

Mutationsanalyse des PCDH19-Gens bei frühkindlichen epileptischen Enzephalopathien

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Vera Luise Pöhler

aus Paderborn

Gießen

2013

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

Leiter: Prof. Dr. Bernd A. Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. Bernd A. Neubauer

Gutachter: Frau PD Dr. Heidrun Krämer

Tag der Disputation: 04.06.2014

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Epileptische Enzephalopathien	2
1.1.1	Dravet-Syndrom	2
1.1.2	EFMR	4
1.1.3	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+)	5
1.2	Vererbungsmuster von PCDH19	5
1.3	Die Protocadherine	6
1.4	Zielsetzung	7
2	Materialien und Methoden	9
2.1	Materialien	9
2.1.1	Geräte und Zubehör	9
2.1.2	Chemikalien	11
2.1.3	Lösungen	12
2.1.4	Software	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	DNA-Extraktion aus EDTA-Blut	14
2.2.2	Bestimmung und Einstellung der DNA-Konzentration	15
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
2.2.4	Amplifikation des PCDH19-Gens	16
2.2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA	16
2.2.6	DNA-Sequenzierung	17
2.2.7	Sequenzanalyse	18
2.2.8	Klonierung	19
2.2.9	Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse	20
2.2.10	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	21
3	Studienkollektiv	23
3.1	Fallgeschichten	23
3.1.1	Patientin 1 Mutation PCDH19 c.289_303del	23
3.1.2	Patientin 2 Mutation PCDH19 c.379C>G	23
3.1.3	Patientin 3 Mutation PCDH19 c.695A>G	24
3.1.4	Patientin 4 Mutation PCDH19 c.819_833delins	24
3.1.5	Patientin 5 Mutation PCDH19 c.956_959del	25
3.1.6	Patientin 6 Mutation PCDH19 c.1019A>G	25
3.1.7	Patientin 7 Mutation PCDH19 c.1130A>G	26

3.1.8	Patientin 8 Mutation PCDH19 c.1441_1442delinsCT	26
3.1.9	Patientinnen 9 und 10 Mutation PCDH19 c.1841delT	27
3.1.10	Patientin 11 Mutation PCDH19 c.3041_3056dup	28
3.2	Zusammenfassung klinisches Erscheinungsbild des Studienkollektivs	29
4	Ergebnisse	35
4.1	Überblick	36
4.2	Mutationsbefunde von Exon 1	38
4.2.1	Mutation c.289_303del	39
4.2.2	Mutationen c.695A>G; c.379C>G; c.1019A>G; c.1130A>G	40
4.2.3	Mutation c.819_833delins	44
4.2.4	Mutation c.956_959del	45
4.2.5	Mutation c.1441_1442delinsCT	46
4.2.6	Mutation c.1841delT	47
4.2.7	Stille Mutation c.6G>A und c.1683G>A	49
4.2.8	Polymorphismen c.81C>T, c.402C>A, c.1137C>T, c.1627C>T	49
4.3	Mutationsbefund Exon 5	51
4.3.1	Stille Mutation c.2652C>T	51
4.3.2	Mutation c.3041_3056dup	52
4.3.3	Polymorphismus c.3698C>T	53
5	Diskussion	55
5.1	Dravet-Syndrom	55
5.2	EFMR	55
5.3	Vergleich Dravet-Syndrom mit EFMR	56
5.4	Befunde	56
5.5	Vererbungsmodus und Pathomechanismus	57
5.6	Vergleich der Befunde mit Literaturbefunden	57
5.7	SSCP-Analyse	59
5.8	Schlussfolgerung	60
6	Zusammenfassung	61
7	Summary	63
Anhang		
Literatur		71
A	Ergänzende Tabellen	77
A.1	SSCP-Gele: Übersicht der Bedingungen	77
A.2	Primerbestimmung PCDH19	78
A.3	Übersicht der PCDH19-Mutationen	79

1 Einleitung

Das Wort Epilepsie kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Ergriffen werden“, „Gepackt werden“ oder „von etwas befallen oder erfasst sein“ [29]. Bei einem epileptischen Anfall kommt es zu einer vorübergehenden Funktionsstörung des Gehirns infolge exzessiver Entladungen von Nervenzellen. Die Epilepsie ist wiederum durch diese wiederholt unprovokiert auftretenden zerebralen Krampfanfälle charakterisiert [23]. In Europa beträgt die Prävalenz der Epilepsie 0,52% [41].

Die Einteilung der verschiedenen Epilepsien und der epileptischen Anfälle wird durch die ILAE (International League against Epilepsy) organisiert. 1960 wurde die erste internationale Klassifizierung veröffentlicht, 1981 bzw. 1989 wurde die Einteilung der epileptischen Anfälle bzw. die der Epilepsien überarbeitet. Diese Einteilung besteht in ihren Grundzügen bis heute, sie basiert hauptsächlich auf den Erkenntnissen aus der Neuroradiologie, der Genetik und den Konzepten der Molekularbiologie.

Die epileptischen Anfälle werden laut der ILAE als vorübergehendes Auftreten von krankhaften Befunden und/oder Symptomen aufgrund einer pathologisch exzessiven oder synchronen neuronalen Aktivität im Gehirn [19] definiert. Sie werden in generalisiert (Ausbreitung der neuronalen Entladung auf beide Hemisphären), fokal (auf eine Hemisphäre beschränkt) und unbekannt eingeteilt.

Die Epilepsie „ist 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“ [19]. 2010 wurde von der ILAE ein neues Schema veröffentlicht (*Revidierte Terminologie und Konzepte zur Einteilung von epileptischen Anfällen und Epilepsien: Bericht der Klassifikations- und Terminologiekommision der Internationalen Liga gegen Epilepsie, 2005-2009*), welches die „Elektroklinischen Syndrome und andere Epilepsien“ klassifiziert: zum Einen werden die Elektroklinischen Syndrome nach Manifestationsalter (aufgeteilt in Neugeborenenzeit, Kleinkindalter, Kindesalter und Adoleszenz-/Erwachsenenalter) und in weniger spezifische Altersbeziehungen eingeteilt, zum Anderen in Unverwechselbare Konstellationen (wie zum Beispiel das Rasmussen-Syndrom oder die Hemikonvulsions-Hemiplegie-Epilepsie), in Epilepsien aufgrund von und eingeteilt nach strukturell-metabolischen Ursachen (wie zum Beispiel aufgrund von Tumoren, Infektionen, Traumen usw.), in Epilepsien unbekannter Ursache und in Zustände mit epileptischen Anfällen, die traditionell nicht als eine Epilepsieform per se betrachtet werden (unterteilt in Benigne Neonatale Anfälle und fiebergebundene Anfälle) [3].

1.1 Epileptische Enzephalopathien

Eine epileptische Enzephalopathie ist ein elektroklinisches Syndrom, das mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit einhergeht, dass Betroffene enzephalopathische Merkmale (zum Beispiel Kognitions- und Verhaltensstörungen) entwickeln, die sich nach dem Beginn der Epilepsie erstmals zeigen oder verschlechtern. Dieses beinhaltet im Umkehrschluss, dass eine Unterbindung der epileptischen Aktivität zu einer Verbesserung des Verhaltens und der Kognition führen kann [3]. Bestimmte Syndrome werden unter dem Begriff epileptische Enzephalopathie zusammengefasst, wobei man jedoch berücksichtigen muss, dass enzephalopathische Auswirkungen von Anfällen und Epilepsien bei allen Epilepsieformen vorkommen können.

Diese bestimmten Syndrome, die zu den epileptischen Enzephalopathien gezählt werden, bestehen aus einer Gruppe von seltenen Erkrankungen, die durch einen frühen Beginn in den ersten Lebensjahren und einen therapieschwierigen Verlauf sowie multiple Komorbiditäten gekennzeichnet sind [39]. Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist sehr unterschiedlich, zu ihr gehören symptomatische Gehirndefekte, metabolische Ursachen und zahlreiche genetische Syndrome. Zu den epileptischen Enzephalopathien, die eine genetische Ursache haben, zählt das Dravet-Syndrom [7], die *CDKL5/STK9* Rett ähnliche epileptische Enzephalopathie [48], die *ARX* assoziierte epileptische Enzephalopathie [40], die SRPX2-related Rolando-Epilepsie assoziiert mit Dyspraxie und mentale Retardierung [34] und die EFMR (Epilepsy and mental retardation limited to females) assoziiert mit Mutationen in *PCDH19*[13].

Im Folgenden sollen das Dravet-Syndrom, die EFMR und das GEFS+ Syndrom näher dargestellt werden, da diese Erkrankungen im Zusammenhang mit Mutationen im *PCDH19*-Gen stehen.

1.1.1 Dravet-Syndrom

Das Dravet-Syndrom ist auch unter dem Namen „schwere myoklonische Epilepsie im Kindesalter, kurz SMEI“ bekannt, welches 1978 von Dravet [5] zum ersten Mal beschrieben wurde. Das Dravet-Syndrom gehört derzeit zu der Gruppe der epileptischen Enzephalopathien, daher auch die Bezeichnung EIEE6 (*early infantile epileptic encephalopathie [MIM 607208]*). Derzeit wird das Syndrom nach der aktuellsten Veröffentlichung der ILAE zu den elektroklinischen Syndromen und andere Epilepsien im Kleinkindalter gezählt [3].

Diese Form der Epilepsie ist durch febrile und afebrile, entweder generalisierte oder unilaterale, klonische oder klonisch-tonische Anfälle charakterisiert [17]. Die Anfälle treten innerhalb des ersten Lebensjahres, im Durchschnitt mit sechs Monaten, bei bis zu diesem Zeitpunkt normal entwickelten Kindern auf. Die ersten Anfälle werden dabei typischerweise durch Fieber getriggert, jedoch können sie im Verlauf der Erkrankung auch ohne Fieber auftreten. Dieser erste Anfallstyp ist klonisch, entweder generalisiert oder unilateral, mit wechselnder Lateralisation

und von der Dauer variabel. Die febrilen Anfälle können sich innerhalb von 6 bis 8 Wochen in prolongierter Form wiederholen, die oft zu einem Status epilepticus führen [17]. Neben den klonischen Anfällen können im Verlauf myoklonische Anfälle, die typischerweise generalisiert sind und normalerweise mehrere Male am Tag auftreten, und Absencen, die eine sehr kurze Dauer haben und als EEG-Korrelat rhythmische generalisierte spike-waves erkennen lassen, vorkommen. Ein weiterer Anfallstyp besteht aus komplex partiellen Anfällen, die gelegentlich sekundär generalisieren können.

Mit dem zweiten Lebensjahr tritt in der Regel eine psychomotorische Retardierung auf. Darauf folgend entwickeln sich fortschreitende neurologische Defizite wie Ataxien und Pyramidenbahnzeichen. Zusätzlich sind alle Patienten kognitiv beeinträchtigt, was sich bis zum vierten Lebensjahr verstärkt. Die Prognose des Dravet-Syndroms ist ungünstig. Betroffene Kinder werden ihr Leben lang unter Anfällen leiden, lediglich die partialen Anfälle und myoklonischen Zuckungen verschwinden oder werden schwächer. Die Therapiemöglichkeiten sind größtenteils sehr unbefriedigend. Um generalisierte Anfälle zu verhindern ist es wichtig, Infektionen und Hyperthermien zu vermeiden. Die Mortalitätsrate beträgt 15,9 bis 18% [15].

In 15-25% der Fälle besteht eine positive Familienanamnese entweder für Epilepsie oder für Fieberkrämpfe [14]. Die Inzidenz der SMEI beträgt weniger als 1 zu 40000 [25], ähnliche Zahlen wurden von Yakoub et al. 1992 bestätigt mit 1:20000 [49]. Jungen sind doppelt so häufig betroffen wie Mädchen [17].

Für die Entstehung der SMEI sind Mutationen im *SCN1A* Gen von großer Bedeutung. Sie konnten bei Anwendung moderner Diagnosekriterien in Studien mit Häufigkeiten von etwa 80% nachgewiesen werden [21]. Bei *SCN1A* negativen Patienten mit der Diagnose Dravet-Syndrom wurden in mehreren Studien Mutationen im *PCDH19*-Gen entdeckt [31] [9]. Es wird angenommen, dass *PCDH19*-Mutationen für 5% aller Patienten mit Dravet-Syndrom für dieses Krankheitsbild verantwortlich sind [9], wobei Depienne es als epileptische Enzephalopathie, die das Dravet-Syndrom nachahmt, beschreibt. *PCDH19-DS* Patienten und *SCN1A-DS* Patienten haben viele Gemeinsamkeiten: die normale psychomotorische Entwicklung vor Anfallsauftreten, die Assoziation von febrilen und afebrilen Anfällen, der Anfallsbeginn im ersten Lebensjahr, Auftreten von hemiklonischen oder unilateralen Anfällen, in Assoziation mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen und die mentale und motorische Retardierung nach Beginn der Erkrankung. Die *PCDH19-DS* Patienten unterscheiden sich nur gering von den *SCN1A-DS* Patienten: sie sind bei Anfallsbeginn etwas älter (durchschnittlich 9,5 Monate im Gegensatz zu 6,3 Monaten), sie neigen weniger häufig zu einem Status epilepticus (46% gegenüber 82%), die Anfälle können bei den *PCDH19-DS* Patienten wesentlich besser medikamentös kontrolliert werden und zudem war die kognitive Beeinträchtigung geringer ausgeprägt. Jedoch sind diese Unterschiede nicht ausreichend voneinander abzugrenzen, da sich die klinischen Spektren größtenteils überlappen [11].

1.1.2 EFMR

Die EFMR (*Epilepsy and mental retardation limited to females*), auch bekannt als Juberg-Hellman-Syndrom, ist eine Erkrankung mit einem X-chromosomal gebundenen Vererbungsmuster und einem ungewöhnlichen Geschlechts-limitierten Expressionsmuster. Sie wird wie das Dravet-Syndrom zu den frühkindlichen epileptischen Enzephalopathien gezählt und ist somit auch unter der Bezeichnung EIEE9 (*early infantile epileptic encephalopathy [MIM 30088]*) bekannt. Typischerweise äußert sich eine X-chromosomal gebundene Vererbung durch erkrankte Männer und nicht erkrankte Frauen, die dieses Merkmal heterozygot besitzen [26]. Bei dem Vererbungsmuster der EFMR verhält es sich genau umgekehrt: Der Stammbaum von erkrankten Patientinnen fällt durch ausschließlich erkrankte Frauen bei nicht erkrankten Männern auf.

EFMR wurde erstmals von Juberg und Hellman 1971 [28] bei einer nordamerikanischen Familie beschrieben. In dieser Familie fiel auf, dass bei den weiblichen Mitgliedern im Kleinkindalter Krampfanfälle auftraten und sie daraufhin eine Entwicklungsregression mit milden bis profunden intellektuellen Beeinträchtigungen zeigten [38]. Das Durchschnittsalter bei Anfallsbeginn beträgt etwa 14 Monate. Die Anfälle werden als afebril fokal und generalisiert tonisch-klonisch beschrieben, wobei die Anfallshäufigkeit sich schrittweise erhöht. Scheffer et al. untersuchte an 27 an EFMR erkrankten Mädchen und Frauen aus vier verschiedenen Familien das Krankheitsbild. Hierbei zeigten sich tonisch-klonische fokale und generalisierte Anfälle, Absencen, myoklonische, tonische und atonische Anfälle. 63% dieser Anfälle entwickelten sich unter Fieber. Mit einem Durchschnittsalter von 12 Jahren kam es zu einem Stillstand der Anfälle [38]. Zudem kam Scheffer zu dem Ergebnis, dass die Entwicklungsregression sehr variiert. So kann die Entwicklungsregression mit dem ersten Anfall oder erst später innerhalb des zweiten bis vierten Lebensjahres eintreten oder es besteht von Geburt an eine nicht normale Entwicklung.

Die Mehrheit der Patientinnen mit EFMR ist intellektuell leicht bis stark eingeschränkt, nur zwei von zwanzig Frauen sind normal begabt [35]. Außerdem zeigen Patientinnen mit EFMR psychiatrische Auffälligkeiten, dazu zählen Autismus-Spektrum-Störungen und Zwänge. Insgesamt sind die klinischen Symptome der EFMR schwierig abzugrenzen, da sie stark variieren und damit einhergehend sich mit anderen Erkrankungen überschneiden, wie zum Beispiel dem Rett-Syndrom, dem Aufmerksamkeits-Defizit-Syndrom (ADS) und verschiedene Formen der Epilepsien [26]. 2008 wurden von Dibbens et al. 737 Gene des X-Chromosoms sequenziert und dabei in sieben Familien mit Mitgliedern, die an EFMR leiden, verschiedene Mutationen im *PCDH19*-Gen entdeckt, sodass Mutationen im *PCDH19*-Gen als Ursache für diese Erkrankung angenommen werden können [12].

1.1.3 Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+)

Das Krankheitsbild der GEFS+ besteht aus einem Spektrum von Phänotypen, was es klinisch zu einem sehr heterogenen Syndrom macht. Zu diesem Spektrum gehören die Fieberkrämpfe, die Fieberkrämpfe plus, die Fieberkrämpfe plus und Absencen, die Fieberkrämpfe plus und myoklonische Anfälle, die Fieberkrämpfe plus und atonische Krämpfe und die myoklonisch astatische Epilepsie (MAE) [37]. Als Fieberkrämpfe plus werden Fieberkrämpfe beschrieben, die noch nach dem 6. Lebensalter hinaus bestehen, assoziiert mit oder ohne afebrile generalisierte Krampfanfälle, die keinem anerkannten Syndrom zugeordnet werden können [37].

Als Ursache für diese Erkrankung konnten verschiedene Mutationen nachgewiesen werden, wobei drei Gene für die Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals kodieren, *SCN1A* [18], *SCN2A* [42], *SCN1B* [47] und ein Gen für einen GABA-Rezeptor *GABRG2* [46]. Zusätzlich konnten Depienne et al. bei einer Familie mit drei wahrscheinlich an GEFS+ erkrankten Frauen eine Mutation im *PCDH19*-Gen nachweisen [11].

1.2 Vererbungsmuster von *PDCH19*

Das *PCDH19*-Gen befindet sich auf dem X-Chromosom Locus q22, sodass das *PCDH19*-Gen autosomal vererbt wird. Wie im Kapitel 1.1.2 beschrieben, verläuft der Vererbungsmodus sehr ungewöhnlich: Heterozygote Frauen sind betroffen, während homozygote Männer phänotypisch verschont bleiben. Zurückzuführen ist dieser pathogenetische Mechanismus wahrscheinlich auf eine sogenannte zelluläre Interferenz. Hierbei kommt es zu einem pathogenen Effekt, wenn in einem Gewebe normale und mutierte Zellen nebeneinander vorliegen (Gewebe mosaik) und dabei abnormal miteinander interagieren. Aufgrund der zufälligen Inaktivierung des X-Chromosoms bei Frauen mit Mutationen im *PCDH19*-Gen entstehen diese Mosaiken (also *PCDH19* positive und *PCDH19* negative Zellen), die zur Erkrankung führen. Bei normalen Individuen und homozygot Betroffenen kann es aufgrund der fehlenden Mosaikbildung nicht zu der pathogenetischen zellulären Interferenz kommen. Diese Hypothese wurde von Depienne et al. [9] untermauert, da sie in ihrer Studie einen erkrankten männlichen Probanden entdeckten, der in seinen Fibroblasten ein Mosaik für eine Deletion im *PCDH19*-Gen enthielt. Dieser Pathomechanismus im Zusammenhang mit X-chromosomalen Vererbungsgängen ist nicht unbekannt, beispielsweise wurde er bereits bei dem Cranio-fronto-nasalem-Syndrom (CFNS) beschrieben [8]. Des Weiteren könnte dieser Mechanismus als Erklärung für die hohe Variabilität des Phänotyps auch innerhalb von Familien dienen. Eine vollständige Inaktivierung eines X-Chromosoms würde in Bezug auf das *PCDH19*-Gen zu einer homogenen Zellpopulation (bezogen auf das mutierte oder das nicht mutierte Gen) führen, welches aufgrund der fehlenden Mosaikbildung als nicht pathogene Situation einzustufen wäre. Eine teilweise unausgewoge-

ne Inaktivierung eines X-Chromosoms (wie zum Beispiel im Verhältnis von 60:40, 70:30 oder 80:20) könnte zu einem geringer ausgeprägtem Krankheitsbild als eine zufällige X-Inaktivierung (50:50) führen, weil es hier zu der höchsten zellulären Interferenz kommen würde [11].

Da es sich um einen X-chromosomal gebundenen Vererbungsmodus handelt, haben Patientinnen mit *PCDH19*-Mutationen ein Risiko von 50%, diese Mutation zu vererben, jedoch würden nur betroffene Töchter erkranken, sodass sich eine Wahrscheinlichkeit von 25% ergibt, als erkrankte Mutter ein erkranktes Kind zu bekommen [11].

1.3 Die Protocadherine

Das *PCDH19*-Gen codiert für ein 1148 Aminosäure-langes Protocadherin der delta-2-Unterklasse. Die Protocadherine gehören zu der größten Subgruppe der Cadherine [4]. Für die Cadherine wurden mittlerweile über 100 verschiedene Gene identifiziert. Die Cadherine sind ursprünglich als Calcium-abhängige Zell-Adhäsions-Moleküle beschrieben worden, wobei man heute weiß, dass sie noch in vielen anderen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen, wie zum Beispiel bei der Zellerkennung und bei neuronalen Schaltkreisen [32].

Die Protocadherine werden überwiegend in neuronalem Gewebe und zu verschiedenen Entwicklungsstadien exprimiert [45]. Es wird angenommen, dass sie in die Entwicklung von neuronalen Verbindungen und in Signaltransduktionen an der synaptischen Membran involviert sind [32] [33]. Das Protocadherin 19 besteht aus einer Signalsequenz, sechs extrazellulären Cadherinen, einer transmembranen Domäne und zwei zytoplasmatischen Domänen [13]. Bei dem Protocadherin 19 gibt es einige Isoformen aufgrund von alternativem Splicen und durch verschiedene Akzeptor-Stellen, sodass es wiederum zu Veränderungen in den zytoplasmatischen Domänen kommt [9] [33]. Ob diese Isoformen im Zusammenhang mit *PCDH19* assoziierten Erkrankungen stehen, ist zum aktuellen Stand noch nicht bekannt.

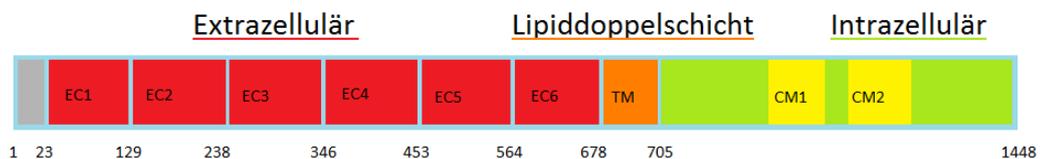


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Protocadherin 19, bestehend aus extrazellulärem Cadherin (EC), transmembranärer (TM) und cytoplasmatischer (CM) Domäne

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des *PCDH19*-Gens, welches ein Protocadherin kodiert, das hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert wird, in Bezug auf die Ätiopathogenese von Dravet-Syndrom ähnlichen Symptomen zu überprüfen. Dazu soll das klinische Erscheinungsbild, welches mit einer Mutation im *PCDH19*-Gen einhergeht, detaillierter eruiert und dargestellt werden. Hierfür wurden die 6 Exons des *PCDH19*-Gens von 108 Patientinnen und Patienten zur Bestimmung der Mutationsrate im entsprechenden Gen sequenziert. Die Patientinnen und Patienten sind zuvor alle negativ auf das *SCN1A*-Gen getestet worden, zusätzlich bestand bei ihnen als Verdachtsdiagnose das Dravet-Syndrom.

Außerdem wurde bei den entdeckten Mutationen und Polymorphismen die Methode der SSCP-Analyse (*single strand conformation polymorphism*) angewandt mit der Fragestellung, inwiefern mit dieser Methode die Mutationen und Polymorphismen dargestellt werden können. Da diese Methode wesentlich schneller und kostengünstiger als die Sequenzierung der einzelnen Proben ist, sollte somit geklärt werden, ob sie sich zum Aufdecken der Mutationen eignet, um dann später als Screening-Verfahren für das *PCDH19*-Gen etabliert werden zu können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Zubehör

Material	Hersteller
ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Blockthermostat QBT2, 2x Wechselblock	Grant, Cambridge, UK
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 °	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Germany
Gefrierschrank -70 °	Heraeus GmbH, Hanau, Germany
Gel Blotting Papier GB002	Schleicher und Schuell, Dassel, Germany
Gelelektrophorese Kammer (vertikal)	Multigel Long Maxigel Biometra/ Whatmann, Göttingen, Germany
Gelkammer Invitrogen™ Horizon 58	Invitrogen, Darmstadt, Germany
Geltrockner Minidry D61	Biometra/ Whatmann, Göttingen, Germany
Geltrocknungsfolie, Cellophan	Biometra/ Whatmann, Göttingen, Germany
Kühlthermostat K15	Haake, Karlsruhe, 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
Mikrotiterplatte PP , U-Form, 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Mikrowelle LG MS 197H	LG Electronics Inc., Seoul, South Korea

2. MATERIALIEN UND METHODEN

Material	Hersteller
Mobile Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Germany
Nano-Drop 1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
PCR-Platte PP, natur, 96 Well	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Germany
Photometer Pharmacia Biotech Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Dübendorf, Suisse
Pipettenspitzen Filter-Tips PE oberflächenoptimiert 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Germany
Pipettenspitzen LTS Tips 250 µl	Rainin, Mettler Toledo Intl. Inc., Gießen, Germany
Reaktionsgefäße 0,2 ml für die PCR PP	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany
Röhrchen 50 ml mit Schraubverschluss PP	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Rotoren 11150/13350 swing out	
12169H fixed angle	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany
Spannungsgerät Power supply PS305T	Biometra/ Whatmann, Göttingen, Germany
Thermocycler T3000	Biometra GmbH, Göttingen, Germany
UV-Bestrahlungssystem Stratagene 2400	Stratagene AG, La Jolla, USA
UV-Kamera-System	Polaroid Ecommerce, Minnetonka, Minnesota, USA
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage Ohaus Navigator™	Ohaus Corp., New Jersey, USA
Wasserbad WB1	Köttermann Laborgeräte GmbH, Medingen, Germany
Wippschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Zentrifuge 4k15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany
Zentrifuge Hettich® Mikro 200R	Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Germany
Zentrifuge Hettich® Rotana 50	Hettich, GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Germany

Tabelle 2.1: Geräte und Zubehör

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Germany
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Germany
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1	Applied Biosystems, Foster City, California
Bromphenolblau Indikator	Merck, Darmstadt, Germany
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich Co., München, Germany
EDTA Puffer 10x	Applied Biosystems, Foster City, California
Essigsäure Rotipuran 100% p.A.	Roth, Karlsruhe, Germany
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
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Germany
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
Natriumcarbonat p.A. ACS, ISO	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
PCR-Oligonukleotidprimer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany
PeqLab Universal Agarose	PEQLAB GmbH, Erlangen, Germany
Phenol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Polyacrylamid (PAA) 40% 19:1 Rotiphorese 40	Roth, Karlsruhe, Germany
POP6 Polymer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Qiagen Multiplex PCR Kit 1000	Qiagen, Hilden, Germany
Qiaquick PCR Purification Kit 250 mit Buffer PB®, Buffer PE®, Buffer EB	Qiagen, Hilden, Germany
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Salpetersäure p.A.	Merck, Darmstadt, Germany
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Co., München, Germany
Silbernitrat p.A. ACS, ISO	Merck, Darmstadt, Germany

Chemikalie	Hersteller
Tetramethylethyldiamin (Temed) p.A	Merck, Darmstadt, Germany
TRIS (Trometamol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Triton X-100 (4-Octylphenol Polyethoxylat)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany

Tabelle 2.2: Chemikalien

2.1.3 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
DNA-Extraktions-Puffer, steril filtriert	40 mM Tris pH 8 20 mM EDTA pH 8 100 mM NaCl ad 1l H ₂ O
Nuclei-Extraktions-Puffer, steril filtriert	109,5 g Saccharose 5 mM MgCl ₂ 10 ml Triton X-100 10 mM Tris pH 8 ad 1l H ₂ O
TAE-Puffer 50-fach	242g TRIS pH 8 57,1ml Acetat 100ml EDTA 0,5 M ad 1l H ₂ O
TBE (5x)	544,9 g Tris-Base 287,1 g Borsäure 46,5 g EDTA ad 10 l H ₂ O
TRIS-EDTA	50 mM Tris pH 8 10 mM EDTA
SSCP-Puffer 10 ml	Formamid (deionisiert) 100 l 1% Bromphenolblau 100 l 1% Xylene-cyanol 200 l 0,5 M Na*EDTA pH 8,0

Tabelle 2.3: Lösungen

2.1.4 Software

Software	Hersteller
Chromas Lite	Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australia
Multiple Sequence Alignment	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Mutalyzer	http://www.mutalyzer.nl/2.0/
NCBI-Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Seqscape [®] v2.1	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
SequenceAnalysis 3.7	Applied Biosystems, Foster City, California, USA

Tabelle 2.4: Software

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Ca. 5-7,5 ml EDTA-Blut auf 40 ml mit 0,9%iger NaCl-Lösung auffüllen
10 min bei 1400 rpm (190 G) und 4°C zentrifugieren
Überstand verwerfen und Pellet in 30 ml Nuclei-Extraktions-Puffer geben
3 x 10 sec vortexen
30 min auf Eis inkubieren
10 min bei 2500 rpm (600 G) und 4°C zentrifugieren
Überstand abnehmen und verwerfen; Pellet in 500 μ l DNA-Extraktions-Puffer geben (kann in diesem Stadium bei -80°C gelagert werden)
Zugabe von 500 μ l DNA-Extraktions-Puffer/SDS 1
Zugabe von 1 Spatelspitze Protease K
3 Stunden bei 50°C im Wasserbad lagern
1 ml Phenol zugeben
30 min wippen
10 min bei 2500 rpm (600 G) und 4°C zentrifugieren
Überstand abnehmen und in 500 μ l Phenol geben
20 min wippen
10 min bei ca. 1300 rpm (160 G) zentrifugieren
Überstand abnehmen und in 500 μ l Phenol/Chloroform geben
20 min wippen
10 min bei ca. 1300 rpm (160 G) zentrifugieren
Überstand abnehmen und in 500 μ l Chloroform geben
20 min wippen
10 min bei ca. 1300 rpm (160 G) zentrifugieren
Überstand abnehmen und in 1000 μ l 3 M NaAc pH 5 + Ethanol 100% (1+19) geben
Manuell wippen
Über Nacht (oder mindestens 30 min) bei -20°C lagern
20 min bei ca. 1300 rpm (160 G) zentrifugieren
Überstand verwerfen
200 μ l Ethanol 70% zugeben
10 min bei ca. 13000 rpm (160 G) zentrifugieren
Überstand verwerfen
Pellet antrocknen
Pellet in 300 μ l Tris-EDTA aufnehmen
Über Nacht (oder wenigstens über Tag) bei 50°C im Wasserbad lagern
Auf Dauer bei 4°C lagern

Tabelle 2.5: Protokoll: Extraktion und Reinigung der DNA

Die zu analysierende DNA wurde aus den zellkernhaltigen Bestandteilen von Blutproben gewonnen. Hierfür stand EDTA-Blut zur Verfügung, welches entweder

direkt nach der Blutentnahme weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren und gelagert wurde.

Die Extraktion der DNA erfolgte mit der Phenol-Chloroform-Methode, die nach unten aufgeführtem Protokoll durchgeführt wurde. In Einzelfällen wurde DNA mit Hilfe des QIAamp Blood Midi Kit (Quiagen) aufgereinigt.

2.2.2 Bestimmung und Einstellung der DNA-Konzentration

Mit Hilfe des NanoDrop 1000 Spectrophotometers wurde die Konzentration der gewonnenen DNA bestimmt. Diese photometrische Messung basiert auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$A = E * b * c$$

wobei A die Absorption, E den Extinktionskoeffizienten, b die Weglänge des Lichtstrahls und c die Konzentration des absorbierenden Agens darstellt. Der Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA beträgt 50 ng-cm/l und die Weglänge b ist im Nanodrop 1000 auf $1,0 \text{ mm}$ standardisiert. Die Absorption setzt sich aus dem negativen Logarithmus der Lichtintensität der Probe geteilt durch die Lichtintensität einer Leerprobe (zum Beispiel destilliertes Wasser) zusammen [44]. Die Messung der Konzentration erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm , da sich hier das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren befindet. Um die Reinheit der DNA zu bestimmen, wird zusätzlich eine Messung bei 280 nm durchgeführt, hier liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der bei 280 nm sollte ungefähr $1,8$ sein, da man bei diesem Wert von einer reinen DNA ausgehen kann. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die DNA auf 10 ng/l verdünnt. Bei drei Proben war die Menge der extrahierten DNA nicht ausreichend, um eine Sequenzanalyse durchzuführen, sodass sie zwecks Reamplifizierung zu der Firma Qiagen geschickt wurde.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

1971 wurde durch Kleppe und seine Mitarbeiter der Grundstein zur Vervielfältigung von DNA gelegt. Erst Jahre später gelangte die Idee der Polymerasekettenreaktion durch Mullis, der 1993 den Nobelpreis für seine Arbeit bekam, an die Öffentlichkeit. Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, mit der sich selbst kleinste Mengen DNA *in vitro* vervielfältigen und somit nachweisen lassen. Die PCR wurde erst durch die Verfügbarkeit synthetischer DNA-Oligonukleotide und durch die Entdeckung von temperaturstabilen DNA-Polymerasen ermöglicht. Letztere besitzen eine optimale Arbeitstemperatur um die 70°C und überstehen auch Erhitzungen über 94°C , was erheblich zu einer Automatisierung dieser Methode beigetragen hat, da man gezielt die DNA denaturieren kann ohne die Polymerasen zu beeinträchtigen. In der PCR wird in jedem Arbeitszyklus der gewünschte Abschnitt der DNA verdoppelt. Durch häufiges Wiederholen, in dieser

Arbeit 35 Mal, erreicht man somit eine exponentielle Vervielfachung dieses DNA-Abschnittes. Ein Zyklus kann in drei Teile eingeteilt werden, in die Denaturierung, die Primerhybridisierung und die Elongation. Durch Erhitzung auf 94 °C werden die beiden Stränge der DNA voneinander getrennt (denaturiert). In einem zweiten Schritt lagern sich die Primer (synthetisch hergestellte Oligonukleotide) bei erniedrigter Temperatur an die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen DNA. Die optimale Temperatur hängt von der Länge und Sequenz der Primer ab, in unserer Arbeit wählten wir eine Temperatur von 65 °C, beziehungsweise 60 °C für die Primer von Exon 4 und Exon 6 d. Daran schließt sich die Phase der Elongation an, bei 72 °C startet die Polymerase an den Primern mit der DNA-Synthese und führt so zur vollständigen Amplifizierung des gewünschten Genabschnittes. Zur Durchführung der PCR wurde das Qiagen Multiplex Kit® verwendet, welches neben der Polymerase die Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), Magnesiumchlorid (MgCl₂) und einen patentierten Puffer enthält.

Tabelle 2.6: PCR-Ansätze und Einstellungen

Ansatz	PCR-Zyklus		
7,5 µl Multiplex	95°C	15min	x35
4,5 µl HO	94°C	30s	
1,5 µl Primer (f und r) 1,6 µmol/l	65°C/60°C	1min 30s	
1,5 µl DNA 10 ng/µl	72°C	45s	
	72°C	10min	

2.2.4 Amplifikation des PCDH19-Gens

Für jedes der sechs zu amplifizierenden Exons wurden je ein f- (*forward*) und r- (*reverse*) Primer mit Hilfe der Software *mutationsdiscovery.com* designt. Die einzelnen Primer besitzen eine Länge von 15 bis 25 Basenpaaren und beinhalten mindestens 10 Basenpaare, die mit dem vorangehenden (f-Primer) oder nachfolgenden (r-Primer) Intron überlappen.

Besonders lange Exons wurden in Unterabschnitte eingeteilt und entsprechende zusätzliche Primer zur Amplifikation dieser entworfen. Exon 1 wurde dabei in Abschnitte a-g eingeteilt, Exon 6 in a-d. Die genauen Angaben zu den Primern befinden sich im Anhang unter Abbildung A.2.

2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation wurde je ein Aliquot der einzelnen PCR-Produkte elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Von jeder Probe wurden dafür jeweils 3 µl mit 2 µl eines Lade-Puffers (*LoadingDye*®) gemischt und auf ein 2%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurden zum

Größenvergleich 10 µl des Größenstandards *GeneRTM® DNA Ladder* aufgetragen, welcher die DNA-Fragmentgrößen in 100 kb Schritten markiert. Die Auftrennung erfolgte in 2xTAE Laufpuffer bei einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 400 mA für 1 h 15 min. Anschließend wurde die im Gel enthaltene DNA mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid angefärbt, der mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Zusätzlich garantiert der Einsatz von Negativ-Proben, ein Ansatz aller bis dahin verwendeten Lösungen, jedoch ohne DNA-Produkte, die Kontaminationsfreiheit mit fremder DNA.

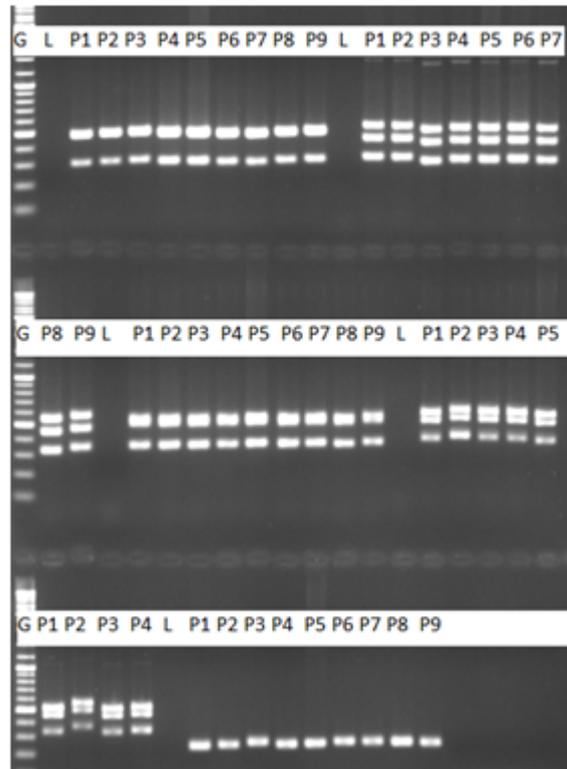


Abbildung 2.1: Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Exone von PCDH19, G=Genruler L=Leerprobe P1-9=Proben mit PatientendNA

2.2.6 DNA-Sequenzierung

Nach der PCR und der Gelelektrophorese erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels des QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden), um eventuelle Farbstoffe, Oligonukleotide und andere Reaktionsprodukte zu entfernen. Zur Sequenzierung der DNA wurde das System der Firma Applied Biosystems (*ABI Prism 3100, Genetic Analyzer*) angewendet, welches auf der Didesoxy-Methode nach Sanger basiert.

Tabelle 2.7: Protokoll Sequenzieransatz

Sequenzieransatz	Einstellung im Thermocycler:			
11,5 l Eluat aus der Aufreinigung	1.	96	Denaturierung	10 s
4 l BigDye® Buffer	2.	50	Annealing	5 s
2 l BigDye® Terminator	3.	60	Elongation	4 min
1,5 l Primer (forward o. reverse)	4.	4	Kühlung	

Bei dieser Methode wird ähnlich wie bei der zuvor durchgeführten Amplifikation der DNA mit Hilfe der PCR ebenfalls der Primer von einer Polymerase mittels Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) verlängert. Allerdings werden dem Ansatz zusätzlich fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs) hinzugefügt. Diese ddNTPs besitzen keine 3-Hydroxygruppe, sodass ein Einbau zum Kettenabbruch führt. Aufgrund des zufälligen Einbaus der ddNTPs führt dieses wiederum zu DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge mit einer fluoreszenzmarkierten ddNTP-Endung. Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese werden die DNA-Fragmente ihrer Länge nach im Sequenzierer aufgetrennt, um anschließend einen Fluoreszenzdetektor zu passieren, der mittels eines Lasers die jeweiligen Didesoxynukleotide ermittelt.

Zur Durchführung der Sequenzierung wurde zu der zuvor aufgereinigten DNA-Probe Oligonukleotidprimer, BigDye® Buffer und BigDye® Terminator aus dem BigDye® Cycle Sequencing Kit v3.1 hinzugefügt. Im Terminator sind sowohl die Didesoxynukleotide als auch eine Polymerase enthalten.

Im Anschluss der PCR wurde die DNA aus dem Produkt mittels eines Ethanol-Natriumacetat-Gemisches gefällt und nach einer 20minütigen Zentrifugation mit 70%igem Ethanol aufgereinigt. Die konzentrierte DNA wurde danach in *HiDi*TM Formamide gelöst, welches konservierend und antievaporativ wirkt, um dann im Sequenzierer analysiert werden zu können.

2.2.7 Sequenzanalyse

Die vom dem *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* ermittelten Daten wurden mit Hilfe der gerätespezifischen Software *ABI PRISM Data Collection Software* gesammelt und graphisch dargestellt. Zur Sequenzanalyse wurden die Daten in *SeqScape 2.1* importiert, um die ermittelte Sequenz mit der Referenzsequenz (NT 011651 17) zu vergleichen.



Abbildung 2.2: Ansicht des Computerprogramms Applied Biosystems Seqscape®
2.1

2.2.8 Klonierung

Durch die Klonierung lassen sich beide Allele eines Genabschnitts getrennt voneinander sequenzieren, sodass dadurch eine exakte Darstellung der Mutation gewährleistet ist. In unserer Studie trat eine Mutation auf, bei der sich der Reverse- und der Forward-Strang in der Mutation bei der Sequenzierung um eine Base unterschieden. Es handelte sich dabei um eine Duplikation. Zur genauen Identifizierung der Duplikation wurde hier die Methode der Klonierung angewandt.

Für die Klonierung wurde *TOPO TA Cloning Kit* for Sequencing der Firma Invitrogen benutzt. Bei dieser Methode werden die mittels PCR amplifizierten mutationstragenden DNA-Fragmente in einen Plasmid-Vektor eingeschleust. Der linearisierte Vektor zeichnet sich durch einen einzelnen überhängenden 3' Thymidinrest aus. Zusätzlich ist eine Topoisomerase kovalent an ihm gebunden, sodass man ihn auch als „aktivierten“ Vektor bezeichnet [27]. Mit Hilfe des Thymidinrestes und der Topoisomerase kann die DNA in den Vektor ligiert werden. Hierzu wurden das PCR-Produkt und der Plasmid-Vektor miteinander vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien transformiert (*One Shot Chemically Competent E. coli*). Dazu erfolgten zunächst eine Inkubation auf Eis für 5 bis 30 Minuten und ein anschließender Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C, damit die Vektoren in die Bakterien aufgenommen werden. Danach wurden die Bakterien in einem S.O.C. Medium für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf eine Platte mit einem S.O.C. Medium aufgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Hier findet eine positive Selektion statt, nur die Bakterien mit Vektoren die auch das PCR-Produkt aufgenommen haben, wachsen auf dieser Platte.

Diese Selektion kann aufgrund einer Disruption des letalen E.coli Gen, genannt CcdB stattfinden. Der Vektor enthält dieses letale Gen, welches jedoch aufgrund der Aufnahme des PCR-Produktes in den Vektor nicht mehr exprimiert werden kann [27]. Daher sterben die Bakterien, die den Vektor mit dem PCR-Produkt nicht enthalten, aufgrund der letalen Wirkung des CcdB-Gens ab und nur Stämme mit dem rekombinierten Vektor können wachsen. Danach wurden mehrere Kolonien gepickt und einem Medium zugeführt, welches Kanamycin, ein bakterizid wirkendes Antibiotikum, enthält. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kits* der Firma Invitrogen isoliert. Mittels der PCR wurde die so gewonnene DNA vervielfältigt, um dann sequenziert werden zu können.

2.2.9 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse

Die SSCP ist eine sensitive, dabei günstige, schnelle und praktische Methode um herauszufinden, welche DNA eine zum Wildtypen abweichende Sequenz trägt. Mit ihr können DNA-Variationen entdeckt werden, ohne dass unnötig viele Proben sequenziert werden müssen [43]. Die SSCP basiert auf der Methode der Gelelektrophorese, wobei ein Polyacrylamidgel als Matrix dient. Dieses Gel weist deutlich feinere Poren als ein Agarosegel auf und ist somit von der DNA schwerer zu durchwandern, was zur Folge hat, dass sie wesentlich besser aufgetrennt wird.

Für ein Gel mittlerer Größe wurden 15 ml PAA, 15 µl Temed und 150 µl APS zusammen pipettiert. Für die Polyacrylamidlösungen wurden zu 10%, 8% oder 6% aus einer 40%igen Acrylamidstammllösung mit 1x bzw. 0,5x TBE Puffer, dH₂O und optional 10% Glycerin angesetzt. Zur Erhöhung der Sensitivität wurden jeweils immer ein Gel mit Glycerin und ein Gel ohne Glycerin angesetzt. Das Glycerin reagiert mit den im TBE enthaltenen Bor-Ionen, was zur einer Senkung des pH-Wertes und Steigerung der Sensitivität führt [30]. Nach erfolgter Polymerisierung wurde das Gel mit den jeweiligen DNA-Proben beladen. Dazu wurden 2µl PCR-Produkt und 5µl SSCP-Puffer im Eppendorfgefäß gemischt und bei 94 °C für 10 min im Thermoblock denaturiert.

Tabelle 2.8: Protokoll zur Herstellung des Polyacrylamidgels sowie des SSCP-Puffers

Polyacrylamidgel:	SSCP-Puffer:
10% /8% /6% PAA in 0,5/ 1xTBE	10 ml Formamid (deionisiert)
TEMED	100 l 1% Bromphenolblau
10% (w/v) APS	100 l 1% Xylene-cyanol
Optional 10% Glycerin	200 l 0,5 M Na*EDTA pH 8

Nach dem Denaturieren wurde das PCR-Produkt schnell auf Eis heruntergekühlt und direkt auf die Gele aufgetragen, sodass die Doppelstrangrenaturie-

rung erschwert wird. Die Proben wurden dann bei 150-250 V für 12-16 h je nach Länge und Zusammensetzung der DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Die idealen Bedingungen für die jeweiligen Exons sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Bei der Denaturierung wird die Doppelstrang-DNA in zwei Einzelstränge aufgeteilt. Diese Einzelstränge besitzen die Tendenz, wieder eine doppelsträngige Form anzunehmen. Zum einen können die Einzelstränge mit ihrem komplementären Strang wieder die ursprüngliche Doppelstrang-Konformation annehmen oder zum anderen innerhalb ihres eigenen Stranges komplementäre Bereiche aneinanderlagern. Dabei bilden sich spezifische Schlaufen und Ausstülpungen, welche durch Anzahl, Länge und Ladungen der doppelsträngigen Bereiche definiert werden. Liegt eine Mutation vor, kann es zu einer veränderten Konformation verglichen mit der Wildtypsequenz kommen, was wiederum zu einer veränderten Mobilität bei der Elektrophorese führt. Sichtbar wird dieses an dem veränderten Bandenmuster, zum Beispiel durch einen Verlust oder Zugewinn einer Bande oder eines verschobenen Musters (siehe 2.3).

Tabelle 2.9: Einstellungen und Laufbedingungen der jeweiligen Exons

Exon	Temp. [°C]	U[V]	Dauer[h]	Laufpuffer	Gelkonz.	Gelgr.
1a	10	200	16	0,5x TBE	10/6% PAA	mittel
1b	10	200	12	0,5x TBE	10/6% PAA	mittel
1c	10	200	16	0,5x TBE	10/6% PAA	mittel
1d	10	200	16	0,5x TBE	10/6% PAA	mittel
1e	10	200	16	0,5x TBE	10/6% PAA	mittel
1f	10	200	12	0,5x TBE	10/6% PAA	mittel
5	10	200	12	0,5x TBE	10/6% PAA	mittel
6a	10	200	16	0,5x TBE	10/6% PAA	mittel
6c	10	200	16	0,5x TBE	10/6% PAA	mittel

2.2.10 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Zum Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte die Silberfärbung nach Budowle [2]. Bei diesem Verfahren werden Silberionen spezifisch an das Phosphat der DNA gebunden und in alkalischer Lösung zu Silber reduziert. Im Gegensatz zur Ethidiumbromidfärbung hat die Silberfärbung den Vorteil, dass auch einzelsträngige DNA, wie sie zum Teil in der SSCP vorliegt, angefärbt wird.

Die einzelnen Schritte wurden unter vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Gele ausreichend von der Lösung umspült werden. Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus den Kammern gelöst und für 10 min mit 10%igen EtOH fixiert. Anschließend wurden sie für 3 min in 1%igen HNO₃ oxidiert. Danach wurden sie für 20 min in AgNO₃

Tabelle 2.10: Verwendete Lösungen

Fixierer:	10% Ethanol
Oxidierer:	1% HNO ₃
Silberlösung:	0,012 M AgNO ₃
Entwickler:	0,28 M Na ₂ CO ₃
	0,5% w/v Paraformaldehyd
Stopplösung:	5% Essigsäure

inkubiert. Im folgenden Schritt wurden sie für 3 min in destilliertem Wasser gewaschen um überschüssiges AgNO₃ zu entfernen. Dann wurden die Gele zweimal nacheinander für jeweils etwa 3 min mit Entwickler umspült, hierbei wurden die Silberionen zu Silber reduziert, sodass mit diesen beiden Schritten das Bandenmuster der DNA sichtbar gemacht wurde. Zum Schluss wurde die Reaktion mit Hilfe von 5%iger Essigsäure gestoppt (10 min). Danach wurden die Gele auf ein spezielles Papier (Gel Blotting Papier GB002) aufgebracht und mit einer Geltrocknungsfolie abgedeckt, um sie dann bei 90 °C auf einer Heizplatte im Vakuum für ein bis zwei Stunden (je nach Geldicke und -größe) zu trocknen.



Abbildung 2.3: Polyacrylamidgel

3 Studienkollektiv

In der vorliegenden Studie wurden die Proben von 108 Patienten sequenziert. Alle Proben waren zuvor auf Mutationen im *SCN1A* Gen untersucht worden, wobei keine Mutation festzustellen war. Ein weiteres Einschlusskriterium war das weibliche Geschlecht, sodass sich eine Geschlechterverteilung von 100 Mädchen zu 8 Jungen ergab.

Die Studienpopulation setzt sich aus Erwachsenen und Kindern zusammen, die zum Teil von der Neuropädiatrie der Uni-Klinik Gießen betreut wurden, sowie vereinzelt von verschiedenen niedergelassenen Kinderärzten und Kinderkliniken.

3.1 Fallgeschichten

Im Folgenden werden die Fallgeschichten der Patientinnen unseres Studienkollektivs genauer beschrieben, bei denen eine Mutation im *PCDH19*-Gen vorliegt.

3.1.1 Patientin 1 Mutation *PCDH19* c.289_303del

Die im folgenden Abschnitt geschilderte Patientin mit der Mutation c.289_303del erlitt ihren ersten epileptischen Anfall im Alter von 15 Monaten mit einer Dauer von etwa fünf Minuten. Dieser hatte aus dem Schlaf heraus stattgefunden und begann mit einem plötzlichen Initialschrei und äußerte sich fokal in Kopfzuckungen nach rechts. Einige Stunden später kam es zu einem generalisierten Krampfanfall. Daraufhin ereigneten sich immer wieder in Clustern auftretende generalisierte tonisch-klonische Anfälle, darunter auch ein Anfall unter Fieber. Unter der Diagnose Grand-mal-Epilepsie wurde sie mit Clobazam, welches später ausgeschlichen wurde, Topiramat und Valproat behandelt.

3.1.2 Patientin 2 Mutation *PCDH19* c.379C>G

Die Trägerin der Mutation c.379C>G erlitt ihren ersten Anfall mit 14 Monaten. Dieser Anfall ereignete sich in Folge einer Pneumokokken-Impfung, worauf sieben weitere Anfälle im Anschluss folgten. Diese Anfälle waren tonisch-klonisch generalisiert, allesamt afebril mit einer durchschnittlichen Dauer von 1-2 Minuten, vorwiegend aus dem Schlaf heraus. Zwei Wochen darauf ereignete sich erneut eine Anfallsserie, die durch einen Infekt der oberen Atemwege getriggert worden war. Bei diesen Anfällen handelte es sich erneut um tonisch-klonisch generalisierte Anfälle. Daraufhin wurde das Mädchen auf Valproat und Clobazam eingestellt,

wobei sie auf das Valproat mit Haarausfall und zittrigen Händen als Nebenwirkung reagierte, was sich wiederum im Verlauf der Behandlung besserte. Zwei Monate später entwickelte sie erneut in Folge einer Impfung eine Serie von Anfällen. Dieses Mal waren jedoch neben den tonisch-klonisch generalisierten Anfällen auch zwei atonische Anfälle dabei. Die Therapie wurde daraufhin von Clobazam auf Topiramamat umgestellt, worauf die Patientin eine allmähliche Verschlechterung der Kognition und besonders der Sprache zeigte, sodass fünf Monate später Topiramamat durch Levetiracetam ersetzt wurde. Seitdem ist die Patientin anfallsfrei, es wurden lediglich im Alter von 2 Jahren und 8 Monaten palpebrale Lidmyoklonien festgestellt, die nach einer Erhöhung des Levetiracetam sistierten.

Insgesamt zeigt die Patientin eine leichte bis moderate Entwicklungsverzögerung, besonders die Sprachentwicklung ist bei ihr verzögert, da sie mit 3,5 Jahren nur über einen sehr geringen Wortschatz verfügt. Zudem leidet sie unter Konzentrationsstörungen, leichten Verhaltensauffälligkeiten und in geringem Grade unter autistischen Zügen.

Bei dem Vater der Patientin wurde das Janz-Syndrom diagnostiziert, er leidet seit seiner Kindheit unter generalisierten epileptischen Anfällen und wird seitdem mit Levetiracetam behandelt. Eine Testung für das *PCDH19*-Gen wies homozygot dieselbe Mutation, die seine Tochter in ihrer DNA trägt, auf. Der Bruder zeigte ebenfalls die Mutation im *PCDH19*-Gen seines X-Chromosoms, klinisch ist dieser jedoch unauffällig. Das Gleiche gilt für die Mutter des Vaters, sie ist homozygot positiv für die *PCDH19*-Mutation getestet worden, sie leidet jedoch weder unter epileptischen Anfällen noch ist sie mental beeinträchtigt. Mütterlicherseits litt die Tante der Patientin unter prolongierten Fieberkrämpfen bis zum 11. Lebensjahr, wobei auch diese geistig unauffällig ist.

3.1.3 Patientin 3 Mutation *PCDH19* c.695A>G

Diese Patientin leidet an einer frühkindlichen Grand-mal-Epilepsie mit mentaler Entwicklungsstörung. Mit acht Monaten traten erste generalisierte Anfälle auf. Im Alter von 11 Jahren kam es zu monatelangen anfallsfreien Intervallen. Die Anfälle traten dabei in Clustern über einen Zeitraum von 24-48 Stunden auf. Dabei kam es alle ein bis zwei Stunden zu einem Grand-Mal-Anfall. Diese Anfälle wurden als tonisch-klonisch mit wechselnder Seitenbetonung beschrieben. Die Anfälle der Patientin werden durch Infekte ausgelöst, auch die ersten Anfälle traten unter Infekten auf. In der Familienanamnese gibt es eine Großcousine mit fraglichen Anfällen, eine weitere Großcousine leidet an cerebralen Anfällen. Sowohl die Eltern als auch die drei Geschwister der Patientin sind gesund. Aktuell ist sie unter der Medikation von Stiripentol, Valproat und Clobazam anfallsfrei.

3.1.4 Patientin 4 Mutation *PCDH19* c.819_833delins

Das Mädchen leidet an einer Epilepsie mit infektgetriggerten Anfallsclustern, die erstmalig im Alter von ungefähr acht Monaten auftraten. Mit etwa einem Jahr

hatte sie bis zu 10 Anfällen pro Tag, die jeweils bis zu einer Minute andauerten. Bei diesen Anfällen kam es zu rhythmischen Zuckungen der Arme und Beine mit Überstreckung des Kopfes, starrem Blick und anschließendem Schmatzen. Im EEG fanden sich eine mittelschwer allgemeinveränderte Grundaktivität bei unregelmäßiger Kurvenverlangsamung und breitbasige sharp-waves frontal. Aufgrund der EEG-Befunde und Anamnese besteht bei dieser Patientin der Verdacht auf eine kryptogene fokale Epilepsie mit Clustern von tonisch-klonischen Anfällen.

3.1.5 Patientin 5 Mutation PCDH19 c.956_959del

Die Patientin mit der Mutation Lys319Thrfs*48 hatte ihren ersten Anfall mit neun Monaten. Dieser war generalisiert, tonisch-klonisch und kam plötzlich aus dem Schlaf heraus ohne bestehenden Infekt. Nach diesem Anfall folgten in den nächsten Wochen 25 weitere Anfälle, diese zum Teil Infekt getriggert. Die Anfälle wurden alle als generalisiert, tonisch-klonisch beschrieben. Unter der Arbeitsdiagnose idiopathische frühkindliche Grand-mal-Epilepsie wird das Mädchen zurzeit mit Valproat und Levetiracetam behandelt, worunter die epileptischen Anfälle in wechselnden Abständen etwa alle 6-8 Wochen auftreten. Zusätzlich zur medikamentösen Therapie wurde dem Mädchen im Alter von 12 Jahren ein Vagus-Nerv-Stimulator implantiert. Die Anfallsdauer beträgt in der Regel 2-3 Minuten, wobei die Anfallsdauer mit der Frequenz der Anfälle abnimmt.

Die geistige und motorische Entwicklung bei der Patientin ist verzögert, erste Wörter konnte sie mit 15 Monaten sprechen, ein Intelligenztest ergab bei ihr einen IQ von 46. Zudem zeigt sie autistische Züge und neigt zu aggressiven verbalen Ausbrüchen, wobei sie dann nur schwer zu beruhigen ist. Diese Ausbrüche haben ab dem siebten Lebensjahr begonnen, nach der Medikamentenumstellung von Kaliumbromid auf Levetiracetam. Dementsprechend besucht die Patientin eine Körperbehindertenschule. Die Familienanamnese bei dieser Patientin bezüglich der Epilepsie ist unauffällig, eine DNA-Testung der Eltern und der Schwester auf eine *PCDH19*-Mutation war negativ.

3.1.6 Patientin 6 Mutation PCDH19 c.1019A>G

Die Patientin mit der Mutation Asn340Ser erlitt ihren ersten Anfall im Alter von 7 Monaten. Bei diesem Anfall handelte es sich um einen einfachen fokalen Anfall, der drei Tage nach einer Hepatitis B Impfung auftrat, bei bestehendem grippalem Infekt. Daraufhin folgten stündlich weitere Anfälle. Ein halbes Jahr später ereignete sich wiederum ein komplex fokaler Anfall nach dem Erwachen, welcher sich eine Woche, danach ein Monat und sieben Monate später wiederholte. Im Alter von zehn Jahren wurde von infektassoziierten tonisch-klonisch generalisierten Anfällen berichtet, von denen während eines zweiwöchigen Klinikaufenthaltes vier weitere Anfälle auftraten. Bis zum heutigen Zeitpunkt ereigneten sich immer wieder sekundär generalisierte Anfälle. Die aktuelle medikamentöse Therapie besteht aus Levetiracetam, Clobazam und Kaliumbromid.

3.1.7 Patientin 7 Mutation PCDH19 c.1130A>G

Die Trägerin der Mutation c.1130A>G hatte ihren ersten epileptischen Anfall, der als tonisch klonisch generalisiert beschrieben wurde, mit sechs Monaten. Dieser Anfall fand nicht unter Fieber statt, wobei die darauffolgenden Anfälle überwiegend infektassoziiert waren. Die Patientin leidet seitdem alle 2-3 Monate unter 2-3 aufeinanderfolgenden Anfällen, die im Durchschnitt etwa von einminütiger Länge sind. Die Anfälle waren dabei von gemischter Form. Es traten sowohl fokale Anfälle mit sekundärer Generalisierung auf, die hauptsächlich rechtsseitig begannen, oder Anfälle mit anfänglichem Schmatzen, als auch generalisierte tonisch-klonische Anfälle. Zurzeit wird die Patientin mit Phenobarbital, Valproat und Kaliumbromid behandelt, ein medikamentöser Therapieversuch zuvor mit Levetiracetam hatte zu keiner Besserung der Symptomatik geführt. Seitdem hatte sie im Alter von zwei Jahren und zehn Monaten ihren letzten epileptischen Anfall und ist nach einer Dosissteigerung des Valproat seit drei Monaten im Alter von drei Jahren anfallsfrei.

Die Patientin ist in ihrer psychomotorischen Entwicklung um 1 bis 1,5 Jahre verzögert. Im Alter von drei Jahren spricht sie nicht, stattdessen gibt sie nur Laute von sich.

Die Familienanamnese ergab, dass väterlicherseits der Großonkel der Patientin bereits an Epilepsie litt und zwei Cousinen, die Schwestern sind. Sowohl Vater und Mutter, als auch die acht Geschwister der Patientin sind gesund.

3.1.8 Patientin 8 Mutation PCDH19 c.1441_1442delinsCT

Das Krankheitsbild dieser Patientin wird als Epilepsie mit febrilen und zum Teil afebrilen rechtsseitig betonten myoklonisch und generalisiert tonisch-klonischen Anfällen beschrieben mit einer statenhaften Häufung bei fieberhaften Infekten bei einer leichten Intelligenzminderung.

Das Mädchen wurde als Frühgeborenes nach 35+6 Schwangerschaftswochen aufgrund einer prolongierten Geburt per Sectio entbunden und war wegen einer postnatalen Pneumonie für fünf Tage intubiert. Ihr erster Krampfanfall ereignete sich mit 2,5 Jahren unter Fieber. Der erste Anfall dauerte etwa 20 Sekunden, wobei sie plötzlich einen starren Blick bekam, nicht ansprechbar war, tonisch-klonisch mit beiden Arme krampfte und den gesamten Körper überstreckte. Diese Krampfanfälle wiederholten sich mehrmals an den darauffolgenden Tagen. Einige Wochen darauf kam sie zur stationären Behandlung in die Neuropädiatrie der Uniklinik Gießen, da sich abermals ein Krampfanfall ereignet hatte. Während des stationären Aufenthaltes traten erneut clusterartige Häufungen von generalisierten, rechts seitenbetonten, ein- bis zweiminütigen Anfällen auf. Sie wurde dann mit dem Neuroleptikum Valproat behandelt. In den darauffolgenden Jahren kam es immer wieder zur stationären Behandlung aufgrund von generalisierten tonisch-klonischen Anfällen gehäuft bei Infekten. Medikamentös wurde ihnen zusätzlich zum Valproat, Lamotrigin und Desoxyphenobarbital verabreicht. Im EEG zeig-

te sich ein Verlangsamungsherd links parieto temporal mit Ausbreitung in die frontalen, zentralen sowie occipitalen Regionen. Im Laufe der Behandlung wurde die medikamentöse Therapie aufgrund wiederholt auftretender Krampfanfälle auf Brom in Kombination mit Clobazam und Desoxyphenobarbital umgestellt. Das Mädchen zeigte im Alter von fünf Jahren deutliche Verhaltensauffälligkeiten im Sinne einer Affektinkontinenz und aggressiven Ausbrüchen. Unter der Bromtherapie war sie für 1,5 Jahre anfallsfrei, nach einigen schweren Anfällen traten jedoch wieder Anfallrezidive auf. Die Patientin befindet sich mittlerweile nicht mehr in der Behandlung des Uniklinikums Gießen, sodass über ihre aktuelle Situation nicht berichtet werden kann.

3.1.9 Patientinnen 9 und 10 Mutation PCDH19 c.1841delT

Bei diesen Patientinnen handelt es sich um ein Geschwisterpaar mit einem Altersunterschied von vier Jahren. Die ältere Schwester leidet seit dem 8. Lebensmonat an einer frühkindlichen Grand-Mal Epilepsie. Im EEG fand sich anfänglich eine geringe Verlangsamung der Grundaktivität mit angedeuteten Thetarhythmen, in einem zweiten EEG stellten sich beidseits alternierende zentro-temporale spike-waves wie für Rolando-Epilepsien charakteristisch dar. Die cerebralen Anfälle traten vorwiegend, aber nicht ausschließlich bei Fieber auf. Die motorische Entwicklung bei dieser Patientin ist nur gering, die mentale und dabei insbesondere die sprachliche Entwicklung sind deutlich verzögert, sodass sie nach dem Schwerstbehindertenplan unterrichtet wird. Nach etlichen Medikamenten ohne Therapieerfolg wurde die Therapie vor drei Jahren von Valproat und Topiramate auf Valproat und Levetiracetam umgestellt, seitdem ist die Patientin anfallsfrei.

Ihre vier Jahre jüngere Schwester entwickelte im Alter von 13 Monaten unter einer Gastroenteritis Anfälle, die klinisch wie Absenzen imponierten. Das ictale EEG zeigte zu diesem Zeitpunkt parietooccipitale repetitive Spitzen, wobei die Patientin eine geringe Tonuserhöhung des ganzen Körpers aufwies. Unter einer Therapie mit Valproat kam es zum Sistieren der Anfälle, auch das EEG war entsprechend unauffällig. Nach einem Jahr kam es im Zuge eines Infektes wieder zu kurzen Anfällen, daraufhin wurde die Dosis des Valproats erhöht. Nach drei Jahren wurde das Valproat ausgeschlichen und es kam infolgedessen erneut zu Anfällen, hauptsächlich unter Infekten. Daher wurde erneut mit Valproat therapiert, drei Jahre später traten bei der Patientin erneut am Morgen absencenartige Zustände auf und Einnässen in der Nacht. Seitdem wird die Patientin zusätzlich mit Levetiracetam therapiert und ist seitdem anfallsfrei.

Die geistige Entwicklung ist eindeutig verzögert, wobei im Gegensatz zu ihrer Schwester nur geringe motorische Defizite auffallen. Im Alltag wirkt sie nicht auffällig, ein Intelligenztest ergab einen IQ von 67.

3.1.10 Patientin 11 Mutation PCDH19 c.3041_3056dup

Diese Patientin entwickelte ihren ersten Anfall im Alter von 13 Monaten mit plötzlichem Tonusverlust und Lippenzyanose, woraufhin weitere Anfälle mit ähnlicher Semiologie folgten. Diese waren zum Teil begleitet von Schmatzen. Die Dauer der Anfälle betrug zwischen 30 und 180 Sekunden, wobei die Anfälle meist kurz nach dem Erwachen oder bei fieberhaften Infekten auftraten. Die initiale Therapie mit Phenobarbital wurde im Alter von 2 Jahren auf Valproat umgestellt. Nach weiteren Anfällen wurde 2 Jahre später mit Brom kotherapiert. Nach einem Jahr Anfallsfreiheit wurde die Medikation von Valproat abgesetzt, worauf sich innerhalb eines Jahres zwei weitere Anfälle ereigneten mit nachfolgender Erhöhung der Bromtherapie. Im Alter von acht Jahren, nach fünfjähriger Brommedikation, wurde aufgrund des Verdachtes auf eine Pannikulitis, ausgelöst durch Brom, Brom reduziert und erneut Valproat in die Therapie aufgenommen. Ein halbes Jahr darauf ereignete sich eine Anfallserie aus dem Schlaf heraus, die nur mit hochdosierter Gabe von Phenobarbital unterbrochen werden konnte. Danach wurde die Therapie mit Brom abgesetzt, worauf sich ein beziehungsweise zwei Monate später erneut zwei Anfallsserien ereigneten, die zum Teil aus atonen Anfällen mit deutlichem Sauerstoffabfall auf 70% und Beatmungspflicht bestanden. Daraufhin wurde bei ihr eine Therapie mit Levetiracetam eingeleitet. Drei Monate später traten bei ihr Myoklonien der Extremitäten auf, die als nicht symmetrisch, teils links, teils rechts abwechselnd in Armen und Beinen beschrieben wurden. Diese Myoklonien traten in Serien bis zu 5 Minuten auf. Im EEG konnte kein Korrelat zu den Myoklonien nachgewiesen werden. Seitdem kam es bei der Patientin unter der Medikation von Valproat und Levetiracetam einmalig noch zum Auftreten erneuter Myoklonien, epileptische Anfälle blieben jedoch aus.

Die frühkindliche Entwicklung dieser Patientin war altersentsprechend, sie zeigte eine regelgerechte Sprachentwicklung. Die Leistungen in der Grundschule waren durchschnittlich bis gut, jedoch fiel der Patientin das Lernen schwer und sie benötigte dafür einen erhöhten Zeitaufwand. Zudem zeigte sich eine Konzentrationschwäche und auch im motorischen Bereich fielen leichte Defizite auf. Ein im Alter von 7 Jahren durchgeführter Intelligenztest ermittelte einen im Altersdurchschnitt liegenden IQ. Eine erneute neuropsychologische Testung im Alter von 10 Jahren aufgrund ihrer Merkschwäche und verlangsamten Arbeitsgeschwindigkeit nach Eindosierung des Levetiracetam ergab, dass ihre Leistungen altersentsprechend durchschnittlich waren, diese unter Druck jedoch deutlich vermindert sind. Zurzeit besucht die Patientin die Realschule.

Die Familienanamnese der Patientin ergab, dass ihre Mutter und deren drei Schwestern sowie zwei Cousinen aus der mütterlichen Verwandtschaft allesamt an einer Grand-mal-Epilepsie leiden, die vor dem 2. Geburtstag begann. Männliche Familienmitglieder sind nicht betroffen, sowohl der Vater als auch der Bruder der Patientin sind gesund.

3.2 Zusammenfassung klinisches Erscheinungsbild des Studienkollektivs

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über das klinische Erscheinungsbild der *PCDH19*-mutationstragenden Patientinnen.

In diesem Studienkollektiv der *PCDH19*-mutationstragenden Patienten betrug das Durchschnittsalter bei ihrem ersten Anfall 11,9 Monate (Median: 9 Monate, Rang 6-36 Monate). Dieser erste Anfall fand bei vier von acht Patienten (50%) unter Fieber statt. Einer der Anfälle war afebril, trat jedoch unmittelbar in Folge einer Impfung auf. Bei den ersten Anfällen handelte es sich bei sechs Patientinnen um einen generalisierten, tonisch-klonischen Anfall, bei zwei Patientinnen um einen fokalen Anfall und bei jeweils einer Patientin um einen atonischen Anfall und eine Absence.

Die im Krankheitsverlauf auftretenden Anfälle variieren und kommen sowohl in ausschließlicher als auch in gemischter Form bei dem Patientenkollektiv dieser Studie vor. Bei acht Patientinnen konnten generalisierte, tonisch-klonische Anfälle beobachtet werden, drei Patientinnen litten an fokalen Anfällen mit sekundärer Generalisierung, eine Patientin entwickelte weiterhin in ihrem Verlauf Anfälle, die klinisch wie Absenzen imponieren mit einer geringen Tonuserhöhung am ganzen Körper, eine weitere Patientin erlitt generalisierte atonische Anfälle, und bei zwei Patientinnen konnten zusätzlich Myoklonien beobachtet werden. Allen *PCDH19*-mutationstragenden Patientinnen dieser Studie ist gemeinsam, dass die Anfälle überwiegend in Clustern auftreten, also in einer Serie von drei oder mehr Anfällen innerhalb von 24 Stunden[24]. Nach dem ersten Auftreten eines epileptischen Anfalls kommt es zu einer Serie von Anfällen, die sich zumeist nach mehreren Monaten wiederholt. Die Anfälle sind teilweise bis ausschließlich von Infekten getriggert. In der Regel nimmt mit zunehmendem Alter die Häufigkeit der Anfälle ab und die anfallsfreien Intervalle werden länger. Unter den elf Patientinnen trat nur bei einer Patientin ein Status epilepticus auf.

