

Universitätsklinik Ulm
Klinik für Neurologie
Prof. Dr. med. A. C. Ludolph

Genetische Kopplungsanalysen bei:

Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus und
Benigne Familiäre Infantile Konvulsionen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Vorgelegt von Skevos Karafyllakis
aus Athen

2007

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Holger Lerche
2. Berichterstatter	Prof. Dr. Dr. h. c. Frank Lehmann-Horn
Tag der Promotion:	19.06.2008

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADNFLE	Autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie
APS	Ammoniumpersulfat
BFIC	Benigne familiäre infantile Konvulsionen
BFNC	Benigne familiäre neonatale Anfälle
BFNIC	Benigne familiäre neonatal/infantile Konvulsionen
bp	Basenpaare
CAE	Kindliche Absence-Epilepsie
CBZ	Carbamazepin
CCT	Computertomographie des Schädels
cM	centiMorgan
CPS	Komplex fokaler Anfall
dNTP	Desoxynukleotide
ddNTP	Didesoxynukleotide
DNA	Desoxyribonucleic acid
EEG	Elektroenzephalogramm
FHM	Familiäre hemiplegische Migräne
FS	Fieberhaft Anfälle
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GEFS ⁺	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus
GTCS	Generalisierte tonisch-klonische Anfälle
h	Stunde
ILAE	International League against Epilepsy
JME	Juvenile myoklonische Epilepsie
LOD	Logarithm of odds
MAE	Myoklonisch-astatische Epilepsie
mA	Mili-Amper
min	Minute
MRI	Magnetresonanztomographie
PBT	Phenobarbital
PCR	Polymerasekettenreaktion

PHT	Phenytoin
rpm	rounds per minute
sec	Sekunde
SMEI	Schwere frühkindliche myoklonische Epilepsie
STM	Sultiam
TEMED	Tetramethyldiamin
U	Unit
VPA	Valproinsäure
W	Watt
⊕	Rekombinatiohäufigkeit

INHALTSVERZEICHNISS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNISS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Epilepsie	1
1.1.1 Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS+).....	3
1.1.2 Benigne familiäre infantile Konvulsionen (BFIC).....	5
1.2 Zielsetzung.....	6
2 PATIENTEN, METHODEN UND MATERIAL	8
2.1 Patienten	8
2.1.1 BFIC-Familien.....	8
2.1.1.1 Patienten (BFIC).....	8
2.1.1.2 Klinische Daten zu BFIC Familien.....	10
2.1.2 GEFS+-Familien.....	13
2.1.2.1 Patienten (GEFS ⁺).....	13
2.1.2.2 Klinische Daten zu GEFS ⁺ Familien.....	14
2.2 Methoden	17
2.2.1 Extraktion und Konzentrationsbestimmung der DNA.....	17
2.2.1.1 Extraktion von DNA aus Leukozyten.....	17
2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA.....	18
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	19
2.2.2.1 Einführung zur PCR.....	19
2.2.2.2 Die Komponenten der PCR.....	20
2.2.2.3 Durchführung der PCR.....	21
2.2.3 Gellelektrophorese.....	22
2.2.3.1 Agarosegel.....	22
2.2.3.2 Polyacrylamidgel.....	23
2.2.4 Kopplungsanalyse.....	25
2.2.4.1 Übersicht zur Kopplungsanalyse.....	26
2.2.4.2 Durchführung einer Kopplungsanalyse.....	28
2.2.4.3 Marker.....	29
2.3 Material	30
2.3.1 Geräte.....	30
2.3.2 Chemikalien, Enzyme, Lösungen.....	30

3 ERGEBNISSE	33
3.1 Einführung.....	33
3.2 Molekulargenetische Ergebnisse (GEFS ⁺).....	33
3.3 Molekulargenetische Ergebnisse (BFIC).....	36
4 DISKUSSION	40
4.1 Kopplungsanalysen für BFIC.....	40
4.2 Kopplungsanalysen für GEFS+.....	43
4.3 Ausblick.....	44
5 ZUSAMMENFASSUNG	46
6 LITERATURVERZEICHNISS	47
7 ANHANG	57
Lebenslauf.....	57
Danksagung.....	59

1. Einleitung

1.1 Epilepsie

Epilepsie ist definiert durch wiederholtes Auftreten von epileptischen Anfällen. Der epileptische Anfall ist das klinische Bild einer plötzlichen, zeitlich begrenzten, abnormen und exzessiven Entladung von neuronalen Zellverbänden. Da jedes Hirnareal betroffen sein kann, ist die klinische Manifestation der Epilepsie vielfältig. Diese umfasst Vegetativum, Motorik, Empfindung, Bewusstsein und Psyche.

Nach der International League against Epilepsy (ILAE) können epileptische Anfälle anhand zwei verschiedener Gesichtspunkte klassifiziert werden. Aus ätiologischer Sicht sind symptomatische Epilepsien durch morphologische Veränderungen des Hirngewebes gekennzeichnet. Idiopathische Epilepsien dagegen haben keine erkennbare Ursache, sie machen 25 – 50 % aller Epilepsien aus (Shinnar et al. 1999, Zarelli et al. 1999, Freitag et al. 2001). Idiopathische epileptische Syndrome sind charakterisiert durch bestimmte Veränderungen des Elektroenzephalogramms und typische Anfälle, wie Absence-Anfälle oder myoklonische Anfälle. Die Mehrheit der Patienten weist eine unauffällige Magnetresonanztomographie auf, ohne Hinweis auf strukturelle Hirnveränderungen. Einen deutlichen genetischen Hintergrund haben idiopathische Epilepsien, einige dieser weisen einen monogenen Vererbungsmodus auf (Annegers et al. 1996, Gourfinkel-An et al. 2004). Eine monogene Ätiologie liegt bei 1 – 2 % der idiopathischen Epilepsien vor (Robinson und Gardiner, 2000).

Anhand der Symptomatik kann zwischen generalisierten und fokalen Anfällen unterschieden werden. Bei letzteren kommt die epileptische Aktivität aus einer spezifischen Hirnregion und wird unterteilt in einfach- und komplex-fokale Anfällen, abhängig davon, ob das Bewusstsein mitbeeinträchtigt ist oder nicht. Bei primär generalisierten Anfällen differenziert man Absencen, myoklonische, tonische, klonische und tonisch-klonische Anfälle (Commission on Classification and Terminology of the international League Against Epilepsy, 1989).

Die Epilepsie hat eine weltweite Prävalenz von 0,5 – 1 % und ist somit die häufigste chronische neurologische Erkrankung (Sridharan, 2002). In Deutschland sind demnach 400.000 – 800.000 Menschen von Epilepsie betroffen. Die jährlichen Neuerkrankungen werden um 30.000 geschätzt (Matthes und Schneble, 1991). Die kumulative Inzidenz beträgt bis zum 25. Lebensjahr 1,1% und bis zum 40. Lebensjahr 1,7% (Hauser und Kurland, 1975). Die kumulative Lebenszeit-Inzidenz, ausgehend von der durchschnittlichen Lebensdauer, beträgt 3 % (Hauser et al. 1996).

Epilepsien zeichnen sich durch eine ausgeprägte ätiologische Heterogenität aus. Zur Ätiologie der als symptomatisch klassifizierten Epilepsie gehören zerebrale Infektionen, zerebrovaskuläre Erkrankungen, zerebrale Tumore, Fieberkrämpfe und perinatale zerebrale Schädigungen. Innerhalb der letzten 10 Jahre wurden die ersten Gene identifiziert, die seltene monogene idiopathische Epilepsien verursachen, wie die autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie (ADNFLE) und benigne familiäre neonatale Anfälle (BFNC). Vor kurzem wurden auch erstmals Mutationen für kindliche Absence-Epilepsie (CAE), juvenile Absence-Epilepsie (JAE), juvenile myoklonische Epilepsie (JME) und Aufwach-Grand-Mal Epilepsie identifiziert. Die Mehrzahl dieser Mutationen betreffen Ionenkanäle (Lerche et al. 2005).

Beispielweise wurde für BFNC eine positive Kopplung zu Chromosom 20 (Leppert et al. 1989) und Chromosom 8 (Lewis et al. 1993) gefunden. Später wurden Mutationen in den Genen KCNQ2 und KCNQ3, die für spannungsabhängige Kaliumkanäle kodieren, als ursächlich für diese Erkrankung identifiziert (Biervert et al. 1998, Singh et al. 1998, Charlier et al. 1998). BFNC ist ein epileptisches Syndrom mit einem dominanten Vererbungsmodus und einer Penetranz von 85% (Ronen et al. 1993, Plouin et al. 1994). Die Anfälle manifestieren sich in den ersten Lebenswochen, treten jedoch nach den ersten Lebensmonaten nicht mehr auf. Die betroffenen Kinder sind bezüglich der neurologischen Untersuchung, dem interiktalen EEG und der späteren Entwicklung unauffällig. Die Prognose ist damit benigne. Bei 15 % der Betroffenen kommt es im spätem Leben erneut zu Anfällen.

Zu den monogenen idiopathischen Epilepsien gehören auch die generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS⁺) und benigne familiäre infantile Konvulsionen (BFIC).

1.1.1 Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS⁺)

Fieberkrämpfe treten üblicherweise nach dem dritten Lebensmonat im Rahmen einer fieberhaften extrazerebralen Erkrankung auf. Bei reinen Fieberkrämpfen sollten keine afebrilen Anfälle in der Anamnese und kein Hinweis auf eine bestimmte Ätiologie vorliegen. Scheffer und Berkovic definierten FS⁺ als ein Syndrom, das durch persistierende febrile Anfälle nach dem sechsten Lebensjahr oder zusätzlich durch generalisierte tonisch-klonische Anfälle gekennzeichnet ist.

Fieberkrämpfe treten mit einer Häufigkeit von 2 - 5 % in Europa und den USA auf (Ross et al. 1980, Verity et al. 1985, Offringa et al. 1991). Höhere kumulative Inzidenzen mit 9% liegen für Japan vor (Tsuboi, 1994). Das Epilepsierisiko bei Kindern nach FS liegt bei einem zweijährigen Follow-up bei 6% (Berg und Shinnar, 1996). Bei komplizierten FS, steigt die Wahrscheinlichkeit des Epilepsierisikos bei Kindern auf bis zu 49% (Annegers et al. 1987).

Berkovic und Scheffer beschrieben GEFS⁺ erstmals 1997 als ein Syndrom mit einem autosomal-dominanten Vererbungsmodus, das durch das Auftreten fieberhafter Anfälle und verschiedener Typen nicht-fieberhafter Anfälle innerhalb einer Familie definiert wurde. Am häufigsten treten fieberhafte Anfälle (FS) auf, einige persistieren nach dem sechsten Lebensjahr. Zwei Drittel der Individuen zeigen den Phänotyp FS und FS⁺, während bei den restlichen Patienten mit FS⁺ zusätzlich Absence-Anfälle, myoklonische Anfälle oder atonische Anfälle beschrieben werden. Der schwerwiegendste Phänotyp ist die myoklonisch-astatische Epilepsie (MAE). Die Penetranz beträgt 60 %. Mittlerweile wurden mehrere Mutationen bei GEFS⁺ Familien nachgewiesen. Eine genetische Heterogenität besteht bei GEFS⁺ überwiegend bei Patienten mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft (Mrabet et al.

2007), dieses wurde zuletzt bei Kopplungsanalysen aus einem skandinavischen Patientenkollektiv bestätigt (Selmer et al. 2007). Diese betreffen Untereinheiten spannungsabhängiger Natriumkanäle. Auf Chromosom 19q13 wurde eine Mutation im Gen SCN1B der β_1 -

Untereinheit entdeckt (Wallace et al. 1998, Audenaert et al. 2003). Weitere Mutationen wurden im Gen SCN1A auf Chromosom 2q21-33 identifiziert, das für die α -Untereinheit des Natriumkanals kodiert (Baulac et al. 1999, Escayg et al. 2000, Wallace et al. 2001). In Abbildung 1 werden bekannte Mutationen für GEFS⁺ dargestellt. Weitere Mutationen betreffen die γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Wallace et al. 2001, Baulac et al. 2001, Harkin et al. 2002).

Der spannungsabhängige Natriumkanal besteht aus einer α - und zwei β -Untereinheiten. Die α -Untereinheit trägt hauptsächlich zur Struktur und Funktion des Kanals bei, während die β -Untereinheiten modulierende Eigenschaften besitzen.

Bei der Punktmutation C121W kommt es zu einem einzelnen Austausch der Aminosäure Cystein zu Tryptophan in der β_1 -Untereinheit. Es kommt zur Auflösung einer Disulfid-Brücke und dadurch zur Änderung der sekundären Struktur der extrazellulären Schleife der β_1 -Untereinheit des Natriumkanals. Die Veränderung dieser Sekundärstruktur führt zu einem Funktionsverlust der β_1 -Untereinheit und damit zu veränderten Na⁺-Strömen (Lerche et al. 2005). An der Untereinheit SCN1A wurden bereits mehrere Mutationen beschrieben. Die Mutationen T875M und R1648H betreffen z.B. das vierte Segment mit den Spannungssensoren der Domäne 2 und 4 des Natriumkanals (Escayg et al. 2000). Viele weitere Mutationen im SCN1A-Gen führen zu einer Abnahme der Aktivität der Natriumkanäle und verursachen den schweren Phänotyp SMEI. Der Funktionsverlust betrifft überwiegend inhibitorische Neuronen, die dann vermindert erregbar sind (Lerche et al. 2005). Am GABA_A-Rezeptor wurde die Mutation R43Q am N-Terminal des extrazellulären Loops der benzodiazepinbindenden Domäne und die Mutation K289M am Loop zwischen Segment M2 und M3 beschrieben (Wallace et al. 2001, Baulac et al. 2001). Beide Mutationen führen zu einer Störung des GABA_A-Rezeptors mit Abnahme seiner Funktion. Mutationen können so zu einer reduzierten Hemmung eines neuronalen Zellverbandes führen.

1.1.2 Benigne familiäre infantile Konvulsionen (BFIC)

BFIC ist charakterisiert durch epileptische Anfälle, die zwischen dem dritten und zwölften Lebensmonat beginnen und nicht fieberhaft sind. Diese epileptischen Anfälle wurden aufgrund klinischer und elektroenzephalographischer Merkmale als partial klassifiziert. Zwischen den Anfällen zeigte das Elektroenzephalogramm meist keine Auffälligkeiten. Die psychische Entwicklung der Kinder wird durch BFIC nicht beeinflusst. Die Prognose ist günstig. Die ersten Patienten, bei denen BFIC beschrieben wurde, waren japanischer Abstammung.

