

Die Rolle von *SLC2A1* und *PRRT2* bei idiopathisch fokalen Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes

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



vorgelegt von Angela Kropp
aus Oldenburg

Gießen 2015

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,
Abteilung für Neuropädiatrie, Sozialpädiatrie und Epileptologie,
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. Dr. med. Bernd Axel Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Axel Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. Dodel

Tag der Disputation: 21.07.2016

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| 1 Einleitung | 4 |
| 1.1. Klassifikation epileptischer Syndrome | 4 |
| 1.1.1. Fokale Epilepsien und Epilepsiesyndrome | 6 |
| 1.1.2. Generalisierte Epilepsien und Epilepsiesyndrome | 7 |
| 1.1.3. Gemischte fokale und generalisierte Epilepsien und Epilepsiesyndrome . | 7 |
| 1.1.4. Spezielle Epilepsien und Epilepsiesyndrome | 8 |
| 1.2. Rolando Epilepsien | 9 |
| 1.3. Glucose Transporter 1 (<i>SLC2A1</i>) | 13 |
| 1.3.1. Aufbau und Funktion des Glucose Transporters 1 | 13 |
| 1.3.2. Das <i>SLC2A1</i> Gen | 14 |
| 1.3.3. <i>SLC2A1</i> und Epilepsien..... | 14 |
| 1.4. Proline-rich transmembrane protein 2 (<i>PRRT2</i>) | 16 |
| 1.4.1. Aufbau und Funktion des prolinreichen transmembranösen Proteins 2.. | 16 |
| 1.4.2. Das <i>PRRT2</i> Gen..... | 17 |
| 1.4.3. <i>PRRT2</i> und Epilepsien | 17 |
| 1.5. Zielsetzung..... | 19 |
| 2 Material und Methoden | 20 |
| 2.1. Material | 20 |
| 2.1.1. Geräte..... | 20 |
| 2.1.2. Zubehör | 22 |
| 2.1.3. Chemikalien | 22 |
| 2.1.4. Lösungen..... | 24 |
| 2.1.5. Software | 25 |
| 2.1.6. Oligonukleotide..... | 26 |
| 2.2. Methoden | 28 |
| 2.2.1. Diagnosekriterien..... | 28 |
| 2.2.2. Studienkollektiv..... | 28 |
| 2.2.3. Molekulargenetische Verfahren..... | 29 |
| 2.2.3.1 DNA Extraktion | 29 |
| 2.2.3.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA | 29 |
| 2.2.3.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 30 |
| 2.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese..... | 32 |
| 2.2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte | 32 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2.3.6 | Sequenzanalyse | 32 |
| 2.2.3.7 | TaqMan® Copy Number Untersuchung | 34 |
| 2.2.4. | Statistische Analyse | 37 |
| 2.2.4.1 | Hardy Weinberg Equilibrium | 37 |
| 2.2.4.2 | Chi-Quadrat-Test nach Pearson | 38 |
| 2.2.4.3 | Exakter Test nach Fisher | 39 |
| 2.2.4.4 | Cochrane Armitage Trend Test | 39 |
| 3 | Ergebnisse | 41 |
| 3.1. | Das <i>SLC2A1</i> -Gen | 41 |
| 3.1.1. | Polymorphismus rs 11537640 | 41 |
| 3.1.2. | Polymorphismus rs 1385129 | 43 |
| 3.1.3. | Polymorphismus rs 11537641 | 45 |
| 3.1.4. | Polymorphismus rs 2229682 | 46 |
| 3.1.5. | Polymorphismus rs 35565219 | 48 |
| 3.1.6. | Polymorphismus rs 190760291 | 48 |
| 3.1.7. | Polymorphismus rs 4658 | 49 |
| 3.1.8. | Mutation c.877t>c, Tyr293His | 51 |
| 3.1.9. | Mutation c.715_716insC, His239Pfs*2 | 52 |
| 3.1.10. | Analyse der Kopienzahlvariationen bei <i>SLC2A1</i> | 54 |
| 3.2. | Das <i>PRRT2</i> -Gen | 55 |
| 3.2.1. | Polymorphismus rs 76335820 | 55 |
| 3.2.2. | Polymorphismus rs 11150573 | 57 |
| 3.2.3. | Polymorphismus rs 141436390 | 59 |
| 3.2.4. | Polymorphismus rs 1045968 | 60 |
| 3.2.5. | Mutation c.649-650insC, p.Arg217Profs*8 | 62 |
| 3.2.6. | Analyse der Kopienzahlvariationen bei <i>PRRT2</i> | 63 |
| 4 | Diskussion | 67 |
| 4.1. | <i>SLC2A1</i> -Analyse | 67 |
| 4.1.1. | Vorbekannte Polymorphismen | 67 |
| 4.1.2. | Mutation Tyr293His und H239Pfs*2 | 67 |
| 4.1.3. | Kopienzahlvariationen bei <i>SLC2A1</i> | 68 |
| 4.1.4. | <i>SLC2A1</i> und RE | 68 |
| 4.2. | <i>PRRT2</i> -Analyse | 69 |
| 4.2.1. | Vorbekannte Polymorphismen | 69 |
| 4.2.2. | Mutation c.649-650insC, p.Arg217Profs*8 | 69 |
| 4.2.3. | Kopienzahlanalyse bei <i>PRRT2</i> | 70 |
| 4.2.4. | <i>PRRT2</i> und RE | 73 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.3. | „Common vs Rare Variant“ -Hypothesen | 74 |
| 4.4. | Weiterführende Untersuchungen und Ausblick..... | 76 |
| 4.5. | Schlussfolgerungen | 78 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 80 |
| 6 | Summary | 81 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 82 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 87 |
| 9 | Tabellenverzeichnis | 89 |
| 10 | Literaturverzeichnis | 90 |
| | Anhang | 108 |
| | Publikationsverzeichnis | 115 |
| | Ehrenwörtliche Erklärung..... | 116 |
| | Danksagung | 117 |

1 Einleitung

Mit einer Prävalenz von 0,5 bis 1 Prozent stellen Epilepsien nach den neurovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Gruppe an neurologischen Erkrankungen dar (Banerjee et al., 2009). Das Ausmaß der genetischen Ätiologie von konvulsiven Erkrankungen ist in zahlreichen Studien untersucht worden. Familienaggregationsstudien ergaben, dass das Risiko an Epilepsie zu erkranken 2,5-fach erhöht ist, wenn ein Geschwisterkind betroffen ist (Bianchi et al., 2003; Callenbach et al., 2003). Zwillingsstudien kommen insgesamt zu dem Ergebnis, dass die Konkordanzraten für das Auftreten von Epilepsien bei monozygoten Zwillingen die Konkordanzrate von dizygoten Zwillingen deutlich übersteigen (Berkovic et al., 1998; Johnson et al., 2003; Kjeldsen et al., 2003). Circa 50 Prozent aller Epilepsien sind genetisch determiniert (Freitag et al., 2001). Insbesondere bei den Epilepsien des Kindes- und Jugendalters, spielen genetische Faktoren eine bedeutende Rolle. Bei einer Vielzahl von Epilepsiesyndromen konnten bereits genetische Defekte in Ionenkanälen nachgewiesen werden (Berkovic et al., 2004; Charlier et al., 1998; Mantegazza et al., 2005; Ogiwara et al., 2009; Singh et al., 1998; Striano et al., 2006; Sugawara et al., 2001). Bei den meisten chronisch verlaufenden Epilepsien sind die genetischen Grundlagen jedoch deutlich komplexer. Hier sind jeweils viele genetische Faktoren an der Pathogenese beteiligt (Neubauer and Hahn, 2012a). Die Kenntnisse der genetischen Epilepsieforschung tragen zum besseren Verständnis der Ätiopathogenese bei. Hieraus können Optimierungen in Diagnostik und Therapie bei Epilepsien abgeleitet werden.

1.1. Klassifikation epileptischer Syndrome

Der Begriff „Epilepsie“ stammt vom griechischen Verb ἐπιλαμβάνειν (epilambanein, „ergreifen“, „packen“, „anfallen“) ab. Im Deutschen wird die Epilepsie daher auch Fallsucht oder Krampfleiden genannt. Sie bezeichnet eine Hirnerkrankung, welche durch wiederkehrende und unvorhersehbare Unterbrechungen der normalen Hirnfunktion, sog. epileptischen Krampfanfällen, gekennzeichnet ist (Fisher et al., 2005). Ein einzelner epileptischer Anfall bezeichnet die klinische Manifestation einer paroxysmalen, abnorm synchronisierten Entladung von Neuronenverbänden im Gehirn. Nach der Definition der *International League Against Epilepsy (ILAE)* ist die Epilepsie eine Störung des Gehirns, die durch eine dauerhafte Neigung zur Entwicklung epileptischer Anfälle sowie durch die neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen dieses Zustands gekennzeichnet ist (Cavalleri et al., 2007; Jensen, 2011). Die Definition einer Epilepsie setzt das Auftreten mindestens eines unprovokierten epileptischen Anfalls voraus (Fisher et al., 2005).

Epilepsien werden unter ätiologischen Gesichtspunkten und nach ihrer Anfallssymptomatik klassifiziert.

In Bezug auf ihre Ätiologie werden Epilepsien durch permanente oder vorübergehende Hirnschäden verursacht. Diese können durch angeborene oder erworbene Missbildungen, Geburtskomplikationen, Stoffwechselerkrankungen, Hirntumore, Folge von Entzündungen, Gefäßerkrankungen, toxische Noxen wie z.B. Alkohol, Traumata oder genetische Veranlagungen bedingt sein (Badawy et al., 2009a, 2009b). Trotz immer modernerer Untersuchungsmethoden bleibt die Ursache einer Epilepsie jedoch in ca. 30% der Fälle noch unklar.

Aus praktischen Gründen und zur Vereinfachung der Kommunikation im klinischen Alltag werden nach den aktuellen Leitlinien der *International League Against Epilepsy (ILAE)* die Ursachen einer Epilepsie in ein Klassifikationsschema eingeteilt. Hiernach werden drei unterschiedliche ursächliche Formen angenommen (Berg et al., 2010):

- Genetische Epilepsien (früher als idiopathische Epilepsien bezeichnet),
- Strukturelle/Metabolische Epilepsien (früher als symptomatische Epilepsien bezeichnet), und
- Epilepsien unbekannter Ursache (früher als kryptogene Epilepsien bezeichnet).

Diese Einteilung ist jedoch sehr artifiziell und simplifiziert. Vielmehr zeigen aktuelle Untersuchungen, dass auch in der Genese struktureller Epilepsien ebenso genetische Faktoren eine Rolle spielen können. Die Entstehung einer Epilepsie ist also in der Regel multifaktoriell durch ein enges Zusammenspiel exogener und endogener Faktoren bedingt (Neubauer and Hahn, 2012a).

Hinsichtlich der Anfallstypen werden drei Gruppen epileptischer Anfälle unterschieden: generalisierende Anfälle, fokale Anfälle und Anfälle mit unbestimmtem Ursprung. Bei generalisierten Epilepsien und Epilepsiesyndromen sind von Beginn des Anfalls an in beiden Hirnhälften Nervenzellen von abnormen Entladungen betroffen. Bei fokalen oder auch partiellen bzw. lokalisationsbezogenen Epilepsien und Syndromen sind die abnormen Entladungen am Beginn nur auf bestimmte räumlich begrenzte Nervenzellgruppen begrenzt. Die Entladungen können jedoch im Verlauf auf beide Hirnhälften übergehen. Man spricht dann von sekundärer Generalisierung. Bei Epilepsien und Epilepsiesyndromen mit unbestimmtem Ursprung handelt es sich in der Regel um gemischte fokale und generalisierte Anfälle.

Epilepsien werden also zunächst nach ihrem Ursprung und dann nach ihrer Ursache eingeteilt. In den entstehenden Untergruppen wird dann meist noch mal nach dem Alter, bei dem die Epilepsie auftritt, sortiert. (Panayiotopoulos, 2010a).

1.1.1. Fokale Epilepsien und Epilepsiesyndrome

Fokale Epilepsien und Epilepsiesyndrome sind mit 60-70 Prozent aller Epilepsien häufiger als generalisierte Epilepsien (Sidenvall et al., 1993). Bei den fokalen Epilepsien überwiegen strukturell-metabolische und unbekannte Formen. In Tabelle 1.1-1 sind die wichtigsten fokalen Epilepsiesyndrome mit den dazugehörigen internationalen Abkürzungen, die in der vorliegenden Arbeit genannt werden, aufgelistet. (Engel, 2006; Panayiotopoulos, 2010b).

| Tabelle 1.1-1 Tabellarische Übersicht der fokalen Epilepsien und Epilepsiesyndrome. Modifiziert nach Engel, 2001 und Panayiotopoulos, 2007. | |
|--|------------|
| Syndrom | Abkürzung |
| Idiopathische fokale Epilepsien von Kleinkindern und Kindern | |
| Benigne nichtfamiliäre infantile Anfälle | BIS |
| Benigne kindliche Epilepsie mit zentrottemporalen Spikes (Rolando Epilepsie) | BECTS (RE) |
| Atypische benigne Partialepilepsie des Kindesalters (Pseudo-lennox Syndrom) | ABPE (PLS) |
| Benigne okzipitale Epilepsie des Kindesalters Typ Panayiotopoulos | PS |
| Spät beginnende okzipitale Epilepsie des Kindesalters (Typ Gastaut) | ICOE-G |
| Familiäre (autosomal-dominante) fokale Epilepsien | |
| Benigne familiäre neonantale Anfälle | BFNS |
| Benigne familiäre infantile Anfälle | BFIS |
| Benigne familiäre neonantale-infantile Anfälle | BFNIS |
| Benigne familiäre infantile Anfälle mit familiärer hemiplegischer Migräne | BFIS-FHM |
| Infantile Konvulsionen mit paroxysmaler Choreoathetose | ICCA |
| Autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie | ADNFLE |
| Familiäre Temporallappenepilepsie | FTLE |
| Familiäre occipitotemporale Epilepsie mit Migräne und visueller Aura | EPOLM |
| Familiäre fokale Epilepsie mit variablen Herden | FPEVF |
| Partielle Epilepsie mit perizentralen Spikes | PEPS |
| Reflexepilepsien | |
| Idiopathisch photosensitive Okzipitallappenepilepsie | IPOE |
| Primäre Leseepilepsie | PRE |

1.1.2. Generalisierte Epilepsien und Epilepsiesyndrome

Generalisierte Epilepsien und Epilepsiesyndrome sind weniger häufig als fokale. Der größte Teil generalisierter Epilepsien ist idiopathisch (genetisch) bedingt. In Tabelle 1.1-2 sind die wichtigsten generalisierten Epilepsiesyndrome mit den dazugehörigen internationalen Abkürzungen, die in der vorliegenden Arbeit genannt werden, aufgelistet. (Engel, 2006; Panayiotopoulos, 2010b).

Tabelle 1.1-2 Tabellarische Übersicht der generalisierten Epilepsien und Epilepsiesyndrome. Modifiziert nach Engel, 2001 und Panayiotopoulos, 2007.

| Syndrom | Abkürzung |
|--|-----------|
| Idiopathisch generalisierte Epilepsien | |
| Benigne myoklonische Epilepsie bei Kleinkindern | BMEI |
| Benigne adulte familiäre myoklonische Epilepsie | BAFME |
| Epilepsie mit myoklonisch astatischen Anfällen (Doose Syndrom) | MAE |
| Epilepsie mit myoklonischen Absencen (Tassinari Syndrom) | EMA |
| Augenlid Myoklonien mit Absencen (Jeavons-Syndrom) | ELMA |
| Idiopathische generalisierte Epilepsien mit variablem Phänotyp | IGE |
| Kindliche Absence Epilepsie | CAE |
| Juvenile Absence Epilepsie | JAE |
| Juvenile myoklonische Epilepsie (Janz Syndrom) | JME |
| Epilepsie mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen | EGTCS |
| Generalisierte Epilepsie mit Fiberkrämpfen plus | GEFS+ |
| Frühkindliche Absence Epilepsie | EOAE |

1.1.3. Gemischte fokale und generalisierte Epilepsien und Epilepsiesyndrome

Eine kleine Gruppe von Epilepsien und Epilepsiesyndromen ist gekennzeichnet durch das Vorkommen von sowohl generalisierten epileptischen Anfällen, z. B. Absencen als auch fokalen Anfällen. Diese Epilepsien kommen mit einem Anteil von etwa 10 Prozent aller Epilepsien im Kindesalter häufig vor. In Tabelle 1.1-3 sind die wichtigsten gemischt fokal und generalisierten Epilepsiesyndrome mit den dazugehörigen internationalen Abkürzungen, die in der vorliegenden Arbeit genannt werden, aufgelistet (Engel, 2006; Panayiotopoulos, 2010b).

Tabelle 1.1-3 Tabellarische Übersicht der gemischt fokalen und generalisierten Epilepsien und Epilepsiesyndrome.

Modifiziert nach Engel, 2001 und Panayiotopoulos, 2007.

| Syndrom | Abkürzung |
|---|-------------|
| Epileptische Enzephalopathie | |
| Ohtahara-Syndrom (frühinfantile epileptische Enzephalopathie) | OS (EIEE) |
| Frühkindliche myoklonische Enzephalopathie | EME (EIEE3) |
| Dravet-Syndrom (schwere frühkindliche myoklonische Epilepsie) | DS (SMEI) |
| Borderline SMEI | SMEB |
| Epilepsie der frühen Kindheit mit migratorischen fokalen Anfällen | MMPSI |
| West-Syndrom (Blitz-Nick-Salaam-Krämpfe) | WS |
| Lennox-Gastaut-Syndrom | LGS |
| Epilepsie mit kontinuierlichen Spike-Wave-Entladungen im Schlaf | CSWS |

1.1.4. Spezielle Epilepsien und Epilepsiesyndrome

Des Weiteren gibt es situationsbezogene Anfälle die häufig nur einmal im Leben auftreten. Deshalb werden diese Anfälle auch als Gelegenheitsanfälle bezeichnet. Zu den Gelegenheitsanfällen zählen die im Kindesalter vorkommenden Fieberkrämpfe, ausgelöst durch hohes Fieber. Streng genommen handelt es sich bei dieser Gruppe nicht um Epilepsien, da sie nicht die Definitionskriterien mit einem mehrmaligen Auftreten erfüllen (Panayiotopoulos, 2010b). In Tabelle 1.1-4 sind die wichtigsten speziellen Epilepsiesyndrome, die keine Epilepsiediagnose erfordern, mit den dazugehörigen internationalen Abkürzungen, die in der vorliegenden Arbeit genannt werden, aufgelistet (Engel, 2006; Panayiotopoulos, 2010b).

Tabelle 1.1-4 Tabellarische Übersicht der speziellen Epilepsiesyndrome, die keine Epilepsiediagnose erfordern.

Modifiziert nach Engel, 2001 und Panayiotopoulos, 2007.

| Syndrom | Abkürzung |
|--|-----------|
| Epileptische Anfälle, die keine Epilepsiediagnose erfordern | |
| Benigne neonatale Anfälle | BNA |
| Fieberkrämpfe | FS |

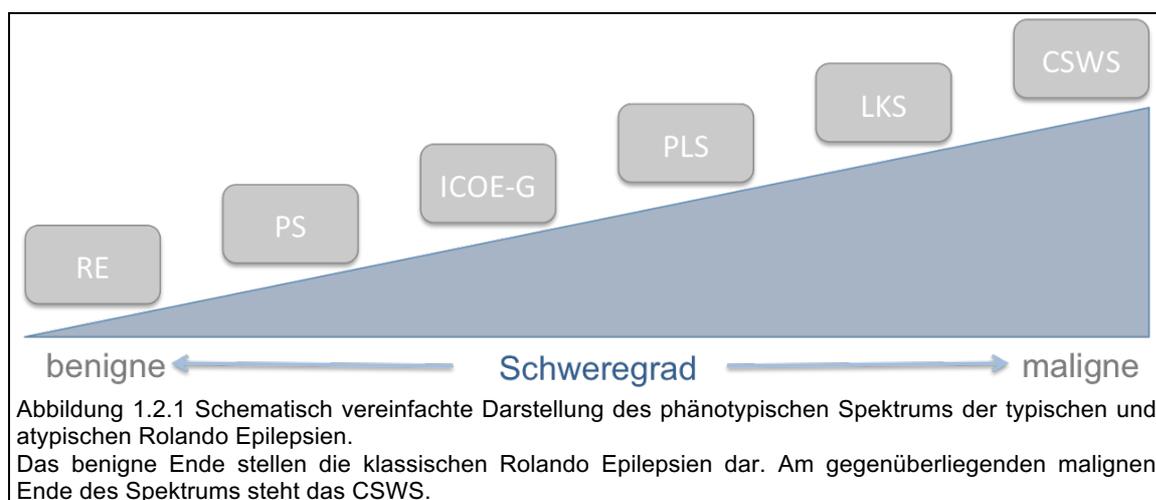
1.2. Rolando Epilepsien

Die Prävalenz von Epilepsien im Kindesalter beträgt etwa 0,5 Prozent (Hauser et al., 1993). In den Industrieländern erkranken im Mittel etwa 50 von 100.000 Kindern jedes Jahr neu an einer Epilepsie. Insgesamt macht der Anteil von Kindern 25 Prozent aller Epilepsie-Neu-Erkrankungen aus (Neubauer et al., 2008a). Die häufigste Epilepsie im Kindesalter ist die Rolando Epilepsie (RE). Sie umfasst circa 15 % aller Epilepsien bei den unter 16-jährigen (Sidenvall et al., 1993). Die RE wird auch als benigne Epilepsie des Kindesalters mit zentrotemporalen Spikes (BECTS) beziehungsweise als perisylvanische oder midtemporale Epilepsie bezeichnet und zählt zu den fokalen Epilepsien (Loiseau and Beaussart, 1973). Sie betrifft altersentsprechend psychomotorisch entwickelte Kinder und wird aufgrund ihrer günstigen Prognose den benignen Epilepsien des Kindesalters zugeordnet. Die RE tritt in der Regel im Alter zwischen zwei und zehn Jahren auf und kommt häufiger bei Jungen als bei Mädchen vor (Geschlechterverteilung Jungen: Mädchen ca. 1,2/1). Die meisten Betroffenen sind zwei bis drei Jahre nach Symptombeginn wieder anfallsfrei (Panayiotopoulos, 2005).

Das Leitsymptom der Rolando Epilepsie sind idiopathische sensomotorische Herdanfälle mit und ohne Generalisation. Meist treten die Anfälle in der Einschlafphase oder beim Aufwachen des Kindes auf. Häufig kommt es auch zu einer sekundären Generalisierung der Anfälle, weswegen sich die Erstmanifestation einer Rolando Epilepsie oftmals in Form eines generalisierten tonisch-klonischen Krampfanfalls während der Nacht präsentiert. Die Betroffenen berichten häufig von unilateral auftretenden sensiblen Reizerscheinungen mit Missempfindungen im Mund-, Zungen- und Gesichtsbereich. Gewöhnlicherweise treten oro-laryngo-pharyngeale Symptome mit Sprechstörungen und vermehrtem Speichelfluss auf. Elektroenzephalographisch finden sich regelhaft fokale und multifokale „sharp waves“ zentrotemporal, sog. Rolando Spikes, bei altersentsprechender Grundaktivität (Berg et al., 2010; Doose et al., 1997). Die Diagnosestellung erfolgt in der Regel anhand der Anfallssemiologie zusammen mit dem typischen EEG Befund (Neubauer and Hahn, 2012b).

Circa drei Prozent aller gesunden Kinder zeigen ebenfalls die typischen EEG Merkmale einer RE, ohne jemals einen Anfall zu erleiden. Zahlreiche Studien haben ergeben, dass die für eine RE typischen „sharp waves“ vermehrt auch bei weiteren Krankheitsbildern wie z.B. ADHS, Rett Syndrom oder chromosomalen Aberrationen auftreten (Giordani et al., 2006; Nicolai et al., 2006; Riva et al., 2007; Staden et al., 1998).

Die RE wird häufig in Verbindung zu weniger benignen Epilepsiesyndromen gebracht, welche in diesem Kontext unter dem Begriff atypische Rolando Epilepsie (ARE) subsumiert werden (Fejerman, 2009). Es handelt sich hierbei um einen zusammenfassenden Begriff für weitere Phänotypen idiopathischer Epilepsiesyndrome, welche als gemeinsames charakteristisches Merkmal zentrotemporale Spikes im EEG aufweisen. Hierzu zählen beispielsweise die atypische benigne Partialepilepsie (ABPE) – oder auch Pseudo-Lennox Syndrom (PLS) genannt - mit astatischen Anfällen und atypischen Absencen (Doose and Baier, 1989; Hahn et al., 2001), die benigne okzipitale Epilepsie des Kindesalters Typ Panayiotopoulos (PS) mit okzipitalen, überwiegend das vegetative Nervensystem betreffenden Anfällen (Ferrie et al., 2006), die spät beginnende okzipitale Epilepsie des Kindesalters Typ Gastaut (ICOE-G) mit visuellen Symptomen (Kivity et al., 2000), das Landau-Kleffner Syndrom (LKS) mit erworbener Sprachaphasie und epileptische Enzephalopathien mit kontinuierlichen spike-and-wave Muster während des Schlafes (CSWS) (Pal, 2011; Vears et al., 2012). Das EEG zeigt bei all diesen Epilepsiesyndromen die gleichen fokalen “sharp waves”, jedoch kommt es zu einer viel stärkeren Aktivierung der hypersynchronen Aktivität bis hin zum bioelektrischen Status im Schlaf. Die Prognose bezüglich der jeweiligen Epilepsie ist letztendlich günstig, jedoch behalten ca. 50 % der Betroffenen kognitive Defizite zurück. Zusammen scheinen diese Erkrankungen ein Spektrum zu bilden, an dessen benignem Ende die RE und an dessen schwerwiegendem Ende das LKS und CSWS stehen (Doose and Baier, 1989; Fejerman, 2009; Vears et al., 2012) (s. Abb., 1.2.1). Unter den genannten Epilepsiesyndromen haben bislang nur BECTS, CSWS und LKS Eingang in die internationale Klassifikation der ILAE gefunden (Berg et al., 2010).



Im Unterschied zu dem pathognomonischen Anfallstyp der klassischen Rolando Epilepsie können somit bei der Gruppe der atypischen Rolando Epilepsien phänotypische Anfallsmuster wie astatische Anfälle, atypische Absencen oder myoklonische Anfälle beobachtet werden. Kommt es nach einem Auftreten eines Rolando Epilepsie typischen Krampfanfalls zu mentalen bzw. psychomotorischen und/oder schwerwiegenden sprachlichen Entwicklungsbeeinträchtigungen, wird diese Entität ebenfalls zur Gruppe der atypischen Rolando Epilepsien gezählt (Aicardi and Chevrie, 1982; Doose et al., 2001; Hahn et al., 2001).

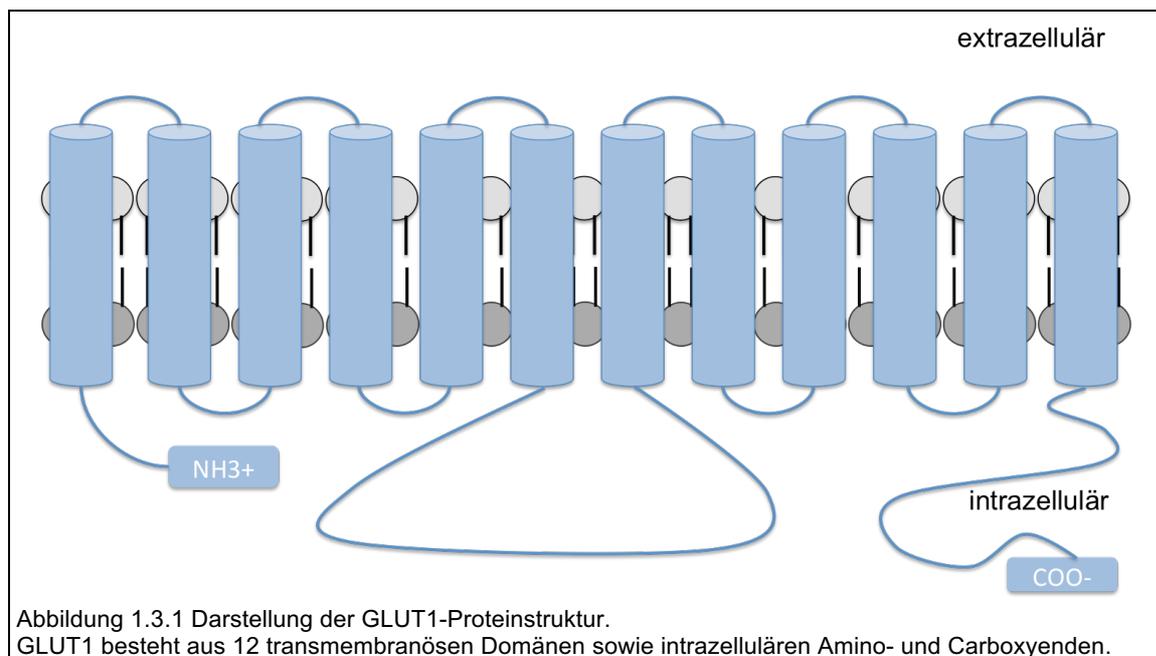
Zahlreiche Familienstudien belegen, dass bei der Ätiopathogenese der RE ebenso wie bei anderen idiopathischen Epilepsien genetische Faktoren eine Rolle spielen (Bali et al., 2007; Doose et al., 1997; Ottman, 1989). Die spezielle genetische Disposition kommt elektroenzephalographisch durch 5-phasige charakteristisch strukturierte „sharp waves“ zum Ausdruck. Es gibt Hinweise für das Vorliegen eines autosomal dominanten Vererbungsmusters bezüglich dieses EEG Merkmals (Bali et al., 2007; Vadlamudi et al., 2006). Genetische Faktoren scheinen bei atypischen Verlaufsformen wie z.B. dem PLS stärker wirksam zu sein als bei der klassischen Verlaufsform, da hier der Anteil positiv konkordanter monozygoter Zwillingspaare viel höher ist als bei der klassischen RE (Doose et al., 2001; Vadlamudi et al., 2006). In der Pathogenese der ARE spielen folglich die gleichen genetischen Dispositionen eine dominierende Rolle wie bei der RE. Lange Zeit wurde dieser Befund angezweifelt. Erst kürzlich konnten aber Mutationen im *GRIN2A*-Gen sowohl bei Kindern mit RE als auch bei Patienten mit PLS, LKS und ESES identifiziert werden (Lemke et al., 2013) und dieser Befund somit molekulargenetisch bestätigt werden. Bei gesunden Kindern treten fokale „sharp waves“ in einer bemerkenswerten Häufigkeit von etwa 2 % auf. Es handelt sich somit um eine weit verbreitete genetische Eigenschaft. Nur ca. 10 % dieser Merkmalsträger zeigen zerebrale Anfallsmuster. In Untersuchungen in Familien, an denen mehrere Kinder das charakteristische EEG Merkmal von zentrotemporalen Spikes aufwiesen (Multiplex-Familien), zeigten sich sehr variable klinische Erscheinungsbilder (Doose and Baier, 1989). Bei den mit Anfällen einhergehenden Manifestationsformen reichte das Spektrum von Neugeborenenanfällen über Fieberkrämpfe und einfache Rolando Anfälle bis hin zu schweren Krankheitsbildern wie dem PLS, dem ESES und dem LKS. Es traten aber auch isolierte psychomentele Beeinträchtigungen wie Teilleistungsstörungen und Sprachentwicklungsverzögerungen ohne Anfälle auf. Eine jüngst durchgeführte Familienstudie beschrieb ein vermehrtes Auftreten von RE, Fieberkrämpfen und „epileptischem Aphasie Syndrom Spektrum“ bei Verwandten von Kindern mit RE (Vears et al., 2012). Hiermit wird die Komplexität des pathogenetischen

Bedingungsgefüges und auch die große Variabilität der klinischen Erscheinungen nochmals verdeutlicht. Für das Markersymptom der fokalen „sharp waves“ wurde die Hypothese einer erblichen Hirnreifungsstörung postuliert. Zusammenfassend kann angenommen werden, dass für die RE eine multifaktorielle Pathogenese anzunehmen ist, bei der die genetische Maturationsstörung eine dominierende Rolle spielt. Heutzutage können einige Chromosomenorte und Gene den verschiedenen Formen idiopathischer Epilepsien oder dem typischen EEG Endophänotyp mit Auftreten von zentrotemporalen Spikes (CTS) zugeordnet werden. In einer Kopplungsanalyse konnte bereits ein Zusammenhang von RE zum Chromosom 15q13.2 und 16p12-11.2 festgestellt werden (Guerrini et al., 1999; Neubauer et al., 1998). Ebenso zeigte sich eine Assoziation von CTS zu 11p3 (Pal et al., 2010). In Einzelfallbeschreibungen wurden Variationen und Mutationen im *KCNQ2* und *KCNQ3* Gen mit dem Auftreten von RE oder dem zugrundeliegendem EEG Muster CTS assoziiert (Neubauer et al., 2008b). In zwei Familien mit mentaler Retardierung, schweren Sprachstörungen und rolandischen Anfällen konnten Mutationen in *SRPX2* gefunden werden (Roll et al., 2006). Im Rahmen einer genomweiten Kopplungsanalyse wurde ein Zusammenhang von RE und CTS zum Elongator Proteinkomplex 4 vermutet (Strug et al., 2009). Bei einem Mädchen mit epileptischer Enzephalopathie und CTS konnte eine de novo *GRIN2A* Mutation identifiziert werden (Endele et al., 2010). Erst kürzlich wurden zudem genetische Alterationen in *GRIN2A*, *RBFOX1/RBFOX3* und *DEPDC5* als genetische Risikofaktoren für idiopathisch fokale Epilepsien mit CTS identifiziert (Carvill et al., 2013a; Lal et al., 2013a, 2014; Lemke et al., 2013; Lesca et al., 2013). Eine aktuelle Studie zur Untersuchung von Kopienzahlvariationen am Chromosomenort 16p11.2 ergab eine Assoziation von Duplikationen in einer Größenordnung von 600kb zu atypischen und typischen RE (Reinthal et al., 2014). Die Suche nach dem krankheitsverursachendem „Rolando-Gen“ verlief jedoch bislang erfolglos. Es scheint somit weniger eine monogenetische als multifaktorielle komplexe (polygene) Pathogenese vorzuliegen. Ziel dieser Arbeit ist es, die genetischen Grundlagen der Rolando Epilepsie und ihr verwandten Epilepsiesyndromen besser zu verstehen.

1.3. Glucose Transporter 1 (SLC2A1)

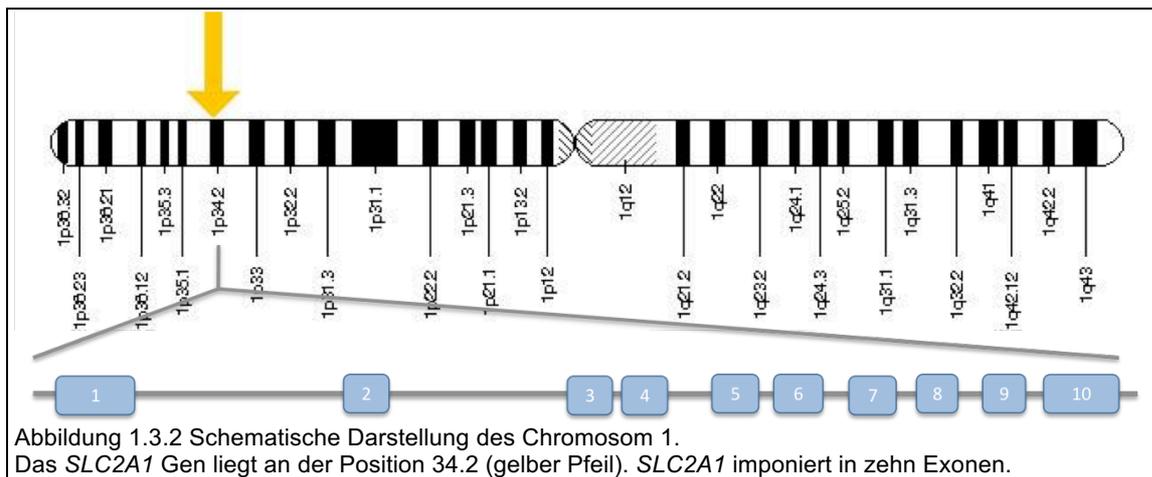
1.3.1. Aufbau und Funktion des Glucose Transporters 1

Der Glucose Transporter 1 (GLUT1) wird im menschlichen Genom durch das Gen *SLC2A1* kodiert. Es handelt sich um ein integrales Membranprotein bestehend aus 492 Aminosäuren. Die 12 hydrophoben Segmente durchspannen die Zellmembran in Form von Helices (s. Abb. 1.3.1) (Mueckler et al., 1985). GLUT1 gehört zur Gruppe der Glucosetransporter, welche Zuckermoleküle nur entlang eines Konzentrationsgradienten transportieren können (erleichterte Diffusion). Es dient zur Einschleusung von Glucose und anderen Pentosen und Hexosen sowie Vitamin C ins Zellinnere. GLUT1 wird auch als Erythrozyten/Hirn-Hexose Facilitator bezeichnet und kommt vorrangig in der Zellmembran von Erythrozyten und den Zellen der Blut-Hirn-Schranke vor (Barros et al., 2007; Vannucci et al., 1997). Es ist ein unentbehrliches Transportprotein für die Glukoseversorgung des menschlichen Gehirns.



