

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktorin: Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein

Molekulargenetische Analysen nikotinischer Acetylcholinrezeptoren  
und assoziierter Interaktionspartner bei Patienten mit Autosomal-  
dominanter nächtlicher Frontallappenepilepsie

**Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Saskia Anneliese Dorothea Hendrich

aus Plauen

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. O. Steinlein
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Dr. B. Feddersen Priv. Doz. Dr. B. Rolf
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. rer. nat. Ch. Schmidt
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	17. 11. 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2007 bis Dezember 2010 im Institut für Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT <sub>3</sub>	5-Hydroxy-Tryptamin-Rezeptor Typ 3/Serotoninrezeptor
α-BgTx	alpha-Bungarotoxin
A	Adenosin
A	Alanin
A	Azetat
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ACZ	Acetazolamid
ADNFLE	Autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie
AS	Aminosäure
bp	base pair
C	Cystein
C	Cytosin
C	Kohlenstoff
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CA3	Cornu ammonis
CBP	Calcium-binding protein
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CBZ	Carbamazepin
Ch	Cholin
<i>CHRNA2</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 2 (neuronal) (Gen)
<i>CHRNA3</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3 (neuronal) (Gen)
<i>CHRNA4</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4 (neuronal) (Gen)
<i>CHRNA5</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5 (neuronal) (Gen)
<i>CHRN2</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 (neuronal) (Gen)
<i>CHRN4</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 4 (neuronal) (Gen)
CRH	corticotropin-releasing hormone
<i>CRH</i>	corticotropin-releasing hormone -Gen
CT	Computertomografie
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalografie
ENW	Episodische nächtliche Wanderattacken
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
F	Phenylalanin
FA	Familienangehörige
FM	Familienmitglieder
G	Glycin
G	Guanin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GCT	Nukleotid bestehend aus Guanin, Cytosin und Thymin
gDNA	genomic Deoxyribonucleic acid
HEK	Human Embryonic Kidney
Hz	Hertz (SI-Einheit der Frequenz)
I	Isoleucin
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie
ins	Insertion
K	Lysin

$K^+$	Kalium
kb	Kilobasenpaare
L	Leucin
m	männlich
M	Methionin
MAF	Minimale Allelfrequenz
MIM	Mendelian inheritance in man
min	Minuten
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MRT	Magnetresonanztomografie
ms	Millisekunde
N	Asparagin
N	Stickstoff
$Na^+$	Natrium
nACh	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
ncr	non-coding region
NCS	Neuronal Calcium Sensor
NFLE	Nächtliche Frontallappenepilepsie
NGS	next generation sequencing
NNGS	next-next generation sequencing
nM	nanomolar
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
NPD	Nächtliche paroxysmale Dystonien
NREM	<i>Non-rapid eye movement</i>
PA	Paroxysmale Aufwachreaktion
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
Phe	Phenylalanin
R	Arginin
RIC3	Resistance to inhibitors of cholinesterase 3 homolog ( <i>C. elegans</i> ) (Protein)
<i>RIC3</i>	Resistance to inhibitors of cholinesterase 3 homolog ( <i>C. elegans</i> ) (Gen)
rs	Reference SNP
S	Serin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSCP	single strand conformation polymorphism
T	Threonin
T	Thymin
TM	Transmembrandomäne
UE	Untereinheit
UTR	untranslated region
UV	unverdaut
V	Valin
VILIP-1	Visinin-like protein 1
VPA	Valproat
VSNL1	Visinin-like protein 1
w	weiblich
Y	Tyrosin