BFIC besitzt einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus (Vigevano et al. 1992). Guipponi et al. gelang 1996 die erste genetische Kartierung auf Chromosom 19q12-q13.11. Weitere Kopplungsanalysen lokalisierten BFIC auf Chromosom 16p12-q12 (Szepetowski et al. 1997, Caraballo et al. 2001, Callenbach et al. 2005), auf Chromosom 16p12-q12 (Valente et al. 2000) und auf Chromosom 2q23-31 (Malacarne et al. 2001). Das am Krankheitsgeschehen beteiligte Gen wurde bei BFIC noch nicht identifiziert. Kopplungsanalysen an chinesischen Familien mit BFIC ergaben keinen Zusammenhang mit den oben aufgeführten Loci, dies ist ein Anzeichen für eine genetische Heterogenität (Xiong et al. 2004). Allerdings ist zu beachten, dass Scheffer und Mitarbeiter bei zwei Familien Anfälle beschrieben, die in den ersten Lebenswochen, zwischen dem für BFNC und BFIC typischen Manifestationsalter, auftraten. Diese Anfälle wurden als benigne familiäre neonatal/infantile Konvulsionen (BFNIC) bezeichnet. Bei diesen zwei Familien und später bei weiteren wurden Mutationen im Gen SCN2A identifiziert, das für die α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals kodiert (Heron et al. 2002). Im KCNQ2 Gen wurde die Mutation G812T identifiziert (Zhou et al. 2006). In manchen Familien kann BFIC in Kombination mit FHM (familiäre hemiplegische Migräne) auftreten. FHM unterliegt einem autosomal-dominanten Vererbungsmodus (Terwindt et al. 1997). In zwei Familien, in denen FHM und BFIC eine Co-Segregation zeigten,

wurden zwei Mutationen im Gen ATP1A2 identifiziert. Dieses Gen kodiert für die alpha2-Untereinheit der Na/K-ATPase (Vanmolkot et al. 2003).

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die genetische Kartierung von Familien mit den Syndromen BFIC und GEFS⁺ bei den Kollektiven, die uns zur Verfügung standen. Diese sollte eine spätere Identifizierung am Krankheitsgeschehen beteiligter Gene ermöglichen.

Bei verschiedenen Familien, in denen GEFS⁺ auftrat, wurde in der Vergangenheit eine Kopplung zu den Chromosomen 2, 5 und 19 festgestellt. Es wurden Mutationen in Untereinheiten des GABA_a-Rezeptors und des spannungsabhängigen Natriumkanals identifiziert. BFIC wurde zu Chromosom 2, 16 und 19 gelinkt. Eine Mutation, die ausschließlich in Zusammenhang mit BFIC steht, wurde noch nicht entdeckt. Allerdings wurde für BFIC eine Mutation des Gens SCN2A, das die α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals auf Chromosom 2 kodiert, identifiziert.

Bei GEFS⁺ wird der Krankheitsphänotyp auf Kopplung zu Chromosom 19q13 untersucht, der das Gen SCN1B beinhaltet. Zusätzlich werden die chromosomalen Regionen 2q21-33 (SCN1A, SCN2A, SCN3A und SCN9A), 3p21-24 (SCN10A, SCN11A), 11q23 (SCN2B, SCN3B) und 12q13 (SCN8A) auf Kopplung getestet. Anschließend werden Loci für fieberhafte Konvulsionen untersucht, wie die chromosomalen Regionen 8q13-21 (FEB1), 19p13.3 (FEB2) und 5q14-15 (FEB4).

Bei BFIC wird der Krankheitsphänotyp bei Familien, die uns zu Verfügung stehen, auf Kopplung mit den für BFIC schon bekannten Loci 19q12-13.11, 2q23-31 und

16p12-q12 untersucht. Zusätzlich werden die für BFNC bekannten Loci 20q13.32-13.33 und 8q24.22 auf Kopplung getestet.

Für BFIC wurden 16 Familien mit insgesamt 200 Individuen untersucht. Aus Deutschland stammen acht Familien, sieben aus Japan und eine aus der Türkei. Für GEFS⁺ stand eine deutsche Familie bestehend aus fünf Generationen zur Verfügung.

Unsere Arbeit könnte langfristig zur Identifikation eines mutierten Gens beitragen, dass für die Entstehung von BFIC und GEFS⁺ verantwortlich ist. Dies würde unser

Verständnis für die Pathogenese dieser Syndrome und der Epilepsie erweitern. Gleichzeitig könnte dies zu einer zielsicheren Diagnostik und effektiveren Therapie führen.

2 Patienten, Methoden und Material

2.1 Patienten

2.1.1 BFIC-Familien

2.1.1.1 Patienten (BFIC)

Es konnten 16 Familien in die Studie eingeschlossen werden. Abbildung 1 zeigt die Stammbäume dieser Familien. Aus Deutschland stammen acht Familien, eine aus der Türkei und sieben aus Japan. Betroffen von BFIC waren 67 Individuen (39 Frauen und 28 Männer). Drei Patienten, die zusätzlich andere epileptische Syndrome hatten, wurden als nicht betroffen in die Kopplungsanalyse aufgenommen. Zu diesen gehören Patient II.2/BFIC8 und III.3/BFIC12. Beide wurden klassifiziert als Epilepsie mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen (GTCSs), die nach dem 5. Lebensjahr auftraten. Von diesen Patienten waren keine EEGs verfügbar. Patient III.1/BFIC12 hatte Fieberkrämpfe bis zum 4. Lebensjahr. Für alle 67 betroffenen Familienmitglieder war die neurologische Untersuchung unauffällig. Bei den meisten BFIC-Patienten wurden GTCSs mit oder ohne Anzeichen eines fokalen Anfalls beschrieben. CPSs traten vereinzelt auf. Zu den Symptomen, wie von Angehörigen beschrieben, gehörten Bewusstseinsverlust, Blässe, Zyanose, Hypotonie, fokale Krämpfe des Gesichts und der Extremitäten und generalisierte klonische Anfälle. Die Anfälle traten zwischen dem zweiten und siebten Lebensmonat auf und verschwanden nach dem 18. Lebensmonat. Migräne mit Aura trat bei Familie BFIC19 auf. Bei dieser Familie waren I.1, I.2, II.5 und II.6 betroffen, während Patient II.3 keine Aura hatte. Die Patienten berichteten bei dieser Aura von visuellen Symptomen und nicht von sensorischen oder motorischen wie es bei FHM der Fall war. Die Migräne bei Familie BFIC19 zeigte keine Co-Segregation mit BFIC, denn beide Eltern (I.1/I.2) waren nicht von Migräne betroffen. Die Mehrzahl der Patienten hatte keine zusätzlichen neurologischen Symptome.

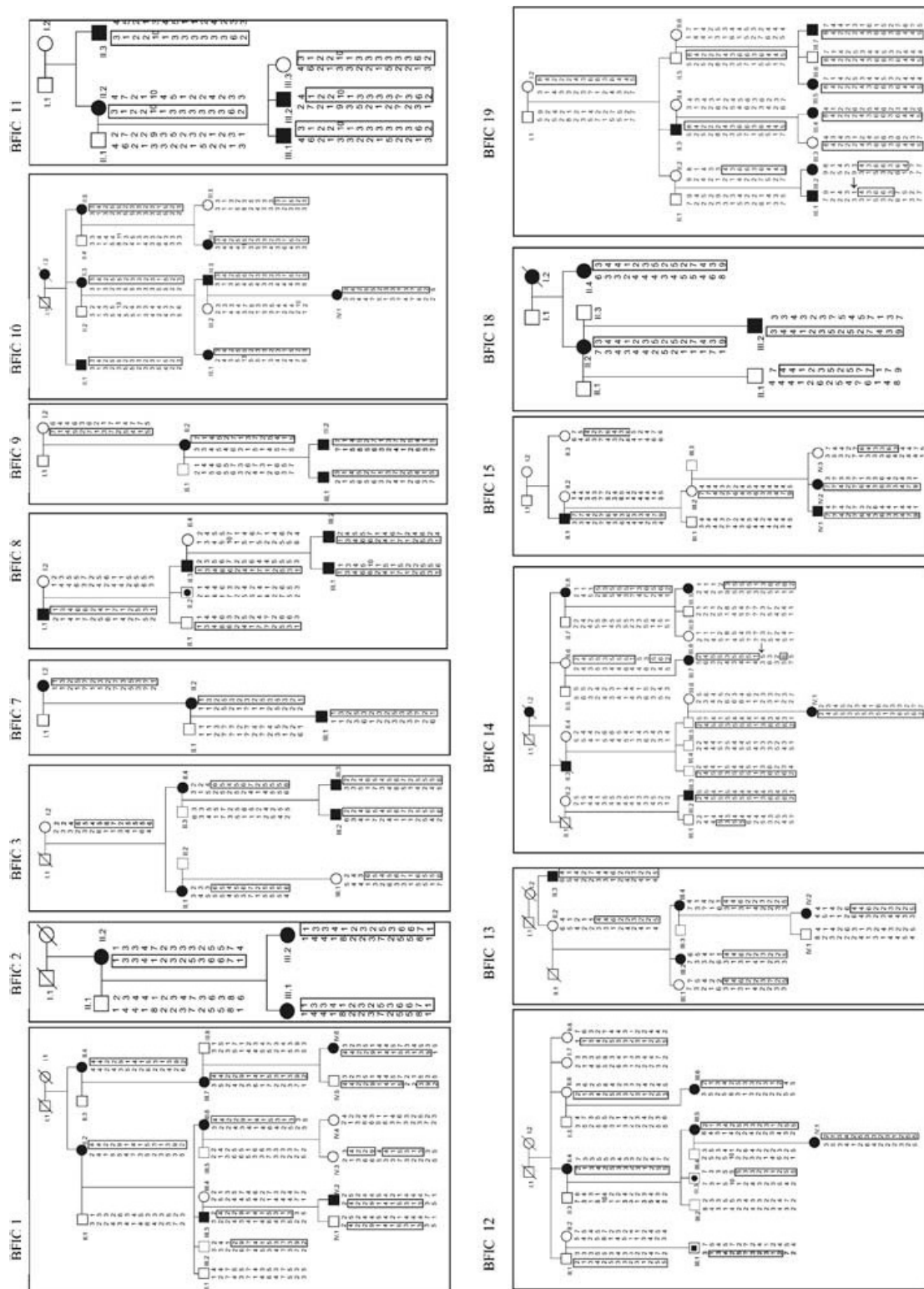


Abbildung 1: Stammbäume der BFIC-Familien. Dargestellt sind auch die Haplotypanalysen am Chromosom 16p12-q12. Marker für diese Kopplungsanalysen: D16S403, D16S3131, D16S769, D16S3093, D16S690, D16S753, D16S3044, D16S3080, D16S411, D16S3136, ATA55A11, D16S2623, D16S419, D16S3137

Alle Familienmitglieder gaben selbst, oder (bei minderjährigen Patienten) ihre Eltern, eine Einverständniserklärung für klinische und genetische Untersuchungen ab. Klinische und genetische Untersuchungen wurden von den Ethikkommissionen der Universität Ulm und Tokyo Women's Medical University überprüft und mit einem positivem Votum versehen. Daten über neurologischen Status, psychomotorische Entwicklung, Elektroenzephalogramme, cerebrale Bildgebung, Anfallshäufigkeit, Symptome, Anamnese und klinische Untersuchungen von Patienten und Angehörigen wurden von Kliniken, die in der Studie eingebunden waren, erfasst und dokumentiert. Zu diesen gehört die Klinik für Neurologie der Universität Ulm, die neuropädiatrische Abteilung der Universität Heidelberg, die pädiatrische Klinik der Universität Tokyo, Japan, die pädiatrische Klinik Wilhelmstift in Hamburg, die St. Johannes Klinik für Pädiatrie in Duisburg, die pädiatrische Klinik der Universität Münster, die neuropädiatrische Abteilung der Universität Giessen und die neuropädiatrische Abteilung der Universität Kiel. Die Epilepsien und Syndrome wurden klassifiziert anhand der *Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures 1981, Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes 1989)*.

2.1.1.2 Klinische Daten zur BFIC Familien

Ein Überblick der klinischen Daten der Familienmitglieder geben Tabelle 1a und 2a wieder. Diese Daten beziehen sich auf 200 Familienmitglieder aus 16 Familien, wobei 67 Individuen von BFIC betroffen sind (39 Frauen und 28 Männer). Drei Patienten, die zusätzlich andere epileptische Syndrome hatten, wurden als nicht betroffen in die Kopplungsanalyse aufgenommen. Zu diesen gehören Patient II.2/BFIC8 und III3/BFIC12. Beide wurden klassifiziert als Epilepsie mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen (GTCSs), die nach dem 5. Lebensjahr auftraten. Von diesen Patienten waren keine EEGs verfügbar. Patient III.1/BFIC12 hatte Fieberkrämpfe bis zum 4. Lebensjahr. Für alle 67 betroffenen Familienmitglieder war die neurologische Untersuchung unauffällig. Bei den meisten BFIC-Patienten wurden GTCSs mit oder ohne Anzeichen eines fokalen Anfalls beschrieben. CPSs traten vereinzelt auf. Zu den

Symptomen, wie von Angehörigen beschrieben, gehören Bewusstseinsverlust, Blässe, Zyanose, Hypotonie, fokale Krämpfe des Gesichts und der Extremitäten. Die Anfälle traten zwischen dem zweiten und siebten Lebensmonat auf und verschwanden nach dem 18. Lebensmonat. Tabelle 1a. und 1b. geben die klinischen Daten der von Epilepsie betroffenen Familienmitglieder wieder.

Tabelle 1a. Klinische Daten der BFIC Familienmitglieder

Tabelle 1a und 1b. : Hier werden die klinischen Daten bezüglich der an Epilepsie erkrankten Familienmitglieder der BFIC Familien aufgetragen. Das Alter wird in Jahrzehnten angegeben. D (deutsche Abstammung), J (japanische Abstammung), T (türkische Abstammung). GTCS generalisierte tonisch-klonische Anfälle, CPS komplex partielle Anfälle, FS fieberhafte Anfälle. Antiepileptika: CBZ (Carbamazepin) , PBT (Phenobarbital), PHT (Phenytoin), VPA (Valproinsäure), STM (Sultiam). Andere: CCT Computertomographie des Schädels, MRI Magnetresonanztomographie.

Familie	Individuum [sex, alter/y]	Anfallsbeginn und -ende(alter /mo)	Typ des Anfalls	Anfallshäufigkeit (Therapieeffect)	Therapie [Dauer (alter/mo)]
BFIC1 (D)	II.2 [f, 65]	6/7	GTCS	gehäuft	Keine
	II.4 [f, 68]	6/7	GTCS	gehäuft	Keine
	III.3[m, 47]	6/8	GTCS	gehäuft	Keine
	III.6 [f, 37]	6/7	GTCS	gehäuft	keine
	III.7 [f, 47]	6/7	GTCS	gehäuft	PBT [6/24]
	IV.2 [m, 12]	6/9	GTCS	2/d in 4 d [sf]	PBT [6/24]
	IV.4 [f, 15]	6/10	GTCS	gehäuft	Keine
BFIC2 (J)	II.2 [f, 25]	4/8	GTCS		Keine
	III.1 [f, 0.3]	3/14	GTCS	3x 4/d [sf]	PBT [6/18]
	III.2 [f, 2]	4/10	GTCS	2x 2/d [sf]	VPA [10/18]
BFIC3 (J)	II.1 [f,28]	5/8	GTCS		Keine
	II.4 [f,30]	5/8	GTCS		Keine
	III.2 [m, 0.9]	4/12	GTCS	2	Keine
	III.3[m,4]	4/10	GTCS	3 [sf]	CBZ [8/18]
BFIC5 (J)	I.1 [m,46]	6/?	GTCS	2-3	Keine
	II.1 [m,5]	5/6	CPS	cluster [sf]	CBZ [6/24]
	II.2 [m,13]	4/4	CPS	cluster [sf]	PBT [6-40]
	II.3 [m,15]	6/6	GTCS	cluster [sf]	PBT [6/36]
BFIC6 (J)	II.2 [f,22]	6/?	GTC	2-3	Keine
	III.1 [m,8]	7/8	CPS	2 [sf]	CBZ [7-24]
BFIC7 (J)	I.2 [f,50]	5/6	GTCS	2	Keine
	II.2 [f,27]	5/6	GTCS	2	Keine
	I.2 [m, 0.5]	5/5	GTCS	4x 4/d [sf]	PBT [6-18]
BFIC8 (J)	I.1 [m,58]	infancy	GTCS		Keine
	II.2 [m,32]	5y/25y	GTCS		CBZ
	II.3 [m,28]	5/10	GTCS	gehäuft	Keine
	III.1 [m,2]	6/14	CPS	gehäuft	keine
	III.2 [m, 0.6]	6/10	CPS	10x/d [sf]	VPA [6/12]
BFIC9 (J)	II.2 [f,26]	3/10	GTCS	gehäuft	Keine
	III.1 [f,3]	5/13	CPS, GTCS	10/d [sf]	CBZ [6/18]
	III.2 [f,0.5]	5/15	CPS	10-15/d [sf]	VPA[6/12],CBZ[13/34]
BFIC 10 (D)	II.1 [m,70]	6/?	GTCS		Keine
	II.3 [f, 63]	6/~18	GTCS	1/w - 2/d	Keine
	II.5 [f, 58]	6/~18	GTCS		Keine

Tabelle 1b. Klinische Daten der BFIC Familienmitglieder

Familie	Individuum [sex, alter/y]	Anfalls- beginn und - ende (age/mo)	Typ der Anfälle	Anfallshäufigkeit [Therapieeffect]	Therapie [Dauer (age/mo)]
BFIC10 (D)	III.1 [f, 34]	4/5	GTCS	5 [sf]	PHT [4/24]
	III.3 [m, 33]	4/5	GTCS	7-8 [sf]	
	III.5 [f, 24]	4/4	GTCS	5 [sf]	PBT [4/24]
	IV.1 [f, 3]	5/5	GTCS	10 in 2 d [sf]	PBT [5-now]
BFIC11 (T)	II.2 [f, 27]				
	II.4 [f, 30]				
	III.1 [m, 9]	5/8			PBT [5/24]
	III.2 [m, 5]	6/6	GTCS/CPS	5 in 1 d [sf]	PBT [6m/?]
	III.3 [m, 3]	6/6	GTCS/FS	2 in 2 d [sf]	PBT [6m/?]
BFIC12 (D)	II.2 [f,60]	?/?	CPS		Keine
	III.6 [f,27]	3/18	CPS	1-3/d [sf]	Keine
	III.5 [f, 36]	6/12	CPS	4-10/d [sf]	Keine
	III.3 [m,33]	16y/	GTCS		VPA [16y/?]
	III.1 [m,21]	4y/5y	FS		Keine
	IV.1 [f,8]	2/9	CPS/GTCS	5/d [sf]	CBZ
BFIC13 (D)	II.3 [m, 79]				Keine
	III.2 [f, 34]	8/8	CPS	1 in 1 d [sf]	PBT [8/48]
	III.3 [f, 39]	8/8	CPS	3 in 3 weeks [sf]	CBZ [8/48]
	IV.2 [f, 17]	8/9	CPS	2 in 1 d [sf]	PBT [8/48]
BFIC14 (D)	II.8 [f, 65]				Ja[?]
	III.2 [m, 40]	5/5	CPS	3 in 1 d [sf]	PBT [5/48]
	III.7 [m, 6]				
	III.10 [f, 35]	6/6	CPS	2-3/day [sf]	PHT [6/36]
	IV.1 [f, 4]	6/6	CPS	3-4/d [sf]	CBZ [6/jetzt]
BFIC15 (D)	II.1 [m, 65]				
	IV.1 [f, 3]	6/6	AtS	2 in 1 d [sf]	STM [18 mo]
	IV.2 [m, 5]	4/12	CPS/GTCS	9/2d, 12m 3/2 d	PBT [18 mo]
BFIC18 (D)	II.2 [f, 39]	3/3	GTCS	5-6 in a few d [sf]	PHT [3/54]
	II.4 [f, 35]	6/?	CPS/GTCS		PHT [3/54]
	III.2 [m, 9]	7/14	FS/CPS	5-6 in 7 mo [sf]	PHT [14/now]
BFIC19 (D)	II.3 [m, 42]	6/6	GTCS	2 in 14 d	Keine
	III.1 [m, 4]	6/6	GTCS	4 over 3 weeks [sf]	PBT [6/36]
	III.2 [f, 2]	5/5	GTCS	6 in 2 d [sf]	PBT [5/jetzt]
	III.4 [f, 8]	4/4	GTCS/CPS	3/10 d, ~ 20/1d [sf]	PBT [4/7]
	III.5 [f, 15]	6/12	GTCS	3 in 6 mo	keine
	III.7 [m, 12]	4/6	CPS/GTCS	8/3 in 8 weeks [sf]	PBT [6/15]

Die Mehrzahl der Patienten war nach Initiierung der Medikation ab dem 18. Lebensmonat anfallfrei. Das meistverabreichte Medikament war Phenobarbital (PB). Andere Medikamente, die verabreicht wurden, sind Carbamazepin (CBZ), Phenytoin (PHT), Valproat (VPA) und Sultiam (STM). Die Medikamentenapplikation wurde zwischen dem 3. Lebensmonat und dem 4. Lebensjahr gestoppt. Bei keinem der Patienten wurde anschließend ein Rezidiv in der Kindheit oder Erwachsenenalter beschrieben.

Die meisten der interiktalen EEG's zeigten keine epileptische Aktivität. Bei einigen Patienten ging die interiktale epileptische Aktivität vom Frontallappen (IV.1/BFIC15, II3/BFIC5, II.2/BFIC5, II.1/BFIC5) oder vom Occipitallappen (III.1/BFIC3, III.1/BFIC6) aus. Bei 17 Patienten, bei denen bildgebende Verfahren (Magnetresonanztomographie MRT und Computertomographie CCT) möglich waren, war kein pathologisches Korrelat zu erkennen. Bei Patient IV.2/BFIC15 wurden wenige weiße unspezifische periventriculäre Läsionen entdeckt. Die Mehrzahl der Patienten hatten keine zusätzlichen neurologischen Symptome. Migräne mit Aura trat bei Familie BFIC19 auf, von der I.1, I.2, II.5 und II.6 betroffen waren, während Patient II.3 eine Migräne ohne Aura hatte. Die Patienten berichteten bei dieser Aura von visuellen Symptomen und nicht von sensorischen oder motorischen, wie von der FHM bekannt ist. Die Migräne in Familie BFIC19 zeigte keine Co-Segregation mit BFIC, denn beide Eltern (I.1/I.2) waren nicht von Migräne betroffen.

2.1.2 GEFS⁺-Familien

2.1.2.1 Patienten (GEFS⁺)

In der Studie wurde eine Familie deutscher Abstammung, bestehend aus fünf Generationen, eingeschlossen. Von 18 Individuen, bei denen Anfälle beschrieben wurden, waren acht von GEFS⁺ betroffen. Abbildung 2. zeigt den Stammbaum dieser Familie.

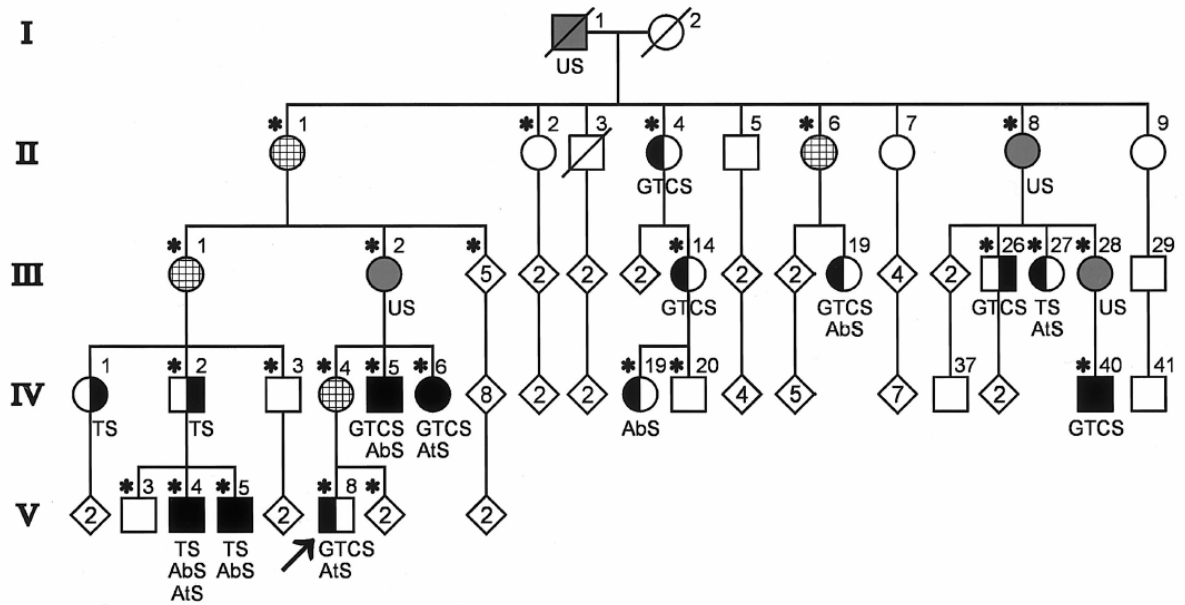
Drei von acht Individuen, die von GEFS⁺ betroffen waren, wurden als FS klassifiziert (IV-2, III-26 und IV-1), ein weiteres Individuum als FS⁺ (IV-40), eins als FS⁺ mit

atonischen Anfällen (IV-6), zwei als FS⁺ mit Absence-Anfällen (IV-5, V-5) und ein Individuum mit atonischen und Absence-Anfällen (V-4). Zwei Familienmitglieder hatten Anfälle ohne FS, eines davon in Zusammenhang mit nicht-fieberhaften generalisierten tonisch-klonischen Anfällen (GTCS). Diese beiden Familienmitglieder wurden der kindlichen Absence-Epilepsie zugeteilt (III-19, IV-19). Die übrigen Phänotypen konnten nicht ausreichend klassifiziert werden: Drei weitere Familienmitglieder hatten nicht-fieberhafte GTCS unabhängig vom Schlaf-Wach-Zyklus (V-8, III-14, II-4), eines davon mit atonischen Krämpfen. Ein anderes Individuum hatte nicht-fieberhafte atonische und tonische Anfälle (III-27). Für vier Familienmitglieder waren die klinischen Daten nicht ausreichend um einen genauen Anfalltyp zu bestimmen (III-2, III-28, II-8, I-1). Das Durchschnittsalter für den Anfallbeginn lag bei $2,8 \pm 1,3$ Jahre. Bei allen Familienmitgliedern wurde eine normale Entwicklung und eine normale neurologische Untersuchung dokumentiert, mit Ausnahme eines Individuums, das von Sprachretardierung betroffen war (V-8). Elektroenzephalographisch zeigten acht Individuen einen irregulären Ablauf von *spikes* und *waves*. Ein weiteres Individuum hatte zusätzlich fokale *spikes*. Bildgebende Verfahren, zerebrospinale Flüssigkeit und ein Aminosäure-screening, die bei wenigen Patienten durchgeführt wurden, zeigten keine Auffälligkeiten. Die antikonvulsive Therapie war komplikationslos.

2.1.2.2 Klinische Daten zur GEFS⁺ Familie

Die Abbildung 2. gibt einen Überblick über den gesamten Stammbaum der GEFS⁺ Familie. Mindestens einen fieberhaften oder nicht-fieberhaften Anfall hatten 18 Individuen. Diese wurden für die Kopplungsanalyse als Betroffene angesehen. Vier Individuen gelten als obligate Träger, einschließlich Individuum II-1, welches nach einem Apoplex, in einem Alter von 69 Jahren, von Anfällen betroffen wurde. Ein Verwandtschaftsverhältnis zu I-1 besteht bei 92 Individuen, während 34 mit I-1 nicht verwandt sind. Keines dieser 34 Individuen hatte je einen Anfall oder eine positive Familienanamnese. Anhand der klinischen Daten beträgt die Penetranz 80%. Drei Individuen hatten fieberhafte Anfälle mit generalisierten tonisch-klonischen (GTCS, 1) oder tonischen Anfällen (TS, 2), die als FS klassifiziert wurden. Fünf Individuen

hatten fieberhafte und nicht-fieberhafte GTCS (3) oder TS (2), vier davon assoziiert mit nicht-fieberhaften Absence-Anfällen (AbS, 2) oder atonischen Anfällen (AtS, 1) oder mit beiden (1). Diese Anfälle wurden klassifiziert als FS⁺ (1), FS⁺ & AbS (2), FS⁺ & AtS (1) und FS⁺ & AbS & AtS (1). Zwei Individuen hatten AbS ohne FS und ohne jeglichen Zusammenhang mit GTCS, diese wurden der kindliche Absence-Epilepsie (CAE) zugeordnet. Die übrigen epileptischen Phänotypen konnten nicht klassifiziert werden. Drei Individuen hatten, ohne Zusammenhang mit einem Schlaf-Wach-Rhythmus, nicht-fieberhafte GTCS. Eines war von AtS und eines von nicht-fieberhaftem AtS und TS betroffen. Für vier Familienmitglieder waren die klinischen Daten nicht ausreichend um die Anfälle zu klassifizieren. Durch zwölf Patienten, bei denen der Krankheitsbeginn bekannt war, wurde das Manifestationsalter auf $2,8 \pm 1,3$ Jahre festgelegt. Eine Gruppe von sechs Patienten, die später eine Epilepsie entwickelten, war der Anfallsbeginn zwischen dem 18. und 24. Lebensmonat. Ein Individuum hatte seinen ersten Anfall erst mit 24 Jahren (III-4). Alle Individuen hatten unauffällige neurologische Untersuchungen oder unauffällige Fremdanamnesen, mit Ausnahme von V-8, welches eine Sprachretardierung aufwies. Bei allen betroffenen Individuen bestanden keine anderen Krankheiten, die Einfluss auf die klinische Symptomatik der epileptischen Syndrome hatten oder als Ursache für diese in Frage kamen. Individuum II-1, das einen Apoplex erlitt, wurde als nicht betroffen betrachtet. Mit Ausnahme des Patienten II-1, war bei keinem Individuum durch ein bildgebendes Verfahren ein pathologisches Korrelat für die Anfälle zu erkennen. Bei einigen Patienten, bei denen CSF und ein Aminosäure-Screening veranlasst wurde, waren diese unauffällig.








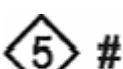

-  fieberhafte Anfälle
-  unklassifizierte Anfälle
-  nicht-fieberhafte Anfälle
-  fieberhafte und nicht-fieberhafte Anfälle
-  obligate Träger
-  gesunde Individuen
-  für die Kopplungsanalyse verfügbar

Abbildung 2: GEFS⁺ -Stammbaum. GTCS= generalisierte tonisch-klonische Anfälle, TS= tonische Anfälle, AtS= atonische Anfälle, AbS= Absence Anfälle, US= unklassifizierte Anfälle

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion und Konzentrationsbestimmung der DNA

2.2.1.1 Extraktion von DNA aus Leukozyten

In allen kernhaltigen Zellen ist die genetische Information in Form von genomischer DNA vorhanden. Zur Gewinnung der DNA aus EDTA-Blut wurde der *DNA Maxi Kit* der Firma QIAGEN verwendet. Es wurden 10 ml Blut eingesetzt.

Einzelne Schritte des QIAamp DNA Maxi Kit Verfahrens:

1. 10 ml Blut werden in eine 50 ml Zentrifugentube pipetiert.
2. Es werden 500 µl QIAGEN Protease Lösung und 12 µl AL-Puffer der Stichprobe hinzugegeben und gemischt.
3. Die Lösungen werden auf 70 °C für 10 min erhitzt, um eine möglichst vollständige Lyse der Zell- und Kernmembranen vorzunehmen.
4. Zur Fällung der DNA werden 10 ml Ethanol (96% - 100%) beigelegt und gemischt.
5. Zur Abtrennung der gefällten DNA von Serum und restlichen Zellanteilen soll die Lösung in ein QIAamp Maxi Säule pipetiert und bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten zentrifugiert werden.
6. Abnehmen der QIAamp Maxi Säule und verwerfen des Filtrats, danach Absetzen der QIAamp Maxi Säule in der 50 ml Zentrifugentube. Der Restbestand der Lösung

vom Schritt 4 wird in der QIAamp Maxi Säule dazugegeben. Zentrifugieren bei 1850x g (3000 Umdrehungen pro Minute) für 3 Minuten.

7. Abnehmen der QIAamp Maxi Säule und verwerfen des Filtrats. Danach Absetzen der QIAamp Maxi Säule in der 50 ml Zentrifugentube (siehe Schritt 6).

8. Es werden 5 ml Puffer AW 1 in der QIAamp Maxi Säule hinzugegeben. Zentrifugieren bei 4500x g (5000 Umdrehungen pro Minute) für 1 Minute.

9. Zugabe von 5 ml Puffer AW 2 in die QIAamp Maxi Säule. Zentrifugieren bei 4500x g (5000 Umdrehungen pro Minute).

10. Verwerfen der 50 ml filtratenthaltende Zentrifugationstube, die QIAamp Maxi Säule muss in eine saubere 50 ml Zentrifugationstube transferiert werden.

11. Beifügen von 1 ml AE-Puffer oder destilliertem Wasser, equilibriert bei Raumtemperatur (15 - 30 °C). Aufwärmen in Raumtemperatur und zentrifugieren bei 4500x g (5000 Umdrehungen) für 5 Minuten.

12. Nachladen 1 ml des DNA erhaltenden Eluats in der Membran der QIAamp Maxi Säule. Den Deckel schließen und bei Raumtemperatur aufwärmen für 5 min. Danach zentrifugieren bei 4500x g (5000 Umdrehungen pro Minute) für 5 Minuten.

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA

Die Bestimmung der extrahierten DNA-Konzentration erfolgt mit Hilfe eines Spekto-Photometers. Es wird die Absorption einer Nukleinsäure-Lösung bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Zur Umrechnung wird folgende Formel benutzt:

$$OD_{260} \times 50 = \text{DNA } [\mu\text{g/ml}]$$

Die maximale Absorption der DNA findet bei einer Wellenlänge von 260 nm statt. Dieser Tatsache bedient man sich, um den Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösung bestimmen zu können. Da Proteine ihre maximale Absorption bei 280 nm haben, wird noch einmal die Extinktion der Lösung bei dieser Wellenlänge gemessen. Der Quotient von OD_{260}/OD_{280} gibt den Reinheitsgrad der DNA-Lösung an. Es sollte ein Wert zwischen 1,5 und 2 erreicht werden. Werte unter 1,5 ließen auf eine Verunreinigung schließen.

2.2.2 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

2.2.2.1 Einführung

Schnell, automatisierbar und spezifisch bietet die PCR eine Möglichkeit zur enzymatischen in-vitro Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Ziel-Sequenz. Das zur Vervielfältigung vorgesehene DNA-Segment wird mit Hilfe zweier kurzer einzelsträngiger Oligonukleotide (Primer) definiert. Diese binden nach Trennung des DNA Doppelstranges (Denaturierung) an die eingesetzte genomische DNA (Annealing). Eine Polymerase erkennt das Primer/DNA Hybrid und amplifiziert die gewünschte Sequenz (Elongation). Durch wiederholte Zyklen des immer gleich ablaufenden Prozesses kann eine exponentielle DNA-Amplifikation erreicht werden. Das ist möglich, weil alle zuvor synthetisierten Sequenzen in den nachfolgenden Zyklen als Ausgangs-DNA (Template) dienen. Der PCR-Zyklus wird in drei Phasen eingeteilt:

Phase 1: Denaturierung

Menschlich genomische DNA wird in der Regel bei 93 – 95 °C denaturiert. Dabei werden die Wasserstoffbindungen der Doppelhelix zerstört. Es liegen zwei einzelsträngige DNA-Moleküle vor und die Primer können sich anlagern.

Phase 2: Annealing

Erfolgt bei einer Temperatur von 50 – 70 °C. Die Temperatur liegt in der Regel 5 °C unter der Schmelztemperatur der Oligonucleotid T_m . Während der darauffolgenden Anlagerung der Primern hybridisieren die Oligonucleotidprimer mit ihrer komplementären, d.h. die der Ziel-DNA-Abschnitt flankierende Region, und bilden eine Primer-Template-Komplex.

Phase 3: Elongation

Die Taq-Polymerase lagert sich an und synthetisiert im Extensions-Schritt bei 72 °C die Komplementärstränge der zwischen den Primern liegendem Genomabschnitt.

2.2.2.2 Die Komponenten einer PCR

1. DNA

Die genomische DNA war Ausgangskomponente in der verwendeten PCR. Es wurden DNA-Konzentrationen von 5 ng/μl und davon 10 μl in einem Gesamtvolumen von 50 μl verwendet.

2. Oligonucleotidprimer

- Die Länge der Primer sollte zwischen 15 – 30 bp sein. Eine geringere Zahl an Basenpaaren ließe die Oligonucleotide auch an anderen Punkten der eingesetzten DNA anheften: verstärkte Unspezifität des Amplifikats ist die Folge.
- Primer bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus, die zu Sekundärstrukturen innerhalb eines Oligonucleotids oder zwischen den Startermolekülen führen können. Um eine optimale Hybridbildung (DNA/Primer) zu erreichen, werden insbesondere Sekundärstrukturen am 3'-Ende vermieden.
- Die Stabilität des DNA/Primer-Hybrids und die Annealing-Temperatur hängen von der Schmelztemperatur der beiden Oligonucleotide ab. Um optimale Bedingungen zu erhalten, werden deshalb die Schmelztemperaturen beider Primer in einem ähnlichen Bereich gewählt.

3. Taq-Polymerase

Die Taq-Polymerase ist eine thermostabile DNA-Polymerase. Sie wurde entdeckt im *Thermus aquaticus*, dem Heißwasserbakterium. Sie verbesserte die Sensitivität, die Spezifität, Ertrag und die Länge der zu amplifizierenden Regionen. Der Vorteil ist dass sie bei einer Temperatur von 95 °C nicht denaturiert. Das macht eine vollautomatisierung des PCR-Vorgangs möglich. Die Durchführung des Extensions-Schrittes bei 72 °C erhöht die Spezifität der Polymerase, da nur hochkomplementäre Stränge hybridisiert bleiben, was die Menge an unspezifischen Reaktionsprodukten weiter reduziert. Der Ertrag der gewünschten Sequenz wird ebenfalls erhöht, da das Temperaturoptimum des Enzyms bei ca. 70 °C liegt. DNA-Sequenzen von bis zu 2 kb Länge können von der Taq-Polymerase amplifiziert werden, da die Ausbildung von Sekundärstrukturen des DNA-Templates bei höheren Temperaturen erschwert wird.

4. dNTP's

Für die Synthese der DNA-Stränge dienen folgende Nukleotide: dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Ultrapure Qualität bevorzugen. Sie sollten bei -20 °C gelagert werden, vor dem Einsetzen empfiehlt es sich diese zu zentrifugieren. Es wurden 0,6 µl einer 25 mmol Lösung in ein Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt.

5. Reaktionspuffer

Der PCR-Puffer besteht aus 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, und 0,1% Gelatine. Bei Bedarf können DMSO oder Glycerol zugegeben werden, um eine höhere Spezifität der PCR zu erhalten.

2.2.2.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasenkettenreaktion wird in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Durch die Verwendung von flexiblen Mikrotidenplatten können 80 Reaktionen parallel durchgeführt werden. In jedes Reaktionslot werden die folgenden Substanzen gegeben.

- DNA 10 µl (5 ng/µl)
- dNTP 0,6 µl (25 nmol/µl)
- Primer 0,6 µl (50 pmol/µl)
- Primer 0,6 µl (50 pmol/µl)
- Puffer 5 µl
- H₂O₂ 33 µl
- Taq 0,2 µl

Die abgedeckte Platte durchläuft in dem PCR-Gerät folgendes PCR-Programm:

1. Erste Denaturierung bei 95 °C (Zeit kann optional eingestellt werden).
2. Denaturierung bei 95 °C für 30 sec.
3. Annealing für 45 sec (Temperatur je nach Primerpaar).
4. Extension bei 72 °C für 30 sec.
5. Letzte Extension bei 72 °C für 2 min.

2. – 4. durchlaufen 35 Zyklen.

Die PCR-Produkte werden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3 Gelelektrophorese

2.2.3.1 Agarosegel

Die Spezifität der PCR wird im Agarosegel überprüft. Eine elektrische Spannung im Gel führt dazu, dass die negativ geladene DNA in Richtung des positiven Pols wandert. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird von deren Größe und der Größe der Gelporen bestimmt. Kurze Nucleinsäurenketten bewegen sich schneller im Agarosegel als längere, wandern so innerhalb eines bestimmten Zeitraumes weiter im Gel. Es wird ein 2 %iges Agarosegel mit einem Zusatz von 1 µg/ml Ethidiumbromid zur visuellen Darstellung der DNA mit 1xTBE-Puffer

verwendet. Ethidiumbromid lagert sich Zwischen den benachbarten Purin- bzw. Pyrimidinbasen an. Unter UV-Licht-Bestrahlung fluoresziert der Farbstoff blauviolett. Die Menge der DNA ist proportional der Fluoreszenz. Die Elektrophorese erfolgt horizontal bei einer Spannung von 80 – 140 V für eine Dauer von 35 – 45 Minuten. Die Zeit kann bei Bedarf variieren um eine möglichst gute Auftrennung sicherzustellen.

Um leichter in die Taschen pipettieren zu können, da das PCR-Produkt nicht sichtbar ist, und damit man auch die Laufgeschwindigkeit besser abschätzen kann, wird 3 µl PCR-Produkt mit 10 µl loading-Puffer vermischt. Der loading-buffer enthält 0,25 % Bromphenolblau. Das Agarosegel wird dann unter einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert. Anhand des Fotos kann eine PCR als spezifisch angesehen werden, wenn nur eine Bande sichtbar und die erwartete Produktlänge bestätigt wird. Um einen Überblick über die Länge der PCR-Produkte zu erhalten, wird im Agarosegel ein Längenstandard parallel zu den PCR-Produkten aufgetragen. Je nach Größe der sog. Leiter erhalten wir auch verschieden lange Fragmente. Diese wandern unterschiedlich weit im Gel und dienen dem direkten Vergleich mit den PCR-Produkten. Die Länge des PCR-Produkts sollte mit der Ziel-DNA-Sequenz identisch sein.

2.2.3.2 Polyacrylamidgele

Polyacrylamid ist ein Monomer. Es polymerisiert in Gegenwart freier Radikale aus (APS, Ammoniumpersulfat). TEMED (Tetramethyldiamin) stabilisiert das Polymer. Die Porengröße wird durch die Länge der Ketten bestimmt und diese wiederum hängt von der Acrylamidkonzentration ab. Der Vorteil dieser Gele gegenüber den Agarosengelen liegt in den besonders kleinen Poren, so dass ein hohes Auflösungsvermögen erreicht werden kann. Polyacrylamidgele werden zwischen Glasplatten gegossen, die durch Abstandhalter (Spacer) voneinander getrennt sind. Das Gel bekommt so eine Dicke von ungefähr 0,5 mm. Es werden vor dem gießen des Gels noch zusätzlich 53 µl TEMED und 210 µl APS (10 %) der Lösung zugesetzt, zu diesem Zeitpunkt muß die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen. Die Gel-Lösung

wird zügig zwischen die Platten gegossen. Das Gel wird in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und Puffer in die dafür vorgesehenen Wannen eingefüllt. Nach Auftrag von 3 µl der Proben erfolgt die Wanderung der DNA von Kathode zu Anode. Nach der Elektrophorese werden die Glasplatten voneinander getrennt.

Herstellung der Acrylamidlösung:

- 25,2 g Urea
- 12 ml AA (30%, 19:1)
- 3,6 ml 10xTBE
- Wasser bis die Lösung ein Volumen von 60 ml erhält

All diese Komponenten werden bei erhöhter Temperatur (50 – 80 °C für) gemischt.

Folgende Parameter (Laufbedingungen) müssen am Sequenzierer eingestellt werden:

- Laufpuffer: 0,6x TBE
- Voltage: 1500 Volt
- Strom: 38 mA
- Leistung: 25 W
- Temperatur: 50 °C
- Laufzeit: 600 Minuten, diese kann bei Bedarf variieren.

Bevor die PCR-Proben in das Gel eingefüllt werden, müssen folgende Komponenten addiert werden:

- Eine blaue Lösung zur sichtbarmachung der Proben beim pipettieren im ALF. Diese besteht aus 10 ml Formamid, 1 ml EDTA 0,2 M und Blutextran. Menge an Blutextran sollte anhand der Färbung der Lösung entsprechend addiert werden.
- Zur späteren Längenbestimmung des Produktes werden DNA-Fragmente definierter Länge zugegeben. Es werden dem PCR-Produkt eine Reihe Standards 95, 204, 300 und 400. Sie dienen als ein fester Anhaltspunkt beim

bearbeiten der Ergebnisse des Acrylamidgels. Jeweils 1 µl vom jeden Standard der Lösung beifügen.

- Vom PCR-Produkt selbst werden 1,3 – 2,0 µl Lösung addiert.

Die Lösung wird auf 95 °C erwärmt für 10 – 15 Minuten (die DNA denaturiert) und anschließend 3 µl davon in die Geltaschen pipettiert.

2.2.4 Kopplungsanalyse

Ziel der Kopplungsanalyse ist die genetische Kartierung eines unbekanntes am Krankheitsgeschehen beteiligten Gens, sie ist vor allem bei monogen vererbten Krankheiten anwendbar. Unter monogen vererbten Erkrankungen versteht man Krankheiten, die durch Defekte an einem einzelnen Gen verursacht werden. Bei dieser Untersuchungsmethode wird grundlegend angenommen, dass alle von der Krankheit betroffenen Individuen das gleiche Krankheitsallel tragen, während es bei Gesunden nicht vorkommt. In der Segregationsanalyse dienen Marker als mendelnde Merkmale. Es wird die Segregation eines Merkmals mit der Segregation von Allelen eines bestimmten Markers innerhalb eines Stammbaums verglichen. Marker sind über das Genom verteilte bekannte DNA-Abschnitte, die durch eine große genetische Variabilität gekennzeichnet sind. Durch die Kopplungsanalyse wird die Rekombinationshäufigkeit zwischen dem Phänotyp und einem durch Marker bekannten definierten DNA-Abschnitt bestimmt. So kann bestimmt werden, ob dieser DNA-Abschnitt mit dem noch unbekanntes Gen gekoppelt ist oder eine freie Rekombination besteht. Die Aussagekraft der Kopplungsanalyse steigt mit der Anzahl der untersuchten Merkmalsträger und Nicht-Merkmalsträger. Die Rekombinationshäufigkeiten dieser Methode werden statistisch ausgewertet. Mit der Kopplungsanalyse wird für den Locus eines am Krankheitsgeschehen beteiligten Gens eine Teilregion an einem Chromosom eingegrenzt. Anschließend kann mit entsprechenden Datenbanken die Suche nach Kandidaten-Genen beginnen, die für die Pathogenese der Erkrankung verantwortlich sein könnten.

2.2.4.1 Übersicht zur Kopplungsanalyse

Während der Meiose werden Allele verschiedener Gene, die auf verschiedenen Chromosomen liegen, unabhängig voneinander vererbt (Ott, 1991). Es findet eine Rekombination dieser Allele statt. Eine freie Rekombination von Genen liegt vor, wenn bei Segregationsanalysen zahlreicher Familien eine gleiche Anzahl von rekombinanten und nicht-rekombinanten Haplotypen vorkommt. Treten bei Familienmitgliedern zwei Allele gehäuft zusammen auf, wird dies als Co-Segregation bezeichnet.

Die meiotische Rekombination macht es möglich, dass Allele verschiedener Gene am gleichen Chromosom eines Elternteils auch getrennt an die Nachkommen vererbt werden können. Während der Prophase der Meiose I lagern sich die Paare homologer Chromosomen zusammen und es kommt zur Bildung von Überkreuzungsstrukturen, dem sog. Crossing-over. Crossing-overs sind zu diesem Zeitpunkt als Chiasmata zu erkennen. Ein Chromosom besteht aus einem kurzen (p-) und einem langen (q-) Arm, die durch das Centromer getrennt sind. Hier findet ein Austausch von DNA-Abschnitten dadurch statt, dass die DNA-Doppelhelices der Chromatiden auseinander brechen und sich mit den Homologen wechselseitig wieder vereinigen. Es kommt zu einem reziproken Austausch von Genen homologer Chromosomen zwischen Nicht-Schwester-Chromatiden. Es entstehen zwei rekombinante Chromatiden. An einem Crossing-over sind immer zwei Chromatiden beteiligt. Ist der Abstand zwischen zwei Allelen eines Chromosoms klein, ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass diese Allele getrennt werden. Je weiter zwei Loci auf einem Chromosom voneinander entfernt sind, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese durch ein Crossing-over getrennt werden. Die Rekombinationshäufigkeiten sind damit ein Maß für die relative Entfernung zweier Loci. Die physikalische Entfernung dagegen wird mit der Anzahl der dazwischen liegenden DNA-Basenpaaren angegeben. Eine Rekombinationshäufigkeit von 1% bedeutet, dass zwei Loci bei 100 untersuchten Meiosen einmal getrennt vererbt wurden. Experimente mit Drosophila-Fliegen lieferten den ersten Zusammenhang zwischen Rekombinationshäufigkeit und genetischen Abstand (Morgan, 1911). Ein Morgan ist definiert als die Länge des Chromosomenabschnitts, die im Durchschnitt einen Austausch pro einzelne

Chromatide durchmacht. Als cM wird das 1/100 des Morgans bezeichnet und entspricht als relativer genetischer Abstand einer Rekombinationshäufigkeit von 1%. Abschnitte eines Chromosoms, an denen häufiger Crossing-overs stattfinden, werden als „*hot spots*“ bezeichnet (Bryda et al. 1992). Doppelt-Crossing-overs werden seltener beobachtet als statistisch zu erwarten wäre. Ein bereits vorhandenes Crossing-over unterdrückt in der unmittelbaren Nachbarschaft die Entstehung eines weiteren. Deshalb wird die Verteilung von Crossing-overs entlang eines Chromosoms als *semirandom* bezeichnet. Das Crossing-over untersteht einer geschlechtsabhängigen differentiellen Regulation. Im heterogametischen Geschlecht sind die Chiasmata seltener. Einerseits wegen der geringen Homologie der Geschlechtschromosomen X und Y ist ein Crossing-over in geringerem Umfang möglich, andererseits tritt bei väterlichen Autosomen eine Rekombination weniger häufig auf.

Die Wahrscheinlichkeit mit der ein Gamet bezüglich zweier Allele von unterschiedlichen Genen rekombinant ist, wird als Rekombinationshäufigkeit bezeichnet. Die Rekombinationshäufigkeit ist das Ausmaß der Genkopplung zwischen diesen Allelen und wird typischerweise mit dem griechischen Buchstaben Θ angegeben. Die Rekombinationsfraktion zwischen zwei Genen, die unabhängig voneinander vererbt werden, beträgt $\Theta = 1/2$. Besteht eine Genkopplung, beträgt die Rekombinationshäufigkeit $\Theta < 1/2$. Liegen zwei Gene auf einem Chromosom so eng beieinander, dass eine Rekombination sehr selten auftritt, beträgt die Rekombinationshäufigkeit Θ annähernd 0. Diese Marker sind gekoppelt und werden als Haplotyp an die Nachkommen weitergegeben.

Bei dieser Methode wird die Wahrscheinlichkeit auf Bestehen einer freien Rekombination mit der Wahrscheinlichkeit einer Kopplung verglichen. Es werden zwei Hypothesen aufgestellt. Der Hypothese, dass eine Kopplung $\Theta < 0,5$ zwischen Eigenschaft und Marker besteht, wird die Nullhypothese $\Theta = 0,5$ gegenübergestellt. Der Quotient dieser beiden Wahrscheinlichkeiten wird *likelihood ratio* genannt. Der dekadische Logarithmus dieses Quotienten wird LOD (*logarithm of odds*)-Wert genannt.

$$Z(\Theta) = \text{LOD-Wert}$$

$$Z(\Theta) = \log_{10} [L(\Theta)/L(1/2)]$$

Eine *odds ratio* von 1000/1 entspricht einem LOD-Wert von 3 ($Z = 3$). Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung zwischen dem zu untersuchenden Locus und dem Marker tausendfach höher ist als die Wahrscheinlichkeit einer freien Rekombination. Als statistisch gesichert gilt eine Kopplung, wenn der LOD-Wert über 3 beträgt ($Z > 3$). Sollte der LOD-Wert unter 2 liegen, ist eine Kopplung unwahrscheinlich (Ott, 1986).

Ein Modell für solche mathematische Berechnungen, das weltweit angewandt wird, lieferte Morton (Morton, 1955). Morton setzte die Signifikanzschwelle auf 0,001 und die Power des Testes auf 0,99. Die Hypothese der freien Rekombination wird erst zurückgewiesen, wenn $Z(\Theta) > 3$ ist. Liegt der LOD-Wert zwischen $-2 < Z(\Theta) < 3$ müssten weitere Segregationsanalysen erfolgen. Verschiedene Computerprogramme werden heute in der Kopplungsanalyse eingesetzt.

2.2.4.2 Durchführung und Auswertung der Kopplungsanalyse

Bei unseren Experimenten wurden die PCR-Produkte einzeln in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit einem automatischen Laserfluoreszenz-Sequenzierer (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) semiquantitativ bestimmt. Bei dem Polyacrylamid-Gel handelt es sich um ein Harnstoffgel, das bei der Herstellung mit einer Vakuumpumpe völlig luftblasenfrei filtriert wird. Das Polyacrylamid-Gel wird vorsichtig zwischen den Glassplatten des Alfs gegossen, möglichst homogen. Damit dies gelingt, müssen die Glassplatten kurz davor sorgfältig mit Alkohol und destilliertem Wasser gespült und anschließend getrocknet werden. Die Spacer halten die zwei Glasplatten des Alfs auseinander und bestimmen so die Dicke des Gels mit 0,5 mm. Nach dem Gießen des Gels wird ein Gelkamm vorsichtig eingeführt. Anschließend wird das Gel in einem geschlossenen Raum zur Polymerisation abgestellt. Ein Prozess, dessen Dauer unter anderem von der Raumtemperatur abhängig ist. Bevor die Glasplatten mit dem Gel am Sequenzierer platziert werden,

wird dieser eingeschaltet, damit sich das destillierte Wasser am Sequenzierer erwärmt. Anschließend wird das Gel am Sequenzierer platziert und der Kamm entfernt. Die Geltaschen, die nach Entfernung des Kamms entstehen, werden vorsichtig mittels einer Pipette mit TBE-Puffer gespült, um den überstehenden Harnstoff zu entfernen. 1 - 2 µl DNA Probe wird mit 5 µl des Puffers vermischt. Dieser enthält die 95 bp, 300 bp und 400 bp langen Standard-DNA Proben. Nach Eingabe der Einstellung am Sequenzierer (Voltage: 1500 Volt, Strom: 38 mA, Leistung: 25 W, Temperatur 50 °C und Laufzeit 600 min) wird der Lauf gestartet.

Die LOD-Wert-Berechnungen werden computergestützt MLINK, einem Unterprogramm des *Linkage package program* (Lathrop, 1984), unter Annahme eines autosomal dominanten Vererbungsmodus, einer Krankheitsallelfrequenz von 0,0001 und einer Penetranz von 70%, ausgewertet.

2.2.4.3 Marker

Die Kopplungsanalyse setzt das Vorhandensein vieler Marker und deren möglichst genaue Lokalisation im Genom, voraus. Marker sollten einen hohen Grad an Polymorphismen aufweisen. Das bedeutet, dass ein Individuum für diesen DNA-Abschnitt mit hoher Wahrscheinlichkeit heterozygot ist. Dies ist Voraussetzung für die Informativität eines Markers. Heute werden Mikrosatelliten als Marker verwendet, das sind polymorphe und einfache repetitive Sequenzen. Repetitive Sequenzen können im Genom hintereinander angeordnet (*tandem repeats*) oder über das Genom verstreut sein (*interspersed nuclear sequences*). Mikrosatelliten, Minisatelliten und Satelliten gehören zu den tandemartigen Sequenzen. Die Tatsache, dass 100.000 Mikrosatelliten über das ganze Genom verteilt sind (Litt und Luty, 1991), und dass sie eine stabile Vererbung zeigen und physikalisch kartiert sind, macht sie zu idealen Markern.

Bei unseren Untersuchungen wurden Marker, triplet repeats und quadruplet repeats, aus dem *Human Screening Set/Version 8.8a*, sowie aus dem *Genethon human linkage map* (Weissenbach 1993, Gyapay 1994, Dib 1996), *Marshfield map of markers* und *Genom Database*, herangezogen.

Die genaue Kartierung wurde der Marshfield Map entnommen:

www.ncbi.nlm.gov:80/cgibin/Entrez/maps.cgi

2.3 Material

2.3.1 Geräte

Biofuge pico	Heraeus
Vortex mixer 7-2020	neoLab
Thermocycler T3	Biometra
Electrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Easy cast Minigelsystem	Pharmacia Biotech
ALF express	Pharmacia Biotech

2.3.2 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

Ampicillin	50 mg/ml ddH ₂ O
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % in ddH ₂ O

DNA-Extraktions-Puffer	<p>4 ml 1 M Tris pH 8,0 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 2 ml 5 M NaCl ad 100 ml ddH₂O, Sterilfiltration</p>
Nukleotide	<p>je 50µl aller dNTPs (10mM) 200 µl ddH₂O</p>
Taq-Puffer	<p>100 mM Tris-HCl pH 8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl₂ 0,1 % Gelatine</p>
TAE (50x)	<p>495,8 g Tris 272,3 g Natriumacetat 74,5 g EDTA ad 2 l ddH₂O</p>
Taq-Puffer (10x)	<p>100 mM Tris/HCl pH 8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl₂ 1 mg/ml Gelatine</p>
TBE (10x)	<p>278 g Boric acid 545 g Tris 250 ml EDTA (0,5 M, pH 8)</p>
TE (1x)	<p>10 mM Tris/HCl, pH 7,6 1 mM EDTA</p>

Acrylamid-Stammlösung

6 % Acrylamid

7 M Urea

1 M TBE

Acrylamid 49 :1 30%

294 g Acrylamid

9 g Bis

300 ml Bis-Lösung

ddH₂O bis 1 l Lösung

Agarosegel 1%

100 ml TBE 1x

1 g Agarose

3 µl Ethidiumbromid

Blue Surcrose

3 g Saccharose

2,5 ml 0,2 M EDTA pH 7,6

25 mg Bromphenolblau

50 µl SDS 20%

ad 10 ml ddH₂O

3. Ergebnisse

4.1 Einführung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine Kopplungsanalyse in einer deutschen Familie mit GEFS+ und die Kopplungsanalyse bei einem Familienkollektiv mit BFIC aus Deutschland, der Türkei und Japan. Bei GEFS⁺ handelt es sich um eine Familie aus fünf Generationen mit 18 betroffenen Individuen. Bei BFIC stehen 200 Familienmitglieder aus 16 Familien zur Verfügung, von denen 67 Individuen betroffen sind.

Es wurden Blutproben von den einzelnen Individuen genommen und DNA aus den Leukozyten extrahiert. Anschließend erfolgten Kopplungsanalysen mit dem Ziel der genetischen Kartierung beider Syndrome.

3.2 Molekulargenetische Ergebnisse (GEFS⁺)

Bei GEFS⁺ wurde durch Kopplungsanalyse der Locus 19q13 für das SCN1B-Gen ausgeschlossen. Zusätzlich wurde Kopplung mit der chromosomalen Region 2q21-33 ausgeschlossen, diese beinhaltet die Gene SCN2A, SCN3A und SCN9A. Eine Kopplung wurde durch Haplotyp- und Lod-Wert-Analyse stets ausgeschlossen. Da einige Marker am Chromosom 2 nicht genügend informativ waren, wurde diese Region anhand von Haplotypanalyse definitiv ausgeschlossen. Es wurden alle Loci ausgeschlossen, die Gene beinhalten, die für die Untereinheiten des spannungsabhängigen Natriumkanals kodieren und im peripheren oder zentralen Nervensystem exprimiert werden. Zu diesen Loci gehören 3p21-24 (SCN10A, SCN11A), 11q23 (SCN2B, SCN3B) und 12q13 (SCN8A). Zuletzt wurden Loci wie 8q13-21 (FEB1), 19p13.3 (FEB2) und 5q14-15 (FEB4) für fieberhafte Konvulsionen ausgeschlossen. Eine anschließende Genome-weite Suche mit Markern, die über das gesamte Genom gleichmäßig verteilt waren, ergab keinen Anhalt für eine Kopplung.

Letztes war nicht mehr Teil dieser Arbeit. Die negativen Lod scores in Tabelle 2 sind signifikant für den Ausschluss aus den entsprechenden chromosomalen Regionen. Tabelle 2 beinhaltet die 50 Marker, die wir für die Kopplungsanalyse, zur Verfügung stellten.

Table 2. Zwei-Punkt Kopplungsanalyse GEFS⁺ (GEFS⁺= Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus, cM= centiMorgan, FEB= familiäre Fieberkrämpfe, SCN= Natriumkanal)

Chromosomale Lokalisation nach dem Abstand vom p-Telomer	Marker	Abstand vom p-Telomer (cM)	Intermarker Abstand (cM)	Lod scores bei verschiedenen Rekombinations-Fractionen θ :					
				.0	.01	.05	.08	.10	.15
GEFS2, SCN2A (2q23-24.3), 168-179 cM FEB3 (2q23-24), 171-178 cM SCN1A/3A/9A (2q24), 173-178 cM	D2S1334	162	0	-6.3	-4.4	-2.6	-1.8	-1.4	-0.7
	D2S442	163	1	-6.1	-5.0	-2.8	-2.1	-1.8	-0.9
	D2S1399	169	6	-7.7	-4.4	-2.2	-1.6	-1.2	-0.7
	D2S1353	175	6	-5.8	-4.4	-2.2	-1.6	-1.2	-0.7
	D2S2330	179	4	-3.2	-1.1	-0.2	0.1	0.3	0.4
	D2S326	184	5	-5.2	-3.7	-1.6	-0.9	-0.6	-0.1
	D2S2261	190	6	-5.3	-0.9	0.3	0.6	0.8	0.9
	D2S1391	194/197	4	-4.0	-1.1	0.2	0.6	0.7	0.9
	D2S311	203	9	-5.0	-4.0	-3.0	-2.4	-2.1	-1.5
	D2S117	204	1	-5.7	-2.5	-1.3	-0.8	-0.6	-0.2
	D2S434	213	9	-7.4	-5.7	-4.0	-3.4	-3.0	-2.3
	D2S1363	223	10	-2.0	-0.1	0.4	0.5	0.5	0.5
	D2S427	226	3	-3.3	-2.2	-0.9	-0.5	-0.3	-0.1
	D2S125	228/232/250	2	-6.0	-3.9	-2.2	-1.6	-1.3	-0.8
	D2S2968	228	4	-6.6	-3.4	-1.8	-1.3	-1.1	-0.7
SCN11 (3p24-p21), 25-68 cM	GATA164B08	25	0	-8.6	-5.8	-3.4	-2.3	-2.1	-1.3
	D3S3038	36	8	-10.7	-8.4	-5.1	-3.8	-3.2	-2.2
SCN10A (3p24.2-p22), 45-52 cM	D3S2432	43	7	-10.5	-8.9	-5.3	-3.9	-3.3	-2.2
	D3S1768	49	6	-5.4	-3.0	-1.4	-0.9	-0.6	-0.3
	D3S2409	63	14	-5.4	-2.9	-3.7	-3.1	-2.7	-1.9
	D3S1766	65	2	-3.0	-2.3	-1.1	-0.7	-0.5	-0.2
	GATA148E04	68	3	-8.3	-4.9	-3.7	-2.0	-1.6	-1.0
	D3S2406	72	4	-10.4	-6.0	-3.5	-2.6	-2.2	-1.4
	GATA128C02	85	13	-7.4	-4.2	-2.4	-1.7	-1.6	-1.1
FEB4 (5q14-q15), 103-119 cM	D5S1725	104	0	-7.8	-5.6	-3.7	-2.9	-2.5	-1.7
	D5S1462	112	8	-5.7	-2.2	-1.0	-0.6	-0.4	-0.1
	D5S1453	127	15	-5.1	-4.8	-3.9	-3.2	-2.8	-2.1
FEB1 (8q13-21), 86-105 cM	D8S1113	80	0	-2.0	-0.1	0.6	0.7	0.7	0.8
	D8S1136	88	8	-3.6	-1.2	-0.1	0.1	0.3	0.4
	D8S2324	92	4	-7.5	-7.0	-5.4	-4.5	-4.0	-3.0
	D8S1119	104	12	-4.4	-0.6	0.1	0.2	0.3	0.3
	GAAT1A4	106	2	-4.2	-3.7	-3.1	-2.8	-2.5	-1.8
	D8S1132	118	12	-8.4	-6.8	-3.8	-2.7	-2.2	-1.4
	D8S592	120	2	-5.7	-3.2	-2.5	-2.3	-2.1	-1.6
	D8S1179	125	5	-4.8	-4.0	-2.1	-1.4	-1.1	-0.5
	D8S1128	127	2	-7.2	-5.8	-3.5	-2.7	-2.3	-1.6
SCN2B/3B (11q23), 109-124 cM	D11S2002	92	0	-11.6	-8.1	-4.9	-3.7	-3.1	-2.1
	D11S2000	107	15	-7.4	-4.0	-1.9	-1.2	-0.9	-0.4
	D11S1986	112	5	-6.3	-5.1	-2.9	-2.1	-1.8	-1.1
	D11S1998	115	3	-2.1	-1.3	-0.3	0.0	0.1	0.4
	D11S4464	122	7	-10.6	-4.6	-2.3	-1.6	-1.3	-0.6
	D11S912	124/130	2/8	-3.0	-2.7	-1.7	-1.1	-0.8	-0.3
	D11S2359	127	3	-7.3	-6.3	-4.5	-3.6	-3.2	-2.4
SCN8A (12q13), 67-83 cM	D12S1301	61	0	-4.2	-3.4	-2.0	-1.4	-1.2	-0.7
	D12S398	74	13	-8.2	-6.7	-3.8	-2.8	-2.3	-1.5
	D12S1294	85	11	-10.9	-9.5	-5.8	-4.4	-3.7	-2.5
FEB2 (19p13.3), 13-20 cM	D19S591	15	0	-4.9	-4.5	-3.5	-3.1	-2.9	-2.2
GEFS1, SCN1B (19q13.1), 44-53 cM	D19S433	43	0	-7.8	-4.1	-2.4	-1.7	-1.4	-0.9
	D19S868	49	6	-8.8	-5.0	-3.7	-3.1	-2.7	-2.1
	D19S191	51	2	-6.3	-5.5	-3.9	-3.2	-2.8	-2.1

3.3 Molekulargenetische Ergebnisse BFIC

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Kopplungsanalyse ist in den Tabellen 3 und 4 dargestellt. Die japanische Familie BFIC6 wurde, wegen der geringen Anzahl der Familienmitglieder von der Kopplungsanalyse ausgeschlossen.

Tabelle 3. Zwei-Punkt Kopplungsanalyse (BFIC): Ausgeschlossene Loci

Für die Kopplungsanalysen wurde eine autosomal-dominante Vererbung, eine Krankheitsallelfrequenz von 0.0001 und eine Penetranz von 70% festgelegt. Ausgeschlossen wurden die Loci auf chr. 19q12-13.11, 2q23-31, 20q13.32-13.33 und 8q24.22.

chrom. Lokalisation	Mbp	Lod score zu verschiedenen Rekombinationsfraktionen θ				
		0.0	0.1	0.2	0.3	0.4
2q23-31						
D2s1353	15.7	-57.8	-9.1	-4.1	-1.7	-0.6
D2s382	16.4	-17.4	-1.9	-0.6	-0.2	-0.1
D2s2330	16.4	-55.1	-7.7	-3.3	-1.4	-0.6
19q12-13.11						
D19s433	30.9	-37.7	-4.0	-1.3	-0.4	-0.2
D19s868	33.9	-15.7	-1.6	-0.3	0.1	0.1
D19s245	34.6	-11.5	-1.8	-0.8	-0.4	-0.1
20q13.32-13.33						
D20s171	57.6	-31.9	-4.1	-1.4	-0.3	-0.1
D20s173	58.6	-25.9	-2.2	-0.4	0.2	0.2
8q24.22						
D8s284	130.2	-38.9	-5.3	-2.0	-0.6	-0.1
D8s529	132	-34.2	-4.9	-2.0	-0.8	-0.2
D8s256	133.3	-18.4	-0.3	0.8	0.9	0.5

Tabelle 4. Zwei-Punkt Kopplungsanalyse (BFIC): Kopplung auf Chrom. 16p12.2-q12.2

Positive Kopplung bei 14 BFIC Familien zu Chromosom 16p12.2-q12.2 mit einem maximalen kumulativen Lod score von 6.1 beim Marker D16S411.

chromosomale Lokalisation	Mbp	Lod score at different recombination fractions θ				
		0.0	0.1	0.2	0.3	0.4
16p12.2-q12.2						
D16s403	22.8	-19.4	-0.8	0.2	0.2	0.1
D16s3131	25.8	-11.3	2.5	2.2	1.3	0.5
D16s769	26.0	-14.1	0.7	1.2	0.9	0.3
D16s3093	26.6	-10.4	-0.2	0.6	0.6	0.4
D16s690	27.8	-8.3	2.0	2.2	1.6	0.8
D16s753	31.2	4.6	4.0	2.9	1.6	0.5
D16s3044	47.0	0.6	1.2	1.3	1.1	0.6
D16s3080	49.3	2.5	3.0	2.5	1.6	0.7
D16s411	49.4	6.1	5.2	3.8	2.3	1.0
D16s3136	50.3	-0.7	1.7	1.5	1.0	0.5
ata55A11	50.8	-2.6	2.8	2.2	1.4	0.6
D16s2623	51.7	-3.2	2.5	2.0	1.2	0.5
D16s419	52.6	-7.7	2.4	2.6	2.0	1.1
D16s3137	53.3	-11.0	1.0	1.7	1.4	0.7

Die Kopplungsanalysen bei allen übrigen Familien erbrachten hohe negative kumulative Zwei-Punkt-LOD-Werte für die bekannten Loci auf den Chromosomen 2q und 19q, aber auch für die BFNC Loci auf den Chromosomen 8q und 20 q.

Um diese Loci sicher auszuschließen, wurden Haplotypanalysen in so vielen Familien wie möglich durchgeführt. Der chromosomale Locus 19q12-13.11 konnte in elf Familien ausgeschlossen werden, wobei in vier Familien die Marker nicht genug informativ waren. Definitiv ausgeschlossen wurde der Locus 2q23-31 bei allen Familien. Außerdem wurde durch Haplotypanalysen die für BFNC bekannte Loci 20q13.32-13.33 in 14 und 8q24.22 in 13 Familien ausgeschlossen.

Die Kopplung bei 14 Familien zeigte sich mit einem maximalen kumulativen Zwei-Punkt-LOD-Wert von 6,1 bei dem Marker D16S411, somit ist BFIC in den untersuchten Familien zu der chromosomalen Region 16p12-q12 gelinkt. Nach

Berücksichtigung der aufgetretenen Rekombinationen bei den Individuen III.2 und III.4 der Familie BFIC13 und der Individuen III.1 und III.2 der Familie BFIC19 zwischen den Markern D16S690 und D16S753, sowie beim Individuum III.7 der Familie BFIC14 zwischen den Marker D16S411 und D16S3136, konnte die Region für BFIC auf einem Bereich von 22.5-Mbp im Intervall D16S690-D16S3136 eingengt werden (Abb.: 4.). Bei der japanischen Familie BFIC5 wurde eine Kopplung zu Chromosom 16 und auch für alle in dieser Studie untersuchten Regionen ausgeschlossen. Weiterhin wurde der Locus für FHM und BFIC auf Chromosom 1q21-23 in der Familie BFIC19 mittels Kopplungsanalyse ausgeschlossen. Für die Kopplungsanalysen wurde eine autosomal-dominante Vererbung, eine Krankheitsallelfrequenz von 0.0001 und eine Penetranz von 70% festgelegt.

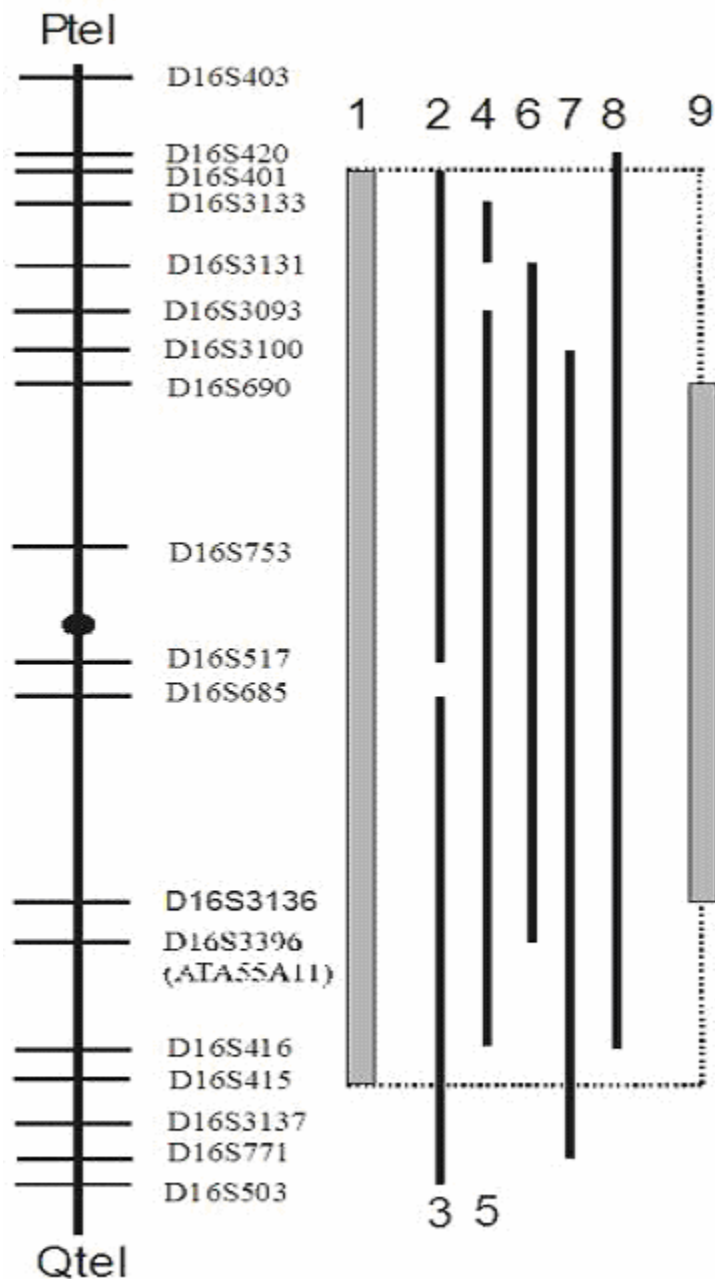


Abbildung 3: Kandidatenregionen bei Chromosom 16. 1, BFIC; 2, ICCA; 3, PKC; 4, RE-PED-WC; 5, PKC; 6, ICCA; 7, PKC; 8, ICCA; 9, betrifft unsere Studie (BFIC= Benigne Familiäre infantile Konvulsionen, ICCA= Infantile Krämpfe und Choreoathetose, PKC= Paroxysmale Bewegungsbedingte Choreoathetose, RE-PED-WC= Rolandic epilepsy with paroxysmal exercise-induced dystonia and writer's cramp)

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine genetische Kartierung für die Syndrome BFIC und GEFS⁺ bei den Familienkollektiven, die uns zur Verfügung standen. Für BFIC konnten 16 Familien in die Studie eingeschlossen werden. Eine deutsche GEFS⁺ Familie, bestehend aus fünf Generationen, wurde ebenfalls untersucht.

4.1 Kopplungsanalyse für BFIC

Bei den BFIC Familien wurden alle bis zum heutigen Zeitpunkt in Frage kommenden Loci auf Kopplung untersucht. Zu diesen Loci zählen 19q12-q13.11, für dem Guipponi et al. 1997 die erste genetische Kartierung für BFIC gelang, zuletzt wurde auch Kopplung bei chinesische Familien bezüglich diesem Locus bestätigt (Xiong et al. 2004), und weitere Loci, für die bereits eine Kopplung in der Vergangenheit gefunden wurde. Dazu gehören Chromosom 16p12-q12 (Szepetowski et al. 1997, Caraballo et al 2001, Valente et al. 2000) und Chromosom 2q23-31 (Malacarne et al. 2001). Untersucht wurden zusätzlich die Loci 20q13.32-13.33 und 8q24.22, die eine Kopplung mit BFNC aufweisen, ein epileptisches Syndrom das BFIC sehr ähnlich ist (Watanabe et al. 1987, Vivegano et al. 1992). Anschließend wurde der Locus für FHM auf Chromosom 1q21-23 untersucht, da Familien beschrieben wurden bei denen BFIC in Kombination mit FHM (familiäre hemiplegische Migräne) auftritt. FHM unterliegt einem autosomal-dominanten Vererbungsmodus (Terwindt et al. 1997). In zwei Familien, in denen FHM und BFIC eine Co-Segregation zeigten, wurden zwei Mutationen am Gen ATP1A2 identifiziert. Dieses Gen kodiert für die alpha2-Untereinheit der Na/K-ATPase (Vanmolkot et al. 2003).

Uns standen 16 Familien mit 200 Familienmitgliedern zur Verfügung. Die betroffenen Familienmitglieder zeigten, obwohl ihre Familien unterschiedliche

ethnische Abstammungen hatten, ein homogenes Bild bezüglich der komplex-partiellen oder generalisierten tonisch-klonischen Anfälle. Dies ist typisch für BFIC, das charakterisiert wird durch nicht fieberhafte Anfälle, die hauptsächlich als komplex partiell und generalisiert tonisch-klonisch beschrieben wurden (Watanabe et al. 1987, Vigevano et al. 1992, Caraballo et al. 2003). Diese Anfälle begannen zwischen den zweiten bis siebten Lebensmonat und hatten eine günstige Prognose. Die drei aufgezeichneten ictalen EEG's bei diesen Patienten deuteten auf eine fokale Anfallsentstehung, ein weiteres Charakteristikum für BFIC. Obwohl bei BFIC Patienten interiktale epileptiforme Aktivitäten sehr selten sind, wurden dennoch solche bei einigen Patienten beschrieben (Berger et al. 1997, Capovilla et al. 2000, Bureau et al. 2002), wie auch in unserer Studie. Drei Patienten hatten eine Symptomatik, die mit BFIC nicht vereinbar war. Ein Patient zeigte reine Fieberkrämpfe, zwei weitere generalisierte tonisch-klonische Anfälle mit einem Anfallsbeginn im 5. oder 16. Lebensjahr. Für unsere Kopplungsanalysen wurden diese drei Patienten als nicht betroffen gekennzeichnet. Weil aber zwei dieser Patienten (III.1/BFIC12 und III.3/BFIC12) den gekoppelten Haplotyp am Chromosom 16 trugen, könnte es sein, dass BFIC genetisch mit anderen Epilepsiesyndromen überlappt, die bis jetzt in keinen anderen BFIC Familien beschrieben wurden. Dies war auch der Fall bei seltenen Fällen von ICCA, bei der eine Persistenz von tonisch-klonischen Anfällen bis zum Erwachsenenalter beschrieben wurde (Lee et al. 1998). Alternativ könnten die Fieberkrämpfe zufällig assoziiert sein und BFIC bei diesen Betroffenen eine reduzierte Penetranz aufweisen.

Unsere Studie belegt die Bedeutung des chromosomalen Locus 16p12.2-q12.2 für BFIC, wie schon von Caraballo beschrieben (Caraballo et al. 2001), mit einem signifikanten kumulativen LOD-Wert von 6,1 bei dem Marker D16S411. Die Kandidatenregion konnte auf einen Bereich von 22,5 Mbp zwischen den Markern D16S690 und D16S3136 begrenzt werden. Familienmitglied III7./BFIC14 bestimmt, infolge einer Rekombination zwischen den Markern D16S411 und D16S3136, das q-telomerische Ende dieser Region, obwohl es noch einen Marker D16S419 des Krankheitshaplotyps beinhaltet. Dieser q-telomerische Anteil des Haplotyps, der auch den Marker D16S419 beinhaltet, ist definitiv ausgeschlossen bei den Patienten III.3/BFIC1 und III.1/BFIC19, bei denen eine zweite Rekombination die p-telomerische Grenze dieser Region bestimmt. Wenn Familie BFIC19 wegen des

unterschiedlichen Phänotyps nicht berücksichtigt würde, so würde der LOD-Wert beim Marker D16S411 immer noch bei 5,2 liegen und die Grenzen der Kandidatenregion würde sich an beiden Seiten nicht ändern, die durch die Rekombinationen aus anderen Familien bestimmt wurden.

Zu dieser Region wurde auch von andere Syndrome mit unterschiedlichen Kombinationen von Epilepsien und paroxysmalen Dyskinesien eine positive Kopplung gefunden (Caraballo et al. 2001, Szepetowski et al. 1997, Lee et al. 1998, Swoboda et al. 2000, Tomita et al. 1999, Valente et al. 2000, Bennett et al. 2000, Guerrini et al. 1999), so dass ein am Krankheitsgeschehen beteiligtes Gen in dieser Region hoch wahrscheinlich ist. Da sich diese Regionen nach den derzeitigen Genkarten nicht völlig überlappen, müssten einige Gene, die für die Krankheitsentstehung verantwortlich sind, sich in enger Nachbarschaft in dieser Region befinden. Die Komplexität dieser Interpretation steigt, wenn man die Inkonsistenz der vorhandenen genetischen Karten und die genotypischen Fehler berücksichtigt. Ein gemeinsamer pathophysiologischer Mechanismus ist für diese epileptischen Syndrome und Dyskinesien anzunehmen, weil ein gemeinsamer identifizierter Locus am Chromosom 16 existiert, die Symptome durch eine erhöhte Reizbarkeit der Neuronenmembran zu erklären sind, sowohl PKC als auch BFIC auf eine antikonvulsive Therapie gut ansprechen, und beide Syndrome in den gleichen Familien zusammen vorkommen können.

Bei einer anhand einer Datenbank ausgeführten Untersuchung in dieser Region (UCSC: www.genome.ucsc.edu, NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov, GDB: www.gdb.org), konnten wir keine verdächtige Sequenz für Ionenkanäle finden, wie bei anderen Formen der idiopathischen Epilepsie beschrieben wurden (Berkovic et al. 2001, Steinlein et al. 2000, Lerche et al. 2000, Kalachikov et al. 2002, Cossette et al. 2002, Heron et al. 2002, Haug et al. 2003, Rundfeldt et al. 2000). Stattdessen wurden Natrium-Glucose-Cotransporter und hypothetische Gene, die den Carboanhydrase-Genen ähnlich sind, identifiziert. Diese könnten als Kandidatengene von Interesse sein. Zuletzt wurde das Gen KST1, das für den Natrium-Glucose-Contransporter in der Region 16p12.1 kodiert, für BFIC ausgeschlossen (Roll et al. 2002).

4.2 Kopplungsanalyse für GEFS+

Obwohl die betroffenen Individuen unserer Familie, anhand dem klinischen Bild und dem dominanten Vererbungsmodus, dem Krankheitsbild GEFS+ zugeordnet werden, gibt es einige Unterschiede zu bisherigen Beschreibungen der Krankheit bei anderen Familien.

Sechs der 18 betroffenen Individuen hatten keinen fieberhaften Anfall. Ein Individuum hatte nach dem 6. Lebensjahr fieberhafte Anfälle und bei weiteren drei gab es keinen Anhalt für fieberhafte Anfälle. Im Vergleich mit anderen GEFS+ Familien traten bei dieser vermehrt nicht-fieberhafte Anfälle auf. Die Phänotypen FS+ oder FS+ mit zusätzlich anderen Typen von Anfällen trat bei acht Individuen auf. Zwei Familienmitglieder hatten eine klassische kindliche Absence-Epilepsie, welche bei keiner anderen GEFS+ Familie bisher beschrieben wurde (Scheffer et al. 1997, Singh et al. 1999).

Statt fieberhafte generalisierte tonisch-klonische Anfälle, welche bei den bisher beschriebenen GEFS+ Familien auftraten, präsentierten vier Individuen fieberhafte tonische Anfälle. Bei den Individuen V-4, V-5, IV-1 und IV-2 war die Anfallsdauer kurz und zusätzlich fehlten die Anzeichen einer klonischen Konvulsion. Deswegen wurden diese Anfälle als tonisch klassifiziert.

Bei einem der betroffenen Individuen zeigte das EEG eine links hemispärische parietale epileptiforme Abnormalität, die bei der Einschlafphase auftrat. Diese EEG-Veränderungen ähnelten damit den kindlich benignen zentrot temporalen *Spikes* (Staden et al. 1998). Die Tatsache, dass bei diesem Familienmitglied eine Sprachretardierung auftrat, bekräftigt diese Annahme.

Bei unserer Familie traten im Stammbaum fünf Äste mit betroffenen Individuen auf. Von diesen boten drei ein homogenes Krankheitsbild. Nachkommen von III-1 hatten fieberhafte und nicht-fieberhafte tonische Anfälle, kombiniert mit atonischen oder Absence Anfällen. Die Nachkommen von III-2 hatten fieberhafte und nicht-

fieberhafte GTCS auch in Kombination mit atonischen Anfällen und Absence-Anfällen. Nachkommen von II-4 zeigten keine fieberhaften Anfälle. Drei Individuen eines weiteren Astes hatten Anzeichen eines anderen idiopathisch generalisierten epileptischen Syndroms. Es scheint als gäbe es einen genetischen Hintergrund, der für das Auftreten einer phänotypischen Variabilität verantwortlich sein könnte. Es ist außerdem möglich, dass als Ursache eine andere Mutation in einem anderen Gen bei den Nachkommen von II-4 für den Phänotyp in Frage kommt.

Nach unseren Untersuchungen kommt es zu einer höheren Heterogenität des epileptischen Syndroms, da die bisher für GEFS+ bekannten Loci ausgeschlossen wurden, zu denen 19q13 und 2q21-33 gehören. Außerdem wurden alle Loci für die Untereinheiten des spannungsabhängigen Natriumkanals und die bekannten Loci für fieberhafte Anfälle ausgeschlossen. Die Mutation, die GEFS+ bei dieser Familie verursacht, muss daher ein anderes Gen betreffen, das für eine andere unbekannte Untereinheit des Natriumkanals oder einen anderen Ionenkanal, beziehungsweise eine andere Proteinstruktur kodieren könnte.

4.3 Ausblick

Bei 14 von 16 BFIC Familien deutscher, japanischer und türkischer Abstammung wurde BFIC mittels Kopplungsanalyse auf Chromosom 16p12-q12 kartiert und in eine Region mit einem Ausmaß von 22,5 Mbp eingegrenzt. Ausnahme bleibt Familie BFIC5, bei der alle bekannten Loci ausgeschlossen wurden. Dies weist auf eine genetische Heterogenität hin.

Anhand von genetischen Datenbanken könnte man in dieser Region, wie es oft bei idiopathischen Epilepsien der Fall war, nach Genen suchen, die für Ionenkanäle oder auch für Rezeptoren kodieren. Dies könnte uns auf eine Mutation eines solchen Gens mit entsprechender Dysfunktion des Kanals oder Rezeptors führen und so auf pathophysiologischer Ebene eine Erklärung dieser Syndrome ermöglichen.

Die Entdeckung der am Krankheitsgeschehen beteiligten Gene und deren Mutationen würden unser Verständnis für die Pathomechanismen dieser Syndrome und der Epilepsie erweitern. Gleichzeitig würde dies zu einer zielsicheren Diagnostik und effektiveren Therapie führen.

Weitere, auf unseren Untersuchungen aufbauende Experimente sind notwendig, um diese Region bei BFIC einzugrenzen und das verantwortliche Gen zu identifizieren, wie auch in der Familie mit GEFS+, in der wir alle bekannten und mit der Krankheit in Zusammenhang stehenden Loci ausgeschlossen haben.

5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die genetische Kartierung der Syndrome Benigne Familiäre Infantile Konvulsionen (BFIC) und Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS⁺) bei den jeweiligen Familienkollektiven, die uns zur Verfügung standen. Es sollten die Chromosomen bestimmt werden, auf denen sich die am Krankheitsgeschehen beteiligten Gene befinden. Diese Regionen sollte so gut wie möglich mittels Kopplungsanalyse eingegrenzt werden.

Für BFIC wurden 16 Familien mit insgesamt 200 Individuen untersucht. Aus Deutschland kamen acht Familien, sieben aus Japan und eine aus der Türkei. Für GEFS⁺ stand eine deutsche Familie, bestehend aus fünf Generationen, zur Verfügung.

Bei der Kopplungsanalyse der GEFS⁺ Familie stellte sich heraus, dass für GEFS⁺ eine starke genetische Heterogenität besteht. Bekannte Loci wurden ausgeschlossen. BFIC wurde zu der chromosomalen Region 16p12-q12 gelinkt. Die Mehrzahl der genetischen Defekte bei idiopathischen Epilepsien betreffen Ionenkanäle. Deshalb könnten auch bei diesen Familien Mutationen in Kanälen oder Transportern zugrunde liegen. Weitere Untersuchungen zur Identifikation dieser Gene und deren Mutationen sind von Interesse.

Diese Arbeit könnte langfristig zur Identifikation eines mutierten Gens für BFIC und GEFS⁺ beitragen. Dies würde unser Verständnis für die Pathomechanismen dieser Syndrome und der Epilepsie erweitern. Gleichzeitig würde dies zu einer zielsicheren Diagnostik und effektiveren Therapie beitragen.

6. LITERATURVERZEICHNISS

1. Ahmed CMI, Ware DH, Lee SC (1992) Primary structure, chromosomal localization, and functional expression of a voltage-gated sodium channel from human brain. *Proc Natl Acad Sci USA*;89:8220-8224
2. Alekov AK, Rahman MM, Mitrovic N, Lehmann-Horn F, Lerche H (2000) A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro. *J Physiol (London)*;529:533-539
3. Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F (1999) A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21-q33. *Am J Hum Genet*;65:1078-1085
4. Bennett LB, Roach ES, Bowcock AM (2000) A locus for paroxysmal kinesigenic dyskinesia maps to human chromosome 16. *Neurology*;54:125-130
5. Berger A, Diener W, Stephani E, Schächtele M, Rating D (1997) Benigne frühkindliche Partialepilepsie nach Watanabe. *Epilepsie-Blätter*;10:76-81
6. Berkovic SF, Scheffer IE (2000) Genetics of the epilepsies. *Epilepsia* 2001;42 Suppl 5:16-23
7. Bhatia KP (1999) The paroxysmal dyskinesias. *J Neurol*;246:149-155

8. Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*;279:403-406
9. Burgess DL, Kohrman DC, Galt J (1995) Mutation of a new sodium channel gene, *Scn8a*, in the mouse mutant 'motor endplate disease'. *Nat Genet*;10:461-465
10. Callenbach PM, van den Boogerd EH, de Coo RF, ten Houten R, Oosterwijk JC, Hageman G, Frants RR, Brouwer OF, van den Maagdenberg AM (2005) Refinement of the chromosome 16 locus for benign familial infantile convulsions. *Clin Genet*.; 67:517-525
11. Capovilla G, Beccaria F (2000) Benign partial epilepsy in infancy and early childhood with vertex spikes and waves during sleep: a new epileptic form. *Brain Dev*;22:93-98
12. Caraballo RH, Cersosimo RO, Amartino H, Szeppetowski P, Fejerman N (2002) Benign familial infantile seizures: further delineation of the syndrome. *J Child Neurol*;17:696-699
13. Caraballo RH, Cersosimo RO, Espeche A, Fejerman N (2003) Benign familial and non-familial infantile seizures: a study of 64 patients. *Epileptic Disord*;5:45-49
14. Caraballo R, Pavsek S, Lemainque A (2001) Linkage of benign familial infantile convulsions to chromosome 16p12-q12 suggests allelism to the infantile convulsions and choreoathetosis syndrome. *Am J Hum Genet*; 68:788-794

15. Charlier C, Singh NA, Ryan SG (1998) A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet*;18:53-55
16. Cossette P, Liu L, Brisebois K (2002) Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet*;31:184-189
17. Dib C, Faure S, Fizames C (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*;380:152-154
18. Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Escayg A, Wood PM, Meisler MH, Waxman SG (1999) Coding sequence, genomic organization, and conserved chromosomal localization of the mouse gene *Scn11a* encoding the sodium channel Na_v1.1. *Genomics*;59:309-318
19. Durner M, Keddache MA, Tomasini L (2001) Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type. *Ann Neurol*;49:328-335
20. Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH (2000) Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS⁺2. *Nat Genet*;24:343-345
21. Eubanks J, Srinivasan J, Dinulos MB, Distèche CM, Catterall WA (1997) Structure and chromosomal localization of the beta2 subunit of the human brain sodium channel. *Neuroreport*;8:2775-2779

22. Freitag CM, May TW, Pfafflin M, Konig S, Rating D (2001) Incidence of epilepsies and epileptic syndromes in children and adolescents: a population-based prospective study in Germany. *Epilepsia*;42:979-985
23. Fukuyama Y (1963) Borderland of childhood epilepsy, with special references to febrile convulsions and so-called infantile convulsions. *Seishin Igaku* (Tokyo);5:211- 223
24. Guerrini R, Bonanni P, Nardocci N (1999). Autosomal recessive rolandic epilepsy with paroxysmal exercise-induced dystonia and writer`s cramp: delineation of the syndrome an gene mapping to chromosome 16p12-11.2. *Ann Neurol*;45:344-352
25. Guipponi M, Rivier F, Vigevano F (1997) Linkage mapping of benign familial infantile convulsions (BFIC) to chromosome 19q. *Hum Mol Genet*; 6:473-477
26. Gyapay G, Morissette J, Vignal A (1994) The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet*;7:246-339
27. Haug K, Warnstedt M, Alekov AK (2003) Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet*;33:527-532
28. Hauser WA (1994) The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia*;35 Suppl 2:S1-6
29. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT (1991) Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. *Epilepsia*;32:429-445

30. Heron SE, Crossland KM, Andermann E (2002) Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet*;360:851-852
31. Johnson EW, Dubovsky J, Rich SS (1998) Evidence for a novel gene for familial febrile convulsions, FEB2, linked to chromosome 19p in an extended family from the Midwest. *Hum Molec Genet*;7: 63-67
32. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B (2002) Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet*;30:335-341
33. Kato N, Sadamatsu M, Kikuchi T, Niikawa N, Fukuyama Y (2006) Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis: from first discovery in 1892 to genetic linkage with benign familial infantile convulsions. *Epilepsy Res.* ;70 Suppl 1: S174-84
34. Keranen T, Riekkinen P (1988) Severe epilepsy: diagnostic and epidemiological aspects. *Acta Neurol Scand Suppl*;117: 7-14
35. Klugbauer N, Lacinova L, Flockerzi V, Hofmann F (1995) Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO J*;14:1084-1090
36. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J (1984) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*;81:3443-3446

37. Lee WL, Tay A, Ong HAT, Go LM, Monaco AP, Szeppetowski P (1998) Association of infantile convulsions with paroxysmal dyskinesias (ICCA syndrome): confirmation of linkage to human chromosome 16p12-q12 in a chinese family. *Hum Genet*;103:608-612
38. Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev*;79:1317-1372
39. Lerche H, Biervert C, Alekov AK (1999) A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann Neurol*;46:305-312
40. Lerche H, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2001) Ion channels and epilepsy. *Am J Med Gen (Sem Med Gen)*;106:146-159
41. Litt M, Luty J, Kwak M, Allen L, Magenis RE, Mandel G (1989) Localization of a human brain sodium channel gene (SCN2A) to chromosome 2. *Genomics*;5:204-208
42. Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA (2000) A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *Am J Hum Genet*;66:698-701
43. Makita N, Sloan-Brown K, Weghuis DO, Ropers HH, George AL Jr (1994) Genomic organization and chromosomal assignment of the human voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit gene (SCN1B). *Genomics*;23:628-634

44. Malacarne M, Gennaro E, Madia F (2001) Benign familial infantile convulsions: Mapping of a novel locus on chromosome 2q24 and evidence of genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*; 68:1521-1526
45. Malo MS, Blanchard BJ, Andresen JM (1994) Localization of putative human brain sodium channel gene (SCN1A) to chromosome band 2q24. *Cytogenet Cell Genet*;67:178-186
46. Morgan K, Stevens EB, Shah (2000) $\beta 3$: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA*;97:2308-2313
47. Moulard B, Guipponi M, Chaigne D, Mouthon D, Buresi C, Malafosse A (1999) Identification of a new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS⁺) on chromosome 2q24-q33. *Am J Hum Genet*;65:1396-1400
48. Mrabet H, Belhedi N, Bouchlaka S, El Gaaied A, Mrabet A (2007) GEFS⁺ is not related to the most common mutations of SCN1B, SCN1A and GABRG2 in two Tunisian families. *Neurol Sci.*;28:311-314
49. Nakayama J, Hamano K, Iwasaki N (2000) Significant evidence for linkage of febrile seizures to chromosome 5q14-q15. *Hum Molec Genet*;9: 87-91
50. Neubauer BA, Fiedler B, Himmelein B (1998) Centrotemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14. *Neurology*;51:1608-1612

51. Peiffer A, Thompson J, Charlier C (1999) A locus for febrile seizures (FEB3) maps to chromosome 2q23-24. *Ann Neurol*;46:671-678
52. Plouin P. Benign familial neonatal convulsions. In: Malafosse P, Genton P, Hirsch E, Marescaux C, Broglin D, Bernasconi R (1994) Idiopathic generalised epilepsies: clinical, experimental and genetic aspects. London: John Libbey,: 39-44
53. Rabert DK, Koch BD, Ilnicka M (1998) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel from human dorsal root ganglia, hPN3/SCN10A. *Pain*;78:107-114
54. Roll P, Massacrier A, Pereira S, Robaglia-Schlupp A, Cau P, Szeppetowski P (2002) New human sodium/glucose cotransporter gene (KST1): identification, characterization, and mutation analysis in ICCA (infantile convulsions and choreoathetosis) and BFIC (benign familial infantile convulsions) families. *Gene*;285:141-148
55. Ronen GM, Rosales TO, Connolly M, Anderson VE, Leppert M (1993) Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. *Neurology*;43:1355-1360
56. Rundfeldt C, Netzer R (2000) The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci Lett*;282:73-76
57. Sander T, Schulz H, Saar K (2000) Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum Mol Gene*;9:1465-1472

58. Scheffer IE, Berkovic SF (1997). Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*;120:479-490
59. Selmer KK, Egeland T, Solaas MH, Nakken Ko, Kjieldsen MJ, Friis ML, Brandal K, Corey L, Undlien DE (2007) Genetic screening of Scandinavian families with febrile seizures and epilepsy or GEFS+. *Acta Neurol Scand.* Oct 10
60. Shinnar S, O'Dell C, Berg AT (1999) Distribution of epilepsy syndromes in a cohort of children prospectively monitored from the time of their first unprovoked seizure. *Epilepsia*;40:1378-1383
61. Singh NA, Charlier C, Stauffer D (1998) A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet*;18:25-29
62. Singh R, Scheffer IE, Crossland K, Berkovic SF (1999) Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a common childhood-onset genetic epilepsy syndrome. *Ann Neurol*;45:75-81
63. Staden U, Isaacs E, Boyd SG, Brandl U, Neville BG (1998) Language dysfunction in children with Rolandic epilepsy. *Neuropediatrics*;29:242-248
64. Steinlein OK, Mulley JC, Propping P (1995) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet*;11:201-203

65. Swoboda KJ, Soong BW, McKenna C (2000) Paroxysmal kinesio-genic dyskinesia and infantile convulsions. *Neurology*;55: 224-230
66. Szepietowski P, Rochette J, Berquin P, Piussan C, Lathrop GM, Monaco A (1997) Familial infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis: A new neurological syndrome linked to the pericentromeric region of human chromosome 16. *Am J Hum Genet*; 61:889-898
67. Tomita H, Nagamitsu S, Wakui K (1999) Paroxysmal kinesio-genic choreoathetosis locus maps to chromosome 16p11.2-q12.1. *Am J Hum Genet*; 65:1688-1697
68. Valente EM, Spacey SD, Wali GM (2000) A second paroxysmal kinesio-genic choreoathetosis locus (EKD2) mapping on chromosome 16q13-q22.1 indicates a family of genes which give rise to paroxysmal disorders on human chromosome 16. *Brain*;123:2040-2045
69. Vanmolkot KRJ, Kors EE, Hottenga JJ (2003) Novel mutations in the Na⁺,K⁺-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann Neurol*;54:360-366
70. Vigevano F, Fusco L, Di Capua M, Ricci S, Sebastianelli R, Lucchini P (1992) Benign infantile familial convulsions. *Eur J Pediatr*;151:608-612
71. Wallace RH, Berkovic SF, Howell RA, Sutherland GR, Mulley JC (1996) Suggestion of a major gene for familial febrile convulsions mapping to 8q13-21. *J Med Genet*;33:308-312

72. Wallace RH, Wang DW, Singh R (1998) Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel β 1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet*;19:366-370
73. Watanabe K, Yamamoto N, Negoro T (1987) Benign complex partial epilepsies in infancy. *Pediatr Neurol*;3:208-211
74. Weissenbach J (1993) A second generation linkage map of the human genome based on highly informative microsatellite loci. *Gene*;135:275-278
75. Xiong G, Deng FY, Xiao B, Yang XS, Ning JC, Wu ZG, Wang K, Deng HW (2004) Preliminary linkage analysis of a Chinese family with benign familial infantile convulsion. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.*; 42:424-428
76. Zarrelli MM, Beghi E, Rocca WA, Hauser WA (1999) Incidence of epileptic syndromes in Rochester, Minnesota: 1980-1984. *Epilepsia*;40:1708-1714
77. Zhou XH, Ma AQ, Liu XH, Huang C, Zhang YM, Shi RM (2006) A novel mutation in KCNQ2 gene causes benign familial infantile convulsions (BFIC) in a Chinese family. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.*; 44: 487-491

7. ANHANG

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Karafyllakis
Vorname	Skevos
Geburt	14.07.1976 in Athen

Schulbildung

1982-1984	Grundschule Kalymnos (Griechenland)
1984-1987	Martin-Schaffner-Schule, Ulm
1987-1989	Schiller-Schule, Stuttgart
1989-1991	Gymnasium Kalymnos
1991-1994	Lyzeum Kalymnos
09.06.1994	Allgemeine Hochschulreife, Apolytirio (Griechenland)
01.10.1994	Immatrikulation an der Universität Ulm Studiengang der Humanmedizin

Hochschulausbildung

09/1998	Ärztliche Vorprüfung
03/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2003	1. Tertial des Praktischen Jahres, Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Ulm,
02/2004	2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Universitätsklinikum Ulm,

05/2004 3. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin,
Universitätsklinikum Ulm,

04/2005 Assistenzarzt in Gynäkologie im Universitätsklinikum
Frankfurt am Main

10/2005 – 10/2006 Assistenzarzt in Gynäkologie im Universitätsklinikum
Homburg (Saarland)

Klinische Ausbildung

Seit 02/2007 Assistenzarzt in Gynäkologie und Geburtshilfe im Krankenhaus
Bad Cannstatt (Klinikum Stuttgart)

Veröffentlichung

Juni 2004 **Yvonne G. Weber, Andrea Berger, Nerses Bebek, Sabine
Maier, Skevos Karafyllakes, Nancy Meyer, Yukio Fukuyama**
Benign Familial Infantile Convulsions: Linkage to Chromosome
16p12-12 in 14 Families
Epilepsia/Volume 45, Issue 6, Page 601-609, June 2004

Danksagung

An dieser Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. Lerche für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung während der Tätigkeit im Labor bzw. der Verfassung dieser Arbeit.

Dank gebührt insbesondere Frau Dr. med. Y. Weber für die kompetente Hilfe bei Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente.

Nicht zu vergessen sind alle Mitarbeiter des Zentrums für klinische Forschung der Universität Ulm, sowie alle Mitarbeiter der Abteilung für Angewandte Physiologie der Universität Ulm. Ein freundliches Arbeitsklima und die fachkundige Hilfe zu jeder Zeit erleichterten die Versuche erheblich.