1.3.2. Das *SLC2A1* Gen

Das zu Grunde liegende Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 an Position 34.2. (s. Abb. 1.3.2.) (Fukumoto et al., 1988; Shows et al., 1987). Genauer gesagt befindet sich das Gen von Basenpaar 42.925.374 bis Basenpaar 42.925.175 auf Chromosom 1. Die Basensequenz von *SLC2A1* imponiert in zehn Exonen, welche 492 Aminosäuren kodieren.



1.3.3. *SLC2A1* und Epilepsien

Im Jahre 1991 beschrieb de Vivo erstmals das klassische GLUT1-Defizienz Syndrom, welches durch Mutationen im *SLC2A1* Gen ausgelöst wird. Diese Erkrankung beginnt bereits im Säuglingsalter mit einer therapieresistenten Epilepsie. Kennzeichnend ist eine niedrige Glucosekonzentration im Liquor cerebrospinalis. Durch Fasten, Fieber oder Infektion kommt es in vielen Fällen der Erkrankung zu einer Zunahme der Symptomatik. Im Verlauf der Enzephalopathie tritt eine Störung der Entwicklung mit erworbener Mikrozephalie und komplexer Bewegungsstörung wie muskulärer Hypotonie, Spastik, Ataxie, Dystonie oder Chorea auf. Es treten generalisierte tonisch-klonische Krampfanfälle ebenso wie myoklonische Anfälle, Absencen, atonische und auch unklassifizierbare Anfälle auf (De Vivo et al., 1991). Mit voranschreitender Hirnreifung im Laufe der frühkindlichen Entwicklung können beim GLUT1-Defekt verschiedene idiopathisch generalisierte Epilepsiesyndrome auftreten (Mullen et al., 2010). Es wurden fünf unterschiedliche seltene Anfallstypen beim GLUT1-Defizienz Syndrom beschrieben: generalisierte tonische oder klonische, myoklonische und atonische Anfälle sowie atypische Absencen und unklassifizierbare Anfallsmuster (Leary et al., 2003). In 10 % - 15 % der Fälle zeigen die betroffenen Individuen jedoch keinerlei Krampfanfälle (Leen et al., 2010). Das klassische GLUT1-Defizienz Syndrom oder auch DeVivo-Erkrankung genannt zeigt somit phänotypische Anfallsmuster, wie

sie auch bei atypischen Rolando Epilepsien auftreten. Myoklonisch astatische Anfälle sind das typische Anfallsmuster bei der atypisch benignen Partialepilepsie des Kindesalters (ABPE) bzw. Pseudo Lennox Syndrom (PLS) und wurden ebenfalls bei Vorliegen von GLUT1-Defizienz beschrieben (Mullen SA et al., 2011). Für die ABPE bzw. für das PLS sind die zugrundeliegenden Gene bis heute unbekannt. Es war daher naheliegend, den Einfluss von *SLC2A1* auf das PLS als mögliche monogenetische Ursache zu untersuchen.

Das Vererbungsmuster beim GLUT1 Defekt erfolgt autosomal dominant. 90 Prozent entstehen durch Neumutationen und nur 10 Prozent der Erkrankten haben ein ebenfalls betroffenes Elternteil (Brockmann et al., 2001; Klepper et al., 2001). Meist handelt es sich um Punktmutationen, jedoch wurden auch größere genomische Deletionen gefunden (Levy et al., 2010; Vermeer et al., 2007). Nach aktuellem Stand der Forschung geht man von dem Vorliegen einer Genotyp-Phänotyp Korrelation aus (Leen et al., 2010; Yang et al., 2011). Kleinere Mutationen, die zu einem missense oder nonsense führen, ziehen einen milden bis moderatem Phänotyp nach sich, wohingegen komplette Deletionen zu einem besonders schweren Phänotyp führen.

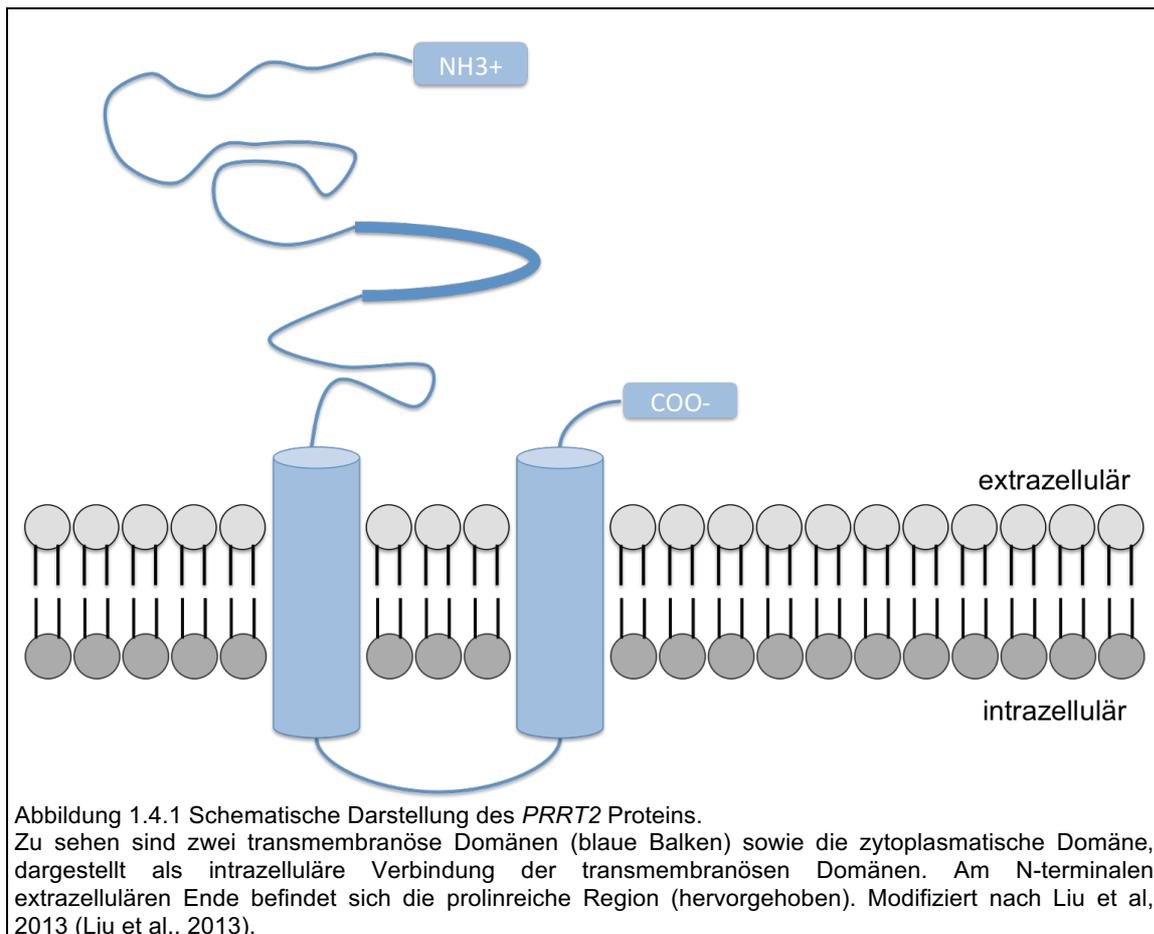
Für das monogenetische GLUT1-Defizienz Syndrom wurde im Laufe der letzten zwei Dekaden ein breites Spektrum an Phänotypen beschrieben (Brockmann, 2009; Friedman et al., 2006; Joshi et al., 2008; Overweg-Plandsoen et al., 2003). Auch monogenetische Epilepsien zeigen eine enorme phänotypische und genotypische Heterogenität. Hierunter versteht man, dass Mutationen im gleichen Gen zum Teil sehr unterschiedliche Krankheitsbilder verursachen können. Mutationen im *SLC2A1* Gen gelten als ursächlich für ein weites Spektrum an Epilepsien unterschiedlichen Schweregrades und begleitenden Komorbiditäten (Scheffer, 2012). So wurden Mutationen im *SLC2A1* Gen auch bei idiopathischen generalisierten Epilepsien (Striano et al., 2012), paroxysmaler aktivitätsinduzierter Dyskinesie und Epilepsie (Suls et al., 2008) und bei einer paroxysmalen Choreoathetose mit Spastik und Epilepsie (Weber et al., 2011) gefunden.

Das breite Spektrum der phänotypischen Erscheinungen bei Vorliegen eines GLUT1-Defektes zeigen somit Überschneidungen zu den Phänotypen der ARE. Eine systematische Analyse des *SLC2A1* Gens bei dieser Epilepsieform war bislang jedoch nicht erfolgt und ist Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit.

1.4. Proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2)

1.4.1. Aufbau und Funktion des prolinreichen transmembranösen Proteins 2

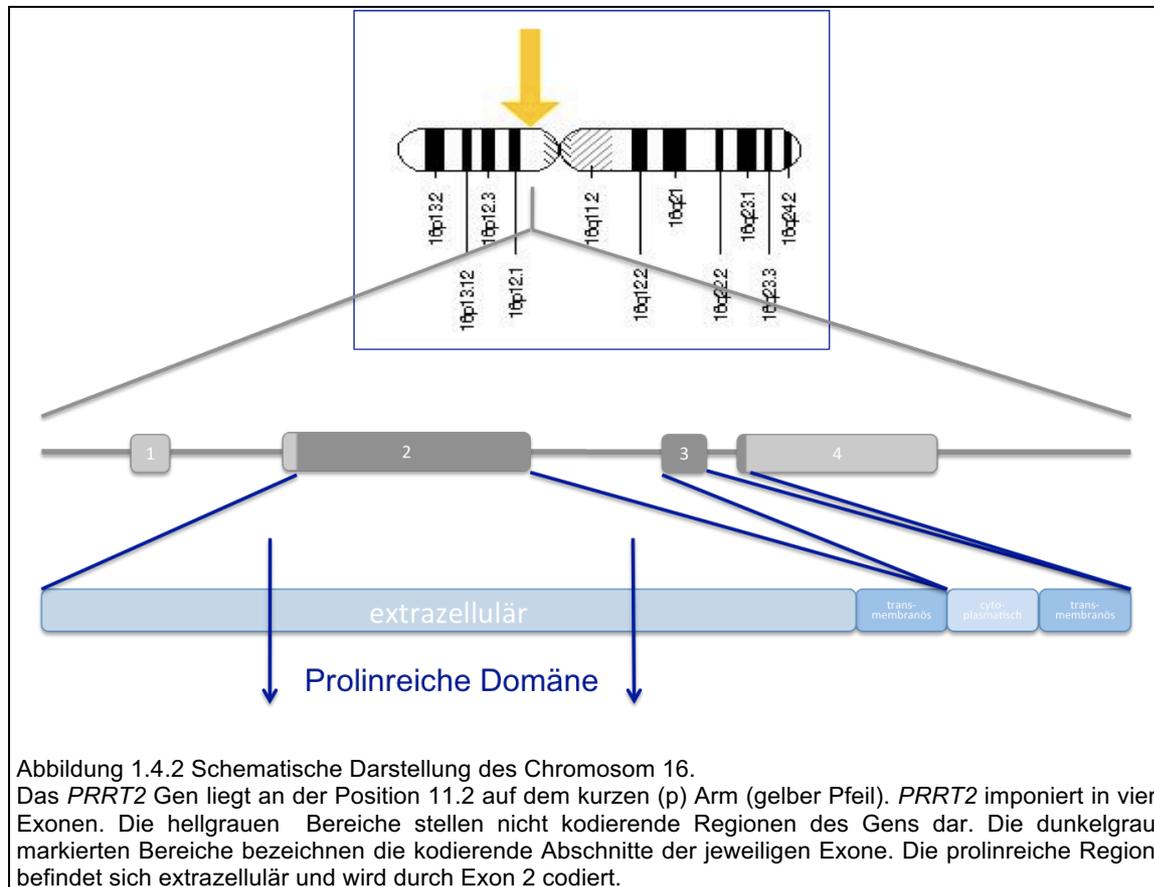
Das prolinreiche transmembranöse Protein 2 wird im menschlichen Genom durch das Gen *PRRT2* (s.Abb. 1.4.1) kodiert. Es handelt sich um ein prolinreiches transmembranöses Protein dessen Funktion bis dato nicht geklärt ist. *PRRT2* wird vorwiegend im zentralnervösen Nervensystem exprimiert.



Aktuelle Studien haben ergeben, dass das Protein in Interaktion mit dem synaptosomal assoziierten Protein 25 (SNAP 25) steht, welches eine Rolle bei der Regulation der intrazellulären Calciumionenkonzentration und der neuronalen Transmitterexozytose spielt (Lee et al., 2012; Liu et al., 2013; de Vries et al., 2012).

1.4.2. Das *PRRT2* Gen

Das zugrundeliegende Gen befindet sich auf dem kurzen Arm auf Chromosom 16 an der Position 11.2 (s. Abb. 1.4.2.) Genauer gesagt befindet sich das Gen von Basenpaar 29.812.087 bis Basenpaar 29.815.880 auf Chromosom 16.



Die Basensequenz von *PRRT2* imponiert in vier Exonen, welche 340 Aminosäuren kodieren. Die zwei transmembranösen Domänen bestehen aus den Aminosäuren 269-289 und 318-338 (Chen et al., 2011).

1.4.3. *PRRT2* und Epilepsien

Mutationen im *PRRT2* Gen gelten heutzutage als Ursache zahlreicher Erkrankungen, die vom klinischen Erscheinungsbild her den typischen und atypischen Roland-Epilepsien ähneln.

So konnten Chen et al. (2011) nachweisen, dass eine Mutation im *PRRT2* Gen mit paroxysmaler kinesinogener Dyskinesie (PKD) assoziiert ist. Hierbei handelt es sich um eine hyperkinetische Bewegungsstörung, bei der die Betroffenen dystone unwillkürliche Bewegungsattacken von kurzer Dauer erleiden. Diese Attacken sind von willkürlichen plötzlichen Bewegungen getriggert. Die PKD tritt häufig in Verbindung mit

dem infantilen Anfalls- und Choreoathetose-Syndrom (infantile convulsions and choreoathetosis (ICCA) syndrome) auf (Swoboda et al., 2000) und wurde auch bei einer Familie mit Rolando-Epilepsie mit paroxysmal Anstrengungs-induzierter Dystonie und Schreibkrampf (REPED-WC) (Guerrini et al., 1999) beschrieben. Bei den Patienten mit ICCA werden bereits im Neugeborenenalter afebrile Krampfanfälle beobachtet (benign familial infantile convulsions (BFIC)). Im weiteren Verlauf kommt es dann zur Entwicklung einer paroxysmalen Choreoathetose, d.h. zu anfallsartigen unwillkürlich ausgelösten schraubenartigen Bewegungen der Extremitäten. Die benignen familiären infantilen Konvulsionen (BFIC) können auch eigenständig auftreten. Dieses epileptische Syndrom wird auch als Watanabe Syndrom bezeichnet und wurde bislang nicht in die *ILAE*-Klassifikation aufgenommen. Es zählt jedoch zu den idiopathischen fokalen Epilepsien und zeigt hinsichtlich des gutartigen Verlaufs mit Spontanremission der Anfälle nach wenigen Tagen und hinsichtlich der Anfallssemiologie mit vegetativen Symptomen wie Blässe oder Atemstörungen, oralen Automatismen und zum Teil begleitenden Kloni Ähnlichkeiten zum Spektrum der typischen und atypischen Rolando-Epilepsien. Schubert et al. untersuchten 49 Familien mit isolierten BFIC und konnten eine bekannte Mutation im *PRRT2* Gen identifizieren (Schubert et al., 2012). Hierbei handelte es sich um eine Duplikation der Nukleobase Cytosin (C) an Position 649 in Exon2 (c.649-650insC;p.Arg217Profs*8). Durch die Duplikation kommt es zu einer Leserasterverschiebung (frameshift) und Einführung eines Stopcodons. Die *PRRT2* 649dupC Mutation konnte in zahlreichen Studien ebenfalls als Mutationshotspot ausgemacht werden (Castiglioni et al., 2013; Chen et al., 2011; Cloarec et al., 2012; Dale et al., 2012a; Gardiner et al., 2012, 2012; Groffen et al., 2013; Heron et al., 2012; Ishii et al., 2013; Lee et al., 2012; Li et al., 2013, 2012; Liu et al., 2012; Marini et al., 2012; Méneret et al., 2012a; Okumura et al., 2013; Ono et al., 2012; Riant et al., 2012a; Scheffer et al., 2012; Schmidt et al., 2012; Schubert et al., 2012; Sheerin et al., 2013; Specchio et al., 2013; Wang et al., 2011, 2011). Die Mutation ist lokalisiert in einem Homopolymer aus neun Cytosinbasen gefolgt von vier Guaninbasen. Diese DNA-Sequenz tendiert zur Bildung sog. Haarnadelstrukturen innerhalb der DNA, welche häufig mit Lesefehlern durch vorübergehendes Loslösen der DNA-Polymerase vergesellschaftet sind. Zusätzlich konnte in drei Fällen eine etwas größere submikroskopische Deletion ausfindig gemacht werden, welche das *PRRT2* Gen mit beinhaltete (Dale et al., 2011, 2012b; Lipton and Rivkin, 2009). Dieser Sachverhalt verdeutlicht die Notwendigkeit der Analyse der Kopienzahlvariationen zusätzlich zur Gensequenzierung um eine vollständige Analyse des Gens zu gewährleisten. In einigen Familien konnten zusätzlich zu BFIC weitere Epilepsiephänotypen bei Mutationen in *PRRT2* beobachtet

werden (Liu et al., 2013; Scheffer et al., 2012). Namentlich zu erwähnen sind hier beispielsweise Fieberkrämpfe und nächtliche Konvulsionen, folglich Phänotypen die den RE sehr nahe stehen. Ein Zusammenhang von RE zu PKD bzw. exercise induced dystonia wurde zweimalig bereits in der Literatur beschrieben (Espeche et al., 2011; Guerrini et al., 1999).

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, systematisch die Assoziation des *PRRT2* Gens bei RE an einem eigenen größere Kollektiv mit typischer und atypischer RE zu überprüfen.

1.5. Zielsetzung

In der Vergangenheit haben verschiedenen Studien einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mutationen im *PRRT2* und *SLC2A1* Gen und dem Auftreten eines variablen phänotypischen Spektrums an idiopathischen Epilepsiesyndromen gezeigt, die sich untereinander überschneiden und in ihrem Erscheinungsbild den typischen und atypischen Rolando Epilepsien nahe stehen. Es gibt Hinweise dafür, dass diese Gene wesentlich an der Pathogenese idiopathisch fokaler Epilepsien mit zentrot temporalen Spikes beteiligt sein könnten. Eine Studie zur genaueren Untersuchung zur Klärung der Frage inwieweit diese Gene bei der Ätiopathogenese von RE und ARE eine Rolle spielen wurde bislang jedoch nicht durchgeführt. Die hier vorliegende Arbeit war die Erste, die das *SLC2A1*- und *PRRT2* Gen gezielt auf einen möglichen Einfluss auf die Entstehung von Rolando Epilepsien beim Menschen untersucht hat.

Es wurde systematisch untersucht, ob eine Assoziation zwischen den untersuchten Phänotypen der idiopathischen fokalen kindlichen Epilepsien und einer möglichen Allelvariante im *SLC2A1*- und *PRRT2*-Gen vorliegt. Das Untersuchungskollektiv bestand aus Kindern und Jugendlichen mit typischer oder atypischer Rolando Epilepsie sowie deren Verwandten ersten Grades. Zur Bestimmung der Mutationsrate wurden die 10 Exone des *SLC2A1*-Gens und die 4 Exone des *PRRT2*-Gens sequenziert. Außerdem wurde bei beiden Genen die Anzahl an Kopienzahlvariationen bestimmt.

Die Ergebnisse der Promotion sollen übergreifend zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der Rolando Epilepsien beitragen. Es wird von der Hypothese ausgegangen, dass Mutationen im *PRRT2* und *SLC2A1* Gen zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von typischen und atypischen Rolando Epilepsien beitragen könnten.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

| | |
|--|--|
| ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer | Applied Biosystems, Foster City, California, USA |
| COBAS® TaqMan® Analyzer | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Germany |
| 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, Southkorea |
| Mobile Pipettierhilfe Pipetboy acu | IBS Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Germany |

| | |
|---|--|
| Photometer PEQLAB Nanodrop 1000® | Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Germany |
| Photometer Pharmacia Biotech Ultrospec 1000 | Pharmacia Biotech, Dübendorf, Suisse |
| Thermocycler T3000 | Biometra GmbH, Göttingen, Germany |
| Rotilabo® Mini-Zentrifuge | Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Germany |
| Stratagene UV Stratalinker® 1800 | Stratagene AG, La Jolla, USA |
| UV-Kamera-System | Polaroid Ecommerce, Minnetonka, Minnesota, USA |
| Vortex-Schüttler | VWR international, Darmstadt, Germany |
| Vortexer VFZ | Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Germany |
| Vortexer Vortex Genie® 2 | Scientific Industries Inc., New York, USA |
| Waage Ohaus Navigator™ | Ohaus Corp., New Jersey, USA |
| Waage Kern EW 2200-ZNM | Kern und Sohn GmbH, Balingen, Germany |
| Wasserbad WB1 | Köttermann Laborgeräte GmbH, Medingen, Germany |
| Wippschüttler | Eppendorf AG, Hamburg, Germany |

Zentrifuge Hettich® Mikro 200R
Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen,
Germany

Zentrifuge Hettich® Rotanta 50
Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen,
Germany

Zentrifuge Hettich® Rotanta 96R
Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen,
Germany

2.1.2. Zubehör

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

Parafilm M Roll
Oshkosh, WI 54952

PCR-Platte PP, natur, 96 Well
Nerbe plus GmbH, Winsen/ Luhe,
Germany

Pipettenspitzen Filter-Tips PE
oberflächenoptimiert 10µl, 20µl, 200µl,
1000µl
Nerbe plus GmbH, Winsen/ Luhe,
Germany

Pipettenspitzen LTS Tips 250µl
Rainin, Mettler Toledo Intl. Inc.,
Gießen, Germany

Reaktionsgefäße 0,2ml für die PCR PP
Greiner Bio-One GmbH,
Frickenhausen, Germany

Reaktionsgefäße 2ml
Sarstedt AG & Co, Nümbrecht,
Germany

Röhrchen 50ml 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, California |
| Chloroform | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| EDTA (Ethyldiamintetraacetat) | Sigma-Aldrich Co., München, Germany |
| EDTA Puffer 10x | Applied Biosystems, Foster City, California |
| 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 |
| Nuclease freies Wasser | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany |
| PeqLab Universal Agarose | PEQLAB GmbH, Erlangen, Germany |
| Phenol | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |

| | |
|---|---|
| POP6™ Polymer | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| POP7™ Polymer | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Qiagen® Multiplex PCR Kit 1000 | Qiagen, Hilden, Germany |
| Quiaquick® PCR Purification Kit 250 mit Buffer PB®, Buffer PE®, Buffer EB® | Qiagen, Hilden, Germany |
| RNase AWAY® Lösung | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany |
| PCR-Oligonukleotidprimer | Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany |
| Saccharose | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| SDS (Sodiumdodecylsulfat) | Sigma-Aldrich Co., München, Germany |
| TRIS (Trometamol) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany |
| Triton X-100 (4-Octylphenol Polyethoxylat) | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |

2.1.4. Lösungen

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

SeqScape® v2.1

Applied Biosystems, Foster City,
California, USA**2.1.6. Oligonukleotide**

Alle Primer wurden durch die Firma MWG/Operon synthetisiert. Sie sind im Folgenden in 5'→3' Richtung aufgeführt.

Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung des *SLC2A1* Gens

| Exon | Sequenz des Forward-Primers | Sequenz des Reverse-Primers |
|------|-----------------------------|--------------------------------|
| 1 | GTCCTATAAACGCTACGGTCCGC | GGCAGGAGTCTGCGCCTTTGTT |
| 2 | CCTGCCCTGTAGTAACCTGCTC | GACTGTGGGCATGTGTGATGTGC |
| 3-4a | GTGAATCTGTGGCAGAGCCAGG | CAGTGCCCACATTCCTTGGGCT |
| 3-4b | GGTATTACCTCTGACCCAGCCC | CAGATCCGAGAGCCACTGAAGC T |
| 5-8a | AGTAGGGAAGGCCACTCTGGCA | ACCACAGCGATGAGGATGGGCT |
| 5-8b | GATGCGGAGAAGAAGGTCACCA | TGGCATAACAGGCTGCTGCAC |
| 5-8c | GCAGGTCTTCTATTACTCCACGAGC | GAGCCAGAAAGTCAGACCCACAG |
| 9 | GGCCTCTGTAGCTTCTGTTTCCC | TGGGCCAGCACTTTCACAGCA |
| 10a | GACTTATCCAAAGTCCTACAGCCAGG | CTGGAGCCGTTAAGTCCTGAATATTCTTCT |
| 10b | GGATGAGACTTCCAAACCTGACAGATG | GGGTAGGAAGAGATGGGAAGGG |
| 10c | CTATCCCAGGAGGTGGCTATGG | CCTCCTACCCTCAATCCACAAGC |
| 10d | CACCACCTCACTCCTGTTACTTACC | GTGCGACTTCAGGCACATAACCTC |

Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung des *PRRT2* Gens

| Exon | Sequenz des Forward-Primers | Sequenz des Reverse-Primers |
|------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | AAGAAGGAGGCGTCTCTCCTGG | GACCTGGTTATCTCCTTCGATCCC |
| 2a | CCTGAGACAGGAATGTGGCCCAA | CTGTGGCCTGGGCTGTTTCTGA |
| 2b | GCTCCAGAAACCACAGAGACCC | TTGAGGGTGGTGAAGTGAAGGCTCAGG |
| 2c | CTGAGATTCTGTCTGAGAGTGTAGGG | TCTATTGCAGCGCTGGCGGGAA |
| 3-4a | TTCTGGGCTGGCTTCTCCTGAC | CTCAGGCTCCCTTGGTCCTTAG |
| 3-4b | TTCCTGTTGGGAGCTGCCTTGG | TGAGGAGGCAGGAAGAGGAAGG |
| 3-4c | CCTCAGTCCTCTCTTCCTTCCCT | CGAAGCACGTGAATGAATCTAGCCC |
| 3-4d | CCCAGTCCGCGAGTTTCTTTCTTG | GTATACCACCCAGTAAGGTTCTGCC |

Sonden zur TaqMan Copy Number Untersuchung des *SLC2A1* Gens

| Exon | Assay | Assay Bestellnummer |
|-------|----------|---------------------|
| 1 | 43424311 | Hs01661729_cn |
| 2 | 43408862 | Hs05803207_cn |
| 3-4a | 43396844 | Hs05718229_cn |
| 3-4b | 43396312 | Hs02166993_cn |
| 5-8ab | 43395317 | Hs01857850_cn |
| 5-8c | 43394554 | Hs05801273_cn |
| 9 | 43393332 | Hs01969270_cn |
| 10a | 43392752 | Hs01967668_cn |
| 10b | 43392370 | Hs00854312_cn |
| 10c | 43391806 | Hs00993646_cn |
| 10d | 43391703 | Hs00425943_cn |

Sonden zur TaqMan Copy Number Untersuchung des *PRRT2* Gens

| Exon | Assay | Assay Bestellnummer |
|------|-----------|---------------------|
| 2a | 29824698 | Hs01404240_cn |
| 2b | 29824836 | Hs01880517_cn |
| 2c | 29825236 | Hs01158537_cn |
| 3-4a | 29825772 | Hs00743564_cn |
| 3-4b | 298262170 | Hs01437935_cn |
| 3-4c | 29826617 | Hs01618875_cn |

2.2. Methoden

Die Ethikkommission der Universität Gießen, Deutschland prüfte und genehmigte das vorliegende Forschungsvorhaben am 13. Januar 2011 unter dem Aktenzeichen 03/11. Sämtliche Patienten bzw. bei Minderjährigen ihre sorgeberechtigten Eltern gaben gemäß den Vorgaben der Ethikkommission der Universität Gießen nach mündlicher Aufklärung ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme mit dem Titel „genomische Variationen bei Patienten mit idiopathischen Epilepsien“ ab.

2.2.1. Diagnosekriterien

Die Diagnose einer Rolando Epilepsie wurde gemäß den Vorgaben der *ILAE* vorgenommen. Zur Beurteilung auf das Vorliegen der krankheitsspezifischen CTS mussten die Kriterien Aktivierung im Schlaf sowie die kennzeichnende elektroenzephalographische Morphologie und Klassifikation der zentrotemporalen Spikes durch zwei unabhängige Untersucher bestätigt werden. Bei Vorliegen anhaltender generalisierter EEG Veränderungen mit dominierenden zentrotemporalen Spikes während des Schlafes bei gleichzeitigem Auftreten von Entwicklungsbeeinträchtigungen beim Kind wurde die Diagnose Epilepsie mit kontinuierlichen spike-wave Entladungen im Schlaf (CSWS) gestellt (Billard et al., 1981; Calvet and Bancaud, 1976; Yasuhara et al., 1991). Die Diagnose einer atypischen Rolando Epilepsie wurde nach den in der Einleitung erwähnten Diagnosekriterien bei Vorliegen von additiven Anfallssemiologien wie astatische Anfällen, atypischen Absencen oder myoklonischen Anfallsmustern vergeben. Traten zusätzlich zu den klassischen Rolandoanfällen weitere Auffälligkeiten wie signifikante kognitive Beeinträchtigungen und/oder eine ausgeprägte sprachliche Entwicklungsstörung auf, wurde dieser Phänotyp ebenfalls als ARE klassifiziert. (Aicardi and Chevrie, 1982; Dose et al., 2001; Hahn et al., 2001). Bei Vorliegen einer Anfallssemiologie wie bei RE und anhaltend prolongiert auftretenden generalisierten zentrotemporalen Spikes während des Schlafes wurde auch bei Nichtvorliegen von additiven Anfallsmustern oder zusätzlichen Entwicklungsbeeinträchtigungen die Diagnose RE vergeben.

2.2.2. Studienkollektiv

Sämtliche diagnostizierte Indexpatienten entstammen einem seit über zwanzig Jahren aufgebauten Familienkollektiv (BRE Kollektiv).

Untersucht wurden 153 Indexpatienten aus 98 Multiplexfamilien in denen mindestens zwei Geschwister erkrankt waren. In 96 Familien erhielt mindestens einer der betroffenen Patienten die Diagnose RE oder ARE, das zweite Geschwisterkind zeigte

entweder Symptome einer RE oder ARE bzw. isoliert EEG Auffälligkeiten im Sinne von CTS. In zwei Familien wurden keine Krampfanfälle sondern lediglich EEG Auffälligkeiten diagnostiziert. Von allen 153 Indexpatienten erhielten insgesamt 116 Patienten die Diagnose einer RE, 32 Patienten die Diagnose einer ARE, vier die Diagnose eines CSWS und bei einem Patienten konnten lediglich zentrotemporale Spikes festgestellt werden.

Zusätzlich wurden 46 nicht-familiäre Fälle in die Studienkohorte mit einbezogen. Von diesen Patienten erhielten 3 die Diagnose einer klassischen RE und 43 die einer ARE.

2.2.3. Molekulargenetische Verfahren

2.2.3.1 DNA Extraktion

Die zu analysierenden Proben wurden im Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen, Abteilung für Kinderneurologie bei -20°C gelagert.

Um die genomische DNA aus dem gewonnenen EDTA-Blut der Patienten zu analysieren ist es notwendig, zunächst die DNA aus den Zellen zu extrahieren. Hierzu wurden zunächst die Zellen mittels Chemikalien lysiert und die freiwerdenden Nucleasen durch Zugabe eines speziellen Extraktionspuffers gehemmt. Um das gewonnene Lysat von Proteinen zu befreien, wurden diese im Anschluss durch Zugabe einer Protease zerstört und mittels Zentrifugation von der gewünschten Probe entfernt. Zur Reinigung und Aufkonzentrierung erfolgte als abschließender Reaktionsschritt eine Ausfällung der DNA durch Zugabe von hochprozentigem Alkohol. Zur DNA Extraktion wurde das QIAamp[®] DNA Blood Midi Kit (Qiagen) nach Angaben gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet (Kit et al., 2007). Ein genaues Pipettierschema findet sich im Anhang (Protokoll zur DNA Extraktion mittels QIAamp[®] Midi Kit).

2.2.3.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA wurde anhand der optischen Dichte im Spektrophotometer NanoDrop[®]1000 bestimmt. Dieses Spektrophotometer ermöglicht die Absorptionsbestimmung von Licht unterschiedlicher Wellenlängen bei DNA-, RNA- und Proteinlösungen. Da die DNA ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzt, wurde bei dieser Wellenlänge die Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung genügte der Einsatz von 1,5 µl der unverdünnten Probe. Als Nullabgleich wurde die erste Messung mit dem Lösungspuffer der DNA zur Bestimmung des Leerwertes durchgeführt. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280 nm und das für organische Verbindungen bei 230 nm. Über die Verhältnisse

der Absorptionsmaxima kann die Reinheit der untersuchten DNA-Lösung quantifiziert werden. Die Reinheit der DNA wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Bestimmung des Absorptionsquotienten A_{260}/A_{280} bestimmt. Die Reinheitsindices aller DNA Proben lagen zwischen den empfohlenen Werten von 1,7 - 2,0.

Sämtliche DNA Proben wurden abschließend auf eine Konzentration von 10 ng/ μ l wahlweise mit 1XTE für eine sich anschließende Sequenzanalyse oder mit HPLC-H₂O für eine weitere Kopienzahlvariationsanalyse verdünnt.

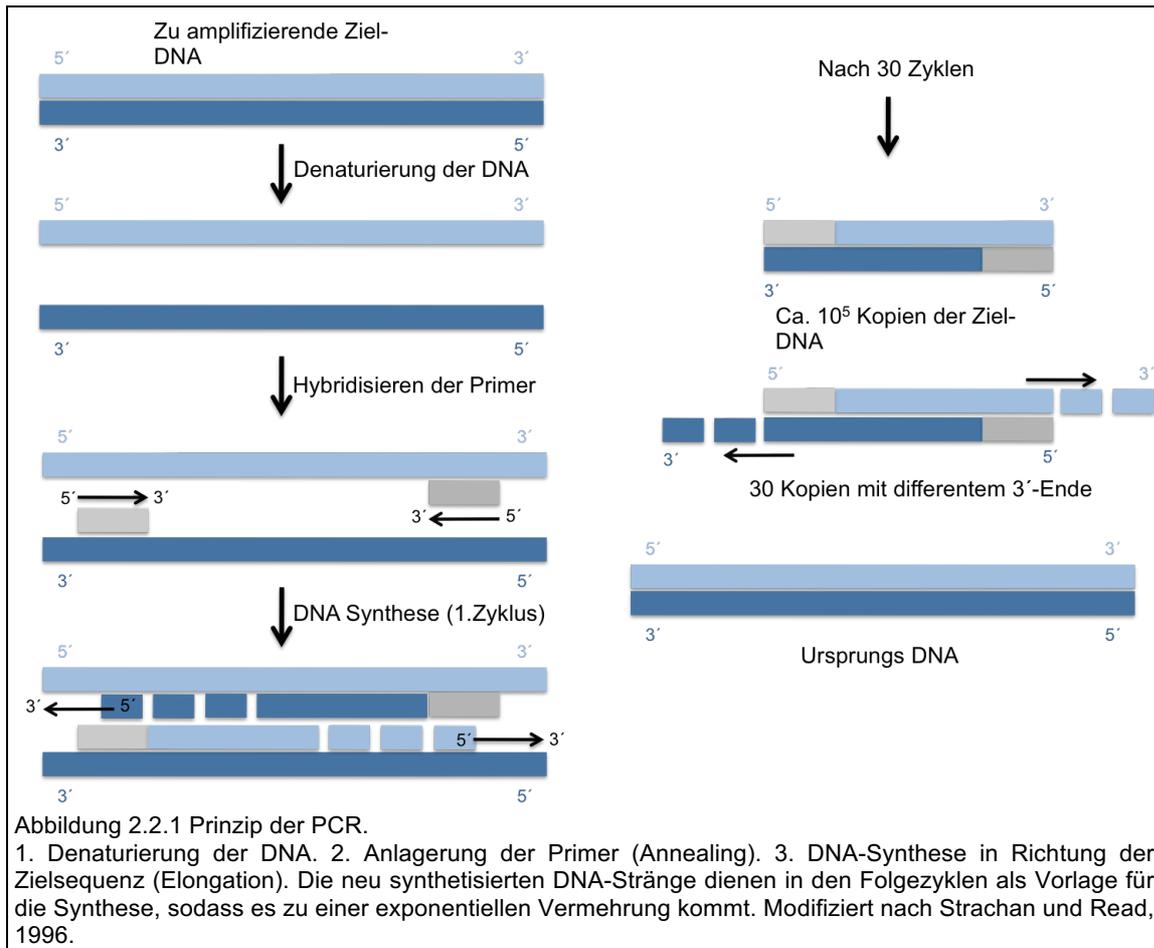
War die Menge der extrahierten DNA nicht ausreichend, wurde die entsprechende Probe zur Firma Qiagen zur Reamplifizierung nach der herstellereigenen REPLI-g Mini Methode versandt. Die hieraus synthetisierte whole genome amplification DNA (WGA-DNA) wurde ebenso wie die originale DNA für weitere Analyseschritte verarbeitet.

2.2.3.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur genaueren Analyse der Sequenz eines speziellen Genabschnittes ist es notwendig, diesen in ausreichender Menge vorliegen zu haben. Die Standardmethode zur exponentiellen Vervielfältigung einer definierten Sequenz einer Vorlagen DNA ist die Polymerasekettenreaktion (PCR).

Die Amplifikation der DNA erfolgt in mehreren aneinandergereihten Reaktionszyklen. Ein Reaktionszyklus besteht aus drei wesentlichen Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation (s. Abb. 2.2.1).

Bei der Denaturierung wird die DNA in ihre zwei Einzelstränge zerlegt. Dies geschieht durch Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 80 – 96 °C, da hierdurch die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA zerstört werden. Beim Annealing kommt es zur Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzabschnitte. Dies erfolgt durch Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 45 – 65 °C und der hierbei möglich werdenden Hybridisierung. In der Phase der Elongation kopiert die im Reaktionsgemisch vorliegende Polymerase den gesuchten Sequenzabschnitt durch Zusammensetzung der Nucleotide. Dieser Reaktionsschritt erfolgt im Temperaturoptimum der Polymerase bei 72 °C (Strachan, 2011) .



Um in einem einzigen Reaktionsansatz mehrere Exone gleichzeitig zu amplifizieren, wurde das Qiagen Multiplex Kit[®] verwendet. Dieses Kit stellte die für den Reaktionsansatz benötigte thermostabile HotStarTaq[®] DNA Polymerase, eine ausreichende Menge an Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs), einen patentierten Puffer (Q-Solution) sowie die für die Polymerase geeignete Konzentration an Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) zur Verfügung.

Die industriell angefertigten Primer wurden mit Hilfe der Software mutationdiscovery.com oder Primer 3 designt. Hierbei wurde sichergestellt, dass die Primer eine Länge von 22 - 35 Nucleotiden aufweisen, der Gehalt an G und C zwischen 45 und 65 % liegt, die 3'-Endungen idealerweise mit 2 Gs oder Cs enden und eine Dimerbildung umgangen wird, indem die 3'-Endungen weder untereinander noch mit sich selbst komplementär sind. Die verwendeten Primer sind im Materialteil aufgelistet und können dort entnommen werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurden maximal drei Exone pro Ansatz amplifiziert. Der Reaktionsansatz durchlief anschließend im Thermocycler das PCR Programm. Als

PCR Bedingung wurde eine 15 minütige Denaturierungsphase bei 95 °C definiert. Im Anschluss wurden jeweils 35 Zyklen durchlaufen, die aus einer 30 sekündigen Denaturierung bei 94 °C, einer sich anschließenden 90 sekündige Annealingphase bei 62 °C und einer 45 Sekunden lange Elongationsphase bei 72 °C bestanden. Um bessere Ergebnisse zu erzielen, wurde das Programm um eine Final Extension Phase von 10 Minuten bei 72 °C erweitert. Eine genaue Anleitung zur praktischen Durchführung der PCR und die jeweiligen Pipettierschemata finden sich im Anhang (Protokoll zur Durchführung der PCR bei *SLC2A1* und Protokoll zur Durchführung der PCR bei *PRRT2*).

2.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die entstandenen PCR Produkte im Anschluss sichtbar zu machen, wurden die Fragmente auf ein Agarose Gel aufgetragen und mittels Ethidiumbromid angefärbt. In der durchgeführten Versuchsreihe wurden durch Aufkochen von 2 g Agarose in 100 ml 1XTAE 2 %ige Gele verwendet. Das Prinzip der Gelelektrophorese basiert auf der Ausrichtung der Fragmente in einem elektrischen Feld. Das Gel befindet sich in einer Pufferlösung (mit 1XTAE gefüllte Elektrophoresekammer). Nach Anlegen einer Spannung von 150 V bei einer Stromstärke von 400 mA für 45 Minuten bewegen sich die Amplifikate in Richtung der positiven Anode, wobei sich kleinere Fragmente schneller bewegen als größere. Zur Erleichterung des Auftrags auf das Gel wurden die Amplifikate zuvor mit dem patentierten Farbstoff LoadingDye[®] versetzt. Als Größenmarker diente der GeneRTM[®] DNA Ladder, der DNA Fragmente in 100 kb Abschnitte markiert. Zur optischen Darstellung und Dokumentation wurde das Gel abschließend mit Etidiumbromid gefärbt und im UV-Transilluminator fotografiert. Zum Ausschluss einer möglichen Kontamination der Proben wurde stets eine Negativprobe angefertigt.

2.2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die Amplifikate von Reaktionsüberresten wie Oligonukleotiden und Farbstoffen vor ihrer weiteren Verwendung zu reinigen, wurde das QIAquick[®] PCR Purification Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellerprotokolls verwendet. Eine genaue praktische Durchführung und ein Pipettierschema finden sich im Anhang (Protokoll zur Aufreinigung der PCR Produkte).

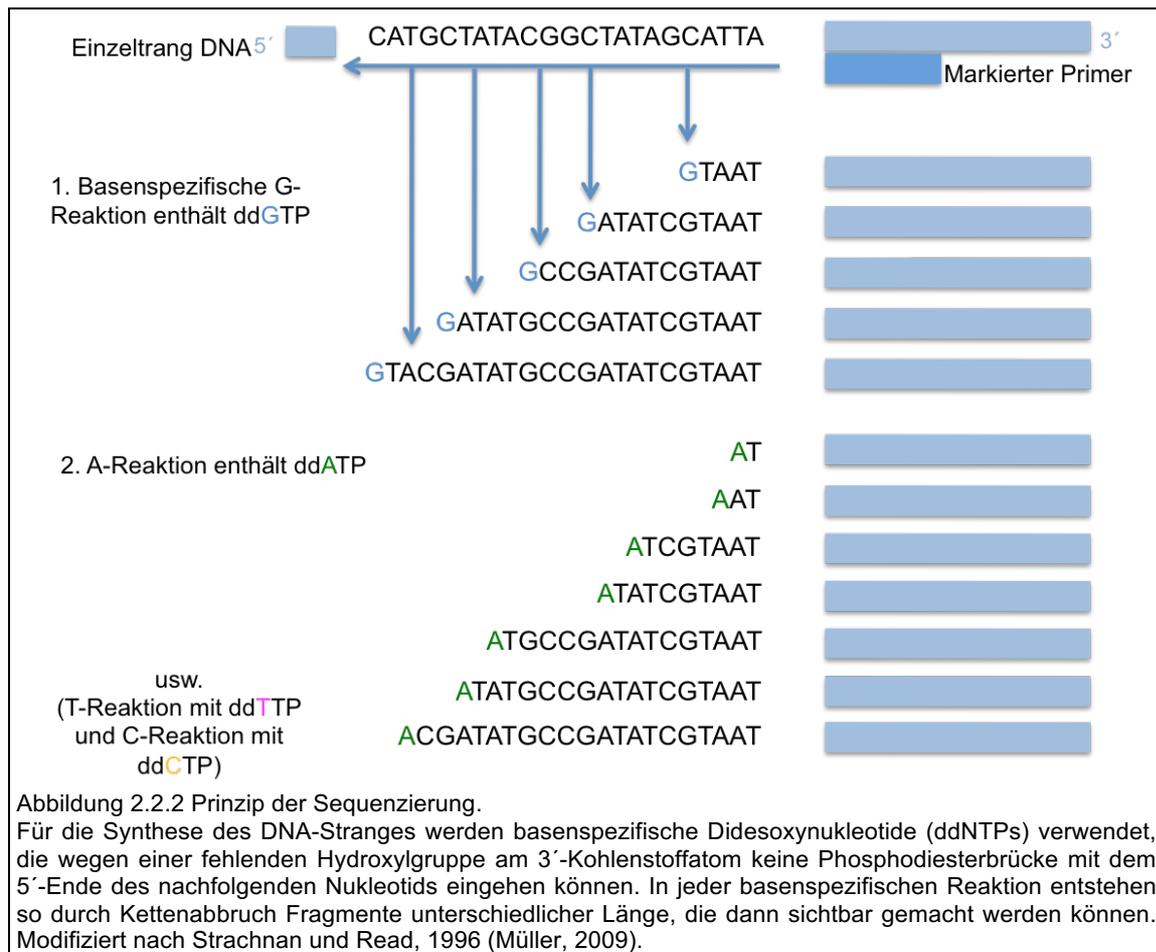
2.2.3.6 Sequenzanalyse

Mit Hilfe der Sequenzierung ist es möglich, die Nukleotidabfolge eines DNA-Abschnittes zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger mit Hilfe des ABI PRISM[®] 3100 Genetic

Analyzer angewandt. Das enzymatische Prinzip der Sequenzierreaktion ist eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion. Die benötigten Substanzen zur Durchführung der Sequenzierung entsprechen daher auch denjenigen der PCR: die zu untersuchende DNA-Probe, Primer, dNTPs, Polymerase und Lösungsmedium (hier HPLC Wasser). Zusätzlich befinden sich im Reaktionsansatz mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelte Didesoxynucleotide (ddNTPs). Sie sind der eigentliche Schlüssel zur Sequenzierung. ddNTPs unterscheiden sich von dNTPs durch ein fehlendes Sauerstoffatom an der 3'-Position der Ribose. Es kann folglich keine Verbindung zur 5'-Phosphatgruppe des nächsten Nucleotids eingegangen werden und es kommt zum Kettenabbruch. Durch den zufälligen Einbau von ddNTPs entstehen daher unterschiedlich lange DNA Fragmente, von denen jedes mit einem der vier verschiedenen dNTPs endet, die komplementär angeben, welches Nucleotid sich an der entsprechenden Position auf der Template DNA befindet. Die DNA-Fragmente werden im Anschluss kapillarelektrophoretisch über eine hochauflösende Polymermatrix (Performanced Optimized Polymer, POP6[®] bzw. POP7[®]) aufgetrennt und durch zwei Argon-Laserstrahlen zur Fluoreszenz angeregt (Dye-Terminator Verfahren) (Strachan, 2011) (s. Abb. 2.2.2.).

In der hier durchgeführten Versuchsreihe wurden die aufgereinigten PCR-Amplifikate mit den Sequenz-Primern sowie den Bestandteilen des BigDye[®] Cycle Sequencing Kit v3.1 gemäß den Herstellerangaben versetzt. Die praktische Versuchsdurchführung und das Pipettierschema sind im Anhang ersichtlich (Protokoll zur Durchführung der Sequenzanalyse). Der Reaktionsansatz durchlief anschließend im Thermocycler das Sequenzierungsprogramm. Als Reaktionsbedingung wurden jeweils 24 Zyklen durchlaufen, die aus einer 10 sekundigen Denaturierung bei 96 °C, einer sich anschließenden 5 sekundigen Annealingphase bei 55 °C und einer 4 Minuten langen Elongationsphase bei 60 °C bestanden.

Die graphische Darstellung der Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem Programm ABI PRISM Data Collection Software. Zur weiteren Datenanalyse wurden die Sequenzen im Anschluss in die Software SeqScape 2.1 exportiert. Diese Software ermöglicht einen Vergleich der genotypisierten Fragmente mit der Referenzsequenz. Die jeweilige Referenzsequenz war für *SLC2A1* NCBI Contig NT_032977 und für *PRRT2* NCBI Contig NT_010393.16.



2.2.3.7 TaqMan[®] Copy Number Untersuchung

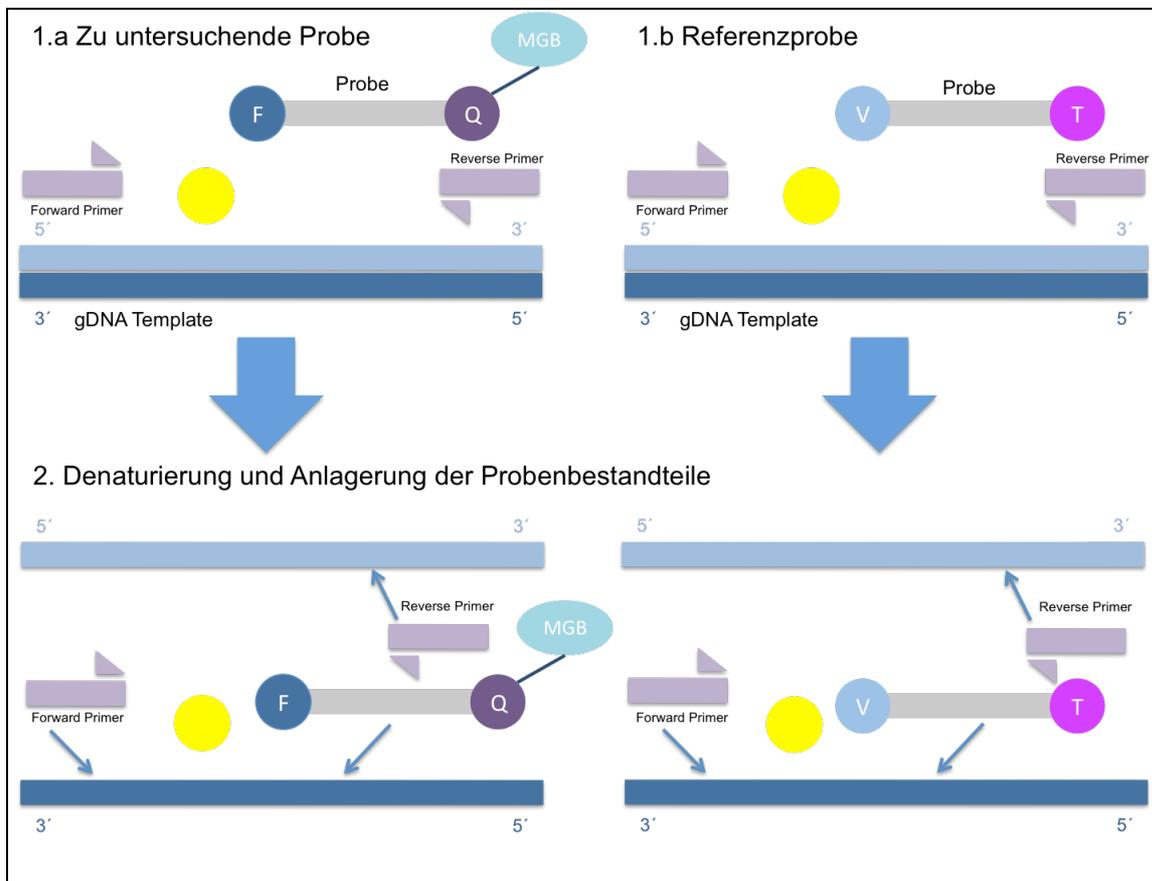
Die Untersuchung der Kopienzahlvariationen der zu analysierenden Gene erfolgte mittels einer quantitativen Real Time PCR unter Verwendung einer TaqMan Sonde.

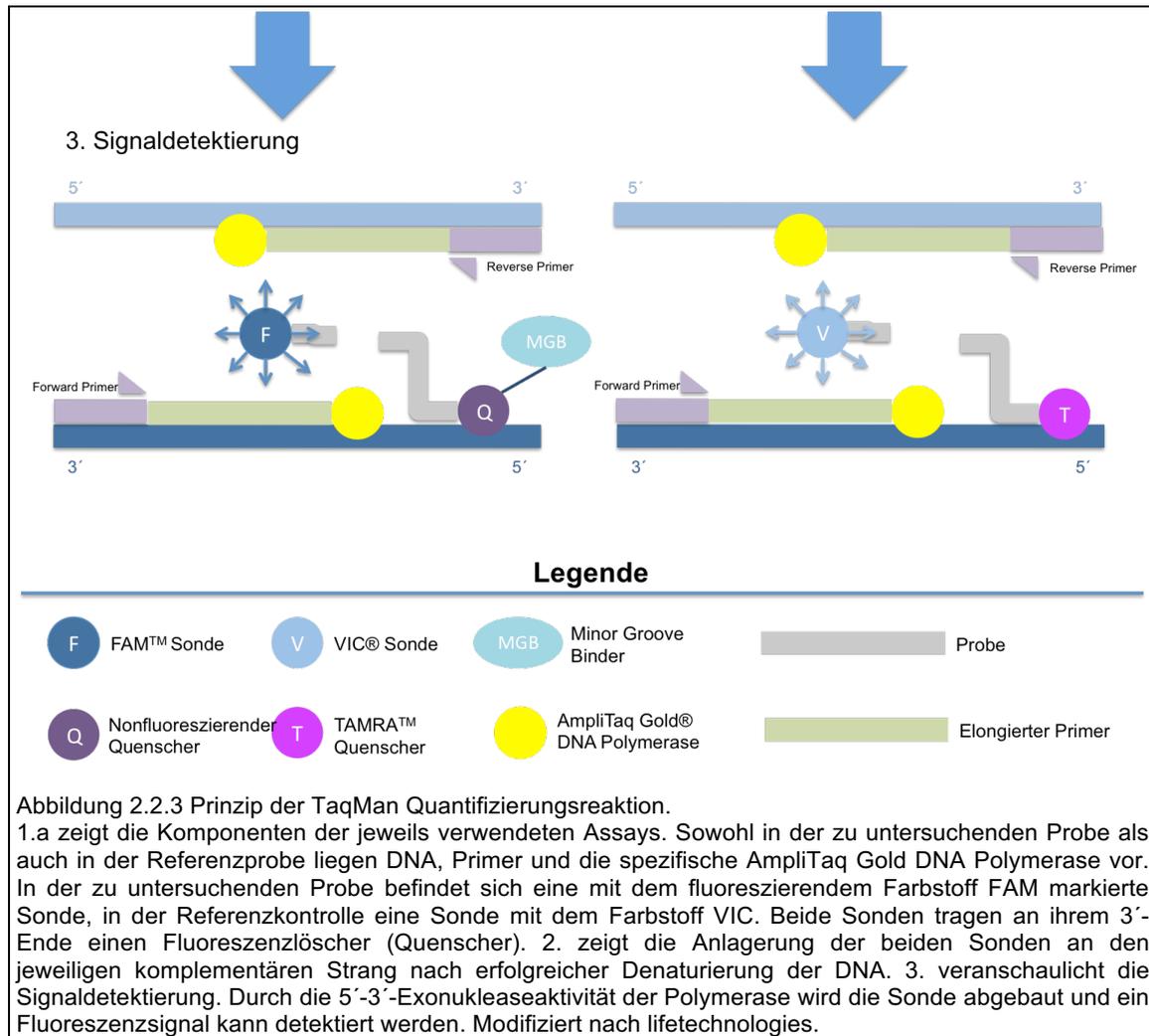
Bei einer quantitativen Real Time PCR findet eine Quantifizierung der PCR Produkte mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen statt. Da nur in der exponentiellen Phase der PCR die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen, werden die Fluoreszenzmessungen in dieser Phase in Echtzeit vorgenommen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der PCR Menge zu.

Bei der TaqMan Copy Number Quantifizierungsreaktion laufen zwei Real Time PCRs simultan ab. In der einen PCR wird die zu untersuchende Sequenz nach Trennung der Doppelstränge in ihre Einzelstränge durch die mit dem Fluorophor-Farbstoff FAM versehene TaqMan Copy Number Assay Sonde markiert. Eine mit dem Fluorophor-Farbstoff VIC versehene TaqMan Reference Sonde markiert zeitgleich eine spezifische stets diploide, also in zwei Kopien vorliegende, Kontrollsequenz. An dem farbstofffreiem Ende sind die beiden Sonden mit einem Fluoreszenzlöcher, dem sog.

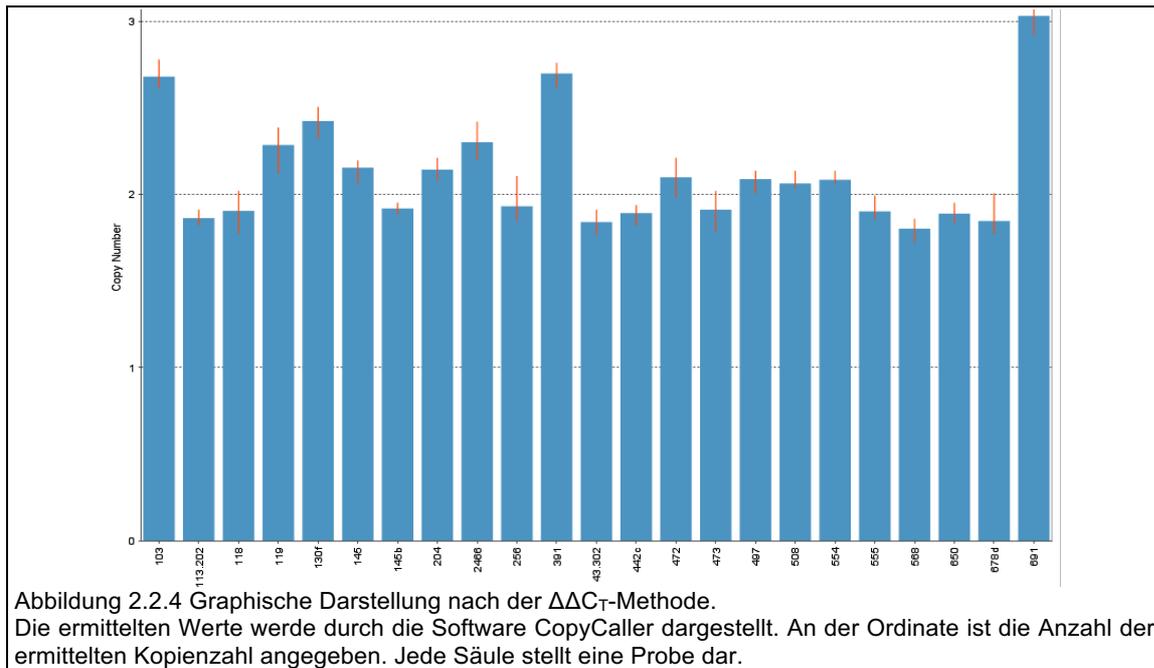
Quencher, versehen. Die verwendete AmpliTaq Gold DNA Polymerase besitzt zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'Exonukleaseaktivität. Während der Synthese des Gegenstranges baut die Polymerase daher die Sonde am 5'-Ende ab. Hierdurch entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden (s. Abb. 2.2.3).

Zur quantitativen Untersuchung des *SLC2A1*- und *PRRT2*-Gens wurden mehrere Sonden verwendet. Die verwendeten Sonden sind im Materialteil aufgelistet und können dort entnommen werden. Zur weiteren Durchführung wurde das TaqMan SNP Genotyping Assay Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Protokoll zur genauen praktischen Durchführung der Reaktion und der jeweiligen Pipettierschemata ist im Anhang ersichtlich (Protokoll zur Durchführung der Bestimmung der Copy Number Variations).





Die Datenauswertung erfolgte mittels relativer Quantifizierung und Berechnung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode durch die Software CopyCaller. Der Ct-Wert (cycle threshold, Schwellenwert) beschreibt den PCR Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt. Die ermittelten Ct-Werte der Probandengruppe wurden von den Ct-Werten der Referenz subtrahiert (ΔC_T Patienten-Probe) und auf die Kontrollgruppen bezogen ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ Patienten-Probe - ΔC_T Kontroll-Probe). Zur graphischen Darstellung wurde der ermittelte Wert in die folgende Gleichung eingesetzt: n-fache Expression (Gruppe A zu B) = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt (s.Abb. 2.2.4).



2.2.4. Statistische Analyse

Zur Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen genetischen Varianten und Merkmalen der untersuchten Stichprobe wurde eine Assoziationsanalyse durchgeführt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm R statistical environment v3.0.3 (<http://www.R-project.org/>). Die Referenzgruppe für die statistische Analyse basierte auf der öffentlich zugänglichen Datenbank dbSNP.

Bei der Durchführung von multiplen Paarvergleichen an einem Datensatz besteht die Gefahr der α -Inflation. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit steigt, dass eine Hypothese fälschlicherweise aufgrund eines Zufalls angenommen wird. Mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur kann einer Kumulierung des α -Fehlers (Fehler 1. Art) entgegengewirkt werden. Das statistische Signifikanzniveau sollte entsprechend der Häufigkeit des Testes angepasst werden, wenn n unabhängige Hypothesen für einen Datensatz getestet werden. Es resultiert folglich eine neue Signifikanzgrenze von $p' = p/n$. Hieraus ergab sich bei den gefundenen Polymorphismen im *SLC2A1* Gen ein Signifikanzniveau von $p = 0,01$ und für die Polymorphismen von *PRRT2* ein Signifikanzniveau von $p = 0,0125$.

2.2.4.1 Hardy Weinberg Equilibrium

Das Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) beschreibt das Verhältnis zwischen Allel- und Genotypfrequenzen. Diese bleiben in einer Population konstant, wenn es keine evolutionären Einflüsse gibt (Hardy, 1908). Die Häufigkeit der drei Genotypen (aa, Aa und AA) ergibt sich aus der Binomialbeziehung:

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: $(p + q)^2 = 1$

Dabei entspricht p der Häufigkeit des Allels A und q der Häufigkeit des Allels a.

Zur Berechnung dieses mathematischen Modells wird von dem Vorliegen einer in der Realität nicht vorzufindenden idealen Population ausgegangen. Das bedeutet, dass keine Evolution stattfindet und über Generationen hinweg unveränderte Allel- und Genotypenhäufigkeiten bestehen bleiben. Es liefert Hinweise zum Einfluss von Evolutionsfaktoren auf eine Population und überprüft systematische Genotypisierungsfehler (Teo et al., 2008). Um vorliegende Populationsstratifikationen aufzudecken, können experimentell ermittelte Häufigkeiten auf diese Weise den erwarteten Frequenzen gegenübergestellt werden.

Das HWE kam in der vorliegenden Studie zur Berechnung von erwarteten Genotypfrequenzen in einer idealen Population als Vergleichsstichprobe zur Anwendung. Die gefundenen Genotypfrequenzen wurden mit den nach HWE ermittelten Frequenzen verglichen, um Einflüsse von Populationsmerkmalen zu untersuchen.

2.2.4.2 Chi-Quadrat-Test nach Pearson

Der Chi-Quadrat Test dient zur Testung von Unterschieden in der Verteilung von Merkmalskombinationen einer Kontingenztafel. Dadurch kann in Anlehnung zum HWE überprüft werden, ob sich die Häufigkeit von Genotypen zwischen untersuchter Population und Vergleichsstichprobe unterscheiden.

In einer Kontingenztafel werden die in der Population beobachteten Merkmalsverteilungen der Genotypen und die in einer Vergleichspopulation erwarteten Merkmalsverteilungen gegenüber gestellt. Die folgende Vierfeldertafel zeigt eine schematische Kontingenztafel für zwei dichotome Merkmale.

| | | Merkmal X (Allel) | |
|---------------------------|--|------------------------|------------------------|
| Merkmal Y (Erkrankung) | | Ausprägung 1 (Allel A) | Ausprägung 2 (Allel a) |
| Ausprägung 1 (Kollektiv) | | a | b |
| Ausprägung 2 (Kontrollen) | | c | d |

Abbildung 2.2.5 Beispiel einer Kontingenztafel.
Dargestellt sind die Häufigkeiten der Merkmalsverteilungen.

Der Chi-Quadrat Test berechnet Abweichungen zwischen den beobachteten und erwarteten Häufigkeiten. Er wird definiert als:

$$\chi^2 = \text{Summe über alle Zellen der } \frac{(\text{beobachteten} - \text{erwarteten Häufigkeiten})^2}{\text{erwartete Häufigkeit}}$$

$$\chi^2 = \frac{n(ad - bc)^2}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

Die Hypothesen für den Test lauten:

Nullhypothese (H₀): Die Genotypfrequenzen in Patienten- (beobachtet) und Kontrollgruppe (erwartet) unterscheiden sich nicht.

Alternativhypothese (H_A): Die Genotypfrequenzen in Patienten-(beobachtet) und Kontrollgruppe (erwartet) unterscheiden sich.

Voraussetzungen für die Durchführung des Chi-Quadrat Testes ist eine Mindestzahl von fünf Beobachtungen pro Zelle.

2.2.4.3 Exakter Test nach Fisher

Der Chi-Quadrat Test nach Pearson stellt die Anforderung von mindestens fünf Beobachtungen pro Zelle. Diese Anforderung wird im Rahmen von genetischen Fragestellungen häufig nicht erfüllt. Als alternativer Test für die Fragestellung des Unterschiedes zwischen Stichprobe und Idealpopulation eignet sich der exakte Test nach Fisher. Aufgrund eines probabilistischen Modells kann auch mit geringerer Zellbesetzung gerechnet werden. Die Zielsetzung, Anwendung und Hypothesen sind analog zum Chi-Quadrat Test.

2.2.4.4 Cochran Armitage Trend Test

Der Cochran Armitage Trend Test testet Unterschiede zwischen zwei kategorialen Variablen und berücksichtigt dabei einen Trend in der Stärke des Einflusses der einen Variablen auf die Andere. Dies dient in diesem Zusammenhang dazu, eine mögliche erhöhte Wahrscheinlichkeit eines veränderten Phänotypes bei stärkeren Mutationen zu erfassen (unter der Annahme dass eine stärkere Mutation zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Krankheit führt). Der Armitage Trend-Test hat in Studien, in denen man von der Annahme ausgeht, dass die Krankheitswahrscheinlichkeit mit wachsenden Stufen des Risikofaktors steigt, eine bessere statistische Power als der Chi-Quadrat Test.

Die Hypothesen für den Test lauten:

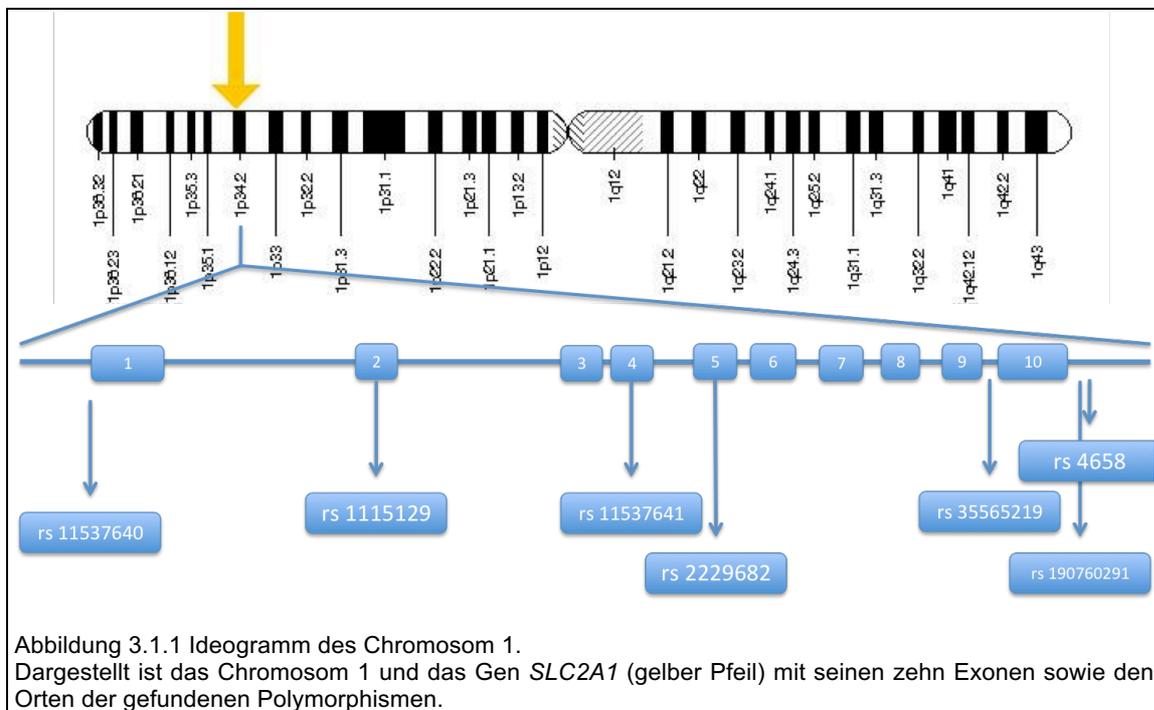
H0: Es zeigt sich kein Unterschied in der Frequenz der gefundenen Mutationen zwischen Probanden und Kontrollgruppe, unter Berücksichtigung des Schweregrad des Genotyps.

HA: Es zeigt sich ein Unterschied in der Frequenz der gefundenen Mutationen zwischen Probanden und Kontrollgruppe, unter Berücksichtigung des Schweregrad des Genotyps.

3 Ergebnisse

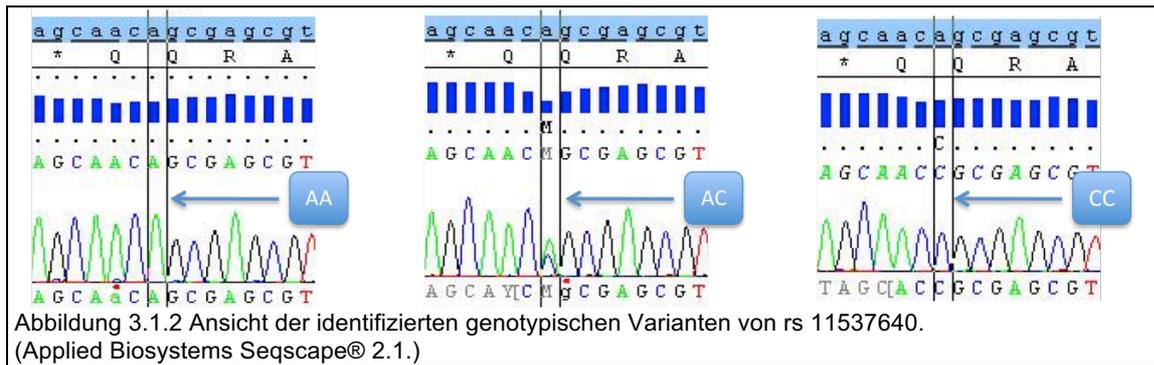
3.1. Das SLC2A1-Gen

Das *SLC2A1* Gen wurde bei allen Patienten analysiert, bei denen keine klassische Rolando Epilepsie vorlag. Hieraus ergab sich eine Gruppengröße von N = 80. Die DNA-Sequenzanalyse ergab insgesamt sieben identifizierte Polymorphismen, die bereits im Reference SNP Cluster Report verzeichnet sind. Die Referenzdatengrundlage bei allen Patienten war Contig NT_032977.9. Ein klinischer Effekt ist für die beschriebenen Polymorphismen bislang nicht bekannt. Außerdem konnten zwei neue bislang nicht vorbeschriebene Mutationen gefunden werden. Die Analyse der Kopienzahlvariationen ergab bei dem *SLC2A1* Gen keinerlei Auffälligkeiten.



3.1.1. Polymorphismus rs 11537640

Der Polymorphismus rs 11537640 wurde im untersuchten Kollektiv bei 21 Patienten gefunden. In 19 Fällen trat er heterozygot, in zwei Fällen homozygot auf. Bei rs 11537640 handelt es sich um einen Basenaustausch an Position 43424519 bei welchem die Nucleinbase Adenosin durch Cytosin ersetzt wird.



Aufgrund der Position im Intron hat die Punktmutation keinen unmittelbaren Einfluss auf die Proteinbiosynthese. Es wurde bei exonnaher Position des Polymorphismus eine Splice-Site Analyse mit dem Analyseprogramm NNSPLICE 0.9, bereitgestellt durch das BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project), durchgeführt. Unter Spleißstelle (englisch = splice-site) versteht man die Grenze zwischen Intron und Exon, an der das sog. Spliceosom, ein Komplex aus Ribonukleinsäure und Protein, die Introns aus der prä-mRNA nach erfolgter Transkription herausschneidet. Sowohl bei der Wildtypsequenz als auch bei dem Polymorphismus rs 11537640 wurden nach Angaben des Analyseprogramms die Spleißstellen identisch und mit gleicher Zuverlässigkeit (Wahrscheinlichkeitsscore = 0,7) erkannt. Ein Einfluss der Punktmutation auf das Spleißverhalten konnte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Im untersuchten Kollektiv wurden die Frequenzen für den homozygoten Wildtypus (AA) mit 0,74, für das heterozygote (CA) Auftreten des Polymorphismus mit 0,24 und für die homozygote Punktmutation (CC) mit 0,02 bestimmt.

Tabelle 3.1-1 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 11537640.

| Genotyp | Absolut (n=80) | Frequenz |
|---------|----------------|----------|
| AA | 59 | 0,74 |
| CA | 19 | 0,24 |
| CC | 2 | 0,02 |

Grundlage der Berechnung der Genotypfrequenzen in einer Idealpopulation mit Hilfe des Hardy Weinberg Equilibriums waren die in der Datenbank unter der Referenznummer ss23075545 angegebenen Frequenzen für das major allel A von

0,81 und das minor allele C von 0,19. Daraus ergaben sich die Genotypfrequenzen von 0,66 für den Genotyp AA, 0,3 für den Genotyp CA und 0,04 für den Genotyp CC. Die hieraus ermittelten erwarteten Häufigkeiten für die untersuchte Stichprobe betragen 53 (AA), 24 (CA) und 3 (CC).

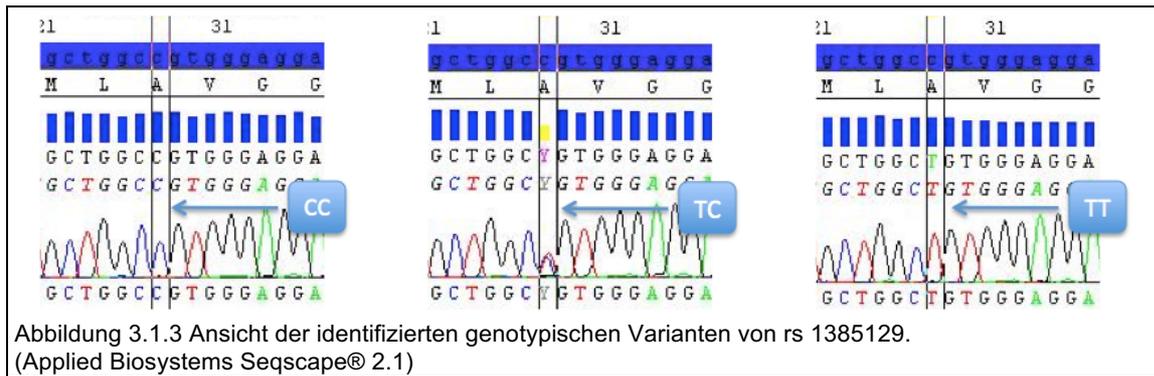
Die Voraussetzung für die Anwendung eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson von mindestens fünf Beobachtungen pro Zelle wurde nicht erfüllt. Der Fisher's Exact Test zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenzen zwischen den Probanden und den Kontrollen ($p = 0,604$).

Der Cochran Armitage Test for Trends zeigte unter Berücksichtigung der ordinalen Sortierung des Schweregrades keine signifikanten Unterschiede zwischen untersuchtem Kollektiv und Kontrollgruppe ($p = 0,276$).

Die Nullhypothesen konnten nicht abgelehnt werden, d.h. es konnte keine abweichende Häufung des detektierten Polymorphismus bei den untersuchten Patienten gefunden werden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass der detektierte Polymorphismus nicht für das Auftreten einer atypischen Rolando Epilepsie prädisponiert.

3.1.2. Polymorphismus rs 1385129

Der Polymorphismus rs 1385129 wurde insgesamt bei 21 Patienten identifiziert. Davon stellte sich die Mutation in 20 Fällen heterozygot und in einem Fall homozygot dar. Bei rs 1385129 handelt es sich um einen Basenaustausch der Nucleinbase Cytosin durch Thymin (C > T) innerhalb des Exon 2 an Position 41649281. Der Austausch der Nucleinbasen führt zur Bildung des Basentriplets GCT statt GCC. Bei der Transkription werden die Nucleinbasen der DNA (A-T-G-C) in die Nucleinbasen der RNA (A-U-G-C) umgeschrieben. Die hieraus resultierenden RNA-Triplets GCU und auch GCC kodieren beide für die Aminosäure Alanin (Ala, A). Im Rahmen der Proteinbiosynthese erfolgt somit während der Translation kein Austausch einer Aminosäure. Die Proteinfunktion bleibt erhalten. Man spricht daher von einer stillen Mutation.



Im untersuchten Kollektiv wurden die Frequenzen für den homozygoten Wildtypus (CC) mit 0,74, für das heterozygote (TC) Auftreten des Polymorphismus mit 0,25 und für die homozygote Punktmutation (TT) mit 0,01 bestimmt.

Tabelle 3.1-2 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 1385129.

| Genotyp | Absolut (n=80) | Frequenz |
|---------|----------------|----------|
| CC | 59 | 0,74 |
| TC | 20 | 0,25 |
| TT | 1 | 0,01 |

Grundlage der Berechnung der erwarteten Häufigkeiten mit Hilfe des Hardy Weinberg Equilibriums waren die in der Datenbank unter der Referenznummer ss48421149 angegebenen Frequenzen für das major allel C von 0,778 und das minor allel T von 0,222. Daraus ergaben sich die Genotypfrequenzen von 0,61 für den Genotyp CC, 0,33 für den Genotyp TC und 0,06 für den Genotyp TT. Die hieraus ermittelten erwarteten Häufigkeiten für die untersuchte Stichprobe betragen 49 (CC), 27 (TC) und 4 (TT).

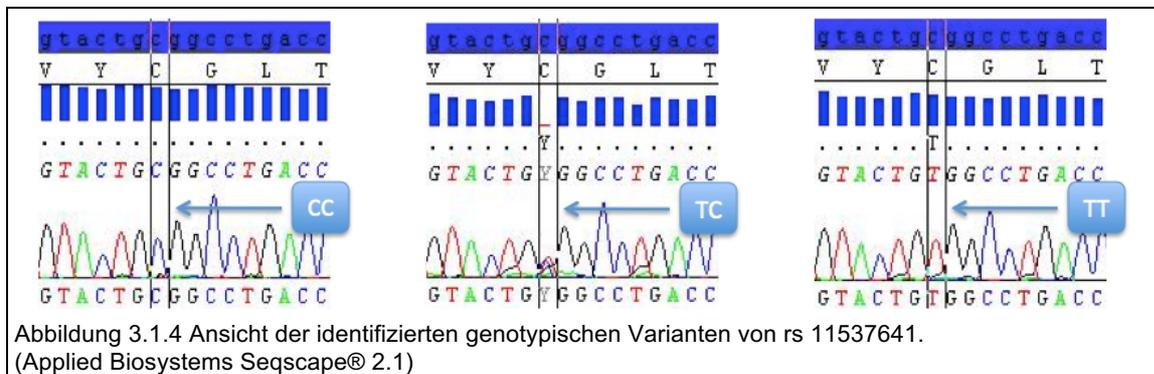
Die Voraussetzung für die Anwendung eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson von mindestens fünf Beobachtungen pro Zelle wurde nicht erfüllt. Der Fisher's Exact Test zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenzen zwischen den Probanden und den Kontrollen ($p = 0,177$).

Der Cochran Armitage Test for Trends zeigte unter Berücksichtigung der ordinalen Sortierung des Schweregrades keine signifikanten Unterschiede zwischen untersuchtem Kollektiv und Kontrollgruppe ($p = 0,057$).

Die Nullhypothesen konnten nicht abgelehnt werden, d.h. es konnte keine abweichende Häufung des detektierten Polymorphismus bei den untersuchten Patienten gefunden werden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass der detektierte Polymorphismus nicht für das Auftreten einer atypischen Rolando Epilepsie prädisponiert.

3.1.3. Polymorphismus rs 11537641

Bei insgesamt 19 Patienten konnte der Polymorphismus rs 11537641 identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um einen Basenaustausch an Position 43396414 bei dem die Nucleinbase Cytosin durch Thymin ersetzt wird. Der Basenaustausch führt zu keinem Aminosäureaustausch, da sowohl das Basentriplett TGC als auch das Basentriplett TGT für die Aminosäure Cystein (Cys, C) kodieren. Ebenso wie beim zuvor beschriebenen Polymorphismus handelt es sich folglich um eine stille Mutation.



Im untersuchten Kollektiv wurden die Frequenzen für den homozygoten Wildtypus (CC) mit 0,76, für das heterozygote (TC) Auftreten des Polymorphismus mit 0,2 und für die homozygote Punktmutation (TT) mit 0,04 bestimmt.

Tabelle 3.1-3 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 11537641.

| Genotyp | Absolut (n=80) | Frequenz |
|---------|----------------|----------|
| CC | 61 | 0,76 |
| TC | 16 | 0,20 |
| TT | 3 | 0,04 |

Grundlage der Berechnung der Genotypfrequenzen in einer Idealpopulation mithilfe des Hardy Weinberg Equilibriums waren die in der Datenbank unter der

Referenznummer ss24791569 angegebenen Frequenzen für das major allel C von 0,77 und das minor allel T von 0,23. Daraus ergaben sich die Genotypfrequenzen von 0,58 für den Genotyp CC, 0,39 für den Genotyp TC und 0,03 für den Genotyp TT. Die hieraus ermittelten erwarteten Häufigkeiten für die untersuchte Stichprobe betragen 46 (CC), 31 (TC) und 3 (TT).

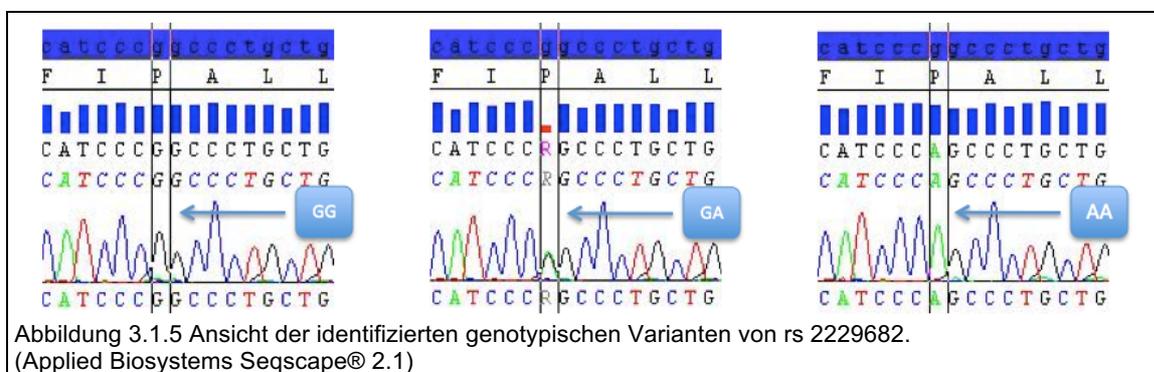
Die Voraussetzung für die Anwendung eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson von mindestens fünf Beobachtungen pro Zelle wurde nicht erfüllt. Der Fisher's Exact Test zeigte keine signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenzen zwischen den Probanden und den Kontrollen ($p = 0,032$) unter gleichzeitiger Beachtung der Bonferroni Korrektur.

Der Cochran Armitage Test for Trends zeigte unter Berücksichtigung der ordinalen Sortierung des Schweregrades keine signifikanten Unterschiede zwischen untersuchtem Kollektiv und Kontrollgruppe ($p = 0,033$).

Die Nullhypothesen konnten nicht abgelehnt werden, d.h. es konnte keine abweichende Häufung des detektierten Polymorphismus bei den untersuchten Patienten gefunden werden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass der detektierte Polymorphismus nicht für das Auftreten einer atypischen Rolando Epilepsie prädisponiert.

3.1.4. Polymorphismus rs 2229682

Bei insgesamt 20 Patienten konnte der Polymorphismus rs 2229682 in Exon 5 des *SLC2A1* Gens an der Chromosomenposition 43395635 gefunden werden. Es handelt sich hierbei um eine stille Mutation, bei der die Base Guanin durch Alanin ersetzt wird. Das daraus resultierende Basentriplett CCA codiert ebenso wie das Referenztriplett CCG für die Aminosäure Prolin.



Im untersuchten Kollektiv wurden die Frequenzen für den homozygoten Wildtypus (GG) mit 0,75, für das heterozygote (GA) Auftreten des Polymorphismus mit 0,2 und für die homozygote Punktmutation (AA) mit 0,05 bestimmt.

Tabelle 3.1-4 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 2229682.

| Genotyp | Absolut (n=80) | Frequenz |
|---------|----------------|----------|
| GG | 60 | 0,75 |
| GA | 16 | 0,20 |
| AA | 4 | 0,05 |

Grundlage der Berechnung der Genotypfrequenzen in einer Idealpopulation mit Hilfe des Hardy Weinberg Equilibriums waren die in der Datenbank unter der Referenznummer ss24240819 angegebenen Frequenzen für das major allel G von 0,825 und das minor allel A von 0,175. Daraus ergaben sich die Genotypfrequenzen von 0,68 für den Genotyp GG, 0,29 für den Genotyp GA und 0,03 für den Genotyp AA. Die hieraus ermittelten erwarteten Häufigkeiten für die untersuchte Stichprobe betragen 55 (GG), 23 (GA) und 2 (AA).

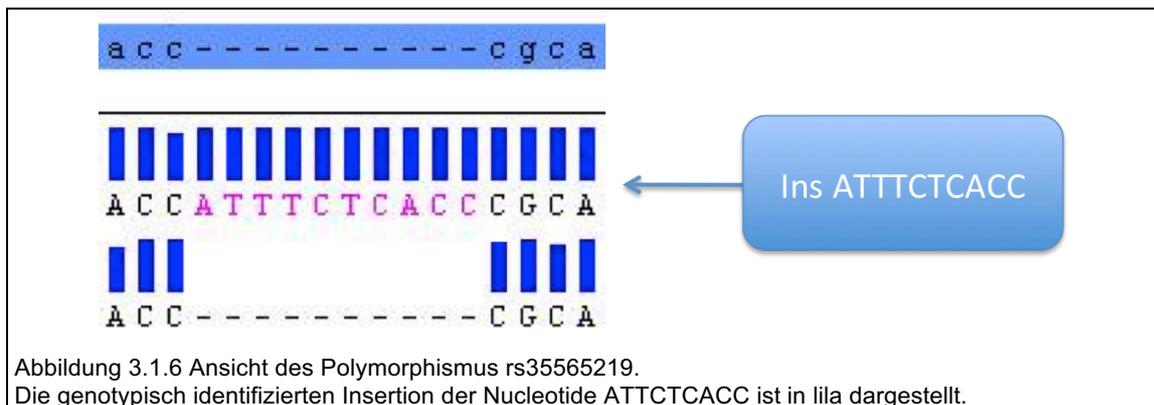
Die Voraussetzung für die Anwendung eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson von mindestens fünf Beobachtungen pro Zelle wurde nicht erfüllt. Der Fisher's Exact Test zeigte keine signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenzen zwischen den Probanden und den Kontrollen ($p = 0,38$).

Der Cochran Armitage Test for Trends zeigte unter Berücksichtigung der ordinalen Sortierung des Schweregrades keine signifikanten Unterschiede zwischen untersuchtem Kollektiv und Kontrollgruppe ($p = 0,66$).

Die Nullhypothesen konnten nicht abgelehnt werden, d.h. es konnte keine abweichende Häufung des detektierten Polymorphismus bei den untersuchten Patienten gefunden werden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass der detektierte Polymorphismus nicht für das Auftreten einer atypischen Rolando Epilepsie prädisponiert.

3.1.5. Polymorphismus rs 35565219

Bei 14 Patienten konnte der Polymorphismus rs 35565319 im Intron, 30 Basenpaare hinter dem Exon 9 zwischen der Chromosomenposition 43393246 und 43393247 ausfindig gemacht werden. Es handelt sich hierbei um eine Mutation, bei der zusätzliche Nucleotide in die DNA eingebaut wurden, eine sog. Insertion. Im vorliegenden Fall wurden die Nucleotide ATTCTCACC zusätzlich eingebaut.

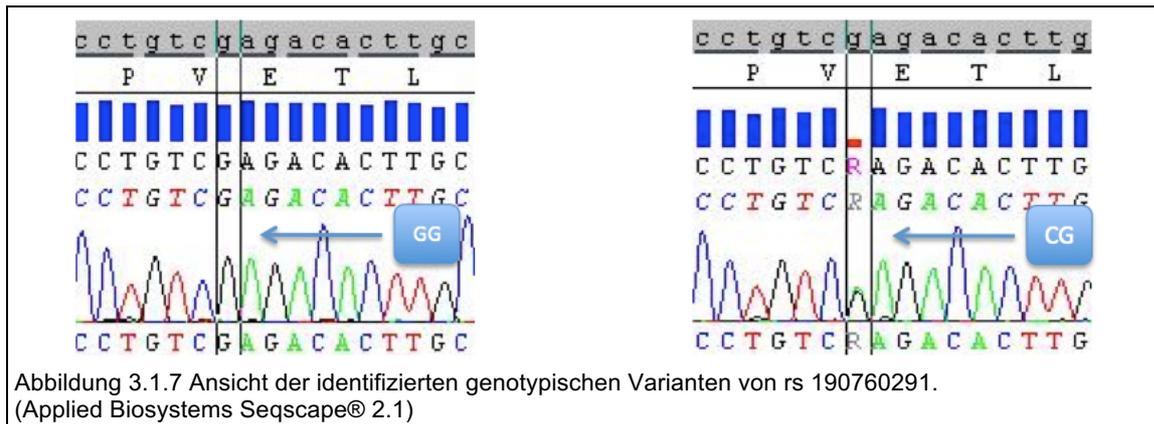


Aufgrund der exonnahen Lage wurde bei der gefundenen Mutation eine Splice-Site Analyse mit dem Analyseprogramm NNSPLICE 0.9 durchgeführt. Sowohl bei der Wildtypsequenz als auch bei dem Polymorphismus rs 35565219 wurden nach Angaben des Analyseprogramms die Spleißstellen identisch und mit gleicher Zuverlässigkeit (Wahrscheinlichkeitsscore = 0,92) erkannt. Ein Einfluss der Punktmutation auf das Spleißverhalten konnte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die Mutation trat im untersuchten Kollektiv in einer Frequenz von 0,175 auf. Der Polymorphismus war zwar im Reference SNP Cluster Report verzeichnet, jedoch lagen keine Daten bezüglich der Häufigkeiten in der Normalbevölkerung vor, so dass auf weitere statistische Analysen verzichtet werden musste.

3.1.6. Polymorphismus rs 190760291

Bei zwei Patienten konnte im untersuchten Kollektiv im Intron, 346 Basenpaare hinter dem Exon 10, ein Basenaustausch der Nucleinbase Guanin zu Cytosin detektiert werden. Die Punktmutation tritt an Position 43392366 auf und ist im Reference SNP Cluster Report unter der Bezeichnung rs 190760291 verzeichnet.

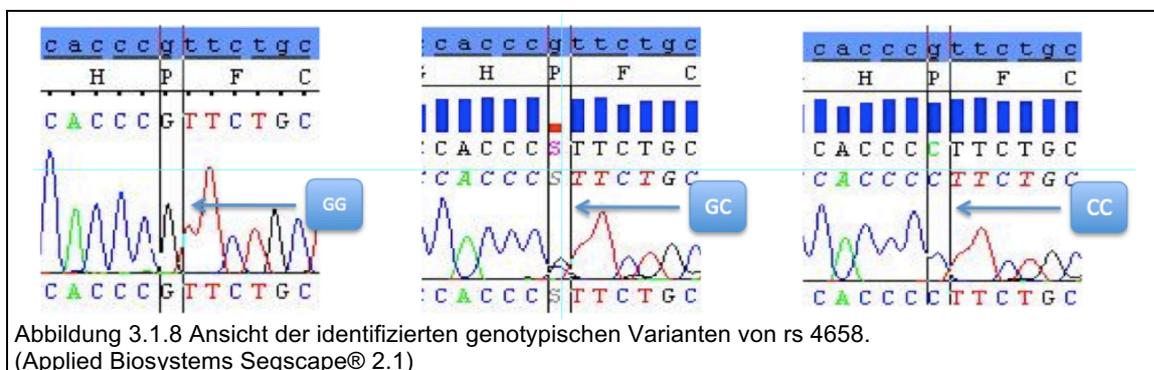


Aufgrund der exonnahen Lage wurde bei der gefundenen Mutation eine Splice-Site Analyse mit dem Analyseprogramm NNSPLICE 0.9 durchgeführt. Sowohl bei der Wildtypsequenz als auch bei dem Polymorphismus rs 35565219 wurden nach Angaben des Analyseprogramms die Spleißstellen identisch und mit gleicher Zuverlässigkeit (Wahrscheinlichkeitsscore = 0,95) erkannt. Ein Einfluss der Punktmutation auf das Spleißverhalten konnte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden

Die Mutation trat im untersuchten Kollektiv in einer Frequenz von 0,175 auf. Der Polymorphismus war zwar im Reference SNP Cluster Report verzeichnet, jedoch lagen keine Daten bezüglich der Häufigkeiten in der Normalbevölkerung vor, so dass auf weitere statistische Analysen verzichtet werden musste.

3.1.7. Polymorphismus rs 4658

Bei insgesamt 15 Patienten konnte an der Chromosomenposition 43392250 im Intron 462 Basenpaare hinter Exon 10 ein weiterer Polymorphismus detektiert werden. Es zeigte sich hier ein Basenaustausch der Base Guanin zu Cytosin.



Bei 13 Patienten lag die Mutation heterozygot vor, bei zwei Patienten homozygot. Daraus ergaben sich bezüglich der Häufigkeiten des Auftretens der Genotypen für den Wildtyp (GG) eine Frequenz von 0,81, für die heterozygote Mutation (GA) eine Frequenz von 0,16 und für die homozygote Mutation (AA) eine Frequenz von 0,03.

Tabelle 3.1-5 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 4658.

| Genotyp | Absolut (n=80) | Frequenz |
|---------|----------------|----------|
| GG | 65 | 0,81 |
| CG | 13 | 0,16 |
| CC | 2 | 0,03 |

Aufgrund der exonnahen Lage wurde bei der gefundenen Mutation eine Splice-Site Analyse mit dem Analyseprogramm NNSPLICE 0.9 durchgeführt. Sowohl bei der Wildtypsequenz als auch bei dem Polymorphismus rs 4658 wurden nach Angaben des Analyseprogramms die Spleißstellen identisch und mit gleicher Zuverlässigkeit (Wahrscheinlichkeitsscore = 0,72) erkannt. Ein Einfluss der Punktmutation auf das Spleißverhalten konnte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Grundlage der Berechnung der Genotypfrequenzen in einer Idealpopulation mit Hilfe des Hardy Weinberg Equilibriums waren die in der Datenbank unter der Referenznummer ss52079079 angegebenen Frequenzen für das major allel G von 0,75 und das minor allel C von 0,25. Daraus ergaben sich die Genotypfrequenzen von 0,53 für den Genotyp GG, 0,43 für den Genotyp CG und 0,04 für den Genotyp CC. Die hieraus ermittelten erwarteten Häufigkeiten für die untersuchte Stichprobe betragen 43 (GG), 34 (CG) und 3 (CC).

Die Voraussetzung für die Anwendung eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson von mindestens fünf Beobachtungen pro Zelle wurde nicht erfüllt. Der Fisher's Exact Test zeigte signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenzen zwischen den Probanden und den Kontrollen ($p = 0,0037$), d.h. mehr GG als erwartet und mehr CG als erwartet.

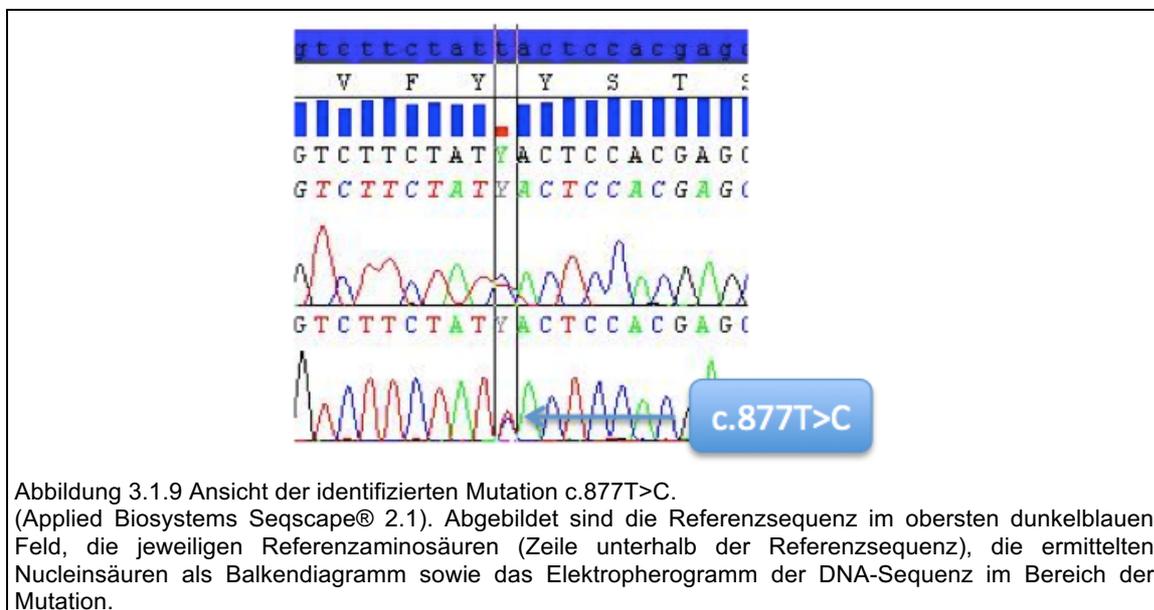
Der Cochran Armitage Test for Trends zeigte unter Berücksichtigung der ordinalen Sortierung des Schweregrades ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen untersuchtem Kollektiv und Kontrollgruppe ($p = 0,00076$).

Die Nullhypothesen konnten abgelehnt werden, d.h. es konnte eine abweichende Häufung des detektierten Polymorphismus bei den untersuchten Patienten gefunden werden. Der Polymorphismus trat signifikant seltener auf als erwartet. Eine Assoziation des detektierten Polymorphismus zu atypischen Rolando-Epilepsien ist daher eher unwahrscheinlich.

3.1.8. Mutation c.877t>c, Tyr293His

Zusätzlich fanden wir in Exon 7 bei einem Patienten eine heterozygot vorliegende Mutation. Bei diesem Patienten zeigten sich elektroenzephalographisch zentrotemporale Spikes mit anamnestisch vorliegenden Anfällen ähnlich den BECTS. Zusätzlich zeigte das betroffene Kind klinisch myoklonische Absenzen und eine paroxysmale Choreoathetose. Der Indexpatient wurde folglich als mögliche ARE mit zusätzlicher Choreoathetose klassifiziert.

Bei der gefundenen Mutation handelte es sich um einen Basenaustausch 10 Basen hinter dem Beginn des Exon 7. Die Nucleinsäure Thymin wurde durch die Base Cystein ersetzt. Der Basentausch resultiert in dem Basentriplett CAC, welches für die Aminosäure Histidin codiert. Beim Wildtyp liegt an dieser Position das Basentriplett CAC, welches für die Aminosäure Tyrosin codiert vor. Es handelt sich bei der gefundenen Veränderung folglich um eine neue nicht synonyme Mutation.



Die vorliegende Mutation war in den internationalen Datenbanken bislang noch nicht beschrieben. Die durchgeführte bioinformatische Bewertung mittels der Software „PolyPhen-2“, welche evolutionäre Konservierung, biochemische Eigenschaften der

jeweiligen Aminosäuren, Lokalisierung in funktionell wichtigen Proteindomänen und Veränderungen im Spleißverhalten miteinbezieht ergab eine Klassifizierung als „probably damaging“ (Score 0,991). In der Literatur wird für „PolyPhen-2“ die Rate an „falsch positiv“ vorhergesagten Mutationen mit ca. 20 % angegeben, dabei liegt die Rate an korrekt vorhergesagten „true positives“ bei ca. 75 %. Da es sich hierbei um eine bioinformatische Bewertung handelt, muss die klinische Relevanz dieser Mutation im Zusammenhang mit der Familienanamnese bewertet werden.

Eine weitere Analyse der Mutation mittels der Software Mutation Taster ergab die Vorhersage „disease causing“ mit einem p-Wert von 0,99.

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei der Mutation um eine Neumutation oder eine vom Elternteil vererbte Mutation handelte, wurde der betroffene Genabschnitt der elterlichen DNA ebenfalls untersucht. Bei beiden Elternteilen fanden sich keine Sequenzabweichungen.

Die Auswirkungen der Mutation auf die Proteinstruktur wurde mit dem Programm Phyre2 prognostiziert und in Abb. 3.1.10 dargestellt. Es wurde eine zusätzliche Faltung einer intrazellulären Schleife vorhergesagt.

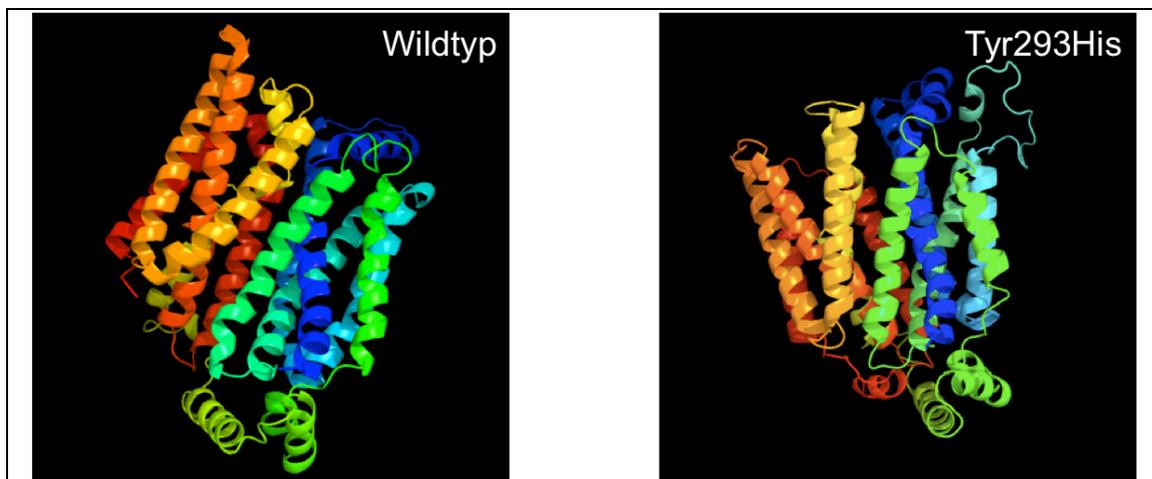


Abbildung 3.1.10 Mutationsauswirkungen von c.877T>C auf die Proteinstruktur.

Links ist die dreidimensionale Proteinstruktur des Wildtypes (WT) und rechts die dreidimensionale Proteinstruktur der gefundenen Mutation modelliert. Die prognostizierte dreidimensionale Struktur beider Proteinvarianten wurde mit Jmol visualisiert. Die Zuverlässigkeit der vorhergesagten Modelle wird mit >75% für WT und Mutante bewertet.

3.1.9. Mutation c.715_716insC, His239Pfs*2

In Exon 6 konnte außerdem eine heterozygot vorliegende Mutation detektiert werden. Bei dem Indexpatienten zeigten sich elektroenzephalographisch zentrotemporale Spikes mit anamnestisch vorliegenden Anfällen ähnlich den BECTS. Zusätzlich zeigte das betroffene Kind eine ataktisch-dystone Bewegungsstörung, eine globale

Entwicklungsverzögerung sowie eine sekundäre Mikrozephalie. Der Indexpatient wurde folglich als mögliche ARE klassifiziert.

Bei der gefundenen Mutation handelte es sich um eine Insertion der Nucleinbase Cytosin an der Aminosäureposition 239. Hierdurch kommt es zu einer Leserasterverschiebung (frameshift) mit einer veränderten Aminosäuresequenz (H239Pfs*2), welche Auswirkungen auf die Proteinstruktur haben kann.

Die vorliegende Mutation war in den internationalen Datenbanken bislang noch nicht beschrieben. Die durchgeführte bioinformatische Bewertung mittels der Software „Mutation Taster“ ergab eine Klassifizierung als „disease causing“ ($p=1$). Mutation Taster deklariert jedoch alle Sequenzveränderungen als krankheitsverursachend, sobald sie zu einer Veränderung der Position des Stoppcodons führen. Zur endgültigen Bewertung dieser Mutation muss daher die klinische Relevanz dieser Mutation im Zusammenhang mit der Familienanamnese betrachtet werden.

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei der Mutation um eine Neumutation oder eine vom Elternteil vererbte Mutation handelte, wurde der betroffene Genabschnitt der elterlichen DNA ebenfalls untersucht. Zur Überprüfung einer möglichen familiären Segregation stand jedoch nur DNA der Kindsmutter zur Verfügung, deren Sequenz homozygot den WT zeigte.

Die Auswirkungen der Mutation auf die Proteinstruktur wurde mit dem Programm Phyre2 prognostiziert und ist in Abb. 3.1.11 dargestellt.

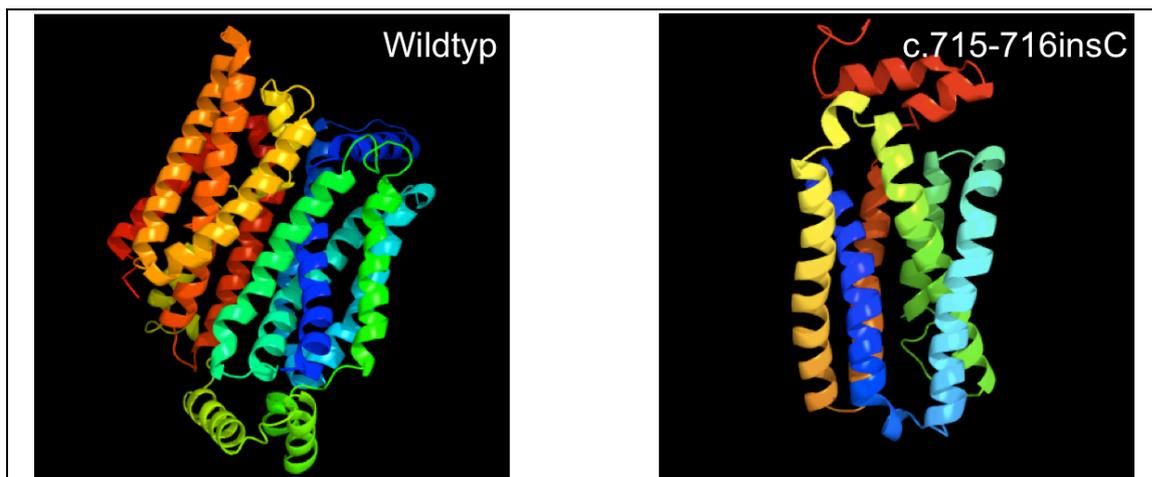


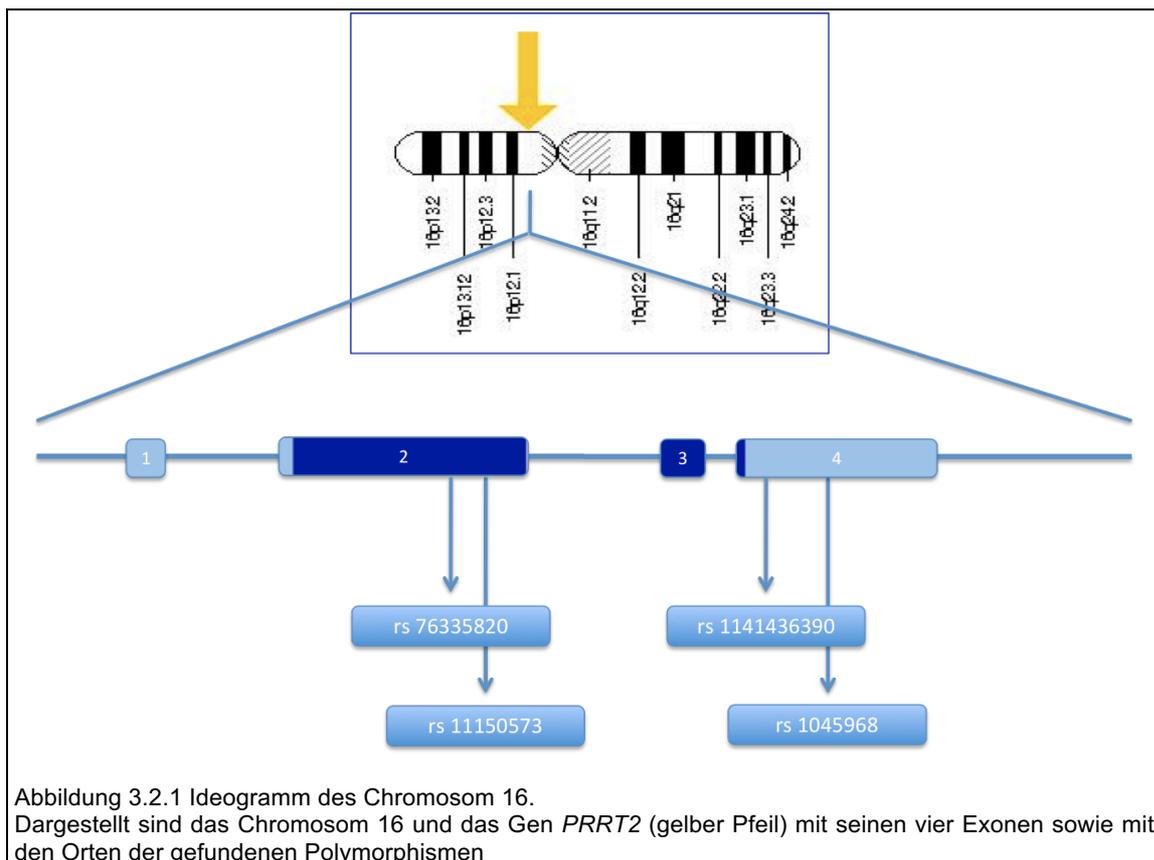
Abbildung 3.1.11 Mutationsauswirkungen von 715_716insC auf die Proteinstruktur. Links ist die dreidimensionale Proteinstruktur des Wildtypes und rechts die dreidimensionale Proteinstruktur der gefundenen Mutation modelliert. Die prognostizierte dreidimensionale Struktur beider Proteinvarianten wurde mit Jmol visualisiert. Die Zuverlässigkeit der vorhergesagten Modelle wird mit $>75\%$ für WT und Mutante bewertet.

3.1.10. Analyse der Kopienzahlvariationen bei *SLC2A1*

Bei allen insgesamt 80 analysierten Patienten und Probanden konnte keine Deletion oder Duplikation einzelner Exone des *SLC2A1* Gens gefunden werden.

3.2. Das PRRT2-Gen

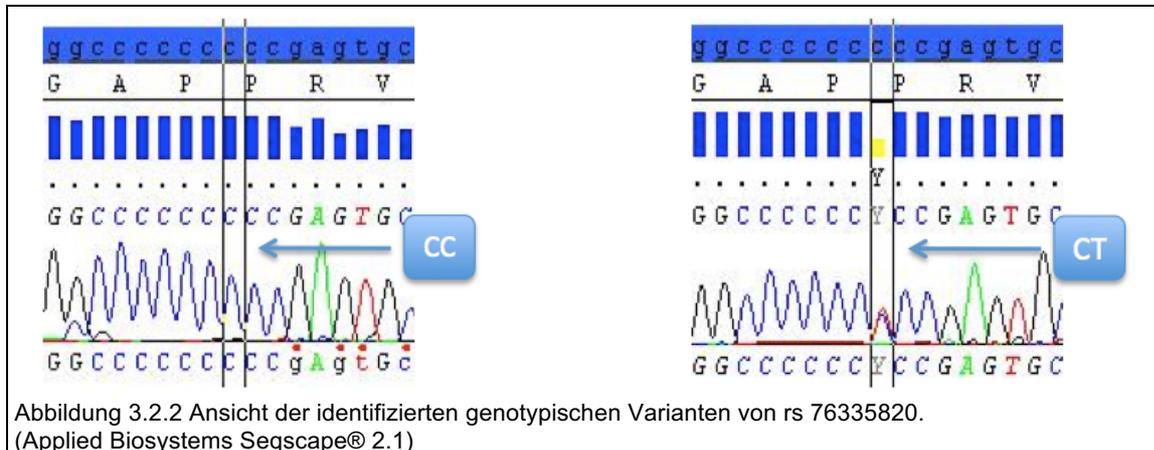
Das *PRRT2* Gen wurde bei allen Patienten analysiert, bei denen die Diagnosekriterien die unter 2.2.1 erwähnt wurden vorlagen. Aufgrund von Unstimmigkeiten in den diagnostischen Zuschreibungen musste bei insgesamt 6 Patienten festgestellt werden, dass die Diagnosekriterien einer klassischen Rolandoepilepsie nicht hinreichend erfüllt waren. Hieraus ergab sich daher eine Gruppengröße von $N = 193$. Die Sequenzanalyse ergab insgesamt vier identifizierte Polymorphismen die bereits im Reference SNP Cluster Report verzeichnet sind. Die Referenzdatengrundlage bei allen Patienten war Contig NT_010393.15. Ein klinischer Effekt ist für die beschriebenen Polymorphismen bislang unbekannt. Außerdem wurde bei Verwendung von WGA-DNA die häufige, bereits vorbeschriebene Mutation c.649-650insC gefunden, die als wahrscheinlich krankheitsverursachend gilt. Die Analyse der Kopienzahlvariationen ergab bei insgesamt vier Patienten eine komplette Duplikation des *PRRT2* Gens. In diesen Fällen wurde zusätzlich eine Segregationsanalyse durchgeführt.



3.2.1. Polymorphismus rs 76335820

Der Polymorphismus rs 76335820 wurde im untersuchten Kollektiv bei 4 Patienten gefunden. In den detektierten Fällen trat der Polymorphismus jeweils heterozygot auf. Bei rs 76335820 handelt es sich um einen Basenaustausch an Position 29765022 bei

welchem die Nucleinbase Cytosin durch Thymin ersetzt wird. Der Basentausch resultiert in dem Basentriplett CTC, welches für die Aminosäure Leucin codiert. Beim Wildtyp liegt an dieser Position das Basentriplett CCC, welches für die Aminosäure Prolin codiert vor. Es handelt sich bei der gefundenen Veränderung folglich um eine nicht synonyme Mutation.



Die vorliegende Mutation war in den internationalen Datenbanken bereits beschrieben. Auch Heron et al fanden in einer 2012 durchgeführten Studie die Mutation bei insgesamt 5,2 % eines gesunden australischen Kontrollkollektivs (Heron et al., 2012). Eine pathogene Wirkung des Polymorphismus wurde bislang nicht beschrieben. Ein Aminosäurewechsel an gleicher Position durch Guanin hingegen (c.747C > G) steht in enger Assoziation zu PKD.

Im untersuchten Kollektiv wurden die Frequenzen für den homozygoten Wildtypus (CC) mit 0,98, für das heterozygote (CT) Auftreten des Polymorphismus mit 0,02 und für die weitere heterozygote Punktmutation (AC) mit 0,00 bestimmt.

Tabelle 3.2-1 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 76335820.

| Genotyp | Absolut (n=193) | Frequenz |
|---------|-----------------|----------|
| CC | 189 | 0,98 |
| CT | 4 | 0,02 |
| AC | 0 | 0,00 |

Grundlage der Berechnung der Genotypfrequenzen in einer Idealpopulation mit Hilfe des Hardy Weinberg Equilibriums waren die in der Datenbank unter der

Referenznummer ss491716767 angegebenen Genotypfrequenzen von 0,96 für den Genotyp CC, 0,03 für den Genotyp CT und 0,01 für den Genotyp AT. Die hieraus ermittelten erwarteten Häufigkeiten für die untersuchte Stichprobe betragen 185 (CC), 6 (CT) und 2 (AT).

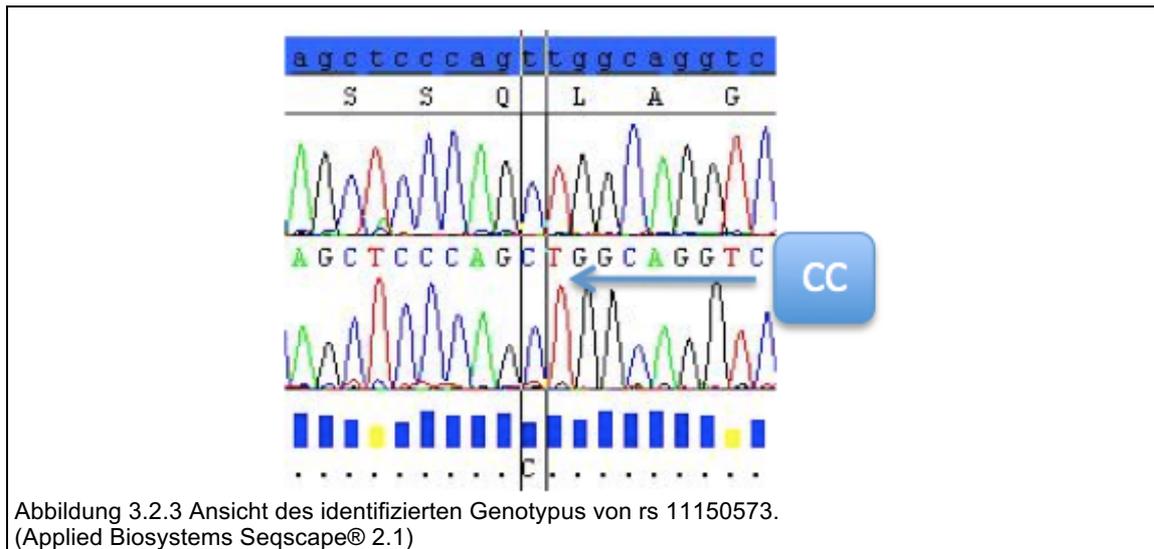
Die Voraussetzung für die Anwendung eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson von mindestens fünf Beobachtungen pro Zelle wurde nicht erfüllt. Der Fisher's Exact Test zeigte keine signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenzen zwischen den Probanden und den Kontrollen ($p = 0,32$).

Der Cochran Armitage Test for Trends zeigte unter Berücksichtigung der ordinalen Sortierung des Schweregrades keine signifikanten Unterschiede zwischen untersuchtem Kollektiv und Kontrollgruppe ($p = 0,15$).

Die Nullhypothesen konnten nicht abgelehnt werden, d.h. es konnte keine abweichende Häufung des detektierten Polymorphismus bei den untersuchten Patienten gefunden werden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass der detektierte Polymorphismus nicht für das Auftreten einer idiopathisch fokalen Epilepsie mit CTS prädisponiert.

3.2.2. Polymorphismus rs 11150573

Der Polymorphismus rs 11150573 wurde bei allen 193 Indexpatienten identifiziert. Die Mutation stellte sich stets homozygot dar. Bei rs 11150573 handelt es sich um einen Basenaustausch der Nucleinbase Thymin durch Cytosin (T > C) innerhalb des Exon 2 an Position 29765126. Der Austausch der Nucleinbasen führt zur Bildung des Basentriplets CTG statt TTG. Die hieraus resultierenden RNA-Triplets kodieren beide für die Aminosäure Leucin (Leu, L). Im Rahmen der Proteinbiosynthese erfolgt somit während der Translation kein Austausch einer Aminosäure. Die Proteinfunktion bleibt erhalten. Es lag somit eine stille Mutation vor.



Im untersuchten Kollektiv wurden die Frequenzen für den homozygoten Wildtypus (CC) mit 1,0, für das heterozygote (CT) Auftreten des Polymorphismus mit 0,0 und für die homozygote Punktmutation (TT) mit 0,0 bestimmt.

Tabelle 3.2-2 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 11150573.

| Genotyp | Absolut (n=193) | Frequenz |
|---------|-----------------|----------|
| TT | 193 | 1,00 |
| TC | 0 | 0,00 |
| CC | 0 | 0,00 |

Grundlage der Berechnung der Genotypfrequenzen in einer Idealpopulation mit Hilfe des Hardy Weinberg Equilibriums waren die in der Datenbank unter der Referenznummer ss342425499 angegebenen Frequenzen für das major allel C von 0,991 und das minor allel T von 0,009. Daraus ergaben sich die Genotypfrequenzen von 0,98 für den Genotyp CC, 0,02 für den Genotyp CT und 0,00 für den Genotyp TT. Die hieraus ermittelten erwarteten Häufigkeiten für die untersuchte Stichprobe betragen 189 (CC), 4 (CT) und 0 (TT).

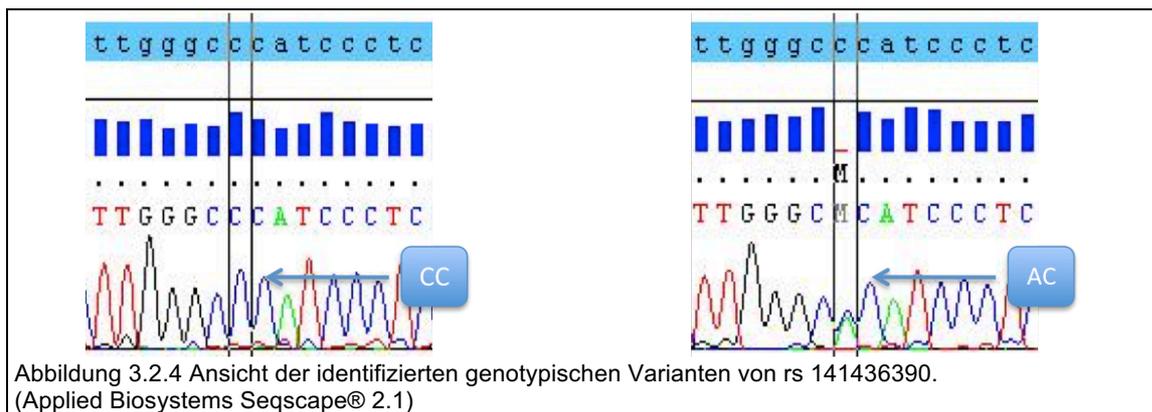
Die Voraussetzung für die Anwendung eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson von mindestens fünf Beobachtungen pro Zelle wurde nicht erfüllt. Der Fisher's Exact Test zeigte keine signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenzen zwischen den Probanden und den Kontrollen ($p = 0,12$).

Der Cochraner Armitage Test for Trends zeigte unter Berücksichtigung der ordinalen Sortierung des Schweregrades keine signifikanten Unterschiede zwischen untersuchtem Kollektiv und Kontrollgruppe ($p = 0,044$) unter Beachtung der Bonferroni Adjustierung.

Die Nullhypothesen konnten nicht abgelehnt werden, d.h. es konnte keine abweichende Häufung des detektierten Polymorphismus bei den untersuchten Patienten gefunden werden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass der detektierte Polymorphismus nicht für das Auftreten einer idiopathisch fokalen Epilepsie mit CTS prädisponiert.

3.2.3. Polymorphismus rs 141436390

Der Polymorphismus rs 141436390 wurde im untersuchten Kollektiv bei 8 Patienten gefunden. In allen 8 Fällen trat er heterozygot auf. Bei rs 141436390 handelt es sich um einen Basenaustausch an Position 29766014, 55 Basenpaare hinter Exon 4, bei welchem die Nucleinbase Cytosin durch Adenosin ersetzt wird.



Aufgrund der Position im Intron hat die Punktmutation keinen unmittelbaren Einfluss auf die Proteinbiosynthese. Bei exonnaher Position des Polymorphismus wurde eine Splice-Site Analyse mit dem Analyseprogramm NNSPLICE 0.9, bereitgestellt durch das BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project), durchgeführt. Sowohl bei der Wildtypsequenz als auch bei dem Polymorphismus rs 141436390 wurden nach Angaben des Analyseprogramms die Spleißstellen identisch und mit gleicher Zuverlässigkeit (Wahrscheinlichkeitsscore = 0,77) erkannt. Ein Einfluss der Punktmutation auf das Spleißverhalten konnte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Im untersuchten Kollektiv wurden die Frequenzen für den homozygoten Wildtypus (CC) mit 0,96, für das heterozygote (AC) Auftreten des Polymorphismus mit 0,04 und für die homozygote Punktmutation (AA) mit 0,0 bestimmt.

Tabelle 3.2-3 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 141436390.

| Genotyp | Absolut (n=193) | Frequenz |
|---------|-----------------|----------|
| CC | 185 | 0,96 |
| AC | 8 | 0,04 |
| AA | 0 | 0,00 |

Grundlage der Berechnung der Genotypfrequenzen in einer Idealpopulation mit Hilfe des Hardy Weinberg Equilibriums waren die in der Datenbank unter der Referenznummer ss491716770 angegebenen Genotypfrequenzen von 0,94 für den Genotyp CC, 0,06 für den Genotyp AC und 0,0 für den Genotyp AA. Die hieraus ermittelten erwarteten Häufigkeiten für die untersuchte Stichprobe betragen 181 (CC), 12 (AC) und 0 (AA).

Die Voraussetzung für die Anwendung eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson von mindestens fünf Beobachtungen pro Zelle wurde nicht erfüllt. Der Fisher's Exact Test zeigte keine signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenzen zwischen den Probanden und den Kontrollen ($p = 0,49$).

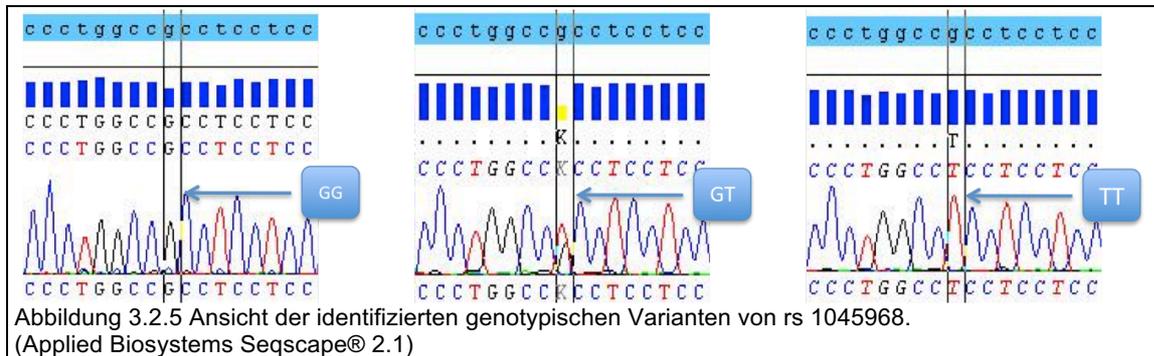
Der Cochran Armitage Test for Trends zeigte unter Berücksichtigung der ordinalen Sortierung des Schweregrades keine signifikanten Unterschiede zwischen untersuchtem Kollektiv und Kontrollgruppe ($p = 0,36$).

Die Nullhypothesen konnten nicht abgelehnt werden, d.h. es konnte keine abweichende Häufung des detektierten Polymorphismus bei den untersuchten Patienten gefunden werden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass der detektierte Polymorphismus nicht für das Auftreten einer idiopathisch fokalen Epilepsie mit CTS prädisponiert.

3.2.4. Polymorphismus rs 1045968

Bei 39 Patienten konnte der Polymorphismus rs 1045968 im Intron, 406 Basenpaare hinter dem Exon 4 an der Chromosomenposition 29766365 ausfindig gemacht werden. In allen 34 Fällen trat der Polymorphismus heterozygot, in fünf Fällen homozygot auf.

Bei rs 1045968 handelt es sich um einen Basenaustausch, bei welchem die Nucleinbase Guanin durch Thymin ersetzt wird.



Aufgrund der exonnahen Lage wurde bei der gefundenen Mutation eine Splice-Site Analyse mit dem Analyseprogramm NNSPLICE 0.9 durchgeführt. Sowohl bei der Wildtypsequenz als auch bei dem Polymorphismus rs 1045968 wurden nach Angaben des Analyseprogramms die Spleißstellen identisch und mit gleicher Zuverlässigkeit (Wahrscheinlichkeitsscore=0,77) erkannt. Ein Einfluss der Punktmutation auf das Spleißverhalten konnte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Im untersuchten Kollektiv wurden die Frequenzen für den homozygoten Wildtypus (GG) mit 0,8, für das heterozygote (GT) Auftreten des Polymorphismus mit 0,18 und für die homozygote Punktmutation (TT) mit 0,02 bestimmt.

Tabelle 3.2-4 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 1045968.

| Genotyp | Absolut (n=193) | Frequenz |
|---------|-----------------|----------|
| GG | 154 | 0,80 |
| GT | 34 | 0,18 |
| TT | 5 | 0,02 |

Grundlage der Berechnung der Genotypfrequenzen in einer Idealpopulation mit Hilfe des Hardy Weinberg Equilibriums waren die in der Datenbank unter der Referenznummer ss43872638 angegebenen Frequenzen für das major allel G von 0,836 und das minor allel T von 0,164. Daraus ergaben sich die Genotypfrequenzen von 0,7 für den Genotyp GG, 0,27 für den Genotyp GT und 0,03 für den Genotyp TT. Die hieraus ermittelten erwarteten Häufigkeiten für die untersuchte Stichprobe betragen 135 (GG), 52 (GT) und 6 (TT).

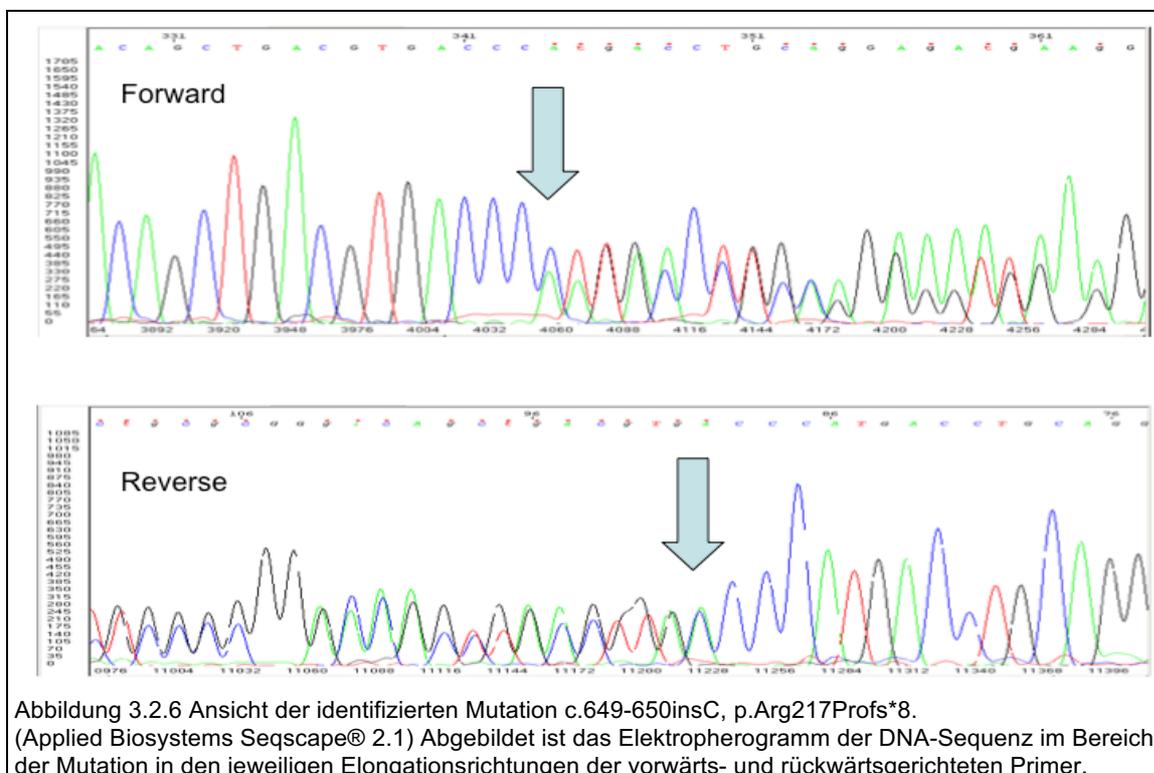
Der Chi-Quadrat-Tests nach Pearson zeigte keine signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenzen zwischen den Probanden und den Kontrollen ($p=0,078$). Der Fisher's Exact Test bestätigte das Ergebnis ($p=0,069$).

Der Cochran Armitage Test for Trends zeigte unter Berücksichtigung der ordinalen Sortierung des Schweregrades keine signifikanten Unterschiede zwischen untersuchtem Kollektiv und Kontrollgruppe ($p = 0,045$) unter Beachtung der Bonferroni Adjustierung.

Die Nullhypothesen konnten nicht abgelehnt werden, d.h. es konnte keine abweichende Häufung des detektierten Polymorphismus bei den untersuchten Patienten gefunden werden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass der detektierte Polymorphismus nicht für das Auftreten einer idiopathisch fokalen Epilepsie mit CTS prädisponiert.

3.2.5. Mutation c.649-650insC, p.Arg217Profs*8

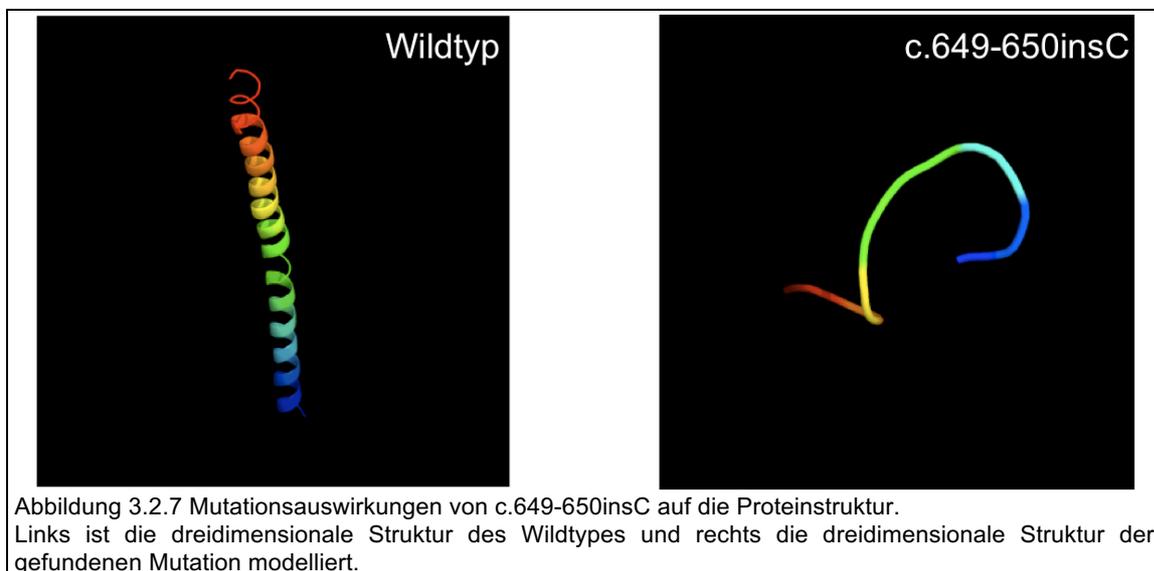
In Exon 2 konnte außerdem die bereits in der Literatur häufig genannte Mutation c.649-650insC, p.Arg217Profs*8 detektiert werden. Die Mutation trat stets in den Fällen auf, bei denen durch die Firma repli-g artifiziell replizierte Whole Genome Amplification (WGA) DNA als Ausgangsmaterial zur Sequenzanalyse verwendet wurde.



Bei der gefundenen Mutation handelte es sich um eine Insertion der Nucleinbase Cytosin an der Aminosäureposition 649. Hierdurch kommt es zu einer Leserasterverschiebung (frameshift) mit einer veränderten Aminosäuresequenz (p.Arg217Profs*8), welche Auswirkungen auf die Proteinstruktur haben kann.

Die vorliegende Mutation wurde in den internationalen Datenbanken mehrfach als Hauptursache für PKD beschrieben (Chen et al., 2014; Méneret et al., 2012b; Shi et al., 2013) und in der Referenzdatenbank dbSNP als Polymorphismus unter rs75497546 verzeichnet. Die durchgeführte bioinformatische Bewertung mittels der Software „Mutation Taster“ ergab eine Klassifizierung als „disease causing“ ($p = 1$).

Die Auswirkungen der Mutation auf die Proteinstruktur wurde mit dem Programm Phyre 2 prognostiziert und in Abb. 3.2.7 dargestellt.



Auffallend war das gehäufte Auftreten der Mutation unter Verwendung von WGA DNA. Wie bei allen auffälligen Befunden wurde die Sequenzierung bei den ausgewählten Proben zum Ausschluss eines methodischen Fehlers zur Befundsicherung wiederholt. In der Versuchsreihe wurde dann jedoch sofern Vorhanden, auf original DNA zurückgegriffen. Hier konnte die gefundene Mutation stets nicht mehr nachgewiesen werden.

3.2.6. Analyse der Kopienzahlvariationen bei *PRRT2*

Zur Analyse auf mögliche Genotypabweichungen wurden Bestimmungen der Kopienzahlvariationen mittels realtime PCR bei insgesamt 193 Patienten für *PRRT2* durchgeführt. Bei insgesamt vier Indexpatienten konnte eine komplette Duplikation des untersuchten Genabschnittes identifiziert werden (3 %). Im Vergleich mit der Prävalenz

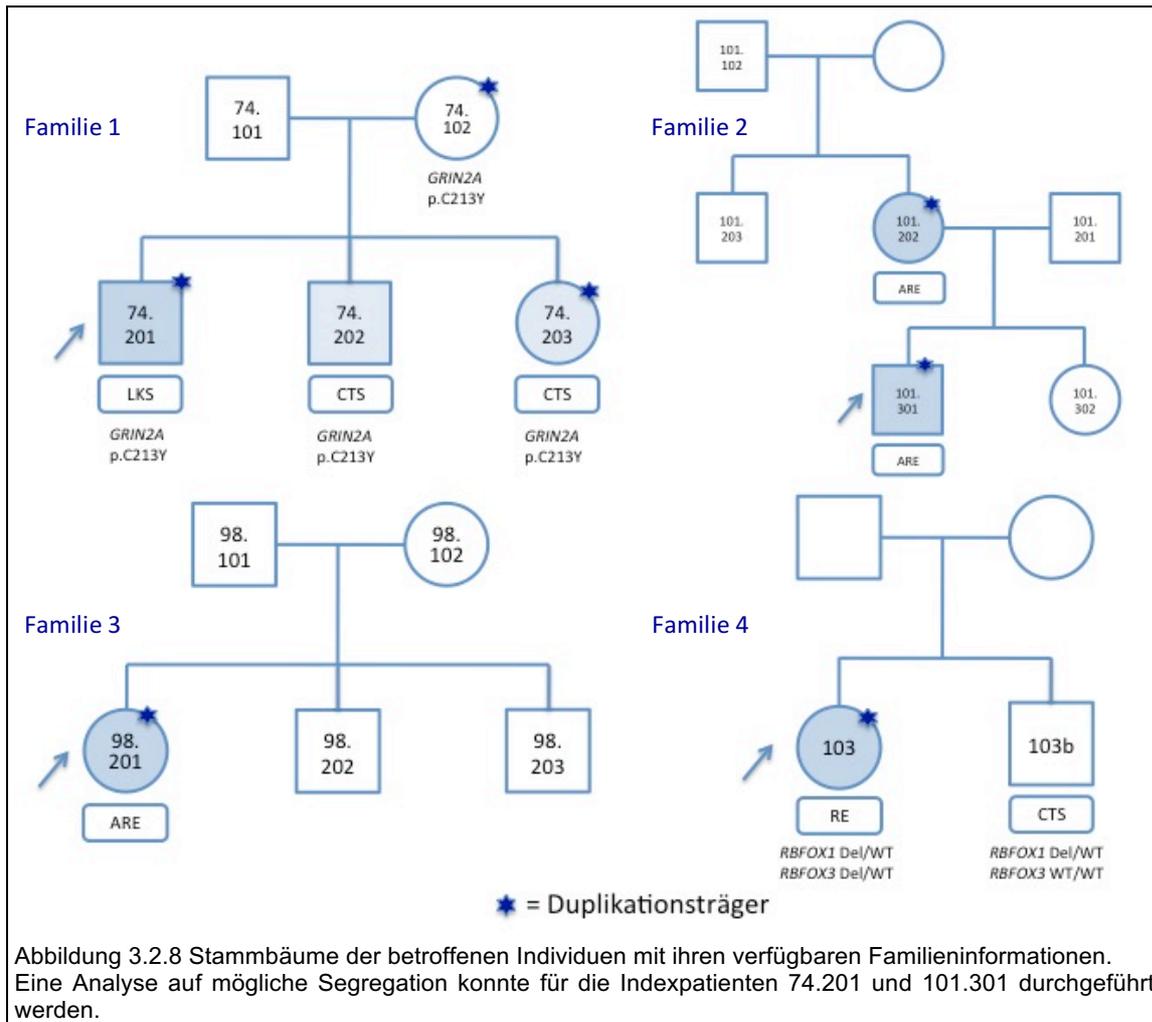
in der Normalbevölkerung (0,05 %)(Jacquemont et al., 2011a) tauchten die gefundenen CNVs somit signifikant häufiger im untersuchten Kollektiv auf (Fisher's Exact Test, $P < 0,05$, Odds Ratio (OR) = 40,5; 95 % Konfidenzintervall (CI):11,7 - 104).

Die gefundenen Mutationsträger zeigten klinisch sowohl den Phänotyp RE (n = 1) als auch ARE (n = 3) (Tab. 3.2-5). Alle Patienten mit klassischer Rolando Epilepsie zeigten eine normale psychomotorische Entwicklung bei unauffälligen neuropsychologischen Testuntersuchungen. Lediglich bei Patient 74.201 mit der Diagnose LKS zeigte sich eine schwerwiegende globale Entwicklungsverzögerung. In der aktuellen Literatur gibt es Hinweise auf das Vorliegen von Mikrozephalie und reduziertem BMI bei Duplikationsträgern (Jacquemont et al., 2011a; de Vries et al., 2012). Daten zur Auswertung dieser Parameter bei den untersuchten Probanden lagen leider nicht vor.

Tabelle 3.2-5 *PRRT2* Varianten und Phänotypen der Indexpatienten.

| Familie | Index-patient | Patient | Variante | Epilepsie-syndrom | Anfallssemiologie | Komorbidität |
|---------|---------------|---------|---------------------------|-------------------|--|---|
| 1 | x | 74.201 | PRRT2:4,024kb Duplikation | LKS | Fokale Anfälle, generalisiert tonisch-klonische Anfälle | Motorische und sprachliche Entwicklungsverzögerung, milde intellektuelle Beeinträchtigung |
| 1 | | 74.202 | PRRT2:4,024kb Duplikation | CTS | Keine Anfälle, isolierte EEG Auffälligkeit | Keine (unauffällige globale Entwicklung, normale Sprachentwicklung) |
| 1 | | 74.203 | PRRT2:4,024kb Duplikation | CTS | | Keine (unauffällige globale Entwicklung, normale Sprachentwicklung) |
| 1 | | 74.102 | PRRT2:4,024kb Duplikation | ⊙ | Keine Anfälle und/oder EEG Besonderheiten | Keine (unauffällige globale Entwicklung, normale Sprachentwicklung) |
| 2 | x | 101.301 | PRRT2:4,024kb Duplikation | ARE | | |
| 2 | | 101.201 | PRRT2:4,024kb Duplikation | ARE | | |
| 3 | x | 98.201 | PRRT2:4,024kb Duplikation | ARE | | |
| 4 | x | 103 | PRRT2:4,024kb Duplikation | RE | Nächtliche generalisierte tonisch klonische Anfälle, postikateler Spracharrest | Keine (unauffällige globale Entwicklung, normale Sprachentwicklung) |

In Abbildung 3.2.8 sind die Stammbäume der betroffenen Individuen bei den gefundenen Duplikationen graphisch dargestellt. In vier Familien konnte eine Segregation der *PRRT2* Varianten ausfindig gemacht werden. In den Fällen, in denen eine Testung möglich war (n = 2), waren alle Varianten vererbt, in beiden Fällen maternal.



In der vorliegenden Arbeit konnte ein Patient von 193 mit LKS ermittelt werden (0,5 %), der eine hemizygot Duplikation im *PRRT2* Gen trug. Die detektierte Duplikation erstreckte sich über 4,024 kb und beinhaltete somit das gesamte Gen inklusive aller translatisierenden Exone und deren flankierenden intronischen Sequenzen. Bei diesem Indexpatienten 74.201 (Familie 1) konnte eine Analyse auf Segregation bei ausreichenden Informationen über die Familie durchgeführt werden. Die *PRRT2* Duplikation segregiert mit variablem Phänotypus in Bezug auf Anfallssemiologie, pathologischem EEG Muster und/oder intellektuellen Einschränkungen bei den jeweiligen Familienmitgliedern. Einige Individuen trugen die familiäre Mutation, zeigten aber keinerlei klinische Affektionen. Hier zeigte sich das transmittierenden Elternteil völlig symptomfrei zum Untersuchungszeitpunkt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dies Elternteil zu früheren Zeiten einmal CTS im EEG zeigte, wenn man bedenkt, dass die Expression dieses Endophänotyps ihr Maximum bezüglich des Manifestationsalters in der frühen Kindheit hat. Anhand von Familie 1 kann die Variabilität der Phänotypen bei Duplikationsträgern gut demonstriert werden. Während

der Indexpatient (74.201) am schweren LKS erkrankt war, zeigte seine jüngere Schwester (74.203) lediglich CTS im EEG. Das dritte Geschwisterkind (74.202) hingegen zeigte CTS ohne Duplikationsträger zu sein. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass in dieser Familie ebenfalls eine neue Mutation p.C213Y *GRIN2A* vorliegt (Lemke et al., 2013). Während die *GRIN2A* Mutation mit dem EEG Muster CTS segregiert, scheinen *PRRT2* Mikroduplikationen jedoch nicht für diese elektrophysiologische Komponente des Phänotyps mitverantwortlich zu sein.

Bei Indexpatient 101.301 (Familie 2) segregierte die Mutation hingegen mit einheitlichem Phänotypus. Aufgrund fehlender Informationen und nicht vorhandener DNA konnte bei der Familie des Indexpatienten 103 keine Segregationsanalyse durchgeführt werden. Bei Indexpatient 98.201 lagen von den übrigen Familienmitgliedern lediglich WGA DNA vor, welche in der Analyse auf Kopienzahlvariationen konstant nicht verwertbare Ergebnisse bei Nicht-Erreichen des benötigten Konfidenzintervalles lieferte.

4 Diskussion

4.1. SLC2A1-Analyse

4.1.1. Vorbekannte Polymorphismen

Im untersuchten Kollektiv konnten drei exonische (rs1115129 in Exon 2, rs11537641 in Exon 4 und rs2229682 in Exon 5) und vier intronische (rs1385129, rs35565219, rs4658 und rs190760291) Polymorphismen gefunden werden. Die gefundenen Häufigkeiten der Polymorphismen entsprachen den aus der Referenzdatenbank dbSNP entnehmbaren Häufigkeiten größerer Populationsstudien. Die durchgeführte Analyse war somit in unserem Kollektiv hinreichend präzise.