Die psychomotorische Entwicklung ist bei acht von neun Patientinnen leicht bis moderat verzögert, lediglich eine Patientin zeigt eine normale Entwicklung. Zwei Patientinnen weisen leichte autistische Züge auf, zudem kommt es ebenfalls bei zwei Patientinnen vermehrt zu aggressiven Ausbrüchen. Soweit feststellbar, verlief bei allen Patientinnen die Entwicklung bis zu ihrem ersten Anfall unauffällig, erst nach dem ersten Anfall kam es zur Verzögerung bis zur Regression. Bei einer Patientin wurde berichtet, dass sie mit einem Jahr einzelne Worte sprechen konnte, diese im Verlauf der Anfälle wieder verlernte. Zudem ist bei zwei Patientinnen vermerkt, dass sich nach der Einnahme von Clobazam beziehungsweise Topiramamat und Valproat eine Verschlechterung von Kognition und Sprache zeigte.

Den Patientinnen gemeinsam ist, dass die frühen Anfälle therapierefraktär waren. Mit steigendem Alter lässt jedoch die Frequenz der Anfälle nach, zusätzlich werden die zeitlichen Abstände zwischen den Anfällen länger. Bei allen Patientinnen ist zu vermerken, dass keine der anfänglichen Medikation beibehalten wurde,

in allen Fällen wurde die medikamentöse Therapie ein bis mehrmals geändert. Die derzeitige Medikation besteht bei fünf von elf Patientinnen aus Valproat in Kombination mit Levetiracetam, wobei einer Patientin zusätzlich ein Vagus-Nerv-Stimulator implantiert wurde. Bei drei weiteren Patientinnen beinhaltet die Therapie ebenfalls Valproat, jedoch jeweils in Kombination mit Topiramat, Phenobarbital oder Phenobarbital mit Kaliumbromid. Die restlichen drei Patientinnen werden momentan mit Phenobarbital und Topiramat, Phenobarbital und Clobazam und Kaliumbromid oder mit Levetiracetam und Clobazam und Kaliumbromid behandelt. An der sehr unterschiedlichen medikamentösen Therapie lässt sich das heterogen ausgeprägte Krankheitsbild erkennen, sowie das nicht Ansprechen vieler Medikamente auf die Anfälle.

3.2 Zusammenfassung klinisches Erscheinungsbild des Studienkollektivs

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Mutation	p.Pro97_Ile101del	p.Pro127Ala	p.Asn232Ser	p.Val274Asnfs*41
Geschlecht	weiblich	weiblich	weiblich	weiblich
Geburtsdatum	07.08.2004	15.10.2008	02.03.1996	01.11.2000
Alter bei Anfallsbeginn	15 Monate	14 Monate	8 Monate	8 Monate
Erster Anfallstyp	Adversiv-anfall, afebril	Generalisiert, tonisch-klonisch, afebril (nach Impfung)	Generalisiert, febril	unbekannt
Anfallstypen	generalisiert, tonisch-klonisch in Clustern Status epilepticus	Generalisiert, tonisch-klonisch, atonisch, in Clustern Lid-myoklonien	Generalisiert, tonisch-klonisch in Clustern	Fokal mit sekundärer Generalisierung, in Clustern
Kognition	unbekannt	Leichte bis moderate Entwicklungsverzögerung, leichte autistische Züge	Mentale Entwicklungsstörung	unbekannt
Familien-geschichte	unauffällig	Vater Janz-Syndrom, Tante mütterl. prol. Fieberkrämpfe Vater, Onkel, Großmutter Mutations-träg.	2 Groß-cousinen epileptische Anfälle	unbekannt
Febrile Anfälle	ja	2x nach Impfung, 1x nach Infekt	ja	ja
Diagnose	Grand-mal-Epilepsie	PCDH19 assoziierte Epilepsie	Frühkindliche Grand-mal-Epilepsie	Verdacht auf kryptogene fokale Epilepsie

3. STUDIENKOLLEKTIV

	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8
Mutation	p.Lys319Thrfs *48	p.Asn340Ser	p.Asp377Gly	p.Asp481Leu
Geschlecht	weiblich	weiblich	weiblich	weiblich
Geburtsdatum	27.10.1998	18.02.1998	07.02.2009	31.08.1998
Alter bei Anfallsbeginn	9 Monate	7 Monate	6 Monate	2,5 Jahre
Erster Anfallstyp	Generalisiert, tonisch-klonisch, afebril	Fokal, febril	wahrscheinlich tonisch-klonisch, generalisiert, afebril	Generalisiert, tonisch-klonisch
Anfallstypen	Generalisiert, tonisch-klonisch, in Clustern	Fokal (einfach, komplex), sekundär generalisiert, in Clustern	Sowohl fokal als auch generalisiert, tonisch-klonisch, in Clustern	Generalisiert, tonisch-klonisch, in Clustern
Kognition	Verzögerte Entwicklung, Verbal aggressive Ausbrüche (IQ46), Autistische Züge	Entwicklungsstörungen schulischer Fähigkeiten	Psychomotorische Entwicklung 1-1,5 Jahre verzögert	Leichte Intelligenzminderung, Affektinkontinenz, Aggressivität
Familien-geschichte	unauffällig	unbekannt	Väterlicherseits: Großonkel, 2 Cousinen Epilepsie	unbekannt
Febrile Anfälle	teilweise	teilweise	vorwiegend	ja
Diagnose	Idiopathische frühkindliche Grand-Mal-Epilepsie	Kryptogene fokale E. mit sekundär generalisierten Krampfanf.	EFMR	Siehe Studienpop.

	Patient 9	Patient 10	Patient 11
Mutation	p.Phe614 Serfs* 4	p.Phe614 Serfs*4	p.Pro1020*
Geschlecht	weiblich	weiblich	weiblich
Geburtsdatum	15.05.1998	14.05.2002	21.12.1999
Alter bei Anfallsbeginn	8 Monate	13 Monate	13 Monate
Erster Anfallstyp	Generalisiert, tonisch- klonisch, febril	Klinisch wie Absencen, febril	Atonisch mit Lippen- zyanose,
Anfalls- typen	Grand- Mal,hemi- Grand-Mal, Grand-Mal mit fokalen Zeichen, in Clustern	Absencen mit Tonus- erhöhung	Generalisiert atonisch, tonisch- klonisch Myoklonien, in Clustern
Kognition	Psycho- motorische Entwicklungs- verzögerung	Leichte Psychomoto- rische Entwick- lungsverzöge- rung (IQ 67)	Altersentsprechende durchschnitt- liche Intelligenz, Leistungs- minderung unter Druck
Familien- geschichte	Schwester Absencen (Pat.10)	Schwester Frühkindliche Grand-mal- Epilepsie (Pat.9)	Mutter, dessen 3 Schwestern + 2 Cousinsen Grand-Mal- Epilepsie
Febrile Anfälle	vorwiegend	vorwiegend	teilweise
Diagnose	Frühkindliche Grand-Mal- Epilepsie	Epilepsie bei Mutation im PCDH19-Gen	Generalisierte Epilepsie

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde bei 108 Patientinnen und Patienten das Gen *PCDH19*, welches das Protocadherin 19 kodiert, untersucht.

Dazu wurde das sechs Exons umfassende *PCDH19*-Gen in 15 Fragmenten mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Zusätzlich wurden die nachgewiesenen Mutationen und Polymorphismen mit der SSCP-Analyse untersucht um zu überprüfen, wie gut diese Methode in der Lage ist, Sequenzvariationen im *PCDH19*-Gen nachzuweisen.

Eine Übersicht über die gefundenen Mutationen und Polymorphismen gibt die folgende Tabelle 4.1.

Exon	Abweichung vom Wildtyp	Vorkommen
1	Mutation c.289_303del (Pro97_Ile101del)	1/108
	Mutation c.379C>G (Pro127Ala)	1/108
	Mutation c.695A>G (Asn232Ser)	1/108
	Mutation c.819_833delins (Val274Asnfs*41)	1/108
	Mutation c.956_959del (Lys319Thrfs*48)	1/108
	Mutation c.1019A>G (pAsn340Ser)	1/108
	Mutation c.1130A>G (Asp377Gly)	1/108
	Mutation c.1441_1442delinsCT (Asp481Leu)	1/108
	Mutation c.1841delT (Phe614Serfs*4)	2/108
	Stille Mutation c.6G>A	1/108
	Polymorphismus c.81C>T	3/108
	Polymorphismus c.402C>A	9/108
	Polymorphismus c.1137C>T	4/108
	Polymorphismus c.1627C>T	45/108
Stille Mutation c.1683G>A	1/108	
2	unauffällig	-
3	unauffällig	-
4	unauffällig	-
5	Stille Mutation c.2652C>T	1/108
6	Mutation c.3041_3056dup (Pro1020*)	1/108
	Polymorphismus c.3698C>T	47/108

Tabelle 4.1: Übersicht der gefundenen Mutationen und Polymorphismen in dem jeweiligen Exon. Alle Sequenzveränderungen, die in den bekannten Datenbanken (z.B. dbSNP) bisher nicht bekannt waren oder eine Frequenz von unter 1% zeigten, werden als Mutation bezeichnet. Sequenzvariationen mit höherer Frequenz werden als Polymorphismus bezeichnet.

4.1 Überblick

In Exon 1, 5 und 6 konnten einige Abweichungen zur Referenzsequenz festgestellt werden. Als Referenzsequenz diente der Klon AB037734.1, Genbank-Accession-Nummer NM_020766.2. Wie man in Tabelle 4.1 erkennen kann, wurde die Mehrheit der Mutationen und Polymorphismen in Exon 1 gefunden, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien deckt [26][31][9][11].

Insgesamt konnten elf Mutationen, drei stille Mutationen und fünf verschiedene Polymorphismen, die bereits im *Reference SNP Cluster Report* verzeichnet sind, nachgewiesen werden. Im Fall einer Mutation wurde die gleiche bei einem Geschwisterpaar festgestellt. Die elf Mutationen setzen sich aus vier Missense Mutationen, vier Deletionen, einer Duplikation und zwei Deletionen/Insertionen (kurz: Indel) zusammen. Mit Ausnahme einer stillen Mutation traten die gesamten Mutationen ausschließlich bei weiblichen Probanden auf, während die Polymorphismen bei beiden Geschlechtern vertreten waren.

Die gefundenen Mutationen und Polymorphismen konnten durch das Verfahren der SSCP-Analyse bestätigt werden. Die Deletionen, Insertionen und Duplikationen konnten in etwa 92% (55 von 60) nachgewiesen werden, wenn man das Verfahren mit und ohne Glycerin-Färbung zusammen betrachtet, sogar in 100% (30 von 30). Bei den zwei Missense Mutationen konnte in 56,5% (13 von 23) der Ansätze die Mutation sichtbar gemacht werden, zählt man die Technik mit und ohne Glycerin-Färbung zusammen, kommt man auf ein Ergebnis von 75% (9 von 12). Die Polymorphismen konnten insgesamt in 30% (39 von 130) dargestellt werden, wobei auch einige (13/130=10%) davon nur fraglich identifizierbar waren. Tabelle 4.2 zeigt eine Übersicht der erstellten SSCP-Gele (+ steht hierbei für nachgewiesene, - für nicht nachgewiesene und ? für fragliche Mutationen).

In Exon 2-4 konnten keine Veränderungen der Basensequenz im Vergleich zur Referenzsequenz festgestellt werden.

In der Abbildung 4.1 werden die Mutationen unserer Studienpopulation und die bisher publizierten Mutationen zusammengefasst.

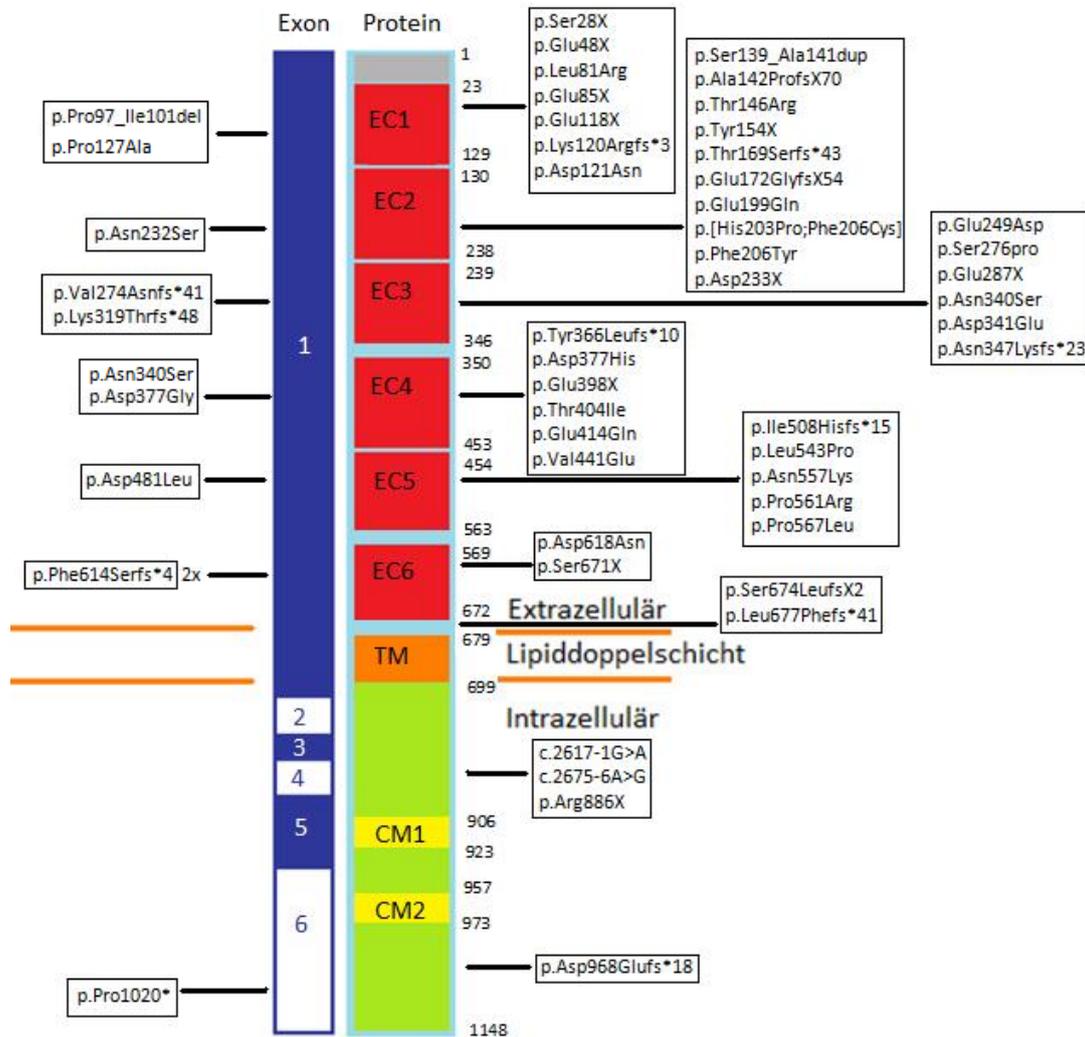


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Protocadherins 19; links: Darstellung der Mutation unseres Studienkollektivs, rechts: Darstellung der in der Literatur beschriebenen Mutationen (Stand nach Depienne et al. 201)

Tabelle 4.2: Übersicht der SSCP-Gele: Nachweis der Mutationen

		Mutation	o. Glycerin			m. Glycerin			Gele
			+	-	?	+	-	?	
Ex 1a	8	81C>T Polym. heteroz.	0	6	0	0	6	0	12
Ex 1a	10	81C>T Polym. heteroz.	0	6	0	0	6	0	12
Ex 1a	77	81C>T Polym. heteroz.	0	5	1	1	5	0	12
Ex 1a	238	289_ 303del	6	0	0	6	0	0	12
Ex 1a	564	6G>A stille Mutation	1	5	0	0	6	0	12
Ex 1b	418	402C>A Polym. heteroz.	3	1	0	2	2	0	8
Ex 1b	470	402C>A Polym. homoz.	4	0	0	2	2	0	8
Ex 1c	139	819_ 833delins	6	0	0	6	0	0	12
Ex 1c	418	695A>G Missense	4	2	0	5	1	0	12
Ex 1c	588	1130A>G Missense	2	3	1	2	4	0	12
Ex 1d	9	1137C>T Polym. heteroz.	0	4	1	2	3	1	11
Ex 1d	285	1137C>T Polym. heteroz.	0	4	1	3	2	1	11
Ex 1d	287	1137C>T Polym. heteroz.	0	4	1	3	2	1	11
Ex 1d	553	1137C>T Polym. heteroz.	0	4	1	1	4	1	11
Ex 1d	321	956_ 959del	6	0	0	6	0	0	12
Ex 1e	22	1441_ 1442delinsCT	4	1	0	3	2	0	10
Ex 1e	265	1683G>A stille Mutation	0	5	0	3	2	0	10
Ex 1e	386	1627C>T Polym. homoz.	0	4	1	1	2	2	10
Ex 1e	418	1627C>T Polym. heteroz.	0	4	1	1	4	0	10
Ex 1f	54	1841delT	0	1	0	1	0	0	2
Ex 1f	55	1841delT	0	1	0	1	0	0	2
Ex 5	507	2652C>T stille Mutation	1	0	0	1	0	0	2
Ex 6a	536	3041_ 3056dup	5	0	0	5	0	0	10
Ex 6c	9	3698C>T Polym. heteroz.	0	3	0	2	2	0	7
Ex 6c	22	3698C>T Polym. homoz.	1	2	0	0	4	0	7

4.2 Mutationsbefunde von Exon 1

Zehn der insgesamt elf gefundenen Mutationen und der Großteil der Polymorphismen befinden sich in Exon 1. Betrachtet man jedoch die Größe des Exons im Vergleich zu den anderen Exons fällt auf, dass Exon 1 mit einer Größe von 3143 Basenpaaren teilweise mehr als das Zehnfache an Basenpaaren enthält (Exon2=296 Bp; Exon 3=436 Bp; Exon 4=250 Bp; Exon 5=342 Bp). Eine Ausnahme bildet Exon 6 mit seinen 1906 Basenpaaren. Wie auch in Abbildung 5 sichtbar, codiert das Exon 1 für den gesamten extrazellulären Bereich und die transmembranäre Domäne des Protocadherin, sodass dementsprechend dem Exon 1 die größte Bedeutung zukommt (siehe zu den einzelnen Größenangaben auch Tabelle A.2 im Anhang).

4.2.1 Mutation c.289_303del

Aufgrund seiner Länge wurde Exon 1 zur Sequenzierung in die Abschnitte a-g unterteilt. Im ersten Abschnitt befand sich in einer der Proben eine Deletion von 15 Basenpaaren an Position c.289-303 (siehe Abb. 4.2). Diese Mutation führt zu einem Verlust von fünf Aminosäuren, sodass diese Aminosäuren (Prolin, Lysin, Cystein und zweimal Isoleucin) nicht mehr in das Protein eingebaut werden. Bei der SSCP-Analyse war diese Mutation bei allen auswertbaren Gelen (100%, 12 von 12) feststellbar. Bei dem Vergleich mit orthologen und paralogen Proteinen in diesem Bereich, konnte keine übereinstimmende Veränderung der jeweiligen Aminosäuren entdeckt werden (siehe Abb. 4.3).

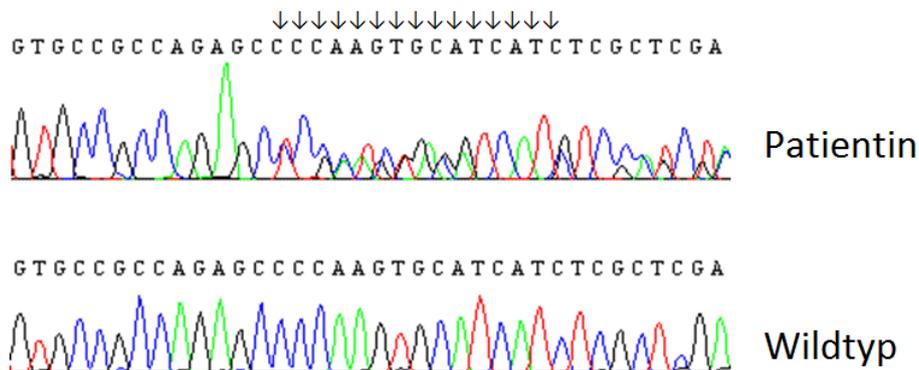


Abbildung 4.2: Mutation c.289_303del im Vergleich zur Wildtypsequenz

PCDH9	Homo sapiens	DREKLCAGASYAEENE CF FELEV
PCDH11X	Homo sapiens	DREKLCAGIP--RDEHCFYEVEV.
PCDH11Y	Homo sapiens	DREKLCAGIP--RDEHCFYEVEV.
PCDH7	Homo sapiens	DREKLPQCQMI FD ENECFLDFEV.
PCDH1	Homo sapiens	DREGLRECQNQLPGDPCILEFEV
PCDH8	Homo sapiens	DRERLCGQAP-----QCVLAFDV
PCDH18	Homo sapiens	DREQLCQKNL-----NCSIEFDV
PCDH10	Homo sapiens	DREQICKQSP-----SCVLHLEV
PCDH17	Homo sapiens	DRESLCRHNA-----KCQLSLEV
PCDH19	Zebrafish	DRDAVCRQTP-----KCFISLEV
PCDH19	Chicken	-----RRRP-----AAI-----
PCDH19	Mouse	DRDLLCRQSP-----KCIISLEV
PCDH19	Rat	DRDLLCRQSP-----KCIISLEV
PCDH19	Dog	DRDLLCRQSP-----KCIISLEV
PCDH19	Bos taurus	DRDLLCRQSP-----KCIISLEV
PCDH19	Homo sapiens	DRDLLCRQSP-----KCIISLEV

↑ ↑↑↑↑

Abbildung 4.3: Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c.289_303del

4.2.2 Mutationen c.695A>G; c.379C>G; c.1019A>G; c.1130A>G

Es wurden vier Punktmutationen, die sich als Missense Mutationen darstellten, in Exon 1 entdeckt. Bei der ersten Missense Mutation kam es zu einem Austausch von Adenin gegen Guanin an Position c.695 (siehe Abb. 4.4). Dieser Basenaustausch führt zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin gegen Serin, welche beide zu der Gruppe der Aminosäuren mit ungeladenen, polaren Seitenketten gehören. Diese Mutation war bei 75% (9 von 12) der auswertbaren SSCP-Gele zu sehen (siehe Abb. 4.6). In einem Vergleich von orthologen und paralogen Proteinen konnte gezeigt werden, dass diese Region zu einem hoch konservierten Bereich gehört, da sowohl die Vertebraten als auch die paralogen Proteine der delta-Protocadherine an dieser Stelle die Aminosäure Asparagin aufweisen (siehe Abb. 4.5).

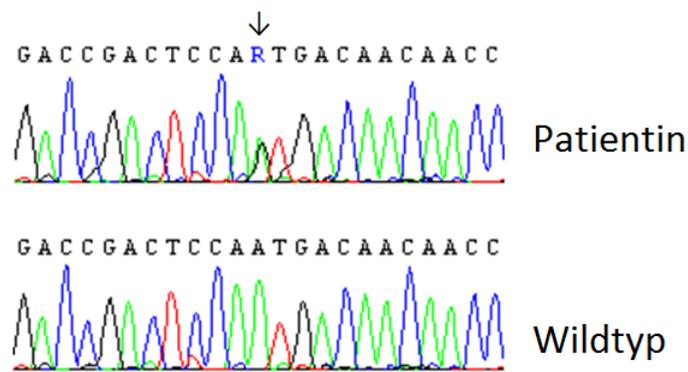


Abbildung 4.4: Mutation c.695A>G im Vergleich zur Wildtypsequenz

PCDH9	Homo sapiens	VTVSDVNDNRPVFKEGQVE-VHIPE
PCDH11X	Homo sapiens	VSVTDTNDNHVFKETEIE-VSIPE
PCDH11Y	Homo sapiens	VSVTDTNDNHVFKETEIE-VSIPE
PCDH7	Homo sapiens	VLITDVNDNSPRFEKSVYE-ADLAE
PCDH1	Homo sapiens	VTVLDTNDNAPKFERPSYE-AELSE
PCDH8	Homo sapiens	VRVLDANDHSPAFPQGAVAEVELAE
PCDH18	Homo sapiens	ISISDSNDNSPAFEQQSYI-IQLLE
PCDH10	Homo sapiens	IRVLDSDNDNVPAFDQPVYT-VSLPE
PCDH17	Homo sapiens	VKVIDSDNDNSPVFEAPSYL-VELPE
PCDH19	Zebrafish	IKVIDSDNDNNPVFDEPVYT-VNVLE
PCDH19	Chicken	IRVIDSDNDNNPLFEAPAYT-VSVPE
PCDH19	Mouse	IKVIDSDNDNNPVFGESTYS-VSVPE
PCDH19	Rat	IKVIDSDNDNNPVFGESTYS-VSVPE
PCDH19	Dog	IKVIDSDNDNNPVFGESTYA-VSVPE
PCDH19	Bos taurus	IKVIDSDNDNNPVFGESTYS-VSVPE
PCDH19	Homo sapiens	IKVIDSDNDNNPVFSESTYA-VSVPE

↑

Abbildung 4.5: Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c.695A>G



Abbildung 4.6: Mutation c.695A>G Polyacrylamidgel (8% PAA, 1x TBE, 200V, 720min)

Die Missense Mutation an Stelle c.379 kam durch einen Austausch der Base Cytosin gegen die Base Guanin zustande. Aufgrund dieses Austausches codiert nun das Basentriplett anstelle der heterocyclischen Aminosäure Prolin die aliphatische Aminosäure Alanin. Bei der Patientin konnte eine heterozygote Mutation festgestellt werden. In der genetischen Untersuchung der Eltern ergab sich, dass die DNA des Vaters diese Mutation homozygot aufweist, während die DNA der Mutter an dieser Stelle mutationsfrei ist, sodass man von einer Vererbung der mutierten DNA des Vaters auf die Patientin ausgehen kann (siehe Abb. 4.7).

Beim Vergleich dieser Mutation mit orthologen und paralogen Proteinen lässt sich keine derartige Veränderung feststellen, so dass von man nicht von einer evolutionsbedingten Mutation ausgehen kann (siehe Abb. 4.8).

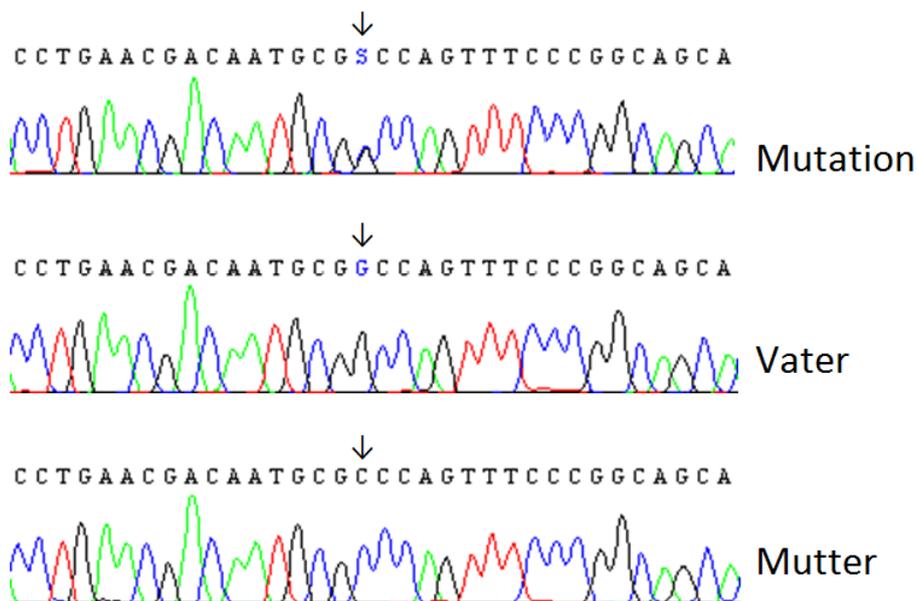


Abbildung 4.7: Mutation c.379C>G im Vergleich zur DNA-Sequenz des Vaters, der homozygoter Träger der Mutation ist, und im Vergleich zur DNA-Sequenz der Mutter, die der Wildtypsequenz entspricht

PCDH19	Homo sapiens	MEICVIKVEIKDLNDNAPSFPAAQI LE LEISEAASPGT
PCDH19	Mouse (<i>Mus Musculus</i>)	MEICVIKVEIKDLNDNAPSFPAAQI LE LEISEAASPGT
PCDH19	<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	MEICVIKVEIKDLNDNAPSFPAAQI LE LEISEAASPGT
PCDH19	<i>Canis familiaris</i> (Dog)	MEICVIKVEIKDLNDNAPSFPAAQI LE LEISEAASPGT
PCDH19	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	MEICVIK IE IIDVNDNAPF PT NHIDIEISENAAPGT
PCDH10	<i>Bos taurus</i> (Cattle)	MEICVIKVEIKDLNDNAPSFPAAQI LE LEISEAASPGT
PCDH1	Homo sapiens	PR LL EGQIEVQDINDNTPNFASPVITLAI P ENTNIGS
PCDH7	Homo sapiens	V DL FEGQVIVLDINDNTP FP SPVLT LT VEEN RP VGT
PCDH8	Homo sapiens	FRLVHVEVEVRDVNDHAP FP RAQIPVEVSEGA AV GT
PCDH9	Homo sapiens	FRLIKIKI IV KDTNDNAP FP SPVINISIP EN TLINS
PCDH10	Homo sapiens	LELFQVEIEVLDINDNPP FP EPDLTVEISESAT PG T
PCDH11X	Homo sapiens	FRLVKIRFLIEDINDNAP LP FATVINISIP EN SAINS
PCDH11Y	Homo sapiens	FRLVKIRFLIEDINDNAP LP FATVINISIP EN SAINS
PCDH17	Homo sapiens	KEICMIKVEIQDINDNAP FS SDQI EM DISENA AP GT
PCDH18	Homo sapiens	LQLFHIEVEVLDINDNS PQ FSRSLI PI EISESA AV GT

↑

Abbildung 4.8: Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c.379C>G

Die nächste Missense Mutation wird durch einen Austausch der Base Adenin gegen Guanin an Position c.1019 hervorgerufen (siehe Abb. 4.9). Dieses führt wiederum zu einem Austausch der ungeladenen Aminosäure Asparagin in die ebenfalls neutral geladene Aminosäure Serin. Im Vergleich mit den orthologen und paralogen Proteinen konnte an dieser Stelle keine Veränderung der Aminosäuren festgestellt werden, sodass ein entwicklungsbedingter Zusammenhang auszuschließen ist (siehe Abb. 4.10).

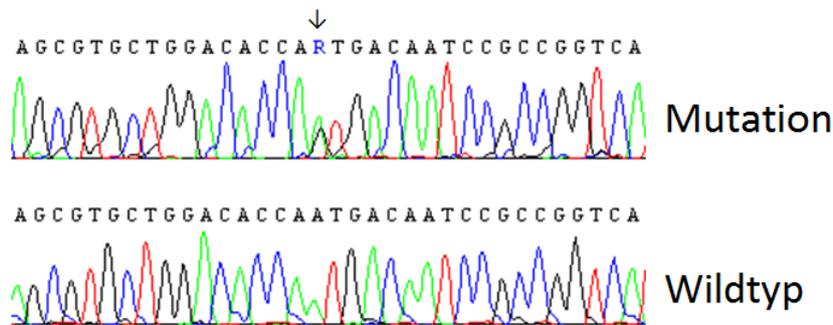


Abbildung 4.9: Mutation c.1019A>G im Vergleich zur Wildtypsequenz

PCDH8	Homo sapiens	RGPGPRAATCKVIVRIRDVNDNAPDIAITP
PCDH11X	Homo sapiens	GGLMP--ARAMVLVNVTDVNDNVPSIDIRY
PCDH11Y	Homo sapiens	GGLMP--ARAMVLVNVTDVNDNVPSIDIRY
PCDH9	Homo sapiens	GSSTP--ARATVTINVTDVNDNPPNIDLRY
PCDH7	Homo sapiens	RGQPPKTDKATVVLNIKDENDNVPSIEIRK
PCDH1	Homo sapiens	RGTNPKSARAQVVVTVKDMNDNAPTIEIRG
PCDH17	Homo sapiens	LGPNIIPAHCKVTVKLIDRNDNAPSIGFVS
PCDH10	Homo sapiens	LGPNAVPAHCKVLVRVLDANDNAPEISFST
PCDH18	Homo sapiens	LGPNSIPAHCKIIIKVVDVNDNKPEININL
PCDH10	Cattle	LGPNSIPAHCKVTISVQDANDNPPLINLLS
PCDH19	Mouse	LGPNSIPAHCKVTVSVLDTNDNPPINLLS
PCDH19	Rat	LGPNSIPAHCKVTVSVLDTNDNPPINLLS
PCDH19	Dog	LGPNSIPAHCKVTVSVLDTNDNPPVINLLS
PCDH19	Homo sapiens	LGPNSIPAHCKVTVSVLDTNDNPPVINLLS

↑

Abbildung 4.10: Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c.1019A>G

Bei der letzten Missense Mutation handelt es sich auch um einen Austausch von Adenin gegen Guanin an Position c.1130, was eine Änderung von Aspartat zu Glycin in der Aminosäuresequenz bewirkt (siehe Abb. 4.11). Aspartat gehört zu den sauren Aminosäuren mit geladenen und polaren Seitenketten, während Glycin mit seiner apolaren Seitenkette hydrophobe Eigenschaften besitzt. Im Gegensatz zu anderen Missense Mutationen war diese nur in einem Drittel (4 von 12) der auswertbaren SSCP-Gele sichtbar. Im Vergleich mit den orthologen und paralogen Proteinen ist wiederum sichtbar, dass auch an dieser Stelle im Laufe der Entwicklung keine Veränderung stattgefunden hat, sodass diese Mutation evolutionsbedingt nicht zu erklären ist (siehe Abb. 4.12).

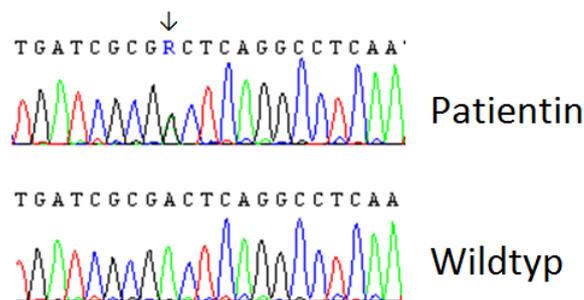


Abbildung 4.11: Mutation c.1130A>G im Vergleich zur Wildtypsequenz

PCDH9	Homo sapiens	LITVSDKDTDVNGKVICFIE
PCDH11X	Homo sapiens	LITVIDKDADHNGRVTCFTD
PCDH11Y	Homo sapiens	LITVIDKDADHNGRVTCFTD
PCDH7	Homo sapiens	LVQVSDRDQGENGVVICTVV
PCDH1	Homo sapiens	LVQVSDRDEGENAAVTCVVA
PCDH8	Homo sapiens	LVSTSDRDSGANGQVRCALY
PCDH18	Homo sapiens	LVRVQDKD SGLNGEIVCKLH
PCDH10	Homo sapiens	LFSVTD RDSEENGQVQCELL
PCDH17	Homo sapiens	LVRVTD RD SGKNGQLQCRVL
PCDH19	<u>Zebrafish</u>	LVRVSDND SGANGKVQCRLQ
PCDH19	Chicken	LVRVSDRD SGANGRVQCRL
PCDH19	Mouse	LVRVSDRD SGLNGRVQCRL
PCDH19	Rat	LVRVSDRD SGLNGRVQCRL
PCDH19	Dog	LVRVSDRD SGLNARVQCRL
PCDH19	<u>Bos taurus</u>	LVRVSDRD SGLNGRVQCRL
PCDH19	Homo sapiens	LVRVSDRD SGLNGRVQCRL

↑

Abbildung 4.12: Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c. 1130A>G

4.2.3 Mutation c.819_833delins

Bei der nächsten Mutation handelt es sich um eine komplexe Mutation, die sich mit der gängigen Nomenklatur nur schwer beschreiben lässt. Sie ist grob als Indel (Insertion/Deletion) zu benennen, da jedoch mehrere Insertionen kombiniert mit unterschiedlichen Duplikationen zu finden sind, ist eine Grafik zur Veranschaulichung besser geeignet (siehe Abb. 4.13). Im *Mutalyzer*-Programm <https://mutalyzer.nl/> wurde die Mutation wie folgt benannt: c.819_833delins

Die letzte Base, die mit dem Wildtyp übereinstimmt, ist das Valin an Position p.273. Danach folgen 41 abweichende Aminosäuren bis zum Stopp Codon an Position p.315. Dieses führt zum Abbruch der Translation innerhalb des ersten Exons. Insgesamt führt diese Mutation zu 41 abweichenden Aminosäuren und einem Verlust durch das frühzeitige Stopp Codon von 787 Aminosäuren. Die DNA der Eltern wies sowohl beim Vater als auch bei der Mutter keine Mutation an dieser Stelle auf, sodass man von einer Neumutation bei der Patientin ausgehen kann.

Wildtyp

GGTCTACTCCTTCTA **TGGCTACGT** **CAACGACC** **GC**ACGCGGAGCTCTTTCAGATCGACCCGCACAGTG

Patientin

CAACGACCT **TGGCTACGT** **CAACGACCT** **TGGCTACGT** **CAACGACC** **GCACGACC** **GC**ACGCGGAGCTCTTT

Abbildung 4.13: Mutation c.819_833delins im Vergleich zur Wildtypsequenz

Mit der SSCP-Analyse konnte diese Mutation mit einer so stark veränderten Basensequenz in 100% (12 von 12) der auswertbaren Gele identifiziert werden (siehe Abb. 4.14).

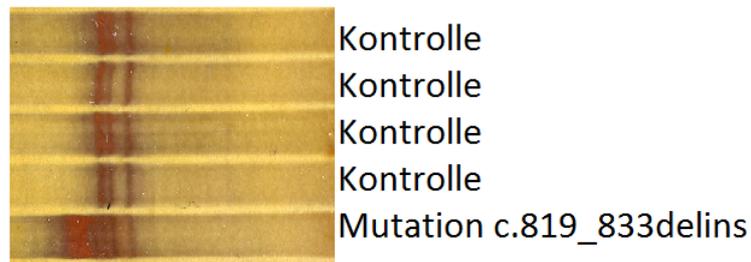


Abbildung 4.14: Mutation c.819_ 833delins im Vergleich zu vier Kontrollen im Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 1x TBE, 200V, 840min)

4.2.4 Mutation c.956_959del

Des Weiteren wurde im Abschnitt d des Exon 1 eine Deletion gefunden. Bei dieser Deletion sind die vier Basen AGGA von Position 956 bis 959 verloren gegangen (siehe Abb. 4.16). Dieses führt zu einer abweichenden Sequenz von 48 Aminosäuren und durch die Leserasterverschiebung ein sich anschließendes Stopp Codon, welches wiederum zu einem Verlust von 735 Aminosäuren verglichen mit dem Wildtyp führt. Auch diese Mutation war bei 100% (12 von 12) der auswertbaren SSCP-Gele sichtbar (siehe Abb. 4.15).

Bei der Schwester, beim Vater und bei der Mutter konnte keine Abweichung zur Wildtypsequenz nachgewiesen werden, so dass bei dieser Mutation von einer Neumutation ausgegangen werden kann (siehe Abb. 4.16).



Abbildung 4.15: Mutation c.956_ 959del Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 720 min)

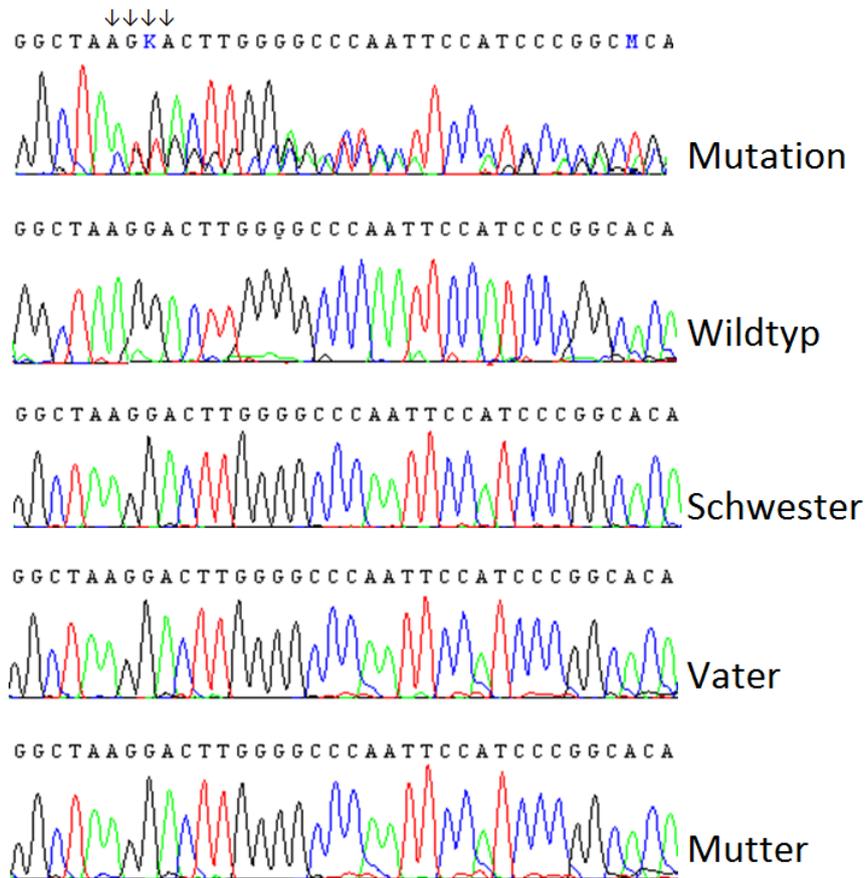


Abbildung 4.16: Mutation c.956_959del im Vergleich zum Wildtyp, der DNA der Schwester und der Eltern

4.2.5 Mutation c.1441_1442delinsCT

Auch im Abschnitt e des Exon 1 konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um eine Indel (Insertion/Deletion) von zwei Basenpaaren. Anstelle der Basen Guanin und Adenin waren hier die Basen Cytosin und Thymin, also die komplementären Basen, eingebaut worden. Die Basen Guanin und Adenin sind deletiert, stattdessen sind Cytosin und Thymidin insertiert (siehe Abb. 4.17). Durch diese Mutation wird in der Proteinsynthese anstelle der hydrophilen, sauren Aminosäure Aspartat die hydrophobe Aminosäure Leucin eingebaut. Mit der SSCP-Analyse konnte die Mutation in 70% (7 von 10) der auswertbaren Gele dargestellt werden (siehe Abb. 4.19). Die orthologen und paraloge Proteine zeigen an dieser Position keine Veränderung der Aminosäure, was für eine hohe Konservierung dieser Position spricht und somit einen Zusammenhang mit der Mutation ausschließt (siehe Abb. 4.18).

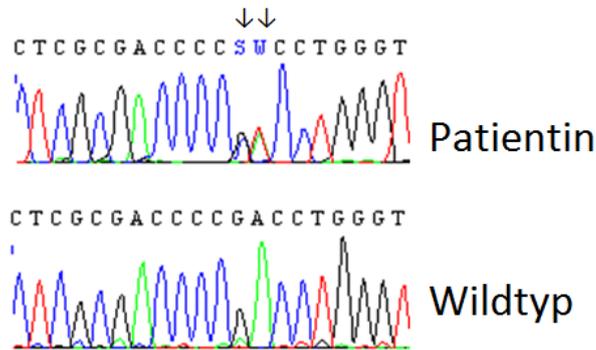


Abbildung 4.17: Mutation c.1441_1442delinsCT im Vergleich zur Wildtypsequenz

PCDH9	Homo sapiens	RRGLYLTTISATDEDSGKNADIVYQL
PCDH11X	Homo sapiens	SPGIQLTKVSAMDADSGPNAKINLYL
PCDH11Y	Homo sapiens	SPGIQLMKVSATDADSGPNAEINLYL
PCDH7	Homo sapiens	IPGERVATVLATDADSGKNAEIAAYSL
PCDH1	Homo sapiens	KPGEVIAEITASDADSGSNAELVYSL
PCDH8	Homo sapiens	PPGAYLATVAARDRLGRNGQVTYRL
PCDH18	Homo sapiens	SPGAYITTVIATDPPDLGENGQVYTI
PCDH10	Homo sapiens	VPGAYIYAVSATDRDEGANAYLAYS
PCDH17	Homo sapiens	IPGEYLGSVLAQDPPDLGQNGTVSYSI
PCDH19	Zebrafish	VPGAFLLAVSARDPDLGMNGTVSYEI
PCDH19	Chicken	TPGAYLLSVSARDPDLGLNGSVSYQI
PCDH19	Mouse	TPGAYLLSVSARDPDMGLNGSVSYQI
PCDH19	Rat	TPGAYLLSVSARDPDLGLNGSVSYQI
PCDH19	Dog	TPGAYLLSVSARDPDLGLNGSVSYQI
PCDH19	Bos taurus	TPGAYLLSVSARDPDLGLNGSVSYQI
PCDH19	Homo sapiens	TPGAYLLSVSARDPDLGLNGSVSYQI

↑

Abbildung 4.18: Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c. 1441_1442delinsCT

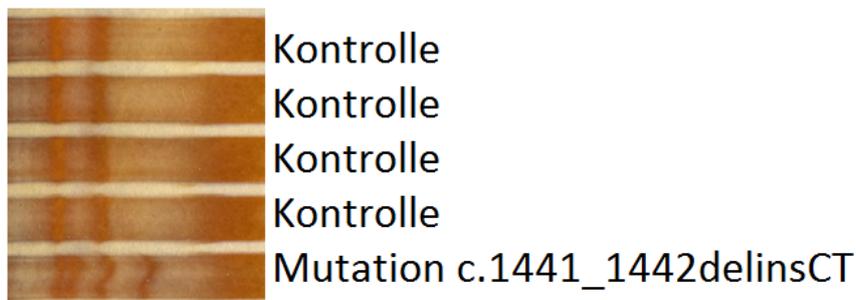


Abbildung 4.19: Polyacrylamidgel Mutation c. 1441_1442delinsCT (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 960min)

4.2.6 Mutation c.1841delT

Die in Abschnitt f des Exon 1 gefundene Mutation trat bei zwei Patientinnen auf. Es handelte sich hier um ein Geschwisterpaar, das die gleiche Mutation in ihrer

DNA trug. Bei dieser Mutation kam es zur Deletion eines Basenpaares, welches zu einer Leserasterverschiebung der nachfolgenden Aminosäuresequenz führte. Dieses wirkt sich folgendermaßen aus: Nach drei abweichenden Aminosäuren wird die Translation aufgrund eines durch die Verschiebung entstandenen Stoppcodons abgebrochen, was bedeutet, dass durch die Deletion in der DNA ein Verlust von 474 Aminosäuren im Protein entsteht. Da es sich hier um ein Geschwisterpaar handelt, welches Träger der gleichen Mutation ist, ist davon auszugehen, dass es sich hier wahrscheinlich nicht um eine Neumutation handelt. Allerdings weisen weder die DNA der Mutter noch die DNA des Vaters eine solche Mutation auf (siehe Abb. 4.20). Daher ist es nicht auszuschließen, dass diese Mutation in der Keimbahn eines der beiden Elternpaare entstanden ist, welches den negativen Mutationsbefund erklären könnte. In der SSCP-Analyse konnte die Mutation in dem Gel mit Glycerin sichtbar gemacht werden (bei 2 Gelen), in dem Gel ohne Glycerin allerdings nicht (bei 0 von 2 Gelen). Da jedoch parallel zwei Gele mit bzw. ohne Glycerin ergänzend angesetzt werden, kann man auch in diesem Fall von einer eindeutigen Feststellung der Mutation mit dieser Methode ausgehen (siehe Abb. 4.21).

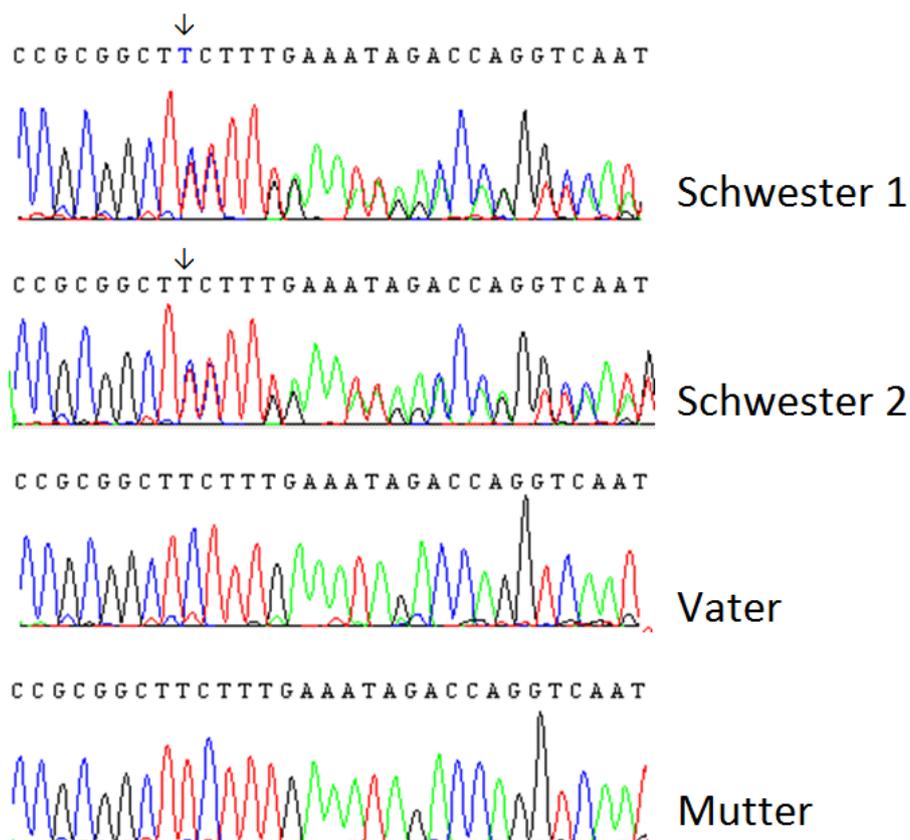


Abbildung 4.20: Mutation c.1841delT bei Schwester 1 und 2 im Vergleich zur DNA der Eltern, die dem Wildtyp entspricht



Abbildung 4.21: Mutation c.1841delT Schwester 1 und 2 im Vergleich mit vier Kontrollen im Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 720min)

4.2.7 Stille Mutation c.6G>A und c.1683G>A

Zusätzlich konnten wir im Exon 1 zwei stille Mutationen (d.h. sie führen zu keiner Veränderung des Proteins) finden. Diese Mutationen sind nur auf DNA-Ebene sichtbar, sie haben also keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. Bei der einen stillen Mutation kam es zu einem Austausch von G gegen A an Position c.6. Da immer drei Basen eine Aminosäure codieren, bedeutet dieses, dass bei dem zweiten Triplet des Exon 1 an der 3. Position eine Base ausgetauscht ist. Da es mehr Basenkombinationsmöglichkeiten als proteinogene Aminosäuren gibt, hat dieses zur Folge, dass es für eine Aminosäure mehrere Kodierungen gibt, wobei sich dieser Unterschied meist auf die dritte Base (auch „wobble base“ genannt) bezieht. So auch in unserem Fall, sowohl das Basentriplett GAG als auch GAA kodieren für die Aminosäure Glutamat, sodass diese Mutation keine Änderung bei der Aminosäuresequenz bewirkt. Daher auch der Name „stille Mutation“. In der SSCP ließ sich diese Mutation nur sehr schlecht nachweisen, lediglich in einem von zwölf Gelen konnte man eine Veränderung im Vergleich zu den Kontrollproben erkennen.

Die andere stille Mutation ist wieder ein Austausch von G gegen A, diesmal an Position c.1683, was wiederum die dritte Position eines Basentriplets darstellt. Sowohl die Wildtypsequenz CCG als auch die durch die Mutation veränderte Sequenz CCA kodieren für die Aminosäure Prolin. Diese stille Mutation konnte in 30% (3 von 10) der auswertbaren Gele sichtbar gemacht werden.

4.2.8 Polymorphismen c.81C>T, c.402C>A, c.1137C>T, c.1627C>T

Des Weiteren konnten im Exon 1 vier verschiedene Polymorphismen gefunden werden. Der erste Polymorphismus trat bei drei Patienten auf. Es handelte sich um einen Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin an Position c.81. Dieser Austausch führt zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz, so dass es sich um eine stille Mutation handelt. Dieser bekannte Polymorphismus ist unter der SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Nummer rs56307810 zu finden. Dieser

Polymorphismus konnte mit der SSCP-Analyse in keinem der Gele nachgewiesen werden.

Der zweite Polymorphismus, bekannt unter der SNP-Nummer rs41300169, kam bei 9 von 108 Patienten (etwa 8,3%) vor. Hierbei kommt es zu einem Basenaustausch von C gegen A an der Position c.402 (siehe Abb. 4.22). Dieser Polymorphismus führt wiederum zu keiner Änderung auf Aminosäureebene, besitzt daher also keine funktionelle Relevanz. Mit der SSCP-Methode konnte man den heterozygoten Polymorphismus in 62,5% (5 von 8) der auswertbaren Gele erkennen und beim homozygoten sogar in 75% (6 von 8) (siehe Abb. 4.23).

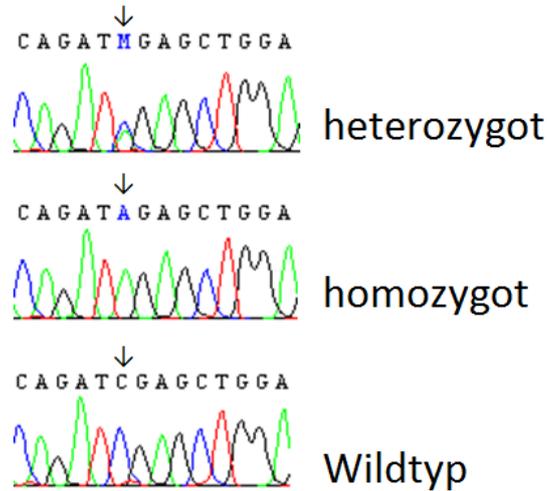


Abbildung 4.22: Polymorphismus 402C>A DNA-Sequenz



Abbildung 4.23: Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 720min)

Der nächste Polymorphismus ist durch einen Basenaustausch von C gegen T an Position c.1137 gekennzeichnet. Er trägt die SNP-Nummer rs56277715 und trat bei 4 (=3,8%) Patienten auf. Dieser Basenaustausch hat keine Relevanz in Bezug auf die Aminosäuresequenz. Mit Hilfe der SSCP-Methode konnte man diesen Polymorphismus bei 9 von 44 Proben erkennen, was in etwa 20 Prozent entspricht.

Der letzte in Exon 1 gefundene Polymorphismus ist zugleich der am zweithäufigsten auftretende in dieser Studie. Er trat bei 45 (etwa 42%) Patienten auf. Ein

Basenaustausch von C gegen T an der Stelle c.1627 ohne Konsequenz für die Aminosäuren definiert den Polymorphismus mit der SNP-Nummer rs1953337 (siehe Abb. 4.24). Auffallend ist, dass er überwiegend (85%) in Kombination mit dem Polymorphismus rs1335268 aus Exon 6 vorkommt. In den SSCP-Gelen war dieser Polymorphismus nur in 10% (2 von 20) der auswertbaren Gele sichtbar, wobei er in der homozygoten Form in 30% (3 von 10) nicht sicher identifizierbar war.

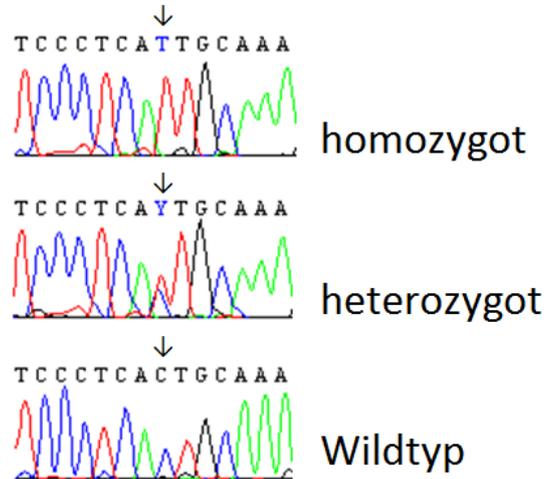


Abbildung 4.24: Polymorphismus 1627C>T

4.3 Mutationsbefund Exon 5

4.3.1 Stille Mutation c.2652C>T

In Exon 5 haben wir einen homozygoten Basenaustausch von C gegen T an Position c.2652 gefunden. Dieser Basenaustausch führt zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz, es liegt somit eine stille Mutation vor. In der SSCP-Analyse war diese Mutation auf allen auswertbaren Gelen sichtbar (siehe Abb. 4.25).

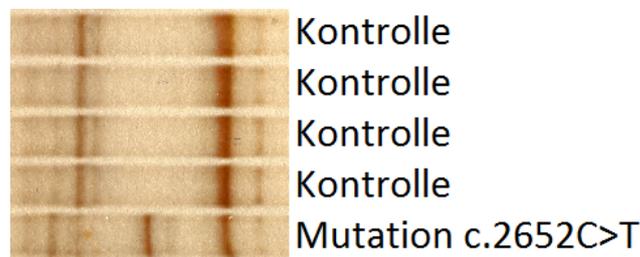


Abbildung 4.25: Mutation c.2652C>T mit vier Kontrollen im Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 720min)

4.3.2 Mutation c.3041_3056dup

Im ersten Abschnitt fand sich eine Mutation, bei der es sich um eine Duplikation von 16 Basenpaaren handelt. Dieses führt zu einer Bildung eines Stopp Codons und somit zum Abbruch der Aminosäuresynthese an der Position p.1020, was zu einem Verlust von 81 Aminosäuren führt (siehe Abb. 4.26). Da sich der Forward und der Reverse-Strang bei der Darstellung der Mutation um eine Base widersprachen, wandten wir das Verfahren des TOPO-Cloning an, um mit Hilfe des Klons die Mutation zu verifizieren. Bei der SSCP-Analyse konnte diese Mutation bei allen Gelen (100%, 10 von 10) dargestellt werden (siehe Abb. 4.27).

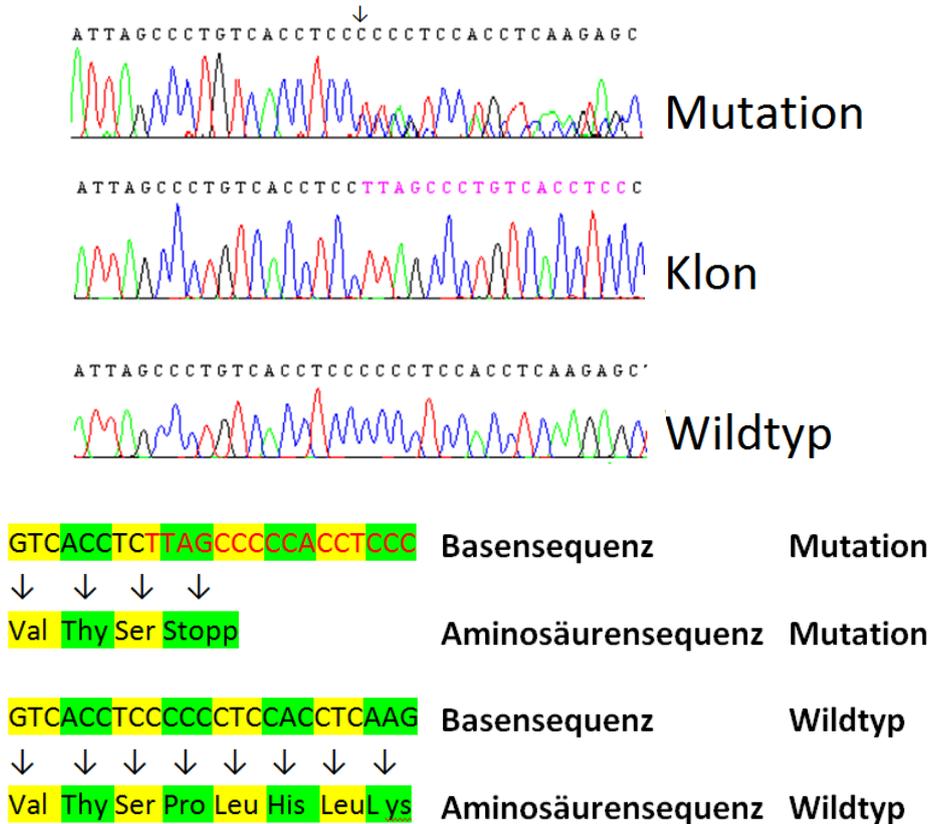


Abbildung 4.26: Mutation c.3041_3056dup im Vergleich zur Wildtypsequenz



Abbildung 4.27: Mutation c.3041_3056dup mit vier Kontrollen im Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 1x TBE, 250V, 840min)

4.3.3 Polymorphismus c.3698C>T

Zudem wurde im dritten Abschnitt von Exon 6 bei 47 Patienten, was einen prozentualen Anteil von etwa 44% ausmacht, ein Polymorphismus entdeckt. Dieser Polymorphismus ist bereits bekannt unter der SNP-Nummer rs1335268. Es handelt sich hierbei um einen Austausch der Base Cytosin gegen Thymin an Position c.3698 (siehe Abb. 4.28). In der SSCP-Analyse konnte dieser Polymorphismus in seiner heterozygoten und homozygoten Form in ca. 21% (3 von 14) auswertbaren Gelen sichtbar gemacht werden.

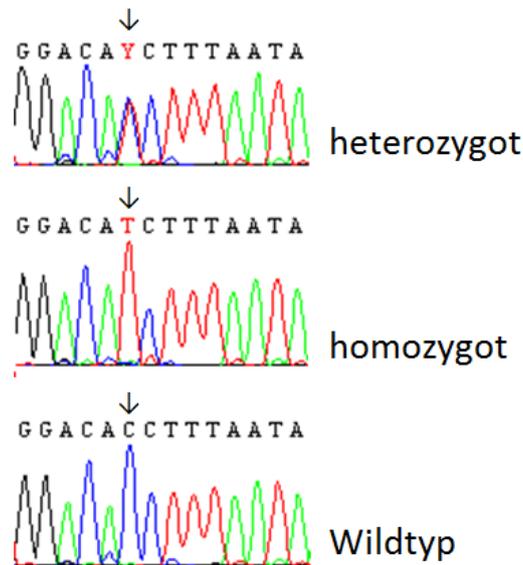


Abbildung 4.28: Polymorphismus c.3698C>T

Auffallend ist, dass die Polymorphismen rs1953337 und rs1335268, welche auf dem Exon 1 beziehungsweise Exon 6 liegen, überwiegend gemeinsam vorkommen (siehe Tab.4.3). Der SNP rs1953337 kommt in 38 von 45 Fällen (ca. 84%) mit dem SNP rs1335268 vor, umgekehrt ist dieses in 38 von 47 Fällen (ca. 81%) zu beobachten.

Tabelle 4.3: Häufigkeit der SNPs

SNP	Anzahl
rs1953337 alleine	4
rs1953337 mit anderen Polymorphismen	3
rs1335268 alleine	6
rs1335268 mit anderen Polymorphismen	3
rs1953337+rs1335268	38

5 Diskussion

In dieser Studie haben wir die DNA von 108 Patienten auf Mutationen im *PCDH19*-Gen (Mendelian Inheritance in Man MIM 300460) untersucht. Eingeschlossen in diese Untersuchung waren Patientinnen, bei denen die Verdachtsdiagnose eines Dravet-Syndroms (MIM 607208) bestand, die jedoch negativ auf eine Mutation im *SCN1A*-Gen getestet wurden.

5.1 Dravet-Syndrom

Das Dravet-Syndrom, auch unter dem Namen schwere myoklonische Epilepsie im Kindesalter (SMEI) bekannt, wurde zum ersten Mal 1978 von Dravet [5] beschrieben. Es gehört zur Gruppe der Epileptischen Enzephalopathien, daher auch die Bezeichnung EIEE6 (*early infantile epileptic encephalopathie*). Das Dravet-Syndrom ist eine seltene Erkrankung, die durch febrile und afebrile, generalisierte und unilaterale, klonische oder tonisch-klonische Anfälle, die im ersten Lebensjahr auftreten, charakterisiert ist. Später sind diese mit myoklonischen, atypischen Absencen und fokalen Anfällen assoziiert. Entwicklungsverzögerungen treten im zweiten Lebensjahr auf, gefolgt von kognitiven Beeinträchtigungen und Persönlichkeitsstörungen [16]. In etwa 80 % der Fälle kann die Entstehung des Dravet-Syndroms auf eine Mutation im *SCN1A* Gen zurückgeführt werden, dabei handelt es sich mehrheitlich um Neumutationen [21]. Weitere 5% werden durch Mutationen im *PCDH19*-Gen verursacht [9], die jedoch der EFMR als eigenständiges Krankheitsbild zugerechnet werden können. In 10% bis 20% ist die Ursache unbekannt. In einigen seltenen Fällen wurde von Mutationen in anderen Genen (*GABRG2*, *SCN1B*, *SCN2A*, *SCN9A*, *CACNB4*) berichtet [1].

5.2 EFMR

Die EFMR (*Epilepsy and mental retardation limited to females*) wird wie das Dravet-Syndrom zu den frühkindlichen epileptischen Enzephalopathien (EIEE9, MIM 300088) gezählt. Die EFMR tritt in der frühen Kindheit auf (6-36 Monate) und geht mit kognitiven Beeinträchtigungen einher. Das klinische Erscheinungsbild ist hauptsächlich durch Cluster von Anfällen innerhalb kurzer Zeit gekennzeichnet [10]. Innerhalb der Pubertät kommt es bei der Mehrheit der Patienten zu Remissionen [22]. Die Erkrankung ist geschlechtsgebunden, sie wird X-chromosomal verbunden vererbt, wobei nur Frauen phänotypisch betroffen sind. Sie wird durch

Mutationen im *PCDH19*-Gen verursacht, die überwiegend in der für die extrazelluläre Domäne des Protocadherins kodierende Region lokalisiert sind.

5.3 Vergleich Dravet-Syndrom mit EFMR

Beim Dravet-Syndrom sind Jungen und Mädchen gleichermaßen betroffen, während die EFMR ausschließlich Mädchen betrifft.

Die durch eine *PCDH19*-Mutation ausgelöste EFMR ähnelt stark dem Dravet-Syndrom. Beide sind mit febrilen Anfällen assoziiert, allerdings unterscheiden sie sich leicht im Durchschnittsalter des ersten Anfalls, im Mittel tritt der Anfall bei der EFMR etwa fünfeinhalb Monate später auf (6,3 Monate [10] versus 11,9 Monate). Zudem ist sowohl ein Status epilepticus als auch das Auftreten von Myoklonien bei der EFMR wesentlich seltener [10]. Während 92% der Dravet-Syndrom-Patienten einen Status epilepticus erlebt haben [6], tritt bei EFMR-Patienten ein Status epilepticus bei etwa 33% [26] auf. Im Gegensatz dazu kommt es bei der EFMR verstärkt zur Clusterbildung von Anfällen innerhalb kurzer Zeit, während dieses Phänomen beim Dravet-Syndrom wesentlich seltener zu beobachten ist. Insgesamt scheint die Prognose der *PCDH19*-positiven Patienten günstiger als die der *SCN1A*-positiven Patienten [22], bei den *PCDH19*-Patienten kommt es meist in der Pubertät zu einer Remission der Anfälle, während *SCN1A*-Patienten eine hohe Mortalitätsrate und epileptische Anfälle im Erwachsenenalter aufweisen [20].

EFMR-Patienten sind durch eine höhere Variabilität in ihren kognitiven Fähigkeiten gekennzeichnet, bis zu einem Drittel der Mädchen besitzen einen normalen Intellekt, der Rest ist leicht bis moderat beeinträchtigt, im Gegensatz zu Patienten mit Dravet-Syndrom, die kognitiv meist stärker beeinträchtigt sind. Allerdings können bei beiden schwere Fälle von geistiger Beeinträchtigung auftreten. Autistische Merkmale treten wiederum gehäuft bei der EFMR auf [36]. Zusätzlich zu den autistischen Merkmalen können zwanghafte und aggressive Verhaltensstörungen auftreten. Bei einigen Patienten spielen ein sozialer Rückzug oder Persönlichkeitsstörungen die größte Rolle unter den Krankheitsmerkmalen, besonders wenn die Patienten älter werden [11]. Neurologische Auffälligkeiten wie Ataxien können gleichermaßen sowohl beim Dravet-Syndrom als auch bei der EFMR auftreten [10]. Zudem wird häufig von einer starken Lichtempfindlichkeit im EEG (Photosensibilität) bei Dravet-Syndrom-Patienten berichtet, während sie bei der EFMR gewöhnlich nicht vorkommt [9].

5.4 Befunde

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung wurden unter den 108 Proben 11 Mutationen, die zu einem veränderten *PCDH19*-Protein führen, identifiziert (ca. 10%). Zudem konnten wir drei stille Sequenzvariationen ohne Veränderung des *PCDH19*-Proteins, die nicht als Polymorphismen bekannt sind, nachweisen. Zusätzlich ent-

deckten wir bei etwa 57% der DNA-Proben insgesamt fünf verschiedene Polymorphismen, die bereits im *Reference SNP Cluster Report* verzeichnet sind. Die gefundenen Mutationen und Polymorphismen wurden zusätzlich zur Etablierung dieses Verfahrens mit der SSCP-Methode (single strand conformation polymorphism) untersucht.

Die elf Mutationen setzen sich aus vier Missense Mutationen, vier Deletionen, einer Duplikation und zwei kombinierten Deletionen mit Insertionen zusammen. Zehn der elf Mutationen befanden sich im Exon 1 des *PCDH19*-Gens, welches aus insgesamt 6 Exons besteht, während lediglich eine Mutation im Exon 6 vorkam.

Soweit uns die DNA der Angehörigen zur Verfügung stand (bei 6 von 11 Elternpaaren der Mutationsträger) identifizierten wir fünf Mutationen als Neumutationen und eine vom Vater vererbte Mutation. Unter den fünf Neumutationen gab es ein Geschwisterpaar mit derselben Mutation. Bei den Eltern dieses Geschwisterpaares konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass es sich hier am ehesten um eine Mutation in den Keimzellen eines Elternteiles handeln könnte.

5.5 Vererbungsmodus und Pathomechanismus

Bei dem Krankheitsbild der EFMR sind männliche Mutationsträger, die aufgrund ihres einfach vorhandenen X-Chromosoms immer homozygot die Mutation aufweisen, von der Krankheit verschont, während heterozygote weibliche Mutationsträger frühkindliche epileptische Anfälle und teilweise eine mentale Retardierung zeigen. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass homozygote weibliche Mutationsträgerinnen ebenfalls klinisch unauffällig sein müssen, während männliche Mutationsträger, die eine unterschiedliche Zusammensetzung des Genoms in ihren Zellen besitzen, also ein Mosaik aufweisen, von der Krankheit betroffen sein müssten. Diese Hypothese bestätigt sich in der Familie der Patientin 2, hier ist die Großmutter, die die Mutation im *PCDH19*-Gen homozygot aufweist, klinisch unauffällig, ebenso der Onkel, der die Mutation in seinem X-Chromosom trägt. Bei dem Vater, der ebenfalls die Mutation besitzt, wurde das Janz-Syndrom (juvenile myoklonische Epilepsie, MIM 254770) diagnostiziert. Hier wäre in einem weiteren Schritt zu klären, ob bei dem Vater zusätzlich eine Mutation im Chromosom 6 vorliegt, die das Janz-Syndrom hervorruft oder ob es sich bei dem Vater um ein genetisches Mosaik handelt, sodass eine durch die Mutation im *PCDH19*-Gen verursachte Epilepsie in Frage kommt.

5.6 Vergleich der Befunde mit Literaturbefunden

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 5.1) gibt eine Übersicht über das klinische Erscheinungsbild unseres Patientenkollektivs im Vergleich zu den von Depienne (2012) zusammengefassten Daten.

Tabelle 5.1: Übersicht der klinischen Merkmale der Mutationsträger

	Literatur (nach Depienne 2012)	Gießen
Altersdurchschnitt bei erstem Anfall	12,9 Monate (Median: 10 Monate, Rang: 4-60 Monate) n=86	11,9 Monate (Median: 9 Monate, Rang 6-36 Monate)
Anfallstypen	tonisch, klonisch, tonisch-klonisch fokal mit oder ohne sekundärer Generalisierung atypische Absencen (selten) atonische Anfälle (selten) Myoklonien (selten)	Tonisch-klonisch, generalisiert (8) Fokal mit sekundärer Generalisierung (3) Atonisch, generalisiert (1) Absence mit Tonuserhöhung (1) Myoklonien (2)
Kognition	Normaler Intellekt (27,7%), Mild (36,1%), moderate (21,7%), oder schwere (14,5%) kognitive Beeinträchtigung	Leichte bis moderate psychomotorische Entwicklungsverzögerung, leichte autistische Züge, Aggressivität
Medikamente	Keine Angaben	Valproat + Levetiracetam (5) Valproat + Topiramamat (1) Valproat + Phenobarbital (1) Valproat + Phenobarbital + Kaliumbromid (1) Phenobarbital + Topiramamat (1) Phenobarbital + Clobazam + Kaliumbromid (1) Levetiracetam + Clobazam + Kaliumbromid (1)
Vererbung	De novo (32) Familiäre Condition (10) Mosaic Mutter (2)	De novo (3) Fraglich de novo, da Geschwisterpaar (2)

	Literatur (nach Depienne 2012)	Gießen
	Paternale Vererbung (9)	Paternale Vererbung (1)
	Maternale Vererbung (6)	Unbekannt (5)
	Unbekannt (23)	

Das klinische Bild der EFMR ist gemischt, sowohl die Anfallstypen als auch der Grad der Ausprägung sind sehr variabel. Die ersten Anfälle treten normalerweise im Säuglingsalter bis zum frühen Kleinkindalter auf, das in der Literatur beschriebene Durchschnittsalter bei dem ersten Anfall beträgt 12,9 Monate (Median: 10 Monate, Rang 4-60 Monate), bei etwa der Hälfte handelt es sich hierbei um febrile Anfälle [10][38][9][11][31]. In unserem Kollektiv betrug das Durchschnittsalter der Patientinnen bei ihrem ersten Anfall 11,9 Monate (Median: 9 Monate, Rang 6-36 Monate). Dieser erste Anfall fand bei 4 von 8 Patienten (50%) unter Fieber statt, deckungsgleich zu den Angaben in der Literatur.

Die im Krankheitsverlauf auftretenden Anfälle variieren und kommen sowohl in ausschließlicher als auch in gemischter Form sowohl bei dem von Depienne beschriebenen Kollektiv als auch dem Patientenkollektiv dieser Studie vor. Die häufigsten Anfallstypen bei der EFMR sind generalisierte tonische, klonische oder tonisch-klonische Anfälle und fokale Anfälle mit oder ohne sekundärer Generalisierung, während atypische Absencen, atonische Anfälle und myoklonische Zuckungen nur selten beobachtet werden [10], was mit dem Patientenkollektiv dieser Studie übereinstimmt. Von einem Status epilepticus wurde in dem Gießener Kollektiv nur bei einer Patientin berichtet, während in der Literatur etwa bei einem Drittel der Patienten ein Status epilepticus aufgeführt wurde [22]. Als diagnostisch sehr wichtiges Kriterium ist allen gemeinsam, dass die Anfälle in Clustern auftreten, die ein bis fünf Minuten dauern und mehrere Male am Tag auftreten.

Genetisch handelt es sich bei den Mutationen im *PCDH19*-Gen meist um Neumutationen, 72% (32/44) bei Depienne [10], 85% (11/13) bei van Harssel und insgesamt von den bisher beschriebenen Mutationen, bei denen die Vererbung bekannt ist, bei 66% (68/103) [22]. Bei dem Gießener Kollektiv waren 83% (5/6) Neumutationen, allerdings waren zwei dieser Neumutationen bei einem Geschwisterpaar aufgetreten, wo die Mutationen nicht bei den Eltern nachgewiesen werden konnten, sodass man auch 50% (3/6) Neumutationen annehmen kann.

5.7 SSCP-Analyse

Da es sich bei der SSCP-Methode um ein kostengünstigeres und weniger zeitaufwendiges Verfahren handelt, wurden die in der Mutationsanalyse gefundenen Mutationen und Polymorphismen zusätzlich mit dieser Methode zur Etablierung untersucht.

Die Deletionen, Insertionen und Duplikationen konnten in etwa 92% (55 von 60) nachgewiesen werden, wenn man das Verfahren mit und ohne Glycerin-Färbung

zusammen betrachtet sogar in 100% (30 von 30). Bei den zwei Missense Mutationen konnte in 56,5% (13 von 23) der Ansätze die Mutation sichtbar gemacht werden, zählt man die Technik mit und ohne Glycerin-Färbung zusammen, kommt man auf ein Ergebnis von 75% (9 von 12). Die Polymorphismen konnten insgesamt in 30% (39 von 130) dargestellt werden, wobei auch einige (13/130=10%) davon nur fraglich identifizierbar waren.

Die SSCP-Methode ist somit hervorragend geeignet, um Mutationen mit Leserasterverschiebung, wie zum Beispiel Deletionen, Insertionen, Duplikationen, nachzuweisen. Bei Punktmutationen, wie bei den stillen und den Missense Mutationen und den Polymorphismen, die zu keiner Leserasterverschiebung führen, ist sie nur bedingt geeignet, da hier die genetischen Veränderungen nur zu einem Teil sichtbar gemacht werden konnten. Zudem kam es hierbei zu einer großen Anzahl von nur fraglich identifizierbaren Mutationen, die nur von einem sehr erfahrenen Untersucher entdeckt werden konnten, sodass diese Methode stark von der durchführenden und untersuchenden Person abhängig ist.

5.8 Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist die EFMR eine seltene Erkrankung, die jedoch unter den epileptischen Enzephalopathien an Bedeutung gewinnt. Durch die teilweise sehr starke Überlappung des klinischen Erscheinungsbildes mit dem Dravet-Syndrom fällt eine Abgrenzung sehr schwer. Insgesamt gibt es jedoch einige, wenn auch manchmal nur geringfügige, Unterschiede, die die Diagnose der EFMR erleichtern. Als klinisch auffälligstes Merkmal ist das Auftreten von Anfällen in Clustern. Zudem weisen das weibliche Geschlecht, der durchschnittlich etwas spätere erste Anfall und Verhaltensauffälligkeiten, wie eine erhöhte Aggressivität und autistische Züge, auf die EFMR hin. Da jedoch das Dravet-Syndrom die wesentlich häufigere Erkrankung ist und die Unterscheidung zwischen EFMR und Dravet-Syndrom klinisch oft nicht möglich ist, sollte zuvor eine Mutationsanalyse des *SCN1A*-Gens vorgenommen werden. Bei negativer Testung für das *SCN1A*-Gen ist dann eine Untersuchung des *PCDH19*-Gens empfehlenswert [36].

6 Zusammenfassung

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung des *PCDH19*-Gens und dem dazugehörigen klinischen Bild bei weiblichen Patienten mit frühkindlicher myoklonischer Epilepsie.

Für die Untersuchung des *PCDH19*-Gen auf Mutationen wurden die Blutproben eines Kollektivs von 108 Patienten mit Dravet-Syndrom-ähnlicher Symptomatik, die zuvor negativ auf Mutationen innerhalb des *SCN1A*-Gens getestet wurden, analysiert. Zu diesem Zweck wurden alle sechs Exons inklusive der angrenzenden intronischen des auf dem X-Chromosom lokalisierten *PCDH19*-Gens amplifiziert und sequenziert. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung mittels des SSCP-Verfahren (single strand conformation polymorphism).

Insgesamt konnten elf Mutationen ($11/108=10,2\%$) nachgewiesen werden, die sich aus vier Missense Mutationen, vier Deletionen, einer Duplikation und zwei kombinierten Deletionen mit Insertionen zusammensetzen. Zusätzlich wurden drei stille Mutationen entdeckt, die nicht als Polymorphismen bekannt sind. Bei etwa 57% der DNA-Proben konnten insgesamt fünf verschiedene Polymorphismen reproduziert werden, die bereits im *Reference SNP Cluster Report* verzeichnet sind.

Zehn der elf Mutationen bewirken eine Veränderung der Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne des vom *PCDH19*-Gen codierten Protocadherins, während die elfte Mutation zu einer Variation der innerhalb der Zelle gelegenen Domäne des Protocadherins führt.

Mit Hilfe des SSCP-Verfahrens konnten die Deletionen, Insertionen und Duplikationen in etwa 92% (55 von 60) aller Fälle nachgewiesen werden, wenn man das Verfahren mit und ohne Glycerin-Färbung zusammen betrachtet sogar in 100% (30 von 30). Bei den zwei Missense Mutationen konnte in 56,5% (13 von 23) der Ansätze die Mutation identifiziert werden, zählt man die Technik mit und ohne Glycerin-Färbung zusammen, kommt man auf ein Ergebnis von 75% (9 von 12). Die Polymorphismen konnten insgesamt in 30% (39 von 130) dargestellt werden, wobei allerdings einige ($13/130=10\%$) davon nur unzureichend identifizierbar waren. Insgesamt stellt die SSCP-Methode somit ein Verfahren dar, welches sich hervorragend als Screeningmethode für Mutationen mit Leserasterverschiebung eignet, jedoch bei Punktmutationen nur eingeschränkt anwendbar ist.

Die klinischen Merkmale der Probanden mit einer *PCDH19*-Mutation zeigten sich in einem Durchschnittsalter bei Erstanfall von 12 Monaten (Median: 9 Monate), dabei handelte es sich bei 5 von 10 (50%) Patienten um febrile Anfälle. Die Anfallstypen äußerten sich dabei hauptsächlich tonisch-klonisch generalisiert (8/11), einfach fokal (2/11), fokal mit sekundärer Generalisierung (3/11), atonisch generalisiert (1/11) und klinisch als Absence mit Tonuserhöhung (1/11). Acht von

neun Probanden sind in ihrer Entwicklung leicht bis moderat verzögert, nur bei einer von neun Probandinnen wurde von einer durchschnittlichen Intelligenz berichtet.

Zusammenfassend konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass dem *PCDH19*-Gen im Zusammenhang mit frühkindlicher myoklonischer Epilepsie bei Mädchen eine große Bedeutung zukommt.

7 Summary

This thesis deals with the importance of the *PCDH19* gene and the associated clinical phenotype in female patients with early childhood myoclonic epilepsy.

In order to investigate the occurrence of mutations within the *PCDH19* gene, blood samples a cohort of 108 patients with Dravet syndrome-like symptoms, which have been previously tested negative for any mutations within the *SCN1A* gene, were examined. For this purpose all six exons including adjacent intronic sections of the *PCDH19* gene, which is located on the X chromosome, were amplified and sequenced. The SSCP method (single beach conformation polymorphism) was used for additional analysis.

A total of eleven mutations ($11/108 = 10.2\%$) were detected, which are composed of four missense mutations, four deletions, one duplication and two deletions combined with insertions. In addition, three silent mutations were discovered, which have not been described as polymorphisms before. In about 57% of all DNA samples a total of five different polymorphisms could be reproduced that have already been listed in the *Reference SNP Cluster Report*. Ten of the eleven mutations result in a change of the amino acid sequence within the extracellular domain of the protocadherin which is encoded by the *PCDH19* gene, while the eleventh mutation leads to a variation of the intercellular located domain.

Using the SSCP method, approximately 92% (55 of 60) of all deletions, insertions and duplications could be identified. If the results obtained by experiments performed with and without glycerol staining are considered in combination, even 100% (30 of 30) could be detected. In case of the two missense mutations the SSCP method was able to detect them in 56,5% (13 of 23), in combination of both methods in 75% (9 of 12). The polymorphisms could be demonstrated in 30% (39 of 130), whereas some ($13/130 = 10\%$) could not be identified in a sufficient manner. Thus, the SSCP represents a method which is suitable to screen for frameshift mutations, however, its applicability to identify point mutations is limited.

The clinical characteristics of patients with a *PCDH19* mutation showed in a mean age at of 12 months (median: 9 months) the primary seizure, and 5 of 10 (50%) patients had febrile seizures. The types of seizures were mainly tonic-clonic generalized (8/11), simply focally (2/11), focal with secondary generalization (3/11), atonic generalized (1/11) and clinically absence of increase in tone (1 / 11). Eight of the nine patients are slightly to moderately retarded in their development, only in case of one of nine patients an average intelligence has been reported. In summary, this study was able to show that the *PCDH19* gene associated with myoclonic epilepsy of early childhood in girls plays an important role.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ARX	aristaless related homeobox
b	Bite
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CDKL5	cyclin-dependent kinase-like 5
CFNS	Cranio-fronto-nasales-Syndrom
del	Deletion
delins	Deletion/Insertion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DS	Dravet-Syndrom
dup	Duplikation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalografie
EFMR	Epilepsy in Females with Mental Retardation
EIEE	early infantile epileptic encephalopathie
G	Guanin
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GEFS+	generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus
h	Stunde
ILAE	International League against Epilepsy
IQ	Intelligenzquotient
l	Liter
m	Meter
M	Molar
MAE	myoklonisch astatische Epilepsie
MIM	Mendelian Inheritance in Man
min	Minute

7. SUMMARY

NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAA	Polyacrylamidgel
PCDH19	Protocadherin 19
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
S.O.C.	Super Optimal broth with Catabolite repression
SCN1A	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit
sec	Sekunde
SMEI	Severe myoclonic epilepsy of infancy
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRPX2	sushi-repeat containing protein, X-linked 2
SSCP	single strand conformation polymorphism
STK9	serine/threonine kinase 9
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des Protocadherin 19, bestehend aus extrazellulärem Cadherin (EC), transmembranärer (TM) und cytoplasmatischer (CM) Domäne	6
2.1	Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Exone von PCDH19, G=Genruler L=Leerprobe P1-9=Proben mit Patienten-DNA	17
2.2	Ansicht des Computerprogramms Applied Biosystems Seqscape® 2.1	19
2.3	Polyacrylamidgel	22
4.1	Schematische Darstellung des Protocadherins 19; links: Darstellung der Mutation unseres Studienkollektivs, rechts: Darstellung der in der Literatur beschriebenen Mutationen (Stand nach Depienne et al. 201)	37
4.2	Mutation c.289_ 303del im Vergleich zur Wildtypsequenz	39
4.3	Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c.289_ 303del	39
4.4	Mutation c.695A>G im Vergleich zur Wildtypsequenz	40
4.5	Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c.695A>G	40
4.6	Mutation c.695A>G Polyacrylamidgel (8% PAA, 1x TBE, 200V, 720min)	41
4.7	Mutation c.379C>G im Vergleich zur DNA-Sequenz des Vaters, der homzygoter Träger der Mutation ist, und im Vergleich zur DNA-Sequenz der Mutter, die der Wildtypsequenz entspricht	41
4.8	Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c.379C>G	42
4.9	Mutation c.1019A>G im Vergleich zur Wildtypsequenz	42
4.10	Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c.1019A>G	43
4.11	Mutation c.1130A>G im Vergleich zur Wildtypsequenz	43
4.12	Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c. 1130A>G	44
4.13	Mutation c.819_ 833delins im Vergleich zur Wildtypsequenz	44
4.14	Mutation c.819_ 833delins im Vergleich zu vier Kontrollen im Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 1x TBE, 200V, 840min)	45

4.15 Mutation c.956_959del Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 720 min)	45
4.16 Mutation c.956_959del im Vergleich zum Wildtyp, der DNA der Schwester und der Eltern	46
4.17 Mutation c.1441_1442delinsCT im Vergleich zur Wildtypsequenz	47
4.18 Auflistung der orthologen und paralogen Proteine im Bereich der Mutation c. 1441_1442delinsCT	47
4.19 Polyacrylamidgel Mutation c. 1441_1442delinsCT (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 960min)	47
4.20 Mutation c.1841delT bei Schwester 1 und 2 im Vergleich zur DNA der Eltern, die dem Wildtyp entspricht	48
4.21 Mutation c.1841delT Schwester 1 und 2 im Vergleich mit vier Kontrollen im Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 720min)	49
4.22 Polymorphismus 402C>A DNA-Sequenz	50
4.23 Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 720min)	50
4.24 Polymorphismus 1627C>T	51
4.25 Mutation c.2652C>T mit vier Kontrollen im Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 0,5x TBE, 200V, 720min)	51
4.26 Mutation c.3041_3056dup im Vergleich zur Wildtypsequenz	52
4.27 Mutation c.3041_3056dup mit vier Kontrollen im Polyacrylamidgel (10/6% PAA, 1x TBE, 250V, 840min)	52
4.28 Polymorphismus c.3698C>T	53

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte und Zubehör	10
2.2	Chemikalien	12
2.3	Lösungen	12
2.4	Software	13
2.5	Protokoll: Extraktion und Reinigung der DNA	14
2.6	PCR-Ansätze und Einstellungen	16
2.7	Protokoll Sequenzieransatz	18
2.8	Protokoll zur Herstellung des Polyacrylamidgels sowie des SSCP-Puffers	20
2.9	Einstellungen und Laufbedingungen der jeweiligen Exons	21
2.10	Verwendete Lösungen	22
4.1	Übersicht der gefundenen Mutationen und Polymorphismen	35
4.2	Mutationen	38
4.3	Häufigkeit der SNPs	53
5.1	Übersicht der klinischen Merkmale der Mutationsträger	57

Literatur

- [1] M Akiyama, K Kobayashi, and Y Ohtsuka. Dravet syndrome: a genetic epileptic disorder. *Acta medica Okayama*, 66(5):369–76, 2012.
- [2] Budowle B, R Chakraborty, AM Giusti, AJ Eisenberg, and RC Allen. Analysis of the vnt1 locus d1s80 by the pcr followed by high-resolution page. *The American Journal of Human Genetics*, 48(1):137–44, 1991 Jan.
- [3] AT Berg, SF Berkovic, MJ Brodie, J Buchhalter, JH Cross, van Emde Boas, W, J Engel, J French, TA Glauser, GW Mathern, SL Moshé, D Nordli, P Plouin, and IE Scheffer. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ilae commission on classification and terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4):676–85, 2010.
- [4] S Biswas, MR Emond, and JD Jontes. Protocadherin-19 and n-cadherin interact to control cell movements during anterior neurulation. *The Journal of Cell Biology*, 191(5):1029–41, 2010.
- [5] C Dravet. Les epilepsies graves de l'enfant. *Vie Medicale*, 8:543–8, 1978.
- [6] M Chipaux, N Villeneuve, P Sabouraud, I Desguerre, N Boddaert, C Depienne, C Chiron, O Dulac, and R Nabbout. Unusual consequences of status epilepticus in dravet syndrome. *Seizure*, 19(3):190–4, 2010.
- [7] L Claes, J Del-Favero, B Ceulemans, L Lagae, C Van Broeckhoven, and P De Jonghe. De novo mutations in the sodium-channel gene scn1a cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *The American Journal of Human Genetics*, 68(6):1327–32, 2001.
- [8] A Compagni, M Logan, R Klein, and RH Adams. Control of skeletal patterning by ephrinb1-ephb interactions. *Developmental Cell*, 5(2):217–30, 2003.
- [9] C Depienne, D Bouteiller, B Keren, E Cheuret, K Poirier, O Trouillard, B Benyahia, C Quelin, W Carpentier, S Julia, A Afenjar, A Gautier, F Rivier, S Meyer, P Berquin, M Hélias, I Py, S Rivera, N Bahi-Buisson, I Gourfinkel-An, C Cazeneuve, M Ruberg, A Brice, R Nabbout, and E Leguern. Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in pcdh19 resembles dravet syndrome but mainly affects females. *PLoS Genetics*, 5(2):e1000381, 2009.

- [10] C Depienne and E LeGuern. Pcdh19-related infantile epileptic encephalopathy: an unusual x-linked inheritance disorder. *Human Mutation*, 33(4):627–34, 2012.
- [11] C Depienne, O Trouillard, D Bouteiller, I Gourfinkel-An, K Poirier, F Rivier, P Berquin, R Nabbout, D Chaigne, D Steschenko, A Gautier, D Hoffman-Zacharska, A Lannuzel, M Lackmy-Port-Lis, H Maurey, A Dusser, M Bru, B Gilbert-Dussardier, A Roubertie, A Kaminska, S Whalen, C Mignot, S Baulac, G Lesca, A Arzimanoglou, and E LeGuern. Mutations and deletions in pcdh19 account for various familial or isolated epilepsies in females. *Human Mutation*, 32(1):E1959–75, 2011.
- [12] LM Dibbens, R Kneen, MA Bayly, SE Heron, T Arsov, JA Damiano, T Desai, J Gibbs, F McKenzie, JC Mulley, A Ronan, and IE Scheffer. Recurrence risk of epilepsy and mental retardation in females due to parental mosaicism of pcdh19 mutations. *Neurology*, 76(17):1514–9, 2011.
- [13] LM Dibbens, PS Tarpey, K Hynes, MA Bayly, IE Scheffer, R Smith, J Bommar, E Sutton, L Vandeleur, C Shoubridge, S Edkins, SJ Turner, C Stevens, S O’Meara, C Tofts, S Barthorpe, G Buck, J Cole, K Halliday, D Jones, R Lee, M Madison, T Mironenko, J Varian, S West, S Widaa, P Wray, J Teague, E Dicks, A Butler, A Menzies, A Jenkinson, R Shepherd, JF Gusella, Z Afawi, A Mazarib, MY Neufeld, S Kivity, D Lev, T Lerman-Sagie, AD Korczyn, CP Derry, GR Sutherland, K Friend, M Shaw, M Corbett, H Kim, DH Geschwind, P Thomas, E Haan, S Ryan, S McKee, SF Berkovic, PA Futreal, MR Stratton, JC Mulley, and J Gécz. X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nature Genetics*, 40(6):776–81, 2008.
- [14] C Dravet, M Bureau, R Guerrini, N Giraud, and J Roger. Severe myoclonic epilepsy infants in: Roger j. bureau m. dravet c. dreifuss fe perret a. wolf p.: Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence. *John Libbey Company Ltd. London*, 2:75–88, 1992.
- [15] C Dravet, M Bureau, H Oguni, Y Fukuyama, and O Cokar. Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. *advances in neurology*, 95:71–102, 2005.
- [16] C Dravet and H Oguni. Dravet syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy). *Handbook of clinical neurology*, 111:627–33, 2013.
- [17] Dravet Charlotte. Severe myoclonic epilepsy in infants and its related syndroms. 2000.
- [18] A Escayg, BT MacDonald, MH Meisler, S Baulac, G Huberfeld, I Angoufinkel, A Brice, E LeGuern, B Moulard, D Chaigne, C Buresi, and A Malafosse. Mutations of scn1a, encoding a neuronal sodium channel, in two families with gefs+2. *Nature Genetics*, 24(4):343–5, 2000.

-
- [19] RS Fisher, W van Emde Boas, W Blume, C Elger, P Genton, P Lee, and J Jr. Engel. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international league against epilepsy (ilae) and the international bureau for epilepsy (ibe). *Epilepsia*, 46(4):470–2, 2005.
- [20] P Genton, R Velizarova, and C Dravet. Dravet syndrome: the long-term outcome. *Epilepsia*, 52:44–9, 2011.
- [21] LA Harkin, JM McMahon, X Iona, L Dibbens, JT Pelekanos, SM Zuberi, LG Sadleir, E Andermann, D Gill, K Farrell, M Connolly, T Stanley, M Harbord, F Andermann, J Wang, SD Batish, JG Jones, WK Seltzer, A Gardner, G Sutherland, SF Berkovic, JC Mulley, and IE Scheffer. The spectrum of scn1a-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain*, 130(3):843–852, 2007.
- [22] Harssel, JJ, S Weckhuysen, Kempen, MJA, K Hardies, NE Verbeek, Kovel, CGF, WB Gunning, E Daalen, MV Jonge, AC Jansen, RJ Vermeulen, Arts, WFM, H Verhelst, A Fogarasi, Rijk-van Andel, JF, A Kelemen, D Lindhout, P Jonghe, Koeleman, BPC, A Suls, and EH Brilstra. Clinical and genetic aspects of pcdh19-related epilepsy syndromes and the possible role of pcdh19 mutations in males with autism spectrum disorders. *Neurogenetics*, 14(1):23–34, 2013.
- [23] WA Hauser, JF Annegers, and WA Rocca. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from rochester, minnesota. *Mayo Clinic Proceedings*, 71(6):576–86, 1996.
- [24] SR Haut, S Shinnar, and SL Moshe. Seizure clustering: risks and outcomes. *Epilepsia*, 46(1):146–9, 2005.
- [25] Hurst DL. Epidemiology of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia*, 31(4):397–400, 1990.
- [26] K Hynes, P Tarpey, LM Dibbens, MA Bayly, SF Berkovic, R Smith, ZA Raisi, SJ Turner, NJ Brown, TD Desai, E Haan, G Turner, J Christodoulou, H Leonard, D Gill, M R. Stratton, J Gecz, and IE Scheffer. Epilepsy and mental retardation limited to females with pcdh19 mutations can present de novo or in single generation families. *Journal of Medical Genetics*, 47(3):211–6, 2010.
- [27] Invitrogen. Topo ta cloning kit for sequencing. *manual*, 1987.
- [28] RC Juberg and CD Hellman. A new familial form of convulsive disorder and mental retardation limited to females. *The Journal of Pediatrics*, 79(5):726–32, 1971.
- [29] G Krämer. *Epilepsie von A - Z*. Trias MVS Medizinverlage, Stuttgart, 2004.

- [30] Y Kukita, T Tahira, SS Sommer, and K Hayashi. Sscp analysis of long dna fragments in low ph gel. *Human Mutation*, 10(5):400–7, 1997.
- [31] C Marini, D Mei, L Parmeggiani, V Norci, E Calado, A Ferrari, A Moreira, T Pisano, N Specchio, F Vigevano, D Battaglia, and R Guerrini. Protocadherin 19 mutations in girls with infantile-onset epilepsy. *Neurology*, 75(7):646–53, 2010.
- [32] H Morishita and T Yagi. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(5):584–92, 2007.
- [33] C Redies, K Vanhalst, and Fv Roy. delta-protocadherins: unique structures and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(23):2840–52, 2005.
- [34] P Roll, G Rudolf, S Pereira, B Royer, IE Scheffer, A Masscrier, MP Valenti, N Roeckel-Trevisiol, C Beclin, C Seegmuller, MN Metz-Lutz, A Lemainque, M Delepine, C Caloustian, A de Saint Martin, N Bruneau, D Depetris, MG Mattei, E Flori, A Robaglia-Schlupp, N Levy, BA Neubauer, R Ravid, C Marescaux, SF Berkovic, E Hirsch, M Lathrop, P Cau, and P Szepetowski. SrpX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Human Molecular Genetics*, 15(7):1195–207, 2006.
- [35] SG Ryan, PF Chance, C Zou, NB Spinner, JA Golden, and S Smietana. Epilepsy and mental retardation limited to females: an x-linked dominant disorder with male sparing. *Nature Genetics*, 17(1):92–5, 1997.
- [36] IE Scheffer. Diagnosis and long-term course of dravet syndrome. *European Journal of Paediatric Neurology*, 16:S5–S8, 2012.
- [37] IE Scheffer and SF Berkovic. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. a genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*, 120(3):479–90, 1997.
- [38] IE Scheffer, SJ Turner, LM Dibbens, MA Bayly, K Friend, B Hodgson, L Burrows, M Shaw, C Wei, R Ullmann, HH Ropers, P Szepetowski, E Haan, A Mazarib, Z Afawi, MY Neufeld, PI Andrews, G Wallace, S Kivity, D Lev, T Lerman-Sagie, CP Derry, AD Korczyn, J Gecz, JC Mulley, and SF Berkovic. Epilepsy and mental retardation limited to females: an under-recognized disorder. *Brain*, 131(4):918–27, 2008.
- [39] S Spiczak, A Caliebe, H Muhle, I Helbig, and U Stephani. Genetische ursachen epileptischer enzephalopathien. *Zeitschrift für Epileptologie*, 24:108–13, 2011.
- [40] P Strømme, ME Mangelsdorf, MA Shaw, KM Lower, SME Lewis, H Bruyere, V Lütcherath, ÁK Gedeon, RH Wallace, IE Scheffer, G Turner, M Partington, SGM Frints, JP Fryns, GR Sutherland, JC Mulley, and J Gécz. Mutations in the human ortholog of aristaless cause x-linked mental retardation and epilepsy. *Nature Genetics*, 30(4):441–5, 2002.

-
- [41] A Strzelczyk, JP Reese, R Dodel, and HM Hamer. Cost of epilepsy: a systematic review. *Pharmacoeconomics*, 26(6):463–76, 2008.
- [42] T Sugawara, Y Tsurubuchi, KL Agarwala, M Ito, G Fukuma, E Mazaki-Miyazaki, H Nagafuji, M Noda, K Imoto, K Wada, A Mitsudome, S Kaneko, M Montal, K Nagata, S Hirose, and K Yamakawa. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11):6384–9, 2001.
- [43] P Sunnucks, AC Wilson, LB Beheregaray, K Zenger, J French, and AC Taylor. Sscp is not so difficult, the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9(11):1699–710, 2000.
- [44] NanoDrop Technologies. Nanodrop 1000 spectrophotomete. *users manual*, 3.7, 2011.
- [45] K Vanhalst, P Kools, K Staes, F Roy, and C Redies. delta-protocadherins: a gene family expressed differentially in the mouse brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(11):1247–59, 2005.
- [46] RH Wallace, C Marini, S Petrou, LA Harkin, DN Bowser, RG Panchal, DA Williams, GR Sutherland, JC Mulley, IE Scheffer, and SF Berkovic. Mutant gaba(a) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nature Genetics*, 28(1):49–52, 2001.
- [47] RH Wallace, DW Wang, R Singh, IE Scheffer, AL George, HA Phillips, K Saar, A Reis, EW Johnson, GR Sutherland, SF Berkovic, and JC Mulley. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the na⁺-channel 1 subunit gene scn1b. *Nature Genetics*, 19(4):366–370, 1998.
- [48] LS Weaving, J Christdoulou, SL Williamson, KL Friend, OL McKenzie, H Archer, J Evans, A Clarke, GJ Pelka, PP Tam, C Watson, H Lahooti, CJ Ellaway, B Bennetts, H Leonard, and J Gecz. Mutations of cdkl5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasm and mental retardation. *The American Journal of Human Genetics*, 75(6):1079–93, 2004.
- [49] M Yakoub, O Dulac, I Jambaque, C Chiron, and P Plouin. Early diagnosis of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Brain and Development*, 14(5):299–303, 1992.

Anhang A

Ergänzende Tabellen

A.1 SSCP-Gele: Übersicht der Bedingungen

Gel 1	8% PAA	0,5xTBE	40 W	960 min	groß
Gel 2	8% PAA/0,5TBE	1xTBE	250 V	720 min	mittel
Gel 3	10/6% PAA	1xTBE	40 W	960min	groß
Gel 4	10/6% PAA	0,5xTBE	150 V	800 min	mittel
Gel 5	10/6% PAA	1xTBE	200 V	840 min	mittel
Gel 6	10/6% PAA	1xTBE	200 V	840 min	mittel
Gel 7	10/6% PAA	0,5xTBE	200 V	720 min	mittel
Gel 8	10/6% PAA	1xTBE	250 V	840 min	mittel
Gel 9	8% PAA 0,5TBE	1xTBE	200 V	720 min	mittel
Gel 10	8% PAA 0,5TBE	1xTBE	200 V	720 min	mittel
Gel 11	8% PAA	1xTBE	200 V	720 min	mittel
Gel 12	10/6% PAA	0,5xTBE	200 V	720 min	mittel
Gel 13	10/6% PAA	0,5xTBE	200 V	940 min	mittel
Gel 14	10/6% PAA	0,5xTBE	200 V	940 min	mittel

A.2 Primerbestimmung PCDH19

Ex	Primer Nr.		Sequenz	Anne- aling	Length
1	a	f	GACGGCGTCGGTCTCGGA	60°C	495
1	a	r	TGCCAGGGCTGGCTGCCT	60°C	
1	b	f	GTCCAGCTCAATGGAAATCTGCG	59.02°C	317
1	b	r	CTAGCGCAGTGATTCGGAAGCTG	60.81°C	
1	c	f	AGCTCACGCCCAACGAGCTG	60.37°C	465
1	c	r	CCAAGTCCTTAGCCTGCACGTC	60.67°C	
1	d	f	AGGGCACCAACGGCCAGGT	60.19°C	525
1	d	r	GCACGGTAAAGGACTTGGCACTC	60.81°C	
1	e	f	TGGACGGACGGCTGGACC	60°C	533
1	e	r	GCCTATGCCAGAGTTGCGGG	60.37°C	
1	f	f	GCTACGGTGCGGGTCATCATC	60.53°C	317
1	f	r	AGAGATGTCTTGCCGTGGTCGTG	60.81°C	
1	g	f	CATGACCGAGGGCGACCG	60°C	491
1	g	r	GATCAACTTGGACTGTCACAAAC	55.46°C	
2		f	GGTACACCTGAATGGAGAAGGAT	57.24°C	296
2		r	GCCCTAGCCCGTTCCCTTT	60.37°C	
3		f	ATCAGTGCATGATTTGGGAGG	54.67°C	436
3		r	CTAAAGAAGGAGACCTGGGAGAAC	59.22°C	
4		f	GGGCAGTTCGAAATCTACTTATG	55.46°C	250
4		r	CAAATAGTAGGTTGGACATTCATT	52.39°C	
5		f	CCGACATCATCCTGGCTCAGAAA	59.02°C	342
5		r	CACTCATTAAGCAAAGTAGTATAGTG	54.84°C	
6	a	f	ATCTAAGAAACCAGAACACTGGG	55.46°C	500
6	a	r	GGAGCCAGGGCAATGGTGTA	58.32°C	
6	b	f	GCAGGCAATGGCTGTGAGG	58.04°C	466
6	b	r	CCCTGCTGCCTGTTGAAA	53.16°C	
6	c	f	CAATGGTTGGTTCTTGAGTGGCT	57.24°C	466
6	c	r	CCACAGCAAAGTAGCGGCATTGG	60.81°C	
6	d	f	TTAATGGTCATTTATTGTGTACTATTC	52.13°C	474
6	d	r	GTATTTCTGACAACCTGCAAATTAGA	52.84°C	

A.3 Übersicht der PCDH19-Mutationen

Übersicht der bisher veröffentlichten Mutationen im PCDH19-Gen nach van Harssel et al. (2013)

Mutation	Protein leve	Mutationtype	Exon	Inheritance	Reference
c.74T>C	p.Leu25Pro	Missense	1	Maternal	Dibbens et al. (2011)
c.78delG	p.Lys26 AsnfsX4	Frameshift	1	De novo	Jamal et al. (2010)
c.83C>A	p.Ser28X	Nonsense	1	De novo De novo	Marini et al. (2010), Marini et al. (2012) Marini et al. (2012)
c.91G>A	p.Glu31Lys	Missense	1	De novo	van Harssel et al. (2013)
c.142G>T	p.Glu48X	Nonsense	1	Paternal	Depienne et al. (2009)
c.152dupT	p.Ala52 ArgfsX37	Frameshift	1	De novo	Marini et al. (2012)
c.215T>G	p.Val72Gly	Missense	1	Unknown	Higurashi et al. (2012)
c.241dupC	p.Leu81 ProfsX8	Frameshift	1	De novo	Depienne et al. (2012)
c.242T>G	p.Leu81Arg	Missense	1	Unknown De novo	Depienne et al. (2011) Marini et al. (2012)
c.253C>T	p.Gln85X	Nonsense	1	Familial	Scheffer et al. (2008), Dibbens et al. (2008)
				Familial	Depienne et al. (2012)
c.289_303del p.Pro97_Ile101del		Deletion	1	Unknown	This study
c.352G>T	p.Glu118X	Nonsense	1	De novo De novo	Depienne et al. (2009) Depienne et al. (2012)

A. ERGÄNZENDE TABELLEN

Mutation	Protein leve	Mutationtype	Exon	Inheritance	Reference
c.357delC	p.Ile119fsX122	Frameshift	1	Familial	Dibbens et al. (2008)
c.361G>A	p.Asp121Asn	Missense	1	Paternal	Depienne et al. (2009)
c.379C>G	p.Pro127Ala	Missense	1	Familial	This study
c.415_423dup	p.Ser139_Ala141dup	In frame dup	1	Maternal	Depienne et al. (2011)
c.416C>A	p.Ser139X	Nonsense	1	De novo	van Harssel et al. (2013)
c.424delG	p.Ala142ProfsX70	Frameshift	1	Unknown	Depienne et al. (2011)
c.437C>G	p.Thr146Arg	Missense	1	Paternal	Depienne et al. (2011)
c.457G>A	p.Ala153Thr	Missense	1	Paternal	Depienne et al. (2012)
c.462C>A	p.Tyr154X	Nonsense	1	Unknown	Depienne et al. (2011)
c.506delC	p.Thr169SerfsX43	Frameshift	1	De novo	Depienne et al. (2009)
c.514dupG	p.Glu172GlyfsX54	Frameshift	1	Unknown	Depienne et al. (2011)
c.569T>G	p.Leu190Arg	Missense	1	Unknown	Depienne et al. (2012)
c.571G>C	p.Val191Leu	Missense	1	Unknown	Higurashi et al. (2012)
c.595G>C	p.Glu199Gln	Missense	1	Unknown	Depienne et al. (2009)
c.[608A>C.617T>]	p.His203Pro, p.Phe206Cys	Missense	1	De novo	Marini et al. (2010), Marini et al. (2012)
c.617T>A	p.Phe206Tyr	Missense	1	Unknown	Depienne et al. (2011)
c.695A>G	p.Asn232Ser	Missense	1	Unknown De novo Unknown	Depienne et al. (2012) Marini et al. (2012) This study
c.697_700delinsTAAC	p.Asp233X	Frameshift	1	Paternal	Depienne et al. (2011)
c.701A>G	p.Asn234Ser	Missense	1	De novo	Depienne et al. (2012)

A.3 Übersicht der PCDH19-Mutationen

Mutation	Protein leve	Mutationtype	Exon	Inheritance	Reference
c.706C>T	p.Pro236Ser	Missense	1	De novo	Specchio et al. (2011), Marini et al. (2012)
c.718G>T	p.Glu240X	Nonsense	1	De novo	van Harssel et al. (2013)
c.729C>A	p.Tyr243X	Nonsense	1	De novo	Jamal et al. (2010)
c.730dupG	p.Ala244 GlyfsX76	Frameshift	1	De novo	Depienne et al. (2012)
c.746A>G	p.Glu249Gly	Missense	1	De novo	Camacho et al. (2012)
c.747A>T	p.Glu249Asp	Missense	1	Maternal	Depienne et al. (2011)
c.772_773de- lAT	p.Ile258 ProfsX61	Frameshift	1	Unknown	Higurashi et al. (2012)
c.785C>A	p.Ala262Asp	Missense	1	Unknown	Depienne et al. (2012)
c.790G>C	p.Asp264His	Missense	1	De novo	Marini et al. (2012)
c.819_833delins	p.Val274 AsnfsX41	Frameshift	1	De novo	This study
c.823T>A	p.Tyr275Asn	Missense	1	Maternal	van Harssel et al. (2013)
c.824A>C	p.Tyr275Ser	Missense	1	Maternal	van Harssel et al. (2013)
c.826T>C	p.Ser276Pro	Missense	1	De novo	Hynes et al. (2010)
c.840C>G	p.Tyr280X	Missense	1	De novo	Higurashi et al. (2012)
c.859G>T	p.Glu287X	Nonsense	1	Paternal	Depienne et al. (2009)
				De novo	Depienne et al. (2009)
c.949C>T	p.Gln317X	Nonsense	1	Unknown	Higurashi et al. (2012)
c.956_959del	p.Lys319 ThrfsX48	Frameshift	1	De novo	This study
c.958dupG	p.Asp320 GlyfsX22	Frameshift	1	De novo	Specchio et al. (2011), Marini et al. (2012)

A. ERGÄNZENDE TABELLEN

Mutation	Protein leve	Mutationtype	Exon	Inheritance	Reference
c.1019A >G	p.Asn340Ser	Missense	1	Unknown	van Harssel et al. (2013)
				De novo	Depienne et al. (2009)
				De novo	Depienne et al. (2009)
				Maternal	Marini et al. (2010), Marini et al. (2012)
				De novo	Marini et al. (2010), Marini et al. (2012)
				Maternal	Dibbens et al. (2011)
				De novo	Specchio et al. (2011)
				De novo	Higurashi et al. (2012)
				De novo	Depienne et al. (2012)
				De novo	Depienne et al. (2012)
				Unknown	Depienne et al. (2012)
				Unknown	Kwong et al. (2012)
				Maternal	Marini et al. (2012)
				De novo	Marini et al. (2012)
De novo	Marini et al. (2012)				
Maternal	Terracciano et al. (2012)				
Unknown	This study				
c.1022A >G	p.Asp341Gly	Missense	1	De novo	van Harssel et al. (2013)
c.1023C >G	p. Asp341Glu	Missense	1	De novo	Depienne et al. (2011)
c.1026_ 1027del- insAA	p.Asn342_ Pro343delins LysThr	Frameshift	1	Unknown	Depienne et al. (2012)

A.3 Übersicht der PCDH19-Mutationen

Mutation	Protein leve	Mutationtype	Exon	Inheritance	Reference
c.1031C >G	p.Pro344Arg	Missense	1	Unknown	Depienne et al. (2012)
c.1031C >T	p.Pro344Leu	Missense	1	De novo	van Harssel et al. (2013)
c.1036_1040dup	p.Asn347 LysfsX23	Frameshift	1	Familial	Depienne et al. (2009)
c.1091 dupC	p.Tyr366 LeufsX10	Frameshift	1	De novo Familial Paternal De novo De novo De novo De novo	van Harssel et al. (2013) Dibbens et al. (2008) Higurashi et al. (2012) Depienne et al. (2012) Marini et al. (2012) Marini et al. (2012) Marini et al. (2012)
c.1091 delC	p.Pro364fs	Frameshift	1	De novo	van Harssel et al. (2013)
c.1123G >T	p.Asp375Tyr	Missense	1	De novo	van Harssel et al. (2013)
c.1129G >A	p.Asp377Asn	Missense	1	De novo	Kwong et al. (2012)
c.1129G >C	p.Asp377His	Missense	1	De novo	Marini et al. (2010), Marini et al. (2012)
c.1130A >G	p.Asp377Gly	Missense	1	De novo	This study
c.1131C >A	p.Asp377Glu	Missense	1	De novo	Depienne et al. (2012)
c.1143 dupT	p.Gly382 TrpfsX19	Frameshift	1	Unknown	Depienne et al. (2012)
c.1183C >T	p.Arg395X	Nonsense	1	De novo	Marini et al. (2012)
c.1192G >T	p.Glu398X	Nonsense	1	Paternal	Marini et al. (2010)
c.1211C >T	p.Thr404Ile	Missense	1	De novo	Marini et al. (2010), Marini et al. (2012)

A. ERGÄNZENDE TABELLEN

Mutation	Protein leve	Mutationtype	Exon	Inheritance	Reference
c.1240G >C	p.Glu414Gln	Missense	1	Paternal	Marini et al. (2010)
c.1298T >C	p.Leu433Pro	Missense	1	De novo	Specchio et al. (2011), Marini et al. (2012)
c.1300_ 1301del- CA	p.Gln434 GlufsXII	Frameshift	1	De novo	Specchio et al. (2011), Marini et al. (2012)
c.1322T >A	p.Val441Glu	Missense	1	Familial	Scheffer et al. (2008), Dibbens et al. (2008)
c.1441_ 1442del- insCT	p.Asp481Leu	Missense	1	Unknown	This study
c.1464_ 1466del	p.Ser489del	Frameshift	1	De novo	Marini et al. (2012)
c.1521 dupC	p.Ile508 Hisfs15	Frameshift	1	De novo	Marini et al. (2010), Marini et al. (2012)
c.1537G >C	p.Gly513Arg	Missense	1	De novo	Specchio et al. (2011), Marini et al. (2012)
c.1628T >C	p.Leu543Pro	Missense	1	Paternal	Depienne et al. (2009)
c.1671C >G	p.Asn557Lys	Missense	1	Familial	Dibbens et al. (2008), Hynes et al. (2010)
c.1682C >G	p.Pro561Arg	Missense	1	Paternal	Depienne et al. (2011)
c.1700C >T	p.Pro567Leu	Missense	1	Maternal De novo	Depienne et al. (2011) Marini et al. (2012)
c.1780G >C	p.Asp594His	Missense	1	De novo	van Harssel et al. (2013)
c.1786G >C	p.Asp596His	Missense	1	Paternal	Marini et al. (2012)
c.1802G >A	p.Gly601Asp	Missense	1	Unknown	van Harssel et al. (2013)
c.1804C >T	p.Arg602X	Nonsense	1	De novo	Depienne et al. (2012)

A.3 Übersicht der PCDH19-Mutationen

Mutation	Protein leve	Mutationtype	Exon	Inheritance	Reference
				De novo	Marini et al. (2012)
c.1841 delT	p.Phe614 SerfsX4	Framshift	1	Familial	This study
c.1852G >A	p.Asp618Asn	Missense	1	Maternal	Depienne et al. (2011)
c.1863 dupT	p.Gly662fs	Frameshift	1	De novo	van Harssel et al. (2013)
c.1924G >A	p.Val642Met	Missense	1	Unknown	Depienne et al. (2012)
c.1955T >C	p.Leu652Pro	Missense	1	Paternal	Camacho et al. (2012)
c.1956_1959del CTCT	p.Ser653 ProfsX6	Frameshift	1	Unknown	Depienne et al. (2012)
c.2012C >G	p.Ser671X	Nonsense	1	Familial	Scheffer et al. (2008), Dibbens et al. (2008)
c.2019 delC	p.Ser67 4LeufsX2	Frameshift	1	De novo	Depienne et al. (2011)
c.2030_2031insT	p.Leu677 fsX717	Frameshift	1	Familial	Scheffer et al. (2008), Dibbens et al. (2008)
c.2341 dupA	p.Ile781 AsnfsX3	Frameshift	4	De novo	Marini et al. (2012)
c.2617-1G>A	p.?	Splicing	4	De novo	Marini et al. (2010)
c.2631_2634del TTTT	?	Frameshift	4	De novo	Jamal et al. (2010)
c.2656C >T	p.Arg886X	Nonsense	4	Unknown Familial Unknown	van Harssel et al. (2013) Depienne et al. (2011) Depienne et al. (2012)
c.2675, 1G>C	p.	Splicing Intron	4	Unknown	Depienne et al. (2012)
c.2675-6A>G	p.?	Splicing intron	4	De novo	Marini et al. (2010)

A. ERGÄNZENDE TABELLEN

Mutation	Protein leve	Mutationtype	Exon	Inheritance	Reference
c.2697 dupA	p. Glu900 Argfs8	Frameshift	5	De novo	Marini et al. (2010), Marini et al. (2012)
c.2705 dupA	p.Asp902 Lysfs6	Frameshift	5	Maternal	Dimova et al. (2012)
c.2903 dupA	p.Asp968 Glufs18	Frameshift	6	De novo	Marini et al. (2010)
c.3041_ 3056dup	p.Pro1020X	Nonsense	6	Unknown	This study
Deletions of exon 1 to 3		Deletion		De novo	Depienne et al. (2011)
Whole gene deletion		Deletion		Unknown	Depienne et al. (2011)
				De novo	Depienne et al. (2011)
				De novo	Vincent et al. (2011)
				Unknown	Vincent et al. (2011)

Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Hiermit möchte ich allen zutiefste Dankbarkeit aussprechen, die an der Entstehung meiner Doktorarbeit beteiligt waren und teilgenommen haben.

Besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. med. Neubauer für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung.

Außerdem möchte ich seiner Mitarbeiterin, Stefanie Garkisch, für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor danken.

Zudem danke ich den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Augenheilkunde der Uniklinik Gießen von Prof. Dr. med. Lorenz, besonders Dr. rer. medic. med. habil. Markus Preising, für die Hilfe bei der Erstellung der SSCP- Gele.

Dann möchte ich mich bei den Patienten, deren Familien und den betreuenden Ärzten bedanken, die mir bereitwillig die Informationen für meine Doktorarbeit haben zukommen lassen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und mir emotional eine sehr große Stütze waren. Dabei möchte ich vor allem meiner Freundin für ihre wertvollen Tipps aufgrund ihres naturwissenschaftlichen Wissens und meinem Bruder danken. Besonderen Dank möchte ich hiermit meinen Eltern aussprechen, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und immer an mich glauben.

Herzlichen Dank.