAATTGCATTAAGCTTCTAAGCTTTGGCTAGAGGAGT AAAAATCGCATAACTTTGAAAAGTAGACAAATTCATGAAATGCTGTCTGTTGACC TTCCACAGAAATTGTCGAGCCATGACACATGTGATAAACCAAGGCATGGCGATG TACTGGGGCACCTCGAGATGGAGTGCTATGGAGATCATGGTAATTTAACTTCTATT TTTAAATGGCTATTGAGTACCTTATTATTGCTTTTCAGATGCCATGCATAAATTGCA AGATCTTTTGCAAACCTTTCTCACAATCACTATGGCACTGGAATTCTAG
PCR-Produkt der Primer 13F und 13R	CTCATGCATACAAATTACAGCGAAGCCTTATTTCTCATCAGTATAAATTTGGTTGTA ATCTCATTCCCTCCCTAGGAAGCCTATTCTGTAGCAAGACAGTTCAATATGATCCCAC CGGTCTGTGAACAAGCTGAGTACCATCTTTCCAGAGAGAGAAAGTGGAGGTCCA GCTGCCAGAGCTCTACCACAAAATAGGTAATCTTCAAAATAAAAGCTACTGAGTAT TTTTAACAGAGAAAAGATCACTGATTGGGGAAAAAATAAAAACAGTGTTATTGA AATGCTTTCCTAAATGTCCCTAATTAACATAGACATTGTAAGAACCATGCATTCCAG AG
PCR-Produkt der Primer 14F und 14R	GAACTGACAGTCCATGTTTAATTGGCTGATTAAAGAATGAAACACAATTTGTAAGC TCCTAAATTGTAATGGAAAAAATGCATGCTGATATTAACATTTTATCTGGCCAGC TTTTCCCTATAACCTACCAAATTCTGTTTAAACACTACTGCCCCACCGCCACCCACC TTTTGATCCAATTTGCACAAGCAACTTTCTAAGTTTTTTCTTCTGTAGGTGTTGGCG CAATGACATGGTCTCCACTTGCCTGTGGAATCATCTCAGGAAAATACGGAAACGG GGTGCTGAAAGTTCAGGGCTTCACTGAAGGTATTTTTCTCAATGTCTAGAAAAA AGCCTGGGAGTAGGAAGGAGGGAAGAAGGTTGG

Tab. 9.9: Ungekürzte PCR-Produktsequenzen der Primerpaare 15 bis 17

PCR-Produkt der Primer 15F und 15R	CCCTGTCAGTGTGAAACATAAGGGTCAAAAAATTCAGAAAATCATTATGAGGTTCA CATATTTTATTGAATTACCATTCTTTGACATCAGATCTTTACCAGACATTAACATTTCA ATGTTATGCTTTTCCCAGTGCTACCAGTGGTTGAAAGAAAGAATTGTAAGTGAAG AAGGGAGAAAACAGCAAAACAAGCTAAAAGACCTTTCCCAATTGCGGAGCGTCT GGGATGCACACTACCTCAGCTAGCTGTTGGTAAGAAAATTACTAAGCTATGGGGTG GTAGAGGGACTTCTGCTGAGATCATAGTTTT CTATTGCTGACCACACCCTTACCATG
PCR-Produkt der Primer 16F und 16R	GCGCCTCTATGCATTTGCATTTCCCCTCCAGCTGGGCTTTGACAGATTCTGTCAAAT CTTCTACACAACAGGGGGTGCTGCTCAGGTTTTTAATCCTAGGAAGCACTGTACATC CTCCACAAAAAGAAGTTAATAAATTTGGCTGCAACAAACAGCTGTAGCAGGTGTT TATAAGCTAATCAACGATTGGAAGTGCTTTGATAAACTGACCCAGTGTCTCTCCTC CCAGCGTGGTGCCTGAGAAAT /CGAAGGTGTGAGTTCTGTGCTCCTGGGATCATCC ACTCTGAACAACCTATTGAAAACCTTGGTGCCATTGAGGCAAGTACTGCAGCCCTT TCCAACATCAGGGAATTAAT GGTGCCTTTGAGGCTATCTCCAG
PCR-Produkt der Primer 17F und 17R	GGGCTTAGATTTAGCTGTGGTTTATGAAGATATATGATTCTAGATTACTTTGCTAA ATATAGAGCACAAAAAACC GAATGATCAACACTGCTAACAATATCCTTTGTACTTCT CCTCCTGCTCTCAGGTTCTCCCAAAGATGACATCACATGTGGTAAATGAGATTGATA ACATACTGCGCAACAAGCCCTACAGCAAGAAGGACTATAGATCATAAGGCAATGCA TGAACCACAGAAGCTGCATGGTAAATAGCGGCCTGTGCCAGTACAGAAAGGT GTTACTAACAGTCTTTTGAATCACTTAGCAG CTTGCTGCTCAACCTCTAGTGTC

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):				
Donor site predictions for 134.176.176.185.11805.0 :				
Start	End	Score	Exon	Intron
76	90	0.99	aatatag G tatgcac	
Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):				
Donor site predictions for 134.176.176.185.11899.0 :				
Start	End	Score	Exon	Intron
76	90	0.99	aatatag G tatgcac	

Abb. 9.6: Ansicht des Ergebnisses der Splice-Site-Software fruitfly.org. Mit einem Score von 0,99 wird bei Auftreten des Wildtypus (oben) wie auch bei vorhandenem Polymorphismus RS 2280031 identisch gespleißt

Tab. 9.10: Ergebnisse der Assoziationsanalysen der EPIGEN Studie (modifiziert nach Cavalleri et al., 2007)

	Test phenotype	Population	SNP number	Gene	Set-association p value	N#
1	SGTCS	Finland	rs16826199	<i>KCNAB1</i>	$4,57 \times 10^{-7}$	685
2	SGTCS	Finland	rs3755631	<i>KCNAB1</i>	$6,45 \times 10^{-7}$	697
3	All epilepsy	Finland	rs3755631	<i>KCNAB1</i>	$5,23 \times 10^{-6}$	782
4	All epilepsy	Finland	rs16826199	<i>KCNAB1</i>	$5,40 \times 10^{-6}$	773
5	Other	Finland	rs3755631	<i>KCNAB1</i>	$1,01 \times 10^{-5}$	698
6	Partial	Finland	rs16826199	<i>KCNAB1</i>	$1,25 \times 10^{-5}$	750
7	Myoclonic	Ireland	rs9362632	<i>GABRR2</i>	$1,28 \times 10^{-5}$	422
8	Myoclonic	Ireland	rs7762767	<i>GABRR2</i>	$1,75 \times 10^{-5}$	429
9	Other	Finland	rs16826199	<i>KCNAB1</i>	$2,06 \times 10^{-5}$	690
10	MTLE-HS	Ireland	rs398702	<i>KCNMB4</i>	$2,19 \times 10^{-5}$	483
11	Partial	Finland	rs3755631	<i>KCNAB1</i>	$2,49 \times 10^{-5}$	761

Tab. 9.11: Die wichtigsten Gendefekte bei idiopathischen Epilepsien (nach MacDonald 2010; Meisler 2010; Ottman et al., 2010)

Natriumkanäle		GABA-Rezeptoren	
SCN1A	GEFS+, SMEI	GABRA1	ADJME
SCN2A	BFNIS, GEFS+	GABRB3	CAE
SCN1B	GEFS+	GABRG2	CAE, FS, GEFS+
Kaliumkanäle		GABRD	GEFS+
KCNQ2	BFNS	Calciumkanäle	
KCNQ3	BFNS	CACNA1A	CAE, EA
KCN1A	PE, EA1		
Acetylcholinrezeptoren			
CHRNA2	ADNFLE		
CHRN2	ADNFLE		
CHRNA4	ADNFLE		

GEFS: Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen; **SMEI:** Schwere myoklonische Epilepsie des Säuglingsalters; **BFNIS:** Benigne familiäre neonatal-infantile Anfälle; **BFNS:** Benigne familiäre neonatale Anfälle; **ADJME:** Autosomal dominante juvenile myoklonische Epilepsie; **CAE:** Absencen des Kindesalters (Pyknolepsie); **ADNFLE:** Autosomal dominante nächtliche Frontallappenepilepsie; **PE:** Partialepilepsie; **EA:** Episodische Ataxie

10. 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

11. Danksagung

All denen, die mir das Verfassen dieser Arbeit ermöglicht haben möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Neubauer für die Überlassung des Themas und die durchgehend engagierte Betreuung.

Danken möchte ich ebenso Frau Garkisch, die mir bei allen Laborarbeiten jederzeit helfend zur Seite stand wie auch Herrn Dr. Pons-Kühnemann, der mich bei der Auswertung der Statistik unterstützte.

Nicht zuletzt bin ich meiner Familie und meinen Freunden zum Dank verpflichtet, die mich während sämtlicher Phasen dieser Arbeit ermutigend begleiteten.