Bei den exonischen Mutationen handelt es sich stets um stille Mutationen ohne Auswirkungen auf das kodierende Protein. Die Analysen ergaben für keine der gefundenen Polymorphismen eine klinische Relevanz. Es liegen somit wahrscheinlich pathogenetisch bedeutungslose Polymorphismen vor.

Die Analyse der intronischen Mutationen ergab keinen Einfluss der Mutationen auf das Spleißverhalten. Auch hier ist somit nicht von dem Vorliegen einer pathogenetischen Relevanz auszugehen.

Weitere seltene Polymorphismen fanden sich nicht. Dies kann durch den geringen Stichprobenumfang von N = 80 bedingt sein.

4.1.2. Mutation Tyr293His und H239Pfs*2

Insgesamt konnten im untersuchten Kollektiv zwei de novo Mutationen gefunden werden, die bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Die bioinformatischen Analysen schätzten die Mutationen als krankheitsverursachend ein. Der eine Indexpatient zeigte eine paroxysmal exercise-induced dystonia (PED) mit atypischen Absencen. Die vorliegende Anfallssemiologie erinnerte bei Rekrutierung der Patienten zunächst an die Symptomatik einer ARE. Es lag jedoch zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung das charakteristische EEG Merkmal einer Rolandoepilepsie vor. Der andere Indexpatient zeigte Symptome einer ARE und eine Mikrozephalie. Die Hauptsymptome beider Indexpatienten waren PED bzw. Mikrozephalie, während die Merkmale der ARE am ehesten als Begleitsymptome zu werten sind. In beiden Fällen lagen somit Komorbiditäten vor, die phänotypisch eher dem klassischen GLUT1-Defekt, als der isolierten ARE nahe stehen. Bei den Patienten, die ausschließlich an ARE erkrankt sind, fanden sich in der untersuchten Stichprobe keine Mutationen. Es ist daher anzunehmen, dass es sich hierbei folglich um einen Befund handelt, der das Vorliegen eines GLUT1-Defektes hinreichend

erklären kann, jedoch nicht vordergründig etwas mit den gefundenen elektroenzephalographischen und anfallssemiologischen Auffälligkeiten zu tun hat. Die Befunde sprechen dafür, dass eine Analyse von *SLC2A1* nur in Ausnahmefällen bei Patienten mit RE und ARE aussagekräftig ist. Genauer gesagt scheint eine Analyse von *SLC2A1* bei Patienten mit RE und ARE nur dann sinnvoll zu sein, wenn Begleitsymptome vorliegen, die phänotypisch auch beim klassischen GLUT1-Defekt vorkommen, wie z.B. PED oder Mikrozephalie.

4.1.3. Kopienzahlvariationen bei *SLC2A1*

Bei keinem der untersuchten Patienten fanden sich Abweichungen der Kopienzahlvariationen in *SLC2A1*. Dies bestätigt die in der aktuellen Literatur beschriebene Hypothese der Genotyp-Phänotyp Korrelation (Leen et al., 2010; Yang et al., 2011). Demnach hätten sich bei Auftreten von größeren Deletionen oder Duplikationen auch besonders schwerwiegende Phänotypen finden müssen. Solche Fälle waren jedoch nicht Bestandteil des untersuchten Kollektivs. Mikroduplikationen und –deletionen scheinen somit pathogenetisch irrelevant für das Auftreten von ARE zu sein und keine Rolle bei der Ätiopathogenese zu spielen.

4.1.4. *SLC2A1* und RE

Im untersuchten Kollektiv fanden sich zwei Mutationsträger. Diese zwei Indexpatienten zeigten zwar Symptome der atypischen Rolandoepilepsie, gleichzeitig lagen aber auch deutliche Merkmale des klinischen Vollbildes eines GLUT1-Defizienzsyndroms vor. Das phänotypische Spektrum des klassischen GLUT1-Defektes wurde in den letzten Jahren aufgrund zahlreicher neuer epilepsiegenetischer Erkenntnisse ständig erweitert. Das Spektrum umfasst mittlerweile unterschiedliche paroxysmale Bewegungsstörungen bis hin zu epileptischen Anfällen mit inhomogener Anfallssemiologie (Brockmann, 2009; Friedman et al., 2006; Guerrini et al., 1999; Joshi et al., 2008; Overweg-Plandsoen et al., 2003; Scheffer, 2012; Striano et al., 2012; Suls et al., 2008; Weber et al., 2011). Das Vollbild des GLUT1-Defizienzsyndroms ist durch mentale und motorische Retardierung, Krampfanfälle, sekundäre Mikrozephalie sowie einer gemischten Bewegungsstörung bestehend aus Ataxie, Dystonie und Spastik gekennzeichnet (Brockmann, 2009). Die gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das beim GLUT1-Defekt auch Symptome einer ARE auftreten können. Das phänotypische Spektrum des GLUT1-Defektes könnte somit um den Aspekt der atypischen Rolandoepilepsie erweitert werden.

Nichtsdestotrotz unterscheiden sich die beiden Indexpatienten in ihrem klinischen Erscheinungsbild. Während der Mutationsträger der Tyr293His Mutation an

myoklonischen Absenzen und PED leidet, finden sich beim Träger der His239Pfs*2 Mutation eine ataktisch-dystone Bewegungsstörung mit globaler Entwicklungsverzögerung und Mikrozephalie. In der durchgeführten Untersuchung konnte somit die bereits in der Literatur beschriebene Variabilität und Heterogenität des Phänotyps von GLUT1-Defekten bestätigt werden. Die hohe phänotypische Variabilität spricht für das Vorliegen unbekannter genetischer Faktoren, die bislang noch nicht untersucht worden sind.

4.2. PRRT2-Analyse

4.2.1. Vorbekannt Polymorphismen

Im untersuchten Kollektiv konnten zwei exonische (rs76335820 und rs11150573) und zwei intronische Polymorphismen (rs141436390 und rs1045968) in einer ähnlichen Häufigkeit nachgewiesen werden, wie sie in großen Populationsstudien ermittelt worden sind. Hieraus ergibt sich, dass das untersuchte Kollektiv mit diesen vergleichbar und die durchgeführte Analyse hinreichend präzise ist. Weitere sehr seltene Polymorphismen fanden sich nicht. Dies kann unter anderem durch die vergleichsweise kleine Personenzahl von 193 begründet sein.

In Exon 2 kam es bei 2 % der Patienten zu einem heterozygoten Basenaustausch, welcher Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des codierenden Proteins hat – c.647C > T führt zum Einbau von Leucin anstelle von Prolin (p(Pro216Leu)). Diese Sequenzabweichung ist in der Literatur bereits beschrieben worden (Heron et al., 2012) und die Angaben der dbSNP Referenzdatenbank zeigten, dass es sich hierbei um einen pathogenetisch bedeutungslosen Polymorphismus handelt. Die weitere Mutation in Exon 2 hatte keinerlei Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und wurde ebenso als pathogenetisch nicht relevant eingestuft.

Auch die beiden intronischen Polymorphismen führten laut splice-site Analyse zu keiner Veränderung der Spliceprodukte, so dass nicht von einer pathogenetischen Relevanz ausgegangen werden kann.

4.2.2. Mutation c.649-650insC, p.Arg217Profs*8

Die häufige Mutation p.Arg217Profs*8 zeigte sich im untersuchten Kollektiv nur bei Verwendung von gesamt genomisch amplifizierter (Whole-Genome Amplified, WGA) DNA. Bei der Untersuchung von WGA DNA welche mit dem repli-g Amplifikationsverfahren der Firma Qiagen erzeugt wurde, zeigte sich stets die p.Arg217Profs*8 Mutation. Eine vergleichbare Beobachtung machte auch eine französische Arbeitsgruppe bei der Untersuchung von *PRRT2* in Bezug auf autistische

Störungsbilder (Huguet et al., 2014). Die Mutation befindet sich in einer Region bestehend aus vier Guaninen und neun Cytosinen und scheint in vitro und in vivo ein höheres Mutationsrisiko zu beinhalten. Die Wiederholung der Sequenzierungen mit originaler DNA ergab bei allen Proben ein unauffälliges Ergebnis. Interessanterweise zeigt die aktuellste Version der Exome Variant Server (EVS) Datenbank, dass an der selben Lokalisation der Mutation (hg19, chr16:29825015) 10 % der *PRRT2* Allele ein zusätzliches C aufweisen, während weitere 10 % eine Deletion eines C's tragen. Im Hinblick auf die hohe Penetranz der Mutation in Bezug auf *PRRT2*-bezogenen Erkrankungen ist es jedoch eher unwahrscheinlich, dass 20 % der *PRRT2* Allele eine frameshift Mutation aufweisen. Die hohen Frequenzangaben zu der A217PfsX8 Mutation in der exome variant server Datenbank könnten eventuell auf whole exome sequencing Angaben basieren, da hier die DNA in einem Reaktionsschritt amplifiziert werden muss. Die Untersuchung der Mechanismen die zur Entstehung der A217PfsX8 Mutation führen war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Jedoch kann die Beobachtung, dass die Verwendung von künstlich amplifizierter DNA bei der DNA-Sequenzierung von *PRRT2* zum Einbau eines zusätzlichen C/G's führt, dazu beitragen, die zugrundeliegenden Mechanismen der Mutationsentstehung zu verstehen.

4.2.3. Kopienzahlanalyse bei *PRRT2*

Bei vier von insgesamt 193 Patienten konnte die seltene Genvariante einer Mikroduplikation des *PRRT2* Gens identifiziert werden. Diese seltene Duplikation am Locus 16p11.2 wurde in bereits durchgeführten Studien bei verschiedenen neurologischen Entwicklungsstörungen und Epilepsien beschrieben (Bedoyan et al., 2010; Shinawi et al., 2010). 16p11.2 Mikrodeletionen sind mit Autismusspektrumstörungen, Übergewicht und herabgesetzten intellektuellen Fähigkeiten mit und ohne Epilepsie assoziiert. Die reziproke Duplikation hingegen ist mit Schizophrenie, Mikrozephalie, herabgesetzten intellektuellen Fähigkeiten und Untergewicht assoziiert (Bijlsma et al., 2009; Jacquemont et al., 2011b; McCarthy et al., 2009; Shinawi et al., 2010; Walters et al., 2010; Weiss et al., 2008; Zufferey et al., 2012). Ein gehäuftes Auftreten von 16p11.2 Mikroduplikation bei Rolando Epilepsien wurde erst kürzlich beschrieben (Dimassi et al., 2014). Die bislang umfangreichsten Studie zu 16p11.2 Duplikationen belegt einen Zusammenhang der Mutation zu einem erhöhtem Krankheitsrisiko für RE und ARE (Reinthaler et al., 2014). In der hier vorliegenden Arbeit tauchte die Duplikation in *PRRT2* mit einer Prävalenz von 3 % auf. Dies entspricht einer 60-fach erhöhten Prävalenz im Vergleich zur Normalpopulation (Jacquemont et al., 2011b). Eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse ist bei einer

geringen Rate von gefundenen CNVs schwierig, da die gefundenen Häufigkeiten auch seltene benigne Varianten sein können. Das Risiko falsch positiver Befunde ist somit erhöht. Einige Autoren gehen davon aus, dass nur etwa 10 % aller CNV Auffälligkeiten in Kandidatengenomen relevante Befunde seien (Carvill et al., 2013b). Dies scheint jedoch nicht für 16p11.2 Mikroduplikationen zu gelten. Hier liegt eine enge Assoziation von Duplikation zu RE/ARE vor (Reinthal et al., 2014). Obwohl die Duplikation nur bei einer kleinen Untergruppe von Trägern identifiziert werden konnte, gelang es den Autoren durch einen umfangreichen Stichprobenumfang und der Auswertung mehrerer zehntausender genotypisierter Datensätze diesen Zusammenhang aufzuspüren. Auch wenn in der hier vorliegenden Arbeit der Stichprobenumfang mit 193 relativ klein war, zeigten sich ähnliche Häufigkeitsverteilungen wie in den Studien von Jacquement und Reinthal. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Untersuchungen hinreichend präzise durchgeführt worden sind. Die hier ermittelte OR scheint nichtsdestotrotz mit 40,5 den Zusammenhang zu überschätzen. Grund hierfür dürfte sein, dass sich in der untersuchten Kohorte auch Patienten mit positiver Familienanamnese fanden.

Im untersuchten Kollektiv ist eine heterogene Bandbreite an Phänotypen mit *PRRT2* Duplikationen assoziiert. In Familie 1 segregiert die Duplikation mit einem variablen Phänotypus an Anfallssemiologie, pathologischem EEG Muster und intellektuellen Einschränkungen (s. Abb. 3.2.7). Einige Individuen tragen die familiäre Mutation, zeigen aber keinerlei klinische Affektionen. Hier war das transmittierende Elternteil zum Untersuchungszeitpunkt völlig symptomfrei. Dies spricht für das Vorliegen einer inkompletten Penetrance der Mutation oder einem Mosaik-Vererbungsmuster. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieses Elternteil zu früheren Zeiten einmal CTS im EEG zeigte, wenn man berücksichtigt, dass die Expression dieses Endophänotyps ihr Maximum der Manifestation in der frühen Kindheit hat. Zeitgleich variieren Schweregrad und Ausprägung der Phänotypen in beachtlicher Weise zwischen den betroffenen Individuen ein und derselben Familie. In Familie 1 leidet der Indexpatient (74.201) am schweren LKS während seine jüngere Schwester (74.203) lediglich CTS im EEG zeigt (s. Abb. 3.2.7). Ein Hinweis für die Richtigkeit der Beobachtung der phänotypischen Varianz im untersuchten Kollektiv liefern Studien, in denen bereits Abweichungen von Kopienzahlvariationen als sichere Risikofaktoren für Epilepsie identifiziert wurden (Helbig et al., 2009; de Kovel et al., 2010). Auch wenn die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind, scheinen genetische Modifikatoren oder Umweltfaktoren bei der Expression von *PRRT2* eine Rolle zu spielen.

Bei zwei Indexpatienten wurden in einer zeitgleich durchgeführten umfangreichen EuroEPIGENOMICS Studie zur Untersuchung von Genalterationen bei Rolando Epilepsien Mutationen in zwei weiteren Kandidatengenen gefunden. So liegt bei Familie 1 beim Indexpatienten und seinen Geschwistern auch eine heterozygote Mutation im *GRIN2A* Gen vor (p.Cys231Tyr) (Lemke et al., 2013) (s. Abb. 3.2.7). *GRIN2A* wurde erst kürzlich als wichtiger genetischer Risikofaktor in der Ätiopathogenese von RE identifiziert (Lemke et al., 2013). *GRIN2A* kodiert für die NR2A Untereinheit im NMDA Rezeptor. Mutationen in diesem Gen führen zu Veränderungen der Strukturuntereinheit und haben somit Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors (Balu and Coyle, 2011). An Tiermodellen konnte bereits ein Zusammenhang zu Temporallappenepilepsien und idiopathischen Absence Epilepsien gezeigt werden (Frasca et al., 2011; Lacey et al., 2012; Di Maio et al., 2012; Niimura et al., 2005). Da viele Antikonvulsiva an NMDA Rezeptoren angreifen, könnte diesem Befund in den kommenden Jahren eine besondere Bedeutung zukommen. In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich in Familie 1 die *GRIN2A* Mutation nicht bei der Mutter, welche klinisch symptomfrei, jedoch Träger der *PRRT2* Duplikation ist (s. Abb. 3.2.7). Es ist daher nicht auszuschließen, dass *PRRT2* Mutationen ihre volle pathogene Wirksamkeit erst zusammen mit *GRIN2A* Mutationen entfalten.

In Familie 4 zeigt sich beim Indexpatienten zusätzlich zur gefundenen *PRRT2* Duplikation eine Deletion in *RBFOX1* und *RBFOX3* (s. Abb. 3.2.7). Diese beiden Kandidatengene wurden in einer parallel durchgeführten EuroEPINOMICS Studie untersucht (Lal et al., 2013a). Abweichungen der Kopienzahlvariationen wurden bislang mit mentaler Retardiertheit in Komorbidität mit Krampfanfällen, ADHS und Autismus assoziiert (Bhalla et al., 2004; Davis et al., 2012; Elia et al., 2012; Martin et al., 2007). In einer weiteren Studie konnte ein Zusammenhang zwischen Deletionen von *RBFOX1* und idiopathisch generalisierten Epilepsien hergestellt werden (Lal et al., 2013b). In vitro Untersuchungen ergaben Hinweise darauf, dass eine Herunterregulation des Genproduktes zu alternativem Splicing in zahlreichen Epilepsiekandidatengenen wie *SLC1A3*, *DCX*, *GABRB3*, *KCNQ2* u.a. führen (Dredge and Jensen, 2011; Lee et al., 2009; Nakhata and Kawamoto, 2005). *RBFOX3* Mikrodeletionen sind insgesamt sehr selten. Mutationen in beiden Genen scheinen das Risiko eine RE zu erhalten zu erhöhen (Lal et al., 2013a). Unter der Annahme, dass die Ätiopathogenese von RE multifaktoriell bedingt ist und ein polygenetischer Vererbungsmodus vorliegt, liegt die Vermutung nahe, dass *PRRT2* Duplikationen im Zusammenspiel mit *RBFOX1* und *RBFOX3* Mikroduplikationen Einfluss auf das Risiko

der Entstehung einer RE nehmen. Diese Hypothese kann jedoch mit der vorliegenden Untersuchung nicht überprüft werden und bleibt somit Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Zusammenfassend erhärten die Befunde der gefundenen Abweichungen der Kopienzahlvariationen in *PRRT2* den Zusammenhang zwischen 16p11.2 Duplikationen und idiopathisch fokalen Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes. Das *PRRT2*-bezogene phänotypische Spektrum kann somit um Rolando Epilepsien erweitert werden. Die vorliegende Untersuchung ergibt, dass Mikrodeletionen und -duplikationen in *PRRT2* nicht monokausal mit RE assoziiert sind. Duplikationen in *PRRT2* sind mit einem höheren Risiko an RE und ARE zu erkranken vergesellschaftet, scheinen jedoch nicht allein an der Pathogenese der Erkrankungsbilder beteiligt zu sein. *PRRT2* Mikroduplikationen fungieren somit als Suszeptibilitätsfaktor mit nicht hoher Penetranz.

4.2.4. *PRRT2* und RE

Im untersuchten Kollektiv ergab die Sequenzanalyse von *PRRT2* keine auffälligen Befunde. In der aktuellen Literatur finden sich zahlreiche Hinweise für das Vorliegen eines erhöhten Krankheitsrisikos bei *PRRT2* Mutationen und vielen Epilepsieformen, die phänotypisch zum Teil den idiopathisch fokalen Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes ähneln (Chen et al., 2011; Cloarec et al., 2012; Gardiner et al., 2012; Liu et al., 2012; Riant et al., 2012b; Scheffer et al., 2012; Schubert et al., 2012; Swoboda et al., 2000). Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchung deuten daraufhin, dass Sequenzabweichungen in *PRRT2* das Risiko eine RE/ARE zu erleiden, nicht erhöhen.

Aus der auf den ersten Blick widersprüchlichen Situation, dass bislang bei Rolandoepilepsien nahezu ausschließlich Neumutationen gefunden wurden, gleichzeitig aber meistens eine positive Familienanamnese bezüglich Krampfanfälle zu erhoben werden kann, ergibt sich ein Ansatzpunkt für weitere Studien. Zur Erklärung des Widerspruches wird hypothetisch von einem polygenetischen Geschehen ausgegangen bei dem mehrere Mutationen zusammen wirken müssen, um das jeweilige klinische Bild auszulösen. Hierin könnte auch eine Erklärung dafür liegen, dass gleiche oder ähnliche Mutationen im *PRRT2* Gen bei verschiedenen Menschen zur Manifestation unterschiedlicher Epilepsiesyndrome führen. Die Arbeitsgruppe um Scheffer und Berkovic stellt in diesem Zusammenhang die Vermutung an, dass es sich bei den modifizierten genetischen Merkmalen vielleicht weniger um Mutationen als um Polymorphismen handeln könnte (Scheffer and Berkovic, 2003).

In der durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass bei einigen Patienten mit der Diagnose einer idiopathischen fokalen Epilepsie mit

zentrotemporalen Spikes Mikroduplikationen im *PRRT2* Gen vorliegen. Dieser Befund weist darauf hin, dass bei der Suche nach Mutationen sequenzbasierte Verfahren durch die Analyse von Kopienzahlvariationen komplettiert werden sollten.

4.3. „Common vs Rare Variant“-Hypothesen

In der vorliegenden Studie wurde bei Patienten mit idiopathisch fokaler Epilepsie mit rolandischen Spikes das *SLC2A1*- und *PRRT2* Gen auf seltene Genvarianten (rare variants) untersucht. Grundlage der Fragestellung ist die „common-disease-multiple rare variant“ (CD/MV) Hypothese, nach der seltene DNA Sequenzvariationen mit hohen Effektstärken (Freq. <1 %; OR>2) Suszeptibilitätsfaktoren für die Entstehung häufiger Erkrankungen darstellen (Pritchard and Cox, 2002). Diese Varianten können durch Sequenzierung erfasst werden. In seltenen Fällen führen genetische Variationen zu einer monogenen Form einer Erkrankung. Beispielsweise genügt bei monogenetischen Epilepsien wie dem Dravet-Syndrom eine einzige Mutation in dem Schlüsselgen *SCN1A* um die Krankheit auszulösen.

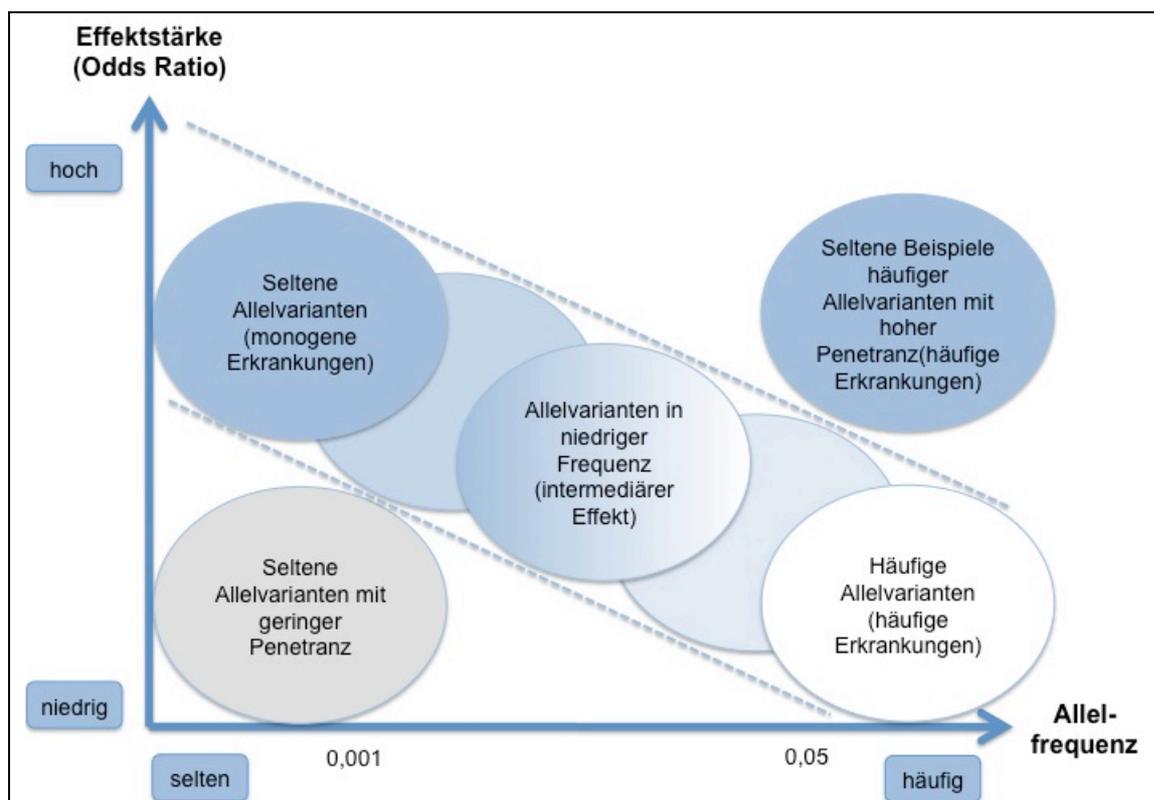


Abbildung 4.3.1 Identifizierbarkeit von Variationen nach Frequenz und Effektstärke.

Dargestellt sind Bereiche aus der möglichen Streuung von genetischen Variationen, in Abhängigkeit der Allelfrequenz und der Effektstärke. Die gestrichelten Linien grenzen die Bereiche ein, die mit gegenwärtigen Methoden erfasst werden können. Modifiziert nach Manolio et al. (2009).

In der durchgeführten Untersuchung konnten zwei seltene Mutationen im *SLC2A1*-Gen bei Patienten mit GLUT1-DS gefunden werden (c.877T>C/p.Tyr293His und c.715-716insC/p.His239Profs*2). Diese beiden Fälle können als maximale Variante der CD/MV-Hypothese betrachtet werden (s. Abb. 4.3.1 seltene Allelvarianten).

Außerdem wurden die häufig vorkommenden Polymorphismen (common variants) auf eine Assoziation zu idiopathisch fokaler Epilepsie mit CTS untersucht. Assoziationsstudien basieren auf der „common-disease-common variant“ (CD/CV) Hypothese. Die CD/CV Hypothese stellt die divergierende Meinung zur CD/MV-Hypothese dar und geht davon aus, dass häufige Allelvarianten (Freq.>1) mehrerer Gene mit jeweils geringen Effektstärken ($OR < 2$) als Summationseffekt das individuell vorhandene Erkrankungsrisiko bestimmen (Lohmueller et al., 2003). Demnach müsste es bei der Vererbung zu einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Polymorphismen kommen, wobei jeder einzelne Polymorphismus nur einen geringen Effekt hat und sich erst in Kombination mit mehreren anderen Allelvarianten auswirkt. Das genetische Risiko an einer RE zu erkranken wäre dann einerseits durch die Summe vieler einzelner Varianten mit im einzelnen geringen Effekt und seltenen Varianten mit im einzelnen großem Effekt bedingt (Manolio et al., 2009). Die durchgeführte Assoziationsanalyse ergab beim untersuchten Kollektiv keine signifikanten Ergebnisse.

Des Weiteren konnten in der durchgeführten Studie im *PRRT2* Gen Kopienzahlvariationen gefunden werden, welche in niedriger Frequenz auftraten (Freq. 0,02). Wie der Abbildung 4.3.1 zu entnehmen ist, lässt sich den gefundenen Auffälligkeiten nach der CD/CV- bzw. CD/MV- Hypothese ein intermediärer Effekt zuschreiben. Dies verdeutlicht die Schwierigkeit der Interpretation der erhobenen Befunde.

Bei idiopathischen fokalen Epilepsien mit CTS besteht eine hohe genetische Heterogenität. Bei den Rolando Epilepsien liegt daher ein komplexes, multifaktorielles polygenes Vererbungsmodell vor. Nach diesem Modell können sämtliche genetische Varianten, sowohl häufige als auch seltene, in unterschiedlichen Kombinationen zur Entstehung einer Rolando Epilepsie prädisponieren und verschiedene Unterformen hervorrufen (Dibbens et al., 2007; Mulley et al., 2005). Genetische Varianten mit hohen Effektstärken werden demnach in Multiplexfamilien angereichert sein, während sporadische Einzelfälle eine breitere Streuung der Effektstärken sowie eine höhere Anzahl an prädisponierenden Genvarianten aufweisen (Ottman, 2005; Winawer et al., 2002). Derzeitig werden die drei molekulargenetischen Strategien genomweite Kopplungsstudie, Assoziationsanalyse und Sequenzanalyse verwandt, um die

unterschiedlichen genetischen Komponenten des multifaktoriellen polygenen Vererbungsmusters bei Rolando-Epilepsien zu erfassen. Durch genomweite Kopplungsstudien bei familiären idiopathischen fokalen Epilepsien mit rolandischen Spikes können einzelne genetische Faktoren mit relativ starken Effektstärken lokalisiert und ggf. positionell identifiziert werden. Mit Hilfe komplementärer Assoziationsanalysen können Sequenzvarianten mit gering disponierenden Effekten erfasst werden. Zur Ermittlung zahlreicher seltener Sequenzvariationen mit ausgeprägter Effektstärke werden Sequenzanalysen der kompletten Exome bzw. Genome durchgeführt. Erst zusammengenommen haben diese drei Verfahren das Potential, ein Großteil der Heretabilität zu erklären.

4.4. Weiterführende Untersuchungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten im untersuchten Kollektiv mehrere Polymorphismen gefunden werden, bei denen nach statistischer und bioinformatischer Analyse von keiner pathogenetische Relevanz auszugehen ist. Dies schließt jedoch ein mögliches Zusammenspiel der Polymorphismen zur Krankheitsentstehung nicht aus. Zur Untersuchung eines Summationseffektes könnte als weiterführende Untersuchung eine Haplotypenanalyse auch unter Einbeziehung der gefundenen Kopienzahlvariationen in *PRRT2* und weiterer Kandidatengene wie beispielsweise *GRIN2A* und *RbFOX1* und 3 durchgeführt werden.

Bei den untersuchten Patientinnen und Patienten mit Epilepsien aus dem Formenkreis der idiopathischen fokalen Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes konnte die ursächliche Mutation nicht gefunden werden. Es scheint daher naheliegend, andere - im Zusammenhang mit idiopathisch fokalen Epilepsien relevante - Gene zu untersuchen. Hierbei erscheinen *GRIN2A* und *RbFOX* am vielversprechendsten. Weitere Kandidatengene sind *DEPDC5* und *QPRT*. *QPRT* ist von Interesse, da es das Enzym Quinolinat-Phosphoribosyltransferase kodiert, welches die Übertragung eines Ribosemoleküls auf Quinolinsäure katalysiert und somit einen wichtigen Teilschritt bei der Biosynthese von NAD⁺ darstellt (Schwarcz et al., 2012). Eine Injektion von Quinolinsäure in Mäusehirnen verursacht im Tiermodell epileptische Anfälle (Lapin, 1978). Außerdem sind erhöhte Quinolinsäurelevel in menschlichem Hirngewebe mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (Németh et al., 2005; Vamos et al., 2009).

Mutationen, die nicht exonisch sind, sondern im Bereich des Promotors liegen, wurden durch die hier durchgeführte Sequenzanalyse in *SLC2A1* und *PRRT2* nicht erfasst. Es ist daher möglich, dass auch bei Patienten, bei denen ein negativer Befund erhoben

wurde, die ursächliche Mutation dennoch im *SLC2A1*- oder *PRRT2*-Gen liegt. Eine Untersuchung der Promotorregion durch Exomsequenzierung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stichprobe könnte diese Frage zukünftig hinreichend beantworten.

Eine Untersuchung der gesamten 16p11.2 Region wurde parallel zur hier vorliegenden Arbeit durch die Arbeitsgruppe um Reinthaler et al. durchgeführt. Dort wurde ein Patient mit RE beschrieben, bei dem sich eine partielle Duplikation in 16p11.2 fand, welche das *QPRT* Gen mit einschloss, sich jedoch nicht über das *PRRT2* Gen erstreckte (Reinthaler et al., 2014). Dies verdeutlicht, dass man keineswegs davon ausgehen kann, dass *PRRT2* monokausal an der Pathogenese von RE und ARE beteiligt ist, sondern es sich vielmehr aus einem diffizilen Zusammenspiel mehrerer Gene in dieser kritischen Region handelt. Welche Rolle die einzelnen 28 Gene in 16p11.2 und somit auch *PRRT2* bei der Pathogenese von RE und ARE spielen, bleibt somit eine offene Frage für zukünftige Studien und könnte durch eine funktionelle Analyse dieser Genregion z.B. in Form einer Sequenzanalyse aller einzelnen Gene beantwortet werden.

16p11.2 Duplikationen gelten als Risikofaktoren für Autismusspektrumstörungen und stellen somit ein wichtiges Verbindungsglied zwischen Epilepsien und Erkrankungen aus dem autistischen Formenkreis dar (Malhotra and Sebat, 2012). Besonders schwere Verlaufsformen einer Epilepsie gehen nicht selten mit mentaler Retardation und sprachlicher Entwicklungsverzögerung einher und zeigen somit Symptome aus dem autistischen Krankheitskomplex (Matsuo et al., 2010; Saemundsen et al., 2007; Steffenburg et al., 2003). Zeitgleich ist die Prävalenz von Epilepsien bei an Autismus Erkrankten erhöht (Spence and Schneider, 2009). Klinischen Beobachtungen zufolge teilen sich idiopathisch fokale Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes und ein weites Spektrum an neuropsychiatrischen Syndromen und Symptomen (wie z.B. kognitive Defizite, sprachliche Entwicklungsverzögerungen, Autismusspektrumstörungen und Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörungen) eine gemeinsame Ätiologie (Clarke et al., 2007; Tovia et al., 2011). 16p11.2 Duplikationen gelten als gemeinsamer genetischer Suszeptibilitätsfaktor (Reinthaler et al., 2014). In unserem Kollektiv fand sich kein Patient mit typischen autistischen Krankheitszeichen. Die erhobenen Daten erlauben daher keinerlei Rückschlüsse, inwieweit eine *PRRT2* Duplikation für das gleichzeitige Auftreten von idiopathisch fokalen Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes und Autismus prädisponiert. Welchen Stellenwert *PRRT2* an der Pathogenese von autistischen Störungen mit begleitenden Epilepsien einnimmt oder ob diese zwei Phänotypen eventuell auch nur zufällig gehäuft parallel auftreten, bleibt somit Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Im heutigen Zeitalter ermöglichen neue Techniken die schnelle und kostengünstige Sequenzierung zahlreicher Gene, des Exoms oder sogar des gesamten Genoms. Mithilfe sogenannter Gen-Panels kann eine Liste von Erkrankungsgenen gleichzeitig sequenziert werden. Diese neuen Technologien der Hochdurchsatzsequenzierung werden unter dem Begriff des Next Generation Sequencing (NGS) vereint und läuten ein neues Zeitalter in genetischer Forschung und Diagnostik ein. In großen Forschungskonsortien wie Epi4K und EuroEPINOMICS (www.euroepinomics.org) werden momentan De-novo Mutationen bei seltenen Epilepsiesyndromen an Patienten-Eltern-Trios gesucht. Die Einzelgensequenzierung bei Verdacht auf idiopathische Epilepsie wird in naher Zukunft vermutlich durch Gen-Panel Untersuchungen ersetzt. Ein Nachteil des Einsatzes der NGS-Techniken ist das vermehrte Aufkommen von Variants of Unknown Significance bei größerem Einsatz der Screening Untersuchungen. Hierbei handelt es sich um genetische Varianten, die sich mit dem heutigen Wissen nicht eindeutig auf ihre klinische Bedeutung interpretieren lassen. Diese Befunde stellen bei der Beratung von Patienten im klinischen Alltag eine besondere Herausforderung dar. Zu Beginn dieser Arbeit waren die in der Untersuchung verwendeten Methoden (Sequenzierung nach Sanger) zur Detektierung seltener Varianten noch „state of the art“. Mit zunehmender Etablierung des NGS wird diese Methode vermutlich bald obsolet sein. Eine Untersuchung auf seltene Varianten in einem Genabschnitt, wie sie in dieser Studie durchgeführt wurde, kann mittlerweile innerhalb eines Tages bei erheblich geringeren Kosten durchgeführt werden.

4.5. Schlussfolgerungen

Im untersuchten Kollektiv konnten für *SLC2A1* insgesamt sieben bekannte Polymorphismen identifiziert werden. Die durchgeführten Assoziationsanalysen ergaben keine signifikanten Ergebnisse. Folglich prädisponieren die gefundenen Polymorphismen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht für das Auftreten idiopathisch fokaler Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes. Außerdem konnten zwei neue *SLC2A1* Mutationen identifiziert werden (c.877T>C/p.Tyr293His und c.715-716insC/p.His239Profs*2). Jedoch zeigten beide Mutationsträger vor allem schwere entwicklungsneurologische Defizite im Rahmen eines GLUT1-Defektes und erfüllten trotz vorhandener Symptome nicht vollständig die Diagnosekriterien einer RE oder ARE. Abweichungen in den Kopienzahlvariationen konnten bei *SLC2A1* nicht gefunden werden. Die Ergebnisse bestätigen vor Allem die Assoziation von *SLC2A1* Mutationen mit entwicklungsneurologischen Defiziten. Eine Analyse von *SLC2A1* bei Patienten mit idiopathisch fokaler Epilepsie mit zentrotemporalen Spikes scheint daher nur dann

sinnvoll zu sein, wenn parallel Hinweise für das Vorliegen eines GLUT1-Defektes bestehen.

Im *PRRT2* Gen konnten insgesamt vier bekannte Polymorphismen detektiert werden. Die Assoziationsanalyse ergab hier ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse. Es scheint somit kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Polymorphismen und idiopathischen Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes zu bestehen. In der vorliegenden Untersuchung wurde die häufig beschriebene *PRRT2* Hotspot Mutation c.649dupC/p.Arg217Profs*8 nur bei Verwendung von artifiziell replizierter Whole Genome Amplification (WGA) DNA identifiziert. Bei erneuter Sequenzierung mit nativer DNA konnte dieses Ergebnis nicht repliziert werden. *PRRT2* Mutationsanalysen mittels Sanger Sequenzierung sollte daher nur mit nativer DNA durchgeführt werden, um ein falsch positives Auftreten der häufigen Mutation c.649dupC/p.Arg217Profs*8 zu vermeiden. Trotz unauffälliger Sequenzierungsergebnisse konnten jedoch Abweichungen in der Kopienzahlvariation und somit Genalterationen bei *PRRT2* gefunden werden. Dies verdeutlicht, dass Sequenzanalysen immer durch CNV Analysen komplettiert werden sollten. *PRRT2* Mikroduplikationen wurden im untersuchten Kollektiv signifikant häufiger gefunden als bei gesunden Kontrollen. *PRRT2* Mikroduplikationen scheinen daher einen Beitrag zur Pathogenese von RE und ARE und leisten. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das untersuchte Gen *PRRT2* zusammen mit 27 weiteren Genen in der Region 16p11.2 liegt. Duplikationen innerhalb dieser Region sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für RE und ARE assoziiert. *PRRT2* Mikroduplikationen scheinen daher nicht monokausal an der Pathogenese von idiopathisch fokalen Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes beteiligt zu sein sondern fungieren mit hoher Wahrscheinlichkeit als Suszeptibilitätsfaktor mit geringer Penetranz. Unklar ist bis heute die Rolle additiver genetischer Faktoren im Zusammenhang mit der Effektstärke genetischer Mutationen und variablen klinischen Erscheinungen der Erkrankung. Zukünftige Studien an gut phänotypisierten Kohorten könnten mehr Licht in dieses Dunkel bringen.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass *SLC2A1* und *PRRT2* Mutationen keine bedeutsame Rolle in der Suszeptibilität bei idiopathisch fokalen Epilepsien mit Rolando Fokus spielen.

5 Zusammenfassung

Die Rolando Epilepsie (RE) ist die häufigste Epilepsie der Kindheit. Das Leitsymptom sind sensomotorische Herdanfälle mit und ohne Generalisation. Elektroenzephalographisch finden sich regelhaft zentrotemporal fokale und multifokale „sharp waves“ (sog. Rolando-Spikes). Bei atypischen Formen der Rolando Epilepsien (ARE) treten zusätzliche Anfallstypen wie z.B. atypische Absencen und myoklonisch-astatische Anfälle auf. In der Pathogenese spielen genetische Dispositionen eine dominierende Rolle. Daher werden RE und ARE als idiopathisch (syn. genetische) fokalen Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes bezeichnet. Ein wichtiger gemeinsamer genetischer Risikofaktor in der Ätiopathogenese stellen Mutationen in *GRIN2A* dar. Die komplexe Pathogenese dieser Epilepsieformen ist jedoch bis heute unbekannt. Anfallssemiotgien der ARE finden sich auch im Spektrum des Glucose 1 Transporter Defizienz Syndroms (GLUT-1-DS), welches durch Mutationen im *SLC2A1*-Gen ausgelöst wird. Ebenso konnte das *PRRT2*-Gen bei gutartigen Epilepsien des Kindesalters als krankheitsauslösendes Gen identifiziert werden, welche vom klinischen Erscheinungsbild her den RE und ARE ähneln. In dieser Arbeit wurde ein möglicher Einfluss von Mutationen im *SLC2A1*- und *PRRT2*-Gen auf die Pathogenese von idiopathisch fokalen Epilepsien mit zentrotemporalen Spikes untersucht.

Hierzu wurde *PRRT2* auf Mutationen bei 193 ($n = 193$) europäischen Patienten analysiert. Analog wurde zusätzlich *SLC2A1* bei allen Patienten untersucht, bei denen keine klassische RE ($n = 80$) vorlag.

Für *SLC2A1* und *PRRT2* konnten mehrere bekannte Polymorphismen identifiziert werden. Die durchgeführten Assoziationsanalysen ergaben keine signifikant positiven Ergebnisse. Die häufig beschriebene *PRRT2* Mutation c.649dupC/p.Arg217Profs*8 wurde nur bei Verwendung von artifiziell replizierter Whole Genome Amplification (WGA) DNA identifiziert. Bei Sequenzierung mit nativer DNA konnte dieses Ergebnis nicht repliziert werden. *PRRT2* Mutationsanalysen dieses Gens sollten daher nur mit nativer DNA durchgeführt werden. *PRRT2* Mikroduplikationen wurden im untersuchten Kollektiv signifikant häufiger gefunden als bei gesunden Kontrollen (Fisher's Exact Test, $P < 0,05$, Odds Ratio(OR) = 40,5). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass *PRRT2* in der Region 16p11.2 liegt. Duplikationen innerhalb dieser Region sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für RE und ARE assoziiert.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass *PRRT2* Duplikationen einen Beitrag zur Pathogenese bei idiopathisch fokalen Epilepsien mit Rolando Fokus leisten. *SLC2A1* und *PRRT2* Mutationen hingegen spielen keine bedeutsame Rolle in der Suszeptibilität dieser Epilepsien.

6 Summary

Rolandic epilepsy (RE) is the most frequent epilepsy in childhood. The cardinal clinical features of RE are brief, focal hemifacial or oropharyngeal sensorimotor seizures with or without secondarily generalized tonic-clonic seizures. Electroencephalograms (EEGs) show rolandic spike-and-wave discharges (mainly centrotemporal spikes, CTS) as a hallmark. Patients suffering from atypical forms of RE (ARE) additionally show various seizure types like atypical absences and atonic-astatic myoclonic seizures. RE and ARE are considered to be genetically determined and therefore also called as idiopathic (genetic) focal epilepsies with centrotemporal spikes. Genomic alterations in *GRIN2A* are important risk factors for RE and ARE. However, the complex etiology of these epilepsy syndromes remain largely unknown. Seizure types similar to ARE have recently been described in the broad spectrum of Glucose transporter-1 deficiency syndrome (GLUT1-DS), caused by mutations in the *SLC2A1*-gene. Likewise the *PRRT2*-gene has recently been identified as the cause of multiple clinical phenotypes, which show clinical similarities with rolandic epilepsy. Aim of this study was to examine the role of *SLC2A1* and *PRRT2* in the etiopathology of idiopathic focal epilepsies with rolandic spikes.

Therefore the *PRRT2* gene was screened for mutations in a group of 193 European patients. In all ARE cases ($n = 80$), the *SLC2A1* gene was additionally analyzed.

Several known polymorphisms for *SLC2A1* and *PRRT2* were detected. Association analysis showed no positive significant results. In this study, the *PRRT2* mutation c.649dupC/p.Arg217Profs*8 previously been reported as a hot-spot mutation was identified only while using whole genome amplification-DNA. Performed resequencing with native DNA material showed no abnormalities. Thus *PRRT2* mutation screening should be restricted to native DNA. *PRRT2* microduplications were found in 3 % of patients. The association analysis revealed a significant excess of *PRRT2* duplications compared to healthy controls (Fisher's Exact Test, $P < 0,05$, Odds Ratio(OR)=40,5). It should be noted that *PRRT2* is located within the 16p11.2 region – a region previously identified as a significant genetic risk factor for RE and ARE.

In summary our study indicates that *PRRT2* microduplications contribute to focal epilepsies with rolandic spikes whereas *SLC2A1* and *PRRT2* mutations do not play a major role in the susceptibility to these epilepsies.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| µl. | Mikroliter |
| A. | Nukleinbase Adenin |
| ABPE. | atypische benigne Partialepilepsie des Kindesalters |
| Abb. | Abbildung |
| ADHS. | Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung |
| ADNFLE. | autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie |
| Ala. | Aminosäure Alanin |
| ARE. | Atypische Rolando Epilepsie |
| BAFME. | Benigne adulte familiäre myoklonische Epilepsie |
| BDGP. | Berkley Drosophila Genome Project |
| BECTS. | Benigne Epilepsie mit zentrotemporalen Spikes |
| BFNS. | Benigne familiäre neonatale Anfälle |
| BFIC. | Benigne familiäre infantile Konvulsionen |
| BFIS. | Benigne familiäre infantile Anfälle |
| BFIS-FHM. | Benigne familiäre infantile Anfälle mit familiärer hemiplegischer Migräne |
| BIS. | Benigne nichtfamiliäre infantile Konvulsionen |
| BMEI. | Benigne myoklonische Epilepsie bei Kleinkindern |
| BMI. | body mass index |
| BNA. | Benigne neonatale Anfälle |
| C. | Nukleobase Cytosin |
| CAE. | Kindliche Absence Epilepsie |
| CD/CV. | common-disease-common variant |
| CD/MV. | common-disease-multiple rare variant |

| | |
|---------------------|--|
| CI. | Konfidenzintervall |
| CNV. | Kopienzahlvariation |
| CSWS. | Epileptische Enzephalopathie mit kontinuierlichen spike-and-wave Muster während des Schlafs |
| Ct. | cycle threshold |
| CTS. | Zentrotemporale Spikes |
| Cys. | Aminosäure Cystein |
| dbSNP. | Single Nucleotide Polymorphism database |
| DNA. | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP. | Desoxynucleosidtriphosphat |
| ddNTP. | Didesoxynucleosidtriphosphat |
| DS (SMEI). | Dravet Syndrom (schwere frühkindliche myoklonische Epilepsie) |
| EGTCS. | Epilepsie mit generalisiert tonisch-klonischen Anfällen) |
| ELMA. | Augenlid Myoklonien mit Absencen (Jeavons-Syndrom) |
| EMA. | Epilepsie mit myoklonischen Absencen (Tassinari Syndrom) |
| EME (EIEE3). | Frühkindliche myoklonische Enzephalopathie |
| EOAE. | Frühkindliche Absence Epilepsie |
| EPOLM. | Familiäre occipitotemporale Epilepsie mit migräne und visueller Aura |
| EuroEPINOMICS. | European Science Foundation for Functional genomic variation in the epilepsies |
| EVS. | Exome Variant Server |
| FPEVF. | Familiäre fokale Epilepsie mit variablen Herden |
| FS. | Fieberkrämpfe |
| FTLE. | Familiäre Temporallappenepilepsie |

| | |
|---------------------|--|
| G. | Nucleinbase Guanin |
| GEFS+. | Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus |
| GLUT1. | Glucose Transporter Typ 1 |
| H0. | Nullhypothese |
| HA. | alternative Hypothese |
| HPLC. | high performance liquid chromatography |
| HWE. | Hardy Weinberg Equilibrium |
| ICCA. | Infantiles Anfalls- und Choreoathetose-Syndrom |
| ICOE-G. | Spät beginnende okzipitale Epilepsie des Kindesalters Typ Gastaut |
| IGE. | Idiopathische generalisierte Epilepsie mit variablem Phänotyp |
| ILAE. | International League Against Epilepsy |
| IPOE. | Idiopathisch photosensitive Okzipitallappenepilepsie |
| JAE. | Juvenile Absence Epilepsie |
| JME. | Juvenile myoklonische Epilepsie (Janz Syndrom) |
| kb. | Kilobasen |
| Leu. | Aminosäure Leucin |
| LKS. | Landau-Kleffner-Syndrom |
| mA. | Milliampere |
| MAE. | Epilepsie mit myoklonisch astatischen Anfällen (Doose Syndrom) |
| MgCl ₂ . | Magnesiumchlorid |
| ml. | Milliliter |
| MMPSI. | Epilepsie der fr frühen Kindheit mit migratorischen fokalen Anfällen |
| mRNA. | Boten-RNA |
| N. | Stichprobengröße |

| | |
|------------|---|
| NAD+ | Nicotinamidadenindinukleotid |
| ng. | Nanogramm |
| NGS. | Next Generation Sequencing |
| NMDA. | N-Methyl-D-Aspartat |
| OR. | Odds Ratio |
| OS (EIEE). | Ohtahara-Syndrom (frühinfantile epileptische Enzephalopathie) |
| PCR. | Polymerasekettenreaktion |
| PED. | paroxysmal exercise-induced dystonia |
| PEPS. | Partielle Epilepsie mit perizentralen Spikes |
| PKD. | paroxysmal kinesinogene Dyskinesie |
| PLS. | Pseudo Lennox Syndrom |
| PRE. | Primäre Leseepilepsie |
| PRRT2. | proline-rich transmutation protein |
| PS. | Okzipitale Epilepsie des Kindesalters Typ Panayiotopoulos |
| RE. | Rolando Epilepsie |
| REPED-WC. | Rolando-Epilepsie mit paroxysmal Anstrengungs- induzierter Dystonie und Schreibkampf |
| RNA. | Ribonukleinsäure |
| SLC2A1. | solute carrier family 2 member 1 |
| SMEB. | Borderline SMEI |
| SNAP 25. | synaptosomal assoziiertes Protein 25 |
| T. | Nucleinbase Thymin |
| TAE. | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TE. | Tris-EDTA Puffer |

| | |
|-----------|--|
| UV. | Ultraviolet |
| V. | Volt |
| WGA. | whole genome amplification |
| WS. | West Syndrom (Blitz-Nick-Salaam-Krämpfe) |
| WT. | Wildtyp |

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.2.1 Schematisch vereinfachte Darstellung des phänotypischen Spektrums der typischen und atypischen Rolando Epilepsien..... | 10 |
| Abbildung 1.3.1 Darstellung der GLUT1-Proteinstruktur..... | 13 |
| Abbildung 1.3.2 Schematische Darstellung des Chromosom 1..... | 14 |
| Abbildung 1.4.1 Schematische Darstellung des <i>PRRT2</i> Proteins..... | 16 |
| Abbildung 1.4.2 Schematische Darstellung des Chromosom 16..... | 17 |
| Abbildung 2.2.1 Prinzip der PCR..... | 31 |
| Abbildung 2.2.2 Prinzip der Sequenzierung..... | 34 |
| Abbildung 2.2.3 Prinzip der TaqMan Quantifizierungsreaktion..... | 36 |
| Abbildung 2.2.4 Graphische Darstellung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode..... | 37 |
| Abbildung 2.2.5 Beispiel einer Kontingenztafel..... | 38 |
| Abbildung 3.1.1 Ideogramm des Chromosom 1..... | 41 |
| Abbildung 3.1.2 Ansicht der identifizierten genotypischen Varianten von rs 11537640. | 42 |
| Abbildung 3.1.3 Ansicht der identifizierten genotypischen Varianten von rs 1385129. | 44 |
| Abbildung 3.1.4 Ansicht der identifizierten genotypischen Varianten von rs 11537641. | 45 |
| Abbildung 3.1.5 Ansicht der identifizierten genotypischen Varianten von rs 2229682. | 46 |
| Abbildung 3.1.6 Ansicht des Polymorphismus rs35565219..... | 48 |
| Abbildung 3.1.7 Ansicht der identifizierten genotypischen Varianten von rs 190760291. | 49 |
| Abbildung 3.1.8 Ansicht der identifizierten genotypischen Varianten von rs 4658..... | 49 |
| Abbildung 3.1.9 Ansicht der identifizierten Mutation c.877T>C..... | 51 |
| Abbildung 3.1.10 Mutationsauswirkungen von c.877T>C auf die Proteinstruktur..... | 52 |
| Abbildung 3.1.11 Mutationsauswirkungen von 715_716insC auf die Proteinstruktur. . | 53 |
| Abbildung 3.2.1 Ideogramm des Chromosom 16..... | 55 |
| Abbildung 3.2.2 Ansicht der identifizierten genotypischen Varianten von rs 76335820. | 56 |
| Abbildung 3.2.3 Ansicht des identifizierten Genotypus von rs 11150573..... | 58 |
| Abbildung 3.2.4 Ansicht der identifizierten genotypischen Varianten von rs 141436390. | 59 |
| Abbildung 3.2.5 Ansicht der identifizierten genotypischen Varianten von rs 1045968. | 61 |
| Abbildung 3.2.6 Ansicht der identifizierten Mutation c.649-650insC, p.Arg217Profs*8. | 62 |
| Abbildung 3.2.7 Mutationsauswirkungen von c.649-650insC auf die Proteinstruktur. . | 63 |

Abbildung 3.2.8 Stammbäume der betroffenen Individuen mit ihren verfügbaren Familieninformationen..... 65

Abbildung 4.3.1 Identifizierbarkeit von Variationen nach Frequenz und Effektstärke. . 74

9 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1.1-1 Tabellarische Übersicht der fokalen Epilepsien und Epilepsiesyndrome. | 6 |
| Tabelle 1.1-2 Tabellarische Übersicht der generalisierten Epilepsien und Epilepsiesyndrome. | 7 |
| Tabelle 1.1-3 Tabellarische Übersicht der gemischt fokalen und generalisierten Epilepsien und Epilepsiesyndrome. | 8 |
| Tabelle 1.1-4 Tabellarische Übersicht der speziellen Epilepsiesyndrome, die keine Epilepsiediagnose erfordern. | 8 |
| Tabelle 3.1-1 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 11537640. | 42 |
| Tabelle 3.1-2 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 1385129. | 44 |
| Tabelle 3.1-3 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 11537641. | 45 |
| Tabelle 3.1-4 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 2229682. | 47 |
| Tabelle 3.1-5 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 4658. | 50 |
| Tabelle 3.2-1 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 76335820. | 56 |
| Tabelle 3.2-2 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 11150573. | 58 |
| Tabelle 3.2-3 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 141436390. | 60 |
| Tabelle 3.2-4 Tabellarische Übersicht der im Kollektiv identifizierten Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen von rs 1045968. | 61 |
| Tabelle 3.2-5 <i>PRRT2</i> Varianten und Phänotypen der Indexpatienten. | 64 |

10 Literaturverzeichnis

Aicardi, J., and Chevrie, J.J. (1982). Atypical benign partial epilepsy of childhood. *Dev. Med. Child Neurol.* 24, 281–292.

Badawy, R.A.B., Harvey, A.S., and Macdonell, R.A.L. (2009a). Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: Understanding the mechanisms of epilepsy - Part 2. *J. Clin. Neurosci.* 16, 485–500.

Badawy, R.A.B., Harvey, A.S., and Macdonell, R.A.L. (2009b). Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: Understanding the mechanisms of epilepsy – Part 1. *J. Clin. Neurosci.* 16, 355–365.

Bali, B., Kull, L.L., Strug, L.J., Clarke, T., Murphy, P.L., Akman, C.I., Greenberg, D.A., and Pal, D.K. (2007). Autosomal dominant inheritance of centrotemporal sharp waves in rolandic epilepsy families. *Epilepsia* 48, 2266–2272.

Balu, D.T., and Coyle, J.T. (2011). Glutamate receptor composition of the post-synaptic density is altered in genetic mouse models of NMDA receptor hypo- and hyperfunction. *Brain Res.* 1392, 1–7.

Banerjee, P.N., Filippi, D., and Allen Hauser, W. (2009). The descriptive epidemiology of epilepsy—A review. *Epilepsy Res.* 85, 31–45.

Barros, L.F., Bittner, C.X., Loaiza, A., and Porras, O.H. (2007). A quantitative overview of glucose dynamics in the gliovascular unit. *Glia* 55, 1222–1237.

Bedoyan, J.K., Kumar, R.A., Sudi, J., Silverstein, F., Ackley, T., Iyer, R.K., Christian, S.L., and Martin, D.M. (2010). Duplication 16p11.2 in a child with infantile seizure disorder. *Am. J. Med. Genet. A.* 152A, 1567–1574.

Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., et al. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51, 676–685.

Berkovic, S.F., Howell, R.A., Hay, D.A., and Hopper, J.L. (1998). Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann. Neurol.* 43, 435–445.

Berkovic, S.F., Heron, S.E., Giordano, L., Marini, C., Guerrini, R., Kaplan, R.E., Gambardella, A., Steinlein, O.K., Grinton, B.E., Dean, J.T., et al. (2004). Benign familial

neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann. Neurol.* 55, 550–557.

Bhalla, K., Phillips, H.A., Crawford, J., McKenzie, O.L.D., Mulley, J.C., Eyre, H., Gardner, A.E., Kremmidiotis, G., and Callen, D.F. (2004). The de novo chromosome 16 translocations of two patients with abnormal phenotypes (mental retardation and epilepsy) disrupt the A2BP1 gene. *J. Hum. Genet.* 49, 308–311.

Bianchi, A., Viaggi, S., Chiossi, E., and LICE Episcreeen Group (2003). Family study of epilepsy in first degree relatives: data from the Italian Episcreeen Study. *Seizure J. Br. Epilepsy Assoc.* 12, 203–210.

Bijlsma, E.K., Gijbbers, A.C.J., Schuurs-Hoeijmakers, J.H.M., van Haeringen, A., Fransen van de Putte, D.E., Anderlid, B.-M., Lundin, J., Lapunzina, P., Pérez Jurado, L.A., Delle Chiaie, B., et al. (2009). Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur. J. Med. Genet.* 52, 77–87.

Billard, C., Autret, A., Laffont, F., De Giovanni, E., Lucas, B., Santini, J.J., Dulac, O., and Plouin, P. (1981). Aphasie acquise de l'enfant avec epilepsie a propos de 4 observations avec etat de mal electrique infraclinique du sommeil. *Rev. Electroencéphalographie Neurophysiol. Clin.* 11, 457–467.

Brockmann, K. (2009). The expanding phenotype of GLUT1-deficiency syndrome. *Brain Dev.* 31, 545–552.

Brockmann, K., Wang, D., Korenke, C.G., von Moers, A., Ho, Y.Y., Pascual, J.M., Kuang, K., Yang, H., Ma, L., Kranz-Eble, P., et al. (2001). Autosomal dominant glut-1 deficiency syndrome and familial epilepsy. *Ann. Neurol.* 50, 476–485.

Callenbach, P.M.C., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Hottenga, J.J., van den Boogerd, E.H., de Coo, R.F.M., Lindhout, D., Frants, R.R., Sandkuijl, L.A., and Brouwer, O.F. (2003). Familial partial epilepsy with variable foci in a Dutch family: clinical characteristics and confirmation of linkage to chromosome 22q. *Epilepsia* 44, 1298–1305.

Calvet, A.F., and Bancaud, J. (1976). Electrocorcography of waves associated with eye movements in man during wakefulness. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 40, 457–469.

Carvill, G.L., Regan, B.M., Yendle, S.C., O’Roak, B.J., Lozovaya, N., Bruneau, N., Burnashev, N., Khan, A., Cook, J., Geraghty, E., et al. (2013a). GRIN2A mutations cause epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nat. Genet.* 45, 1073–1076.

Carvill, G.L., Heavin, S.B., Yendle, S.C., McMahon, J.M., O’Roak, B.J., Cook, J., Khan, A., Dorschner, M.O., Weaver, M., Calvert, S., et al. (2013b). Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat. Genet.* 45, 825–830.

Castiglioni, C., López, I., Riant, F., Bertini, E., and Terracciano, A. (2013). PRRT2 mutation causes paroxysmal kinesigenic dyskinesia and hemiplegic migraine in monozygotic twins. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* 17, 254–258.

Cavalleri, G.L., Weale, M.E., Shianna, K.V., Singh, R., Lynch, J.M., Grinton, B., Szoeki, C., Murphy, K., Kinirons, P., O’Rourke, D., et al. (2007). Multicentre search for genetic susceptibility loci in sporadic epilepsy syndrome and seizure types: a case-control study. *Lancet Neurol.* 6, 970–980.

Charlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J., and Leppert, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat. Genet.* 18, 53–55.

Chen, W.-J., Lin, Y., Xiong, Z.-Q., Wei, W., Ni, W., Tan, G.-H., Guo, S.-L., He, J., Chen, Y.-F., Zhang, Q.-J., et al. (2011). Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nat. Genet.* 43, 1252–1255.

Chen, Y.P., Song, W., Yang, J., Zheng, Z.-Z., Huang, R., Chen, K., Zhao, B., Chen, X.P., Burgunder, J.-M., and Shang, H.-F. (2014). PRRT2 mutation screening in patients with paroxysmal kinesigenic dyskinesia from Southwest China. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* 21, 174–176.

Clarke, T., Strug, L.J., Murphy, P.L., Bali, B., Carvalho, J., Foster, S., Tremont, G., Gagnon, B.R., Dorta, N., and Pal, D.K. (2007). High Risk of Reading Disability and Speech Sound Disorder in Rolandic Epilepsy Families: Case–Control Study. *Epilepsia* 48, 2258–2265.

Cloarec, R., Bruneau, N., Rudolf, G., Massacrier, A., Salmi, M., Bataillard, M., Boulay, C., Caraballo, R., Fejerman, N., Genton, P., et al. (2012). PRRT2 links infantile convulsions and paroxysmal dyskinesia with migraine. *Neurology* 79, 2097–2103.

Dale, R.C., Grattan-Smith, P., Fung, V.S.C., and Peters, G.B. (2011). Infantile convulsions and paroxysmal kinesigenic dyskinesia with 16p11.2 microdeletion. *Neurology* 77, 1401–1402.

Dale, R.C., Gardiner, A., Antony, J., and Houlden, H. (2012a). Familial PRRT2 mutation with heterogeneous paroxysmal disorders including paroxysmal torticollis and hemiplegic migraine. *Dev. Med. Child Neurol.* 54, 958–960.

Dale, R.C., Grattan-Smith, P., Nicholson, M., and Peters, G.B. (2012b). Microdeletions detected using chromosome microarray in children with suspected genetic movement disorders: a single-centre study. *Dev. Med. Child Neurol.* 54, 618–623.

Davis, L.K., Maltman, N., Mosconi, M.W., Macmillan, C., Schmitt, L., Moore, K., Francis, S.M., Jacob, S., Sweeney, J.A., and Cook, E.H. (2012). Rare inherited A2BP1 deletion in a proband with autism and developmental hemiparesis. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A, 1654–1661.

Dibbens, L.M., Heron, S.E., and Mulley, J.C. (2007). A polygenic heterogeneity model for common epilepsies with complex genetics. *Genes Brain Behav.* 6, 593–597.

Dimassi, S., Labalme, A., Lesca, G., Rudolf, G., Bruneau, N., Hirsch, E., Arzimanoglou, A., Motte, J., de Saint Martin, A., Boutry-Kryza, N., et al. (2014). A subset of genomic alterations detected in rolandic epilepsies contains candidate or known epilepsy genes including GRIN2A and PRRT2. *Epilepsia* 55, 370–378.

Doose, H., and Baier, W.K. (1989). Benign partial epilepsy and related conditions: Multifactorial pathogenesis with hereditary impairment of brain maturation. *Eur. J. Pediatr.* 149, 152–158.

Doose, H., Brigger-Heuer, B., and Neubauer, B. (1997). Children with focal sharp waves: clinical and genetic aspects. *Epilepsia* 38, 788–796.

Doose, H., Hahn, A., Neubauer, B.A., Pistohl, J., and Stephani, U. (2001). Atypical “benign” partial epilepsy of childhood or pseudo-lennox syndrome. Part II: family study. *Neuropediatrics* 32, 9–13.

Dredge, B.K., and Jensen, K.B. (2011). NeuN/Rbfox3 nuclear and cytoplasmic isoforms differentially regulate alternative splicing and nonsense-mediated decay of Rbfox2. *PLoS One* 6, e21585.

Elia, J., Glessner, J.T., Wang, K., Takahashi, N., Shtir, C.J., Hadley, D., Sleiman, P.M.A., Zhang, H., Kim, C.E., Robison, R., et al. (2012). Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nat. Genet.* 44, 78–84.

Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., Milh, M., Kortüm, F., Fritsch, A., Pientka, F.K., et al. (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat. Genet.* 42, 1021–1026.

Engel, J., Jr (2006). Report of the ILAE classification core group. *Epilepsia* 47, 1558–1568.

Espeche, A., Cersosimo, R., and Caraballo, R.H. (2011). Benign infantile seizures and paroxysmal dyskinesia: a well-defined familial syndrome. *Seizure J. Br. Epilepsy Assoc.* 20, 686–691.

Fejerman, N. (2009). Atypical rolandic epilepsy. *Epilepsia* 50 Suppl 7, 9–12.

Ferrie, C., Caraballo, R., Covanis, A., Demirbilek, V., Dervent, A., Kivity, S., Koutroumanidis, M., Martinovic, Z., Oguni, H., Verrotti, A., et al. (2006). Panayiotopoulos syndrome: a consensus view. *Dev. Med. Child Neurol.* 48, 236–240.

Fisher, R.S., Boas, W. van E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., and Engel, J. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470–472.

Frasca, A., Aalbers, M., Frigerio, F., Fiordaliso, F., Salio, M., Gobbi, M., Cagnotto, A., Gardoni, F., Battaglia, G.S., Hoogland, G., et al. (2011). Misplaced NMDA receptors in epileptogenesis contribute to excitotoxicity. *Neurobiol. Dis.* 43, 507–515.

Freitag, C.M., May, T.W., Pfäfflin, M., König, S., and Rating, D. (2001). Incidence of epilepsies and epileptic syndromes in children and adolescents: a population-based prospective study in Germany. *Epilepsia* 42, 979–985.

Friedman, J.R.L., Thiele, E.A., Wang, D., Levine, K.B., Cloherty, E.K., Pfeifer, H.H., De Vivo, D.C., Carruthers, A., and Natowicz, M.R. (2006). Atypical GLUT1 deficiency with prominent movement disorder responsive to ketogenic diet. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 21, 241–245.

Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., and Bell, G.I. (1988). Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene. *Diabetes* 37, 657–661.

Gardiner, A.R., Bhatia, K.P., Stamelou, M., Dale, R.C., Kurian, M.A., Schneider, S.A., Wali, G.M., Counihan, T., Schapira, A.H., Spacey, S.D., et al. (2012). PRRT2 gene mutations: from paroxysmal dyskinesia to episodic ataxia and hemiplegic migraine. *Neurology* 79, 2115–2121.

Giordani, B., Caveney, A.F., Laughrin, D., Huffman, J.L., Berent, S., Sharma, U., Giles, J.M., and Garofalo, E.A. (2006). Cognition and behavior in children with benign epilepsy with centrotemporal spikes (BECTS). *Epilepsy Res.* 70, 89–94.

Groffen, A.J.A., Klapwijk, T., van Rootselaar, A.-F., Groen, J.L., and Tijssen, M.A.J. (2013). Genetic and phenotypic heterogeneity in sporadic and familial forms of paroxysmal dyskinesia. *J. Neurol.* 260, 93–99.

Guerrini, R., Bonanni, P., Nardocci, N., Parmeggiani, L., Piccirilli, M., De Fusco, M., Aridon, P., Ballabio, A., Carrozzo, R., and Casari, G. (1999). Autosomal recessive Rolandic epilepsy with paroxysmal exercise-induced dystonia and writer's cramp: Delineation of the syndrome and gene mapping to chromosome 16p12-11.2. *Ann. Neurol.* 45, 344–352.

Hahn, A., Pistohl, J., Neubauer, B.A., and Stephani, U. (2001). Atypical “benign” partial epilepsy or pseudo-Lennox syndrome. Part I: symptomatology and long-term prognosis. *Neuropediatrics* 32, 1–8.

Hardy, G.H. (1908). MENDELIAN PROPORTIONS IN A MIXED POPULATION. *Science* 28, 49–50.

Hauser, W.A., Annegers, J.F., and Kurland, L.T. (1993). Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* 34, 453–468.

Helbig, I., Mefford, H.C., Sharp, A.J., Guipponi, M., Fichera, M., Franke, A., Muhle, H., de Kovel, C., Baker, C., von Spiczak, S., et al. (2009). 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat. Genet.* 41, 160–162.

Heron, S.E., Grinton, B.E., Kivity, S., Afawi, Z., Zuberi, S.M., Hughes, J.N., Pridmore, C., Hodgson, B.L., Iona, X., Sadleir, L.G., et al. (2012). PRRT2 Mutations Cause Benign Familial Infantile Epilepsy and Infantile Convulsions with Choreoathetosis Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 152–160.

Huguet, G., Nava, C., Lemièrre, N., Patin, E., Laval, G., Ey, E., Brice, A., Leboyer, M., Szepetowski, P., Gillberg, C., et al. (2014). Heterogeneous Pattern of Selective Pressure for PRRT2 in Human Populations, but No Association with Autism Spectrum Disorders. *PLoS ONE* 9, e88600.

Ishii, A., Yasumoto, S., Ihara, Y., Inoue, T., Fujita, T., Nakamura, N., Ohfu, M., Yamashita, Y., Takatsuka, H., Taga, T., et al. (2013). Genetic analysis of PRRT2 for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choreoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev.* 35, 524–530.

Jacquemont, S., Reymond, A., Zufferey, F., Harewood, L., Walters, R.G., Kutalik, Z., Martinet, D., Shen, Y., Valsesia, A., Beckmann, N.D., et al. (2011a). Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 478, 97–102.

Jacquemont, S., Reymond, A., Zufferey, F., Harewood, L., Walters, R.G., Kutalik, Z., Martinet, D., Shen, Y., Valsesia, A., Beckmann, N.D., et al. (2011b). Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 478, 97–102.

Jensen, F.E. (2011). Epilepsy as a spectrum disorder: Implications from novel clinical and basic neuroscience. *Epilepsia* 52 Suppl 1, 1–6.

Johnson, M.R., Milne, R.L., Torn-Broers, Y., Hopper, J.L., Scheffer, I.E., and Berkovic, S.F. (2003). A twin study of genetic influences on epilepsy outcome. *Twin Res. Off. J. Int. Soc. Twin Stud.* 6, 140–146.

Joshi, C., Greenberg, C.R., De Vivo, D., Dong Wang, Chan-Lui, W., and Booth, F.A. (2008). GLUT1 deficiency without epilepsy: yet another case. *J. Child Neurol.* 23, 832–834.

Kit, Q.P.R.-P., RT-PCR, Q.P., and Kit, R.V. (2007). *QuantiFast™ Probe RT-PCR Handbook*.

Kivity, S., Ephraim, T., Weitz, R., and Tamir, A. (2000). Childhood epilepsy with occipital paroxysms: clinical variants in 134 patients. *Epilepsia* 41, 1522–1533.

Kjeldsen, M.J., Corey, L.A., Christensen, K., and Friis, M.L. (2003). Epileptic seizures and syndromes in twins: the importance of genetic factors. *Epilepsy Res.* 55, 137–146.

Klepper, J., Willemsen, M., Verrips, A., Guertsen, E., Herrmann, R., Kutzick, C., Flörcken, A., and Voit, T. (2001). Autosomal dominant transmission of GLUT1 deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 10, 63–68.

De Kovel, C.G.F., Trucks, H., Helbig, I., Mefford, H.C., Baker, C., Leu, C., Kluck, C., Muhle, H., von Spiczak, S., Ostertag, P., et al. (2010). Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain J. Neurol.* 133, 23–32.

Lacey, C.J., Bryant, A., Brill, J., and Huguenard, J.R. (2012). Enhanced NMDA receptor-dependent thalamic excitation and network oscillations in stargazer mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 11067–11081.

Lal, D., Reinthaler, E.M., Altmüller, J., Toliat, M.R., Thiele, H., Nürnberg, P., Lerche, H., Hahn, A., Møller, R.S., Muhle, H., et al. (2013a). RBFOX1 and RBFOX3 Mutations in Rolandic Epilepsy. *PLoS ONE* 8, e73323.

Lal, D., Trucks, H., Møller, R.S., Hjalgrim, H., Koeleman, B.P.C., de Kovel, C.G.F., Visscher, F., Weber, Y.G., Lerche, H., Becker, F., et al. (2013b). Rare exonic deletions of the RBFOX1 gene increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 54, 265–271.

Lal, D., Reinthaler, E.M., Schubert, J., Muhle, H., Riesch, E., Kluger, G., Jabbari, K., Kawalia, A., Bäuml, C., Holthausen, H., et al. (2014). DEPDC5 mutations in genetic focal epilepsies of childhood. *Ann. Neurol.* 75, 788–792.

Lapin, I.P. (1978). Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J. Neural Transm.* 42, 37–43.

Leary, L.D., Wang, D., Nordli, D.R., Engelstad, K., and De Vivo, D.C. (2003). Seizure characterization and electroencephalographic features in Glut-1 deficiency syndrome. *Epilepsia* 44, 701–707.

Lee, H.-Y., Huang, Y., Bruneau, N., Roll, P., Roberson, E.D.O., Hermann, M., Quinn, E., Maas, J., Edwards, R., Ashizawa, T., et al. (2012). Mutations in the gene PRRT2 cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions. *Cell Rep.* 1, 2–12.

Lee, J.-A., Tang, Z.-Z., and Black, D.L. (2009). An inducible change in Fox-1/A2BP1 splicing modulates the alternative splicing of downstream neuronal target exons. *Genes Dev.* 23, 2284–2293.

Leen, W.G., Klepper, J., Verbeek, M.M., Leferink, M., Hofste, T., van Engelen, B.G., Wevers, R.A., Arthur, T., Bahi-Buisson, N., Ballhausen, D., et al. (2010). Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain J. Neurol.* 133, 655–670.

Lemke, J.R., Lal, D., Reinthaler, E.M., Steiner, I., Nothnagel, M., Alber, M., Geider, K., Laube, B., Schwake, M., Finsterwalder, K., et al. (2013). Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nat. Genet.* 45, 1067–1072.

Lesca, G., Rudolf, G., Bruneau, N., Lozovaya, N., Labalme, A., Boutry-Kryza, N., Salmi, M., Tsintsadze, T., Addis, L., Motte, J., et al. (2013). GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nat. Genet.* 45, 1061–1066.

Levy, B., Wang, D., Ullner, P.M., Engelstad, K., Yang, H., Nahum, O., Chung, W.K., and De Vivo, D.C. (2010). Uncovering microdeletions in patients with severe Glut-1 deficiency syndrome using SNP oligonucleotide microarray analysis. *Mol. Genet. Metab.* 100, 129–135.

Li, H.-F., Ni, W., Xiong, Z.-Q., Xu, J., and Wu, Z.-Y. (2013). PRRT2 c.649dupC mutation derived from de novo in paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *CNS Neurosci. Ther.* 19, 61–65.

Li, J., Zhu, X., Wang, X., Sun, W., Feng, B., Du, T., Sun, B., Niu, F., Wei, H., Wu, X., et al. (2012). Targeted genomic sequencing identifies PRRT2 mutations as a cause of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. *J. Med. Genet.* 49, 76–78.

Lipton, J., and Rivkin, M.J. (2009). 16p11.2-related paroxysmal kinesigenic dyskinesia and dopa-responsive parkinsonism in a child. *Neurology* 73, 479–480.

Liu, Q., Qi, Z., Wan, X.-H., Li, J.-Y., Shi, L., Lu, Q., Zhou, X.-Q., Qiao, L., Wu, L.-W., Liu, X.-Q., et al. (2012). Mutations in PRRT2 result in paroxysmal dyskinesias with marked variability in clinical expression. *J. Med. Genet.* 49, 79–82.

Liu, X.-R., Wu, M., He, N., Meng, H., Wen, L., Wang, J.-L., Zhang, M.-P., Li, W.-B., Mao, X., Qin, J.-M., et al. (2013). Novel PRRT2 mutations in paroxysmal dyskinesia patients with variant inheritance and phenotypes. *Genes Brain Behav.* 12, 234–240.

Lohmueller, K.E., Pearce, C.L., Pike, M., Lander, E.S., and Hirschhorn, J.N. (2003). Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat. Genet.* 33, 177–182.

Loiseau, P., and Beaussart, M. (1973). The seizures of benign childhood epilepsy with Rolandic paroxysmal discharges. *Epilepsia* 14, 381–389.

Di Maio, R., Mastroberardino, P.G., Hu, X., Montero, L.M., and Greenamyre, J.T. (2012). Thiol oxidation and altered NR2B/NMDA receptor functions in in vitro and in vivo pilocarpine models: Implications for epileptogenesis. *Neurobiol. Dis.* 49C, 87–98.

Malhotra, D., and Sebat, J. (2012). CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 148, 1223–1241.

Manolio, T.A., Collins, F.S., Cox, N.J., Goldstein, D.B., Hindorff, L.A., Hunter, D.J., McCarthy, M.I., Ramos, E.M., Cardon, L.R., Chakravarti, A., et al. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–753.

Mantegazza, M., Gambardella, A., Rusconi, R., Schiavon, E., Annesi, F., Cassulini, R.R., Labate, A., Carrideo, S., Chifari, R., Canevini, M.P., et al. (2005). Identification of an Nav1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18177–18182.

Marini, C., Conti, V., Mei, D., Battaglia, D., Lettori, D., Losito, E., Bruccini, G., Tortorella, G., and Guerrini, R. (2012). PRRT2 mutations in familial infantile seizures, paroxysmal dyskinesia, and hemiplegic migraine. *Neurology* 79, 2109–2114.

Martin, C.L., Duvall, J.A., Ilkin, Y., Simon, J.S., Arreaza, M.G., Wilkes, K., Alvarez-Retuerto, A., Whichello, A., Powell, C.M., Rao, K., et al. (2007). Cytogenetic and molecular characterization of A2BP1/FOX1 as a candidate gene for autism. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* 144B, 869–876.

Matsuo, M., Maeda, T., Sasaki, K., Ishii, K., and Hamasaki, Y. (2010). Frequent association of autism spectrum disorder in patients with childhood onset epilepsy. *Brain Dev.* 32, 759–763.

McCarthy, S.E., Makarov, V., Kirov, G., Addington, A.M., McClellan, J., Yoon, S., Perkins, D.O., Dickel, D.E., Kusenda, M., Krastoshevsky, O., et al. (2009). Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat. Genet.* 41, 1223–1227.

Méneret, A., Grabli, D., Depienne, C., Gaudebout, C., Picard, F., Dürr, A., Lagroua, I., Bouteiller, D., Mignot, C., Doummar, D., et al. (2012a). PRRT2 mutations A major

cause of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in the European population. *Neurology* 79, 170–174.

Méneret, A., Grabli, D., Depienne, C., Gaubert, C., Picard, F., Dürr, A., Lagroua, I., Bouteiller, D., Mignot, C., Doummar, D., et al. (2012b). PRRT2 mutations: a major cause of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in the European population. *Neurology* 79, 170–174.

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., and Lodish, H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941–945.

Mullen, S.A., Suls, A., De Jonghe, P., Berkovic, S.F., and Scheffer, I.E. (2010). Absence epilepsies with widely variable onset are a key feature of familial GLUT1 deficiency. *Neurology* 75, 432–440.

Mullen SA, Marini C, Suls A, and et al (2011). GLucose transporter 1 deficiency as a treatable cause of myoclonic astatic epilepsy. *Arch. Neurol.* 68, 1152–1155.

Müller, H.-C. (2009). Screening for mutations within exon 2 and 3 of galaninreceptor-1-gene in obese children and adolescents, healthy underweight young adults, patients with anorexia nervosa or bulimia nervosa and testing for association.

Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Harkin, L.A., Berkovic, S.F., and Dibbens, L.M. (2005). Susceptibility genes for complex epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* 14 Spec No. 2, R243–249.

Nakahata, S., and Kawamoto, S. (2005). Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities. *Nucleic Acids Res.* 33, 2078–2089.

Németh, H., Toldi, J., and Vécsei, L. (2005). Role of kynurenines in the central and peripheral nervous systems. *Curr. Neurovasc. Res.* 2, 249–260.

Neubauer, P.D.B.A., and Hahn, P.D.A. (2012a). Basismechanismen, allgemeine Ätiologie und Pathogenese. In *Dooses Epilepsien im Kindes- und Jugendalter*, (Springer Berlin Heidelberg), pp. 7–15.

Neubauer, P.D.B.A., and Hahn, P.D.A. (2012b). Verlaufsformen von Epilepsien fokaler Genese. In *Dooses Epilepsien im Kindes- und Jugendalter*, (Springer Berlin Heidelberg), pp. 135–205.

Neubauer, B., Hahn, P.D.A., and Groß, Stephanie (2008a). Deutsches Ärzteblatt: Epilepsie im Kindes- und Jugendalter (25.04.2008).

Neubauer, B.A., Fiedler, B., Himmelein, B., Kämpfer, F., Läßker, U., Schwabe, G., Spanier, I., Tams, D., Bretscher, C., Moldenhauer, K., et al. (1998). Centrotemporal spikes in families with rolandic epilepsy Linkage to chromosome 15q14. *Neurology* 51, 1608–1612.

Neubauer, B.A., Waldegger, S., Heinzinger, J., Hahn, A., Kurlemann, G., Fiedler, B., Eberhard, F., Muhle, H., Stephani, U., Garkisch, S., et al. (2008b). KCNQ2 and KCNQ3 mutations contribute to different idiopathic epilepsy syndromes. *Neurology* 71, 177–183.

Nicolai, J., Aldenkamp, A.P., Arends, J., Weber, J.W., and Vles, J.S.H. (2006). Cognitive and behavioral effects of nocturnal epileptiform discharges in children with benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes. *Epilepsy Behav.* EB 8, 56–70.

Niimura, M., Moussa, R., Bissoon, N., Ikeda-Douglas, C., Milgram, N.W., and Gurd, J.W. (2005). Changes in phosphorylation of the NMDA receptor in the rat hippocampus induced by status epilepticus. *J. Neurochem.* 92, 1377–1385.

Ogiwara, I., Ito, K., Sawaishi, Y., Osaka, H., Mazaki, E., Inoue, I., Montal, M., Hashikawa, T., Shike, T., Fujiwara, T., et al. (2009). De novo mutations of voltage-gated sodium channel alphaII gene SCN2A in intractable epilepsies. *Neurology* 73, 1046–1053.

Okumura, A., Shimojima, K., Kubota, T., Abe, S., Yamashita, S., Imai, K., Okanishi, T., Enoki, H., Fukasawa, T., Tanabe, T., et al. (2013). PRRT2 mutation in Japanese children with benign infantile epilepsy. *Brain Dev.* 35, 641–646.

Ono, S., Yoshiura, K., Kinoshita, A., Kikuchi, T., Nakane, Y., Kato, N., Sadamatsu, M., Konishi, T., Nagamitsu, S., Matsuura, M., et al. (2012). Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. *J. Hum. Genet.* 57, 338–341.

Ottman, R. (1989). Genetics of the partial epilepsies: a review. *Epilepsia* 30, 107–111.

Ottman, R. (2005). Analysis of genetically complex epilepsies. *Epilepsia* 46 Suppl 10, 7–14.

Overweg-Plandsoen, W.C.G., Groener, J.E.M., Wang, D., Onkenhout, W., Brouwer, O.F., Bakker, H.D., and De Vivo, D.C. (2003). GLUT-1 deficiency without epilepsy--an exceptional case. *J. Inherit. Metab. Dis.* 26, 559–563.

Pal, D.K. (2011). Epilepsy and neurodevelopmental disorders of language. *Curr. Opin. Neurol.* 24, 126–131.

Pal, D.K., Li, W., Clarke, T., Lieberman, P., and Strug, L.J. (2010). Pleiotropic effects of the 11p13 locus on developmental verbal dyspraxia and EEG centrotemporal sharp waves. *Genes Brain Behav.* 9, 1004–1012.

Panayiotopoulos, C.P. (2005). Benign Childhood Focal Seizures and Related Epileptic Syndromes.

Panayiotopoulos, C.P. (2010a). Epileptic seizures and their classification. In *A Clinical Guide to Epileptic Syndromes and Their Treatment*, (Springer London), pp. 21–63.

Panayiotopoulos, C.P. (2010b). Epileptic syndromes and their classification. In *A Clinical Guide to Epileptic Syndromes and Their Treatment*, (Springer London), pp. 135–146.

Pritchard, J.K., and Cox, N.J. (2002). The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum. Mol. Genet.* 11, 2417–2423.

Reinthaler, E.M., Lal, D., Lebon, S., Hildebrand, M.S., Dahl, H.-H.M., Regan, B.M., Feucht, M., Steinböck, H., Neophytou, B., Ronen, G.M., et al. (2014). 16p11.2 600 kb Duplications Confer Risk for Typical and Atypical Rolandic Epilepsy. *Hum. Mol. Genet.*

Riant, F., Roze, E., Barbance, C., Méneret, A., Guyant-Maréchal, L., Lucas, C., Sabouraud, P., Trébuchon, A., Depienne, C., and Tournier-Lasserre, E. (2012a). PRRT2 mutations cause hemiplegic migraine. *Neurology* 79, 2122–2124.

Riant, F., Roze, E., Barbance, C., Méneret, A., Guyant-Maréchal, L., Lucas, C., Sabouraud, P., Trébuchon, A., Depienne, C., and Tournier-Lasserre, E. (2012b). PRRT2 mutations cause hemiplegic migraine. *Neurology* 79, 2122–2124.

Riva, D., Vago, C., Franceschetti, S., Pantaleoni, C., D'Arrigo, S., Granata, T., and Bulgheroni, S. (2007). Intellectual and language findings and their relationship to EEG characteristics in benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes. *Epilepsy Behav.* EB 10, 278–285.

Roll, P., Rudolf, G., Pereira, S., Royer, B., Scheffer, I.E., Massacrier, A., Valenti, M.-P., Roeckel-Trevisiol, N., Jamali, S., Beclin, C., et al. (2006). SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1195–1207.

Saemundsen, E., Ludvigsson, P., Hilmarsdottir, I., and Rafnsson, V. (2007). Autism spectrum disorders in children with seizures in the first year of life - a population-based study. *Epilepsia* 48, 1724–1730.

Scheffer, I.E. (2012). GLUT1 deficiency: a glut of epilepsy phenotypes. *Neurology* 78, 524–525.

Scheffer, I.E., and Berkovic, S.F. (2003). The genetics of human epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 428–433.

Scheffer, I.E., Grinton, B.E., Heron, S.E., Kivity, S., Afawi, Z., Iona, X., Goldberg-Stern, H., Kinali, M., Andrews, I., Guerrini, R., et al. (2012). PRRT2 phenotypic spectrum includes sporadic and fever-related infantile seizures. *Neurology* 79, 2104–2108.

Schmidt, A., Kumar, K.R., Redyk, K., Grünewald, A., Leben, M., Münchau, A., Sue, C.M., Hagenah, J., Hartmann, H., Lohmann, K., et al. (2012). Two faces of the same coin: benign familial infantile seizures and paroxysmal kinesigenic dyskinesia caused by PRRT2 mutations. *Arch. Neurol.* 69, 668–670.

Schubert, J., Paravidino, R., Becker, F., Berger, A., Bebek, N., Bianchi, A., Brockmann, K., Capovilla, G., Dalla Bernardina, B., Fukuyama, Y., et al. (2012). PRRT2 Mutations are the major cause of benign familial infantile seizures. *Hum. Mutat.* 33, 1439–1443.

Schwarcz, R., Bruno, J.P., Muchowski, P.J., and Wu, H.-Q. (2012). Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 465–477.

Sheerin, U.-M., Stamelou, M., Charlesworth, G., Shiner, T., Spacey, S., Valente, E.-M., Wood, N.W., and Bhatia, K.P. (2013). Migraine with aura as the predominant phenotype in a family with a PRRT2 mutation. *J. Neurol.* 260, 656–660.

Shi, C., Sun, S., Wang, J., Liu, A., Miao, W., Avinash, C., Mao, X., Tang, B., and Xu, Y. (2013). PRRT2 gene mutations in familial and sporadic paroxysmal kinesigenic dyskinesia cases. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 1313–1314.

Shinawi, M., Liu, P., Kang, S.-H.L., Shen, J., Belmont, J.W., Scott, D.A., Probst, F.J., Craigen, W.J., Graham, B.H., Pursley, A., et al. (2010). Recurrent reciprocal 16p11.2

rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J. Med. Genet.* 47, 332–341.

Shows, T.B., Eddy, R.L., Byers, M.G., Fukushima, Y., Dehaven, C.R., Murray, J.C., and Bell, G.I. (1987). Polymorphic human glucose transporter gene (GLUT) is on chromosome 1p31.3---p35. *Diabetes* 36, 546–549.

Sidenvall, R., Forsgren, L., Blomquist, H.K., and Heijbel, J. (1993). A community-based prospective incidence study of epileptic seizures in children. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 82, 60–65.

Singh, N.A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B.R., Leach, R.J., Melis, R., Ronen, G.M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J.V., et al. (1998). A novel potassium channel gene, *KCNQ2*, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat. Genet.* 18, 25–29.

Specchio, N., Terracciano, A., Trivisano, M., Cappelletti, S., Claps, D., Travaglini, L., Cusmai, R., Marras, C.E., Zara, F., Fusco, L., et al. (2013). *PRRT2* is mutated in familial and non-familial benign infantile seizures. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* 17, 77–81.

Spence, S.J., and Schneider, M.T. (2009). The Role of Epilepsy and Epileptiform EEGs in Autism Spectrum Disorders. *Pediatr. Res.* 65, 599–606.

Staden, U., Isaacs, E., Boyd, S.G., Brandl, U., and Neville, B.G. (1998). Language dysfunction in children with Rolandic epilepsy. *Neuropediatrics* 29, 242–248.

Steffenburg, S., Steffenburg, U., and Gillberg, C. (2003). Autism spectrum disorders in children with active epilepsy and learning disability: comorbidity, pre- and perinatal background, and seizure characteristics. *Dev. Med. Child Neurol.* null, 724–730.

Strachan, T. (2011). *Human molecular genetics* (New York: Garland Science).

Striano, P., Bordo, L., Lispi, M.L., Specchio, N., Minetti, C., Vigeveno, F., and Zara, F. (2006). A novel *SCN2A* mutation in family with benign familial infantile seizures. *Epilepsia* 47, 218–220.

Striano, P., Weber, Y.G., Toliat, M.R., Schubert, J., Leu, C., Chaimana, R., Baulac, S., Guerrero, R., LeGuern, E., Lehesjoki, A.-E., et al. (2012). *GLUT1* mutations are a rare cause of familial idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* 78, 557–562.

Strug, L.J., Clarke, T., Chiang, T., Chien, M., Baskurt, Z., Li, W., Dorfman, R., Bali, B., Wirrell, E., Kugler, S.L., et al. (2009). Centrottemporal sharp wave EEG trait in rolandic epilepsy maps to Elongator Protein Complex 4 (ELP4). *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 17, 1171–1181.

Sugawara, T., Tsurubuchi, Y., Agarwala, K.L., Ito, M., Fukuma, G., Mazaki-Miyazaki, E., Nagafuji, H., Noda, M., Imoto, K., Wada, K., et al. (2001). A missense mutation of the Na⁺ channel alpha II subunit gene Na(v)1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6384–6389.

Suls, A., Dedeken, P., Goffin, K., Esch, H.V., Dupont, P., Cassiman, D., Kempfle, J., Wuttke, T.V., Weber, Y., Lerche, H., et al. (2008). Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain* 131, 1831–1844.

Swoboda, K.J., Soong, B.-W., McKenna, C., Brunt, E.R.P., Litt, M., Bale, J.F., Ashizawa, T., Bennett, L.B., Bowcock, A.M., Roach, E.S., et al. (2000). Paroxysmal kinesigenic dyskinesia and infantile convulsions Clinical and linkage studies. *Neurology* 55, 224–230.

Teo, Y.Y., Small, K.S., Clark, T.G., and Kwiatkowski, D.P. (2008). Perturbation analysis: a simple method for filtering SNPs with erroneous genotyping in genome-wide association studies. *Ann. Hum. Genet.* 72, 368–374.

Tovia, E., Goldberg-Stern, H., Ben Zeev, B., Heyman, E., Watemberg, N., Fattal-Valevski, A., and Kramer, U. (2011). The prevalence of atypical presentations and comorbidities of benign childhood epilepsy with centrottemporal spikes. *Epilepsia* 52, 1483–1488.

Vadlamudi, L., Kjeldsen, M.J., Corey, L.A., Solaas, M.H., Friis, M.L., Pellock, J.M., Nakken, K.O., Milne, R.L., Scheffer, I.E., Harvey, A.S., et al. (2006). Analyzing the etiology of benign rolandic epilepsy: a multicenter twin collaboration. *Epilepsia* 47, 550–555.

Vamos, E., Pardutz, A., Klivenyi, P., Toldi, J., and Vecsei, L. (2009). The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. *J. Neurol. Sci.* 283, 21–27.

Vannucci, S.J., Maher, F., and Simpson, I.A. (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2–21.

Vears, D.F., Tsai, M.-H., Sadleir, L.G., Grinton, B.E., Lillywhite, L.M., Carney, P.W., Harvey, A.S., Berkovic, S.F., and Scheffer, I.E. (2012). Clinical genetic studies in benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes. *Epilepsia* 53, 319–324.

Vermeer, S., Koolen, D.A., Visser, G., Brackel, H.J.L., van der Burgt, I., de Leeuw, N., Willemsen, M.A.A.P., Sistermans, E.A., Pfundt, R., and de Vries, B.B.A. (2007). A novel microdeletion in 1(p34.2p34.3), involving the SLC2A1 (GLUT1) gene, and severe delayed development. *Dev. Med. Child Neurol.* 49, 380–384.

De Vivo, D.C., Trifiletti, R.R., Jacobson, R.I., Ronen, G.M., Behmand, R.A., and Harik, S.I. (1991). Defective Glucose Transport across the Blood-Brain Barrier as a Cause of Persistent Hypoglycorrhachia, Seizures, and Developmental Delay. *N. Engl. J. Med.* 325, 703–709.

De Vries, B., Callenbach, P.M.C., Kamphorst, J.T., Weller, C.M., Koelewijn, S.C., ten Houten, R., de Coo, I.F.M., Brouwer, O.F., and van den Maagdenberg, A.M.J.M. (2012). PRRT2 mutation causes benign familial infantile convulsions. *Neurology* 79, 2154–2155.

Walters, R.G., Jacquemont, S., Valsesia, A., de Smith, A.J., Martinet, D., Andersson, J., Falchi, M., Chen, F., Andrieux, J., Lobbens, S., et al. (2010). A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 463, 671–675.

Wang, J.-L., Cao, L., Li, X.-H., Hu, Z.-M., Li, J.-D., Zhang, J.-G., Liang, Y., San-A, Li, N., Chen, S.-Q., et al. (2011). Identification of PRRT2 as the causative gene of paroxysmal kinesigenic dyskinesias. *Brain* 134, 3493–3501.

Weber, Y.G., Kamm, C., Suls, A., Kempfle, J., Kotschet, K., Schüle, R., Wuttke, T.V., Maljevic, S., Liebrich, J., Gasser, T., et al. (2011). Paroxysmal choreoathetosis/spasticity (DYT9) is caused by a GLUT1 defect. *Neurology* 77, 959–964.

Weiss, L.A., Shen, Y., Korn, J.M., Arking, D.E., Miller, D.T., Fossdal, R., Saemundsen, E., Stefansson, H., Ferreira, M.A.R., Green, T., et al. (2008). Association between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism. *N. Engl. J. Med.* 358, 667–675.

Winawer, M., Ottman, R., and Rabinowitz, D. (2002). Concordance of disease form in kindreds ascertained through affected individuals. *Stat. Med.* 21, 1887–1897.

Yang, H., Wang, D., Engelstad, K., Bagay, L., Wei, Y., Rotstein, M., Aggarwal, V., Levy, B., Ma, L., Chung, W.K., et al. (2011). Glut1 deficiency syndrome and erythrocyte glucose uptake assay. *Ann. Neurol.* 70, 996–1005.

Yasuhara, A., Yoshida, H., Hatanaka, T., Sugimoto, T., Kobayashi, Y., and Dyken, E. (1991). Epilepsy with Continuous Spike-Waves During Slow Sleep and Its Treatment. *Epilepsia* 32, 59–62.

Zufferey, F., Sherr, E.H., Beckmann, N.D., Hanson, E., Maillard, A.M., Hippolyte, L., Macé, A., Ferrari, C., Kutalik, Z., Andrieux, J., et al. (2012). A 600 kb deletion syndrome at 16p11.2 leads to energy imbalance and neuropsychiatric disorders. *J. Med. Genet.* 49, 660–668.

Anhang

Der Anhang besteht aus 6 Protokollen.

- Protokoll zur DNA Extraktion mittels QIAmp® Midi Kit.
- Protokoll zur Durchführung der PCR bei *SLC2A1*.
- Protokoll zur Durchführung der PCR bei *PRRT2*.
- Protokoll zur Aufreinigung der PCR Produkte.
- Protokoll zur Durchführung der Sequenzanalyse.
- Protokoll zur Durchführung der Bestimmung der Copy Number Variations.

Protokoll zur DNA Extraktion mittels QIAamp[®] Midi Kit

- 3 x 15ml Gefäße mit Patientencode versehen.
- 200µl **Protease K[®]** in eines der 15ml Zentrifugengefäße pipettieren.
- 1-2ml Blut zur Protease hinzugeben und leicht schwenken.
- 2,4ml **Buffer AL[®]** hinzufügen. 15 Mal hin und her schwenken und eine Minute vortexen.
- Die Probe im Wasserbad bei 70°C für 10 Minuten inkubieren.
- 2ml **100% Ethanol** hinzufügen erneut mixen und vortexen.
- Die Hälfte des Volumens im Gefäß auf eine Trennsäule in ein neu beschriftetes 15ml Gefäß geben. Das Gefäß verschließen.
- Für 3 Minuten bei 3000rpm für 3 Minuten zentrifugieren.
- Die Säule anschließend herausnehmen und das Filtrat verwerfen. Die Säule wieder einsetzen.
- Die andere Hälfte des Reaktionsgemisches auf die Säule pipettieren und erneut für 3 Minuten bei 3000rpm zentrifugieren.
- Das Filtrat verwerfen und die Auftrennungssäule zurück ins Gefäß stellen.
- 2ml **Buffer AW1[®]** hinzufügen.
- Für eine Minute bei 4500 rpm zentrifugieren.
- Ohne das Filtrat zu verwerfen 2ml **Buffer AW2[®]** auf die Säule pipettieren. Für 15 Minuten bei 4500rpm zentrifugieren.
- Die Auftrennungssäule in ein sauberes, neu beschriftetes 15ml Gefäß überführen und das vorherige Filtrat samt Gefäß verwerfen.
- Sorgsam 300µl **Buffer AE[®]** auf die Membran der Trennungssäule pipettieren.
- Für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Im Anschluß für 2 Minuten bei 4500rpm zentrifugieren.

Protokoll zur Durchführung der PCR bei SLC2A1

Zusammensetzung der Tubes

| Tube1 | Tube2 | Tube3 | Tube4 | Tube5 | Tube6 |
|---------|--------|---------|--------|---------|---------|
| Exon2 | Exon3b | Exon5a | Exon1 | Exon9 | Exon10c |
| Exon3a | Exon5c | Exon10d | Exon5b | Exon10b | |
| Exon10a | | | | | |

Primerverdünnung (100µl, 50µM St.-Lsg., 2µM each)

| | Tube1 | Tube2 | Tube3 | Tube4 | Tube5 | Tube6 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Primer | 8 µl | 12 µl | 8 µl | 8 µl | 8 µl | 4 µl |
| 1xTE | 92 µl | 88 µl | 92 µl | 92 µl | 92 µl | 96 µl |

Mastermixerstellung (bei Bearbeitung von 8 Proben)

| | | Ohne DNA und Primer |
|------------|------------------|--|
| Tube 1 | 20µl x 8 = 160µl | je 16µl |
| Tube 2 | 30µl x 8 = 240µl | je 24µl |
| Tube 3 | 20µl x 8 = 160µl | je 16µl |
| Tube 4 | 20µl x 8 = 160µl | je 16µl |
| Tube 5 | 20µl x 8 = 160µl | je 16 µl |
| Tube 6 | 15µl x 8 = 120µl | je 12 µl |
| Kontrollen | 10µl x 6 = 60µl | je 8 µl |
| Insgesamt | =1060µl | + Pipettierfehler ergibt 1200 µl insgesamt |

| | |
|----------------|---------------------|
| 600 µl | MultiplexMix |
| 240 µl | Q-Solution |
| 120 µl | HPLC-Wasser |
| 120 µl | Primer |
| 120 µl | DNA |
| 1200 µl | gesamt |

MultiplexMix, HPLC Wasser und Q-Solution zusammenpipettieren. Hiervon jeweils 16 µl in Tube 1,3,4 und 5 geben, jeweils 24µl in Tube 2, 12 µl in Tube 6 und 8 µl in die Kontrollen geben. In die Kontrollen jeweils 1 µl HPLC Wasser als DNA Ersatz geben. Im Anschluß die Primerlösung zu den einzelnen Tubes geben. Hierzu 2 µl in Tube 1,3,4 und 5, 3µl in Tube 2, 1,5µl in Tube 6 und 1 µl in die Kontrollen geben. Am Schluss die jeweilige Menge an DNA (100ng/µl) hinzugeben.

Protokoll zur Durchführung der PCR bei PRRT2

Zusammensetzung der Tubes als Multiplex Ansatz

| Tube1 | Tube2 | Tube3 |
|-----------|------------|----------|
| Exon1 F/R | Exon3a F/R | Exon3b F |
| | Exon2a F | Exon3d R |
| | Exon2c R | |

Primerverdünnung (100µl, 50µM St.-Lsg., 2µM each)

| | Tube1 | Tube2 | Tube3 |
|---------------|-------|-------|-------|
| Primer | 4 µl | 8 µl | 4 µl |
| 1xTE | 96 µl | 92 µl | 96 µl |

Mastermixerstellung (bei 12 Proben)

Master Mix 1

| | | Ohne DNA und Primer |
|-----------|--------------------|---|
| Tube 1 | 30µl x 12 = 360 µl | je 24 µl |
| Kontrolle | 10µl x 1 = 10 µl | je 8 µl |
| Insgesamt | = 370 µl | + Pipettierfehler ergibt 440 µl insgesamt |

| | |
|---------------|---------------------|
| 220 µl | MultiplexMix |
| 88 µl | Q-Solution |
| 44 µl | HPLC-Wasser |
| 44 µl | Primermix |
| 44 µl | DNA |
| 440 µl | gesamt |

Master Mix 2

| | | Ohne DNA und Primer |
|------------|--------------------|--|
| Tube 2 | 40µl x 12 = 480 µl | je 32 µl |
| Tube 3 | 30µl x 12 = 360 µl | je 24 µl |
| Kontrollen | 10µl x 2 = 20 µl | je 8 µl |
| Insgesamt | = 860 µl | + Pipettierfehler ergibt 1100 µl insgesamt |

| | |
|----------------|---------------------|
| 550 µl | MultiplexMix |
| 110 µl | Q-Solution |
| 220 µl | HPLC-Wasser |
| 110 µl | Primermix |
| 110 µl | DNA |
| 1100 µl | gesamt |

MultiplexMix, HPLC Wasser und Q-Solution zusammenpipettieren. Vom **Master Mix 1** jeweils **24 µl** in Tube 1 und 8 µl in die Kontrolle geben. Vom **Master Mix 2** jeweils **32 µl** in **Tube 2**, **24 µl** in **Tube 3** geben und jeweils 8 µl in die Kontrollen geben. In die Kontrollen jeweils 1 µl HPLC Wasser als DNA Ersatz geben. Im Anschluß die Primerlösung zu den einzelnen Tubes geben. Hierzu **3 µl** in **Tube 1** und **3**, **4 µl** in **Tube 2** und **1 µl** in die **Kontrollen** geben. Am Schluss die jeweilige Menge an DNA (100ng/µl) hinzugeben.

Protokoll zur Aufreinigung der PCR Produkte

- 5faches Volumen der Menge an Amplicon an **Binding Buffer PB[®]** hinzugeben.
- Emulsion in Zentrifugationssäule überführen.
- Für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugieren
- Zentrifugat verwerfen.
- Auf jede Säule **750µl Wash Buffer PE[®]** hinzufügen.
- Für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugieren.
- Zentrifugat verwerfen.
- Für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugieren.
- Große 2ml Tubes beschriften und die Zentrifugationssäulen in diese Tubes umsetzen.
- Je 11,5µl **Elution Buffer EB[®]** je Primerrichtung den Tubes hinzufügen.
- Für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugieren.
- Zentrifugationsröhrchen verwerfen und Eluat bei 4°C lagern.

Protokoll zur Durchführung der Sequenzanalyse

1.) Primerverdünnung zur Sequenzierung (1,6µM each, von 100 µM)

$$100:1,6 = 62,5 \quad \rightarrow \quad 1 \quad : \quad 61,5 \mu\text{l}$$

$$\quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \rightarrow \quad 2 \quad : \quad 123 \mu\text{l HPLC Wasser}$$

- 24 Tubes beschriften
- In jedes Tube 123µl HPLC Wasser und 2µl Primer geben.

2.) Berechnung der benötigten PCR Produkt Menge

- Die gewünschte Konzentration soll 150ng/µl betragen.
→ 150ng/µl : gemessene conc. Amplicon = benötigtes Volumen
→ Werte in Exceltabelle einfügen

3.) Berechnung der benötigten Menge an HPLC Wasser

- PCR-Produkt+HPLC Wasser = 12,5 µl
- Werte in Exceltabelle eintragen

4.) Übersicht Zusammensetzung

In jedem der 24 Tubes sind:

| | |
|---------|---------------|
| 4 µl | 5X SeqBuffer |
| 2 µl | BigDye |
| 1,5 µl | Primer |
| 12,5 µl | Amplicon+HPLC |
| 20 µl | gesamt |

- Zur MasterMix Erstellung zunächst 5XSeqBuffer und Big Dye zusammengeben und hiervon jeweil 6µl in jedes Tube umfüllen.
- Anschließen jeweils 1,5 µl Primer in jedes Tube geben.
- Zum Schluss das jeweilige Amplicon plus HPLC Wasser in die Tubes geben.

5.) Sequenzierung

- Sequenzansatz in den Thermocycler stellen.
- Programm Nr 51 mit Annealing Temperatur 55 °C wählen.

Protokoll zur Durchführung der Bestimmung der Copy Number Variations

Eine Platte entspricht 96 Wells. Jede Probe wird vierfach bestimmt (zur Analyse wird hieraus der Median ermittelt). $96:4= 24$ Proben. D.h. insgesamt können max. 23 Patientenproben und eine Negativkontrolle auf eine Platte.

Mastermixerstellung

Zur Berechnung gehen wir inclusive Pipettierfehler von 125 wells ausgegangen.

Nach dem Protokoll wird benötigt:

- 10 µl 2XTaqMan® Genotyping Master Mix
- 1 µl TaqMan® Copy Number assay, 20X working stock
- 1 µl TaqMan® Copy Number Reference Assay, 20X
- 4 µl Nuclease freies Wasser

Hieraus ergibt sich bei 125 wells:

| | |
|---------|---------------------------------------|
| 1250 µl | 2XTaqMan® Genotyping Master Mix |
| 125 µl | CopyNumberAssay |
| 125 µl | RNase-P als Referenz |
| 500 µl | HPLC Wasser |

Den MasterMix zusammenstellen und im Anschluss 24 x 500µl Tubes beschriften. Jeweils 80µl des MasterMix in die 24 Tubes geben. Pipettenspitze hierbei jedes Mal wechseln. In die 4 Negativkontrollen jeweils 20µl HPLC Wasser als DNA Ersatz geben. In jedes Tube abschließend 20µl DNA (5ng/µl) geben.

Ein 96well TaqMan® Platte (im Schrank unter DNA Arbeitsplatz) auf ein fusselfreies Tuch stellen. Mit Parafilm die Platte vorübergehend abdecken.

Je 20 µl der Probenansätze mit DNA in die einzelnen Wells pipettieren. Hierbei die Pipettenspitze jedes Mal wechseln. Abschließend kurz bis auf 2000rpm zentrifugieren.

Publikationsverzeichnis

Kongressbeiträge

Vorträge

A.Kropp Genomic variation in typical and atypical rolandic epilepsy in PRRT2 and SLC2A1, Vortrag, Young Researchers in Pediatric Epileptology Meeting 2012, Kiel, August 2012

A. Kropp Ebbersmeyer C., Genthner A., Welcker A., Neubauer B. A., Hahn A. Charakterisierung von Endophänotypen bei juvenilen idiopathischen generalisierten Epilepsien mittels transkranieller Magnetstimulation (TMS), Vortrag, 38. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, Münster 19.-22.04.2012 (Abstract in: *Neuropediatrics* (2012) 43: 73-117), April 2012

Poster

A. Kropp, et al. Intrakortikale Inhibition und Fazilitierung bei juvenilen primär generalisierten Epilepsien. Poster. 51. Jahrestagung für Epileptologie, Stuttgart 29.02-03.03.2012 (Abstract in: *Zeitschrift für Epileptologie* (2012) 25: Suppl. 1: 1-49), Februar 2012

Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Erstgutachter und Betreuer Herrn Professor Dr. med. Neubauer. Er hat bei mir das Interesse an Epilepsiegenetik geweckt und mir die Dimension des Gegenstands meiner Forschung klar gemacht. Hierbei hat er mir aber immer die Freiheit gelassen, meine eigene Sichtweise der Dinge Ausdruck zu verleihen. Ich danke ihm für die Ermöglichung der Bearbeitung des Themas sowie die engagierte Betreuung, mit der er die Entstehung dieser Arbeit begleitet hat.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meinem Zweitgutachter für die kritische Begutachtung der Arbeit und das hilfreiche Feedback bedanken.

Mein aufrichtiger Dank gilt den vielen Patienten und Familienmitgliedern die bereit waren, an der Studie teilzunehmen. Ebenso gilt mein Dank allen beteiligten Kollegen, die an der Rekrutierung weiterer Patienten und Probanden beteiligt waren.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Kinderneurologie und des Forschungsnetzes EuroEPINOMICS für die vielen interessanten Diskussionen und wertvollen Anregungen. Zu nennen ist insbesondere Frau Stefanie Garkisch, die mich umfassend in die molekulargenetische Laborarbeit eingearbeitet und mich bei der Versuchsdurchführung unterstützt hat.

Ein ebenso besonderer Dank gilt meinem stets aufmunternden und erheiternden familiären Umfeld. Hervorzuheben ist hier insbesondere mein „Haus- und Hofstatistiker“ Urs. Er hat mich fachlich kompetent und überaus geduldig mit der nötigen Prise an Humor bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse unterstützt. Für das Korrekturlesen der Arbeit und die konstruktiven Kommentare danke ich ihm gleichermaßen. Mein allergrößter und liebevoller Dank gilt ihm gemeinsam mit unserer kleinen Ida und dem noch ungeborenen Geschwisterchen, die mir die Zeit für die Erstellung der Arbeit ermöglichten und geduldig mit dem zur Welt kommen und Papa werden gewartet haben, bis der Großteil dieser Arbeit geschafft war.