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	<i>Klassifizierung der ADNFLE nach Hirose et al. (Gene Reviews, Update vom 5. April 2010).</i>	<b>S. 11</b>
<b>Tabelle 2</b>	<i>Zusammenfassung bisher detektierter Mutationen und klinischer Daten für ADNFLE- Familien, inkl. Referenzliteratur (Modifiziert nach Steinlein 2011).</i>	<b>S. 22</b>
<b>Tabelle 3</b>	<i>Herkunft und Familienanamnese der untersuchten Patienten.</i>	<b>S. 27-28</b>
<b>Tabelle 4</b>	<i>Primersequenzen für das Gen RIC3.</i>	<b>S. 30</b>
<b>Tabelle 5</b>	<i>Primersequenzen für das Gen VSNL1 (VILIP-1).</i>	<b>S. 31</b>
<b>Tabelle 6</b>	<i>Primersequenzen für das Gen CRH.</i>	<b>S. 31</b>
<b>Tabelle 7</b>	<i>PCR-Bedingungen für das Gen RIC3.</i>	<b>S. 36</b>
<b>Tabelle 8</b>	<i>PCR-Bedingungen für das Gen VSNL1 (VILIP-1).</i>	<b>S. 36</b>
<b>Tabelle 9</b>	<i>PCR-Bedingungen für das CRH-Gen.</i>	<b>S. 37</b>
<b>Tabelle 10</b>	<i>Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das Gen RIC3.</i>	<b>S. 42</b>
<b>Tabelle 11</b>	<i>Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das Gen VSNL1 (VILIP-1).</i>	<b>S. 42</b>
<b>Tabelle 12</b>	<i>Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das CRH-Gen.</i>	<b>S. 42</b>
<b>Tabelle 13</b>	<i>Verwendete Mutageneseprimer und PCR-Bedingungen für die Gene RIC3 und CRH.</i>	<b>S. 43</b>
<b>Tabelle 14</b>	<i>Patientenliste unter Berücksichtigung des Geschlechts, des aktuellen Alters des Manifestationsalters, sowie der Anfallsfrequenz und -dauer falls vorhanden.</i>	<b>S. 45-46</b>
<b>Tabelle 15</b>	<i>Ergebnisse und Validität der SSCP-Analyse.</i>	<b>S. 48-49</b>
<b>Tabelle 16</b>	<i>Detektierte Varianten in RIC3, VSNL1 und CRH im analysierten Patientenkollektiv.</i>	<b>S. 51-52</b>
<b>Tabelle 17</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.-61G&gt;A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 53</b>
<b>Tabelle 18</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.-35G&gt;A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 54</b>
<b>Tabelle 19</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.74A&gt;G unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 55</b>

<b>Tabelle 20</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.354C&gt;A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 56</b>
<b>Tabelle 21</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.362G&gt;C unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 57</b>
<b>Tabelle 22</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.389G&gt;A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 58</b>
<b>Tabelle 23</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.934G&gt;A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 59</b>
<b>Tabelle 24</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.1054G&gt;A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 60</b>
<b>Tabelle 25</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.-390A&gt;C unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 61</b>
<b>Tabelle 26</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.149G&gt;A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 62</b>
<b>Tabelle 27</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die Promotorvariante g.1470C&gt;A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen</i>	<b>S. 64</b>
<b>Tabelle 28</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die Promotorvariante g.1404G&gt;A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen</i>	<b>S. 65</b>
<b>Tabelle 29</b>	<i>Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante g.288A&gt;C unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.</i>	<b>S. 66</b>
<b>Tabelle 30</b>	<i>Gegenüberstellung verschiedener NGS- und NNGS-Verfahren unter Einbeziehung ihrer Funktionsweisen und wirtschaftlicher Aspekte (Shendure and Ji 2008).</i>	<b>S. 70</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** *Dreidimensionale Rekonstruktion des muskulären nAChR (Torpedo) basierend auf dessen elektronenmikroskopischer Struktur (Unwin 2005) modifiziert durch (Albuquerque et al. 2009).* S. 14
- Abbildung 2** *Schema der synaptischen Transmission am Beispiel des neuronalen nAChRs (Modifiziert nach Didaktik Chemie der Universität Bayreuth).* S. 15
- Abbildung 3** *Schematische Repräsentation des nAChRs, eingebettet in die Zellplasmamembran. (high-resolution elektronenmikroskopische Aufnahme)* S. 16
- Abbildung 4** *Putative Transmembraneorganisation der  $\beta 2$ -nAChR-UE (Unwin 1993; Le Novere et al. 1999) mit den im Folgenden beschriebenen Mutationen.* S. 19
- Abbildung 5** *Bisheriges Verständnis der Membrantopologie von RIC3 (Millar 2008).* S. 23
- Abbildung 6** *Strukturelemente des EF-Hand-Motivs (Modifiziert nach Universität Maine, Institut für Chemie).* S. 24
- Abbildung 7** *Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.-61G>A in der nichtkodierenden Region des Gens RIC3.* S. 53
- Abbildung 8** *Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.-35G>A in der nichtkodierenden Region des Gen RIC3.* S. 54
- Abbildung 9** *Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.74A>G in Exon 1 des Gens RIC3.* S. 55
- Abbildung 10** *Bandenmustervariabilität bei Exon 3 des Gens RIC3.* S. 55
- Abbildung 11** *Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.354C>A in Exon 3 des Gens RIC3.* S. 56
- Abbildung 12** *Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.362G>C in Exon 3 des Gens RIC3.* S. 57
- Abbildung 13** *Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.389G>A in Exon 3 des Gens RIC3.* S. 57
- Abbildung 14** *Sequenzierungsausschnitt von einer Kontrollperson mit der Variante c.403C>T im Exon 3 des Gens RIC3.* S. 58
- Abbildung 15** *Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.934G>A in Exon 6 des Gens RIC3.* S. 58
- Abbildung 16** *Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.1054G>A in Exon 6 des Gens RIC3.* S. 59



<b>Abbildung 17</b>	<i>Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.1007+149C&gt;G in der 3'-UTR des Gens RIC3.</i>	<b>S. 60</b>
<b>Abbildung 18</b>	<i>Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.-390A&gt;C in der 5'UTR-Region des Gens VSNL1.</i>	<b>S. 61</b>
<b>Abbildung 19</b>	<i>Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für c.149G&gt;A in der 5'UTR-Region des Gens VSNL1.</i>	<b>S. 61</b>
<b>Abbildung 20</b>	<i>Auffälliges SSCP-Muster bei Patient A104, repräsentativ für sieben weitere Patienten.</i>	<b>S. 62</b>
<b>Abbildung 21</b>	<i>Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für einen Mikrosatellit in der 3'-UTR des Gens VSNL1.</i>	<b>S. 63</b>
<b>Abbildung 22</b>	<i>Restriktionsverdau mit SrfI zur Detektion der Promotorvariante g.-1470C&gt;A im Patientenkollektiv.</i>	<b>S. 64</b>
<b>Abbildung 23</b>	<i>Bestätigung der Promotorvariante g.-1404G&gt;A mittels direkter Sequenzierung bei Patient A60.</i>	<b>S. 65</b>
<b>Abbildung 24</b>	<i>Restriktionsverdau mit SrfI für Familie des Indexpatienten A60 zur Überprüfung der Promotorvarianten g.-1404G&gt;A und g.-1470C&gt;A.</i>	<b>S. 65</b>
<b>Abbildung 25</b>	<i>Sequenzierungs- und SSCP-Ergebnis für g.288A&gt;C in Exon 2 des Gens CRH.</i>	<b>S. 66</b>
<b>Abbildung 26</b>	<i>Vergleichende schematische Darstellung verschiedener NGS- und NNGS-Verfahren (MacLean et al. 2009).</i>	<b>S. 70</b>
<b>Abbildung 27</b>	<i>Schematische Darstellung des groben Ablaufs einer MLPA.</i>	<b>S. 71</b>
<b>Abbildung 28</b>	<i>Vergleichende schematische Darstellung des Ablaufs zweier SNP-Array-Technologien (LaFramboise 2009).</i>	<b>S. 72</b>
<b>Abbildung 29</b>	<i>Verteilung des Nukleotidaustausches g.-1404G&gt;A in der Promotorregion des Gens CRH bei Familie A60.</i>	<b>S. 80</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

**TABELLENVERZEICHNIS**

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

**I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG ..... 1**

**II. GRUNDLAGEN ..... 3**

1. DEFINITIONEN ..... 3

    1.1 *Epilepsie* ..... 3

    1.2 *Genetische Variante* ..... 3

    1.3 *Polymorphismus vs. Mutation* ..... 3

        1.3.1 *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)* ..... 3

2. KRANKHEITSBILD UND GENETIK DER AUTOSOMAL-DOMINANTEN NÄCHTLICHEN FRONTALLAPPENEPILEPSIE ..... 3

    2.1 *Häufigkeit* ..... 4

    2.2 *Klinik* ..... 4

    2.3 *Diagnose* ..... 5

    2.4 *Metaphylaxe und Therapie* ..... 7

    2.5 *Klassifikation* ..... 9

    2.6 *Manifestationsalter* ..... 11

3. MOLEKULARBIOLOGIE DES NIKOTINISCHEN ACETYLCHOLINREZEPTORS ..... 11

    3.1 *Subtypen* ..... 12

    3.2 *Morphologie und Struktur* ..... 13

    3.3 *Rezeptorfunktion* ..... 15

    3.4 *Genetik des nikotinischen neuronalen Acetylcholinrezeptors* ..... 16

        3.4.1 *CHRNA4-Gen* ..... 16

        3.4.2 *CHRNA2-Gen* ..... 19

        3.4.3 *CHRNB2-Gen* ..... 20

        3.4.4 *CRH-Gen* ..... 21

    3.5 *Weitere Kandidatengene* ..... 23

        3.5.1 *RIC3-Gen* ..... 23

        3.5.2 *VSNL1 (VILIP-1)-Gen* ..... 24

**III. MATERIAL UND METHODEN ..... 27**

1. MATERIAL ..... 27

    1.1 *Patientenkollektiv* ..... 27

    1.2 *Elektrische Geräte und Arbeitsutensilien* ..... 28

    1.3 *Chemikalien* ..... 30

    1.4 *Primer* ..... 30

    1.5 *Feinchemikalien und Enzyme* ..... 31

2. METHODEN ..... 32

    2.1 *DNA-Isolation* ..... 32

        2.1.1 *Salzfällung* ..... 32

        2.1.2 *Konzentrationsbestimmung* ..... 33

    2.2 *Polymerase Chain Reaction (PCR)* ..... 33

    2.3 *Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte* ..... 37

        2.3.1 *Agarosegele* ..... 37

2.3.2	Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele) .....	38
2.3.2.1	Single-Strand-Conformation-Polymorphism Analysis (SSCP/SSCA) .....	39
2.3.2.2	Detektion der Fragmente mithilfe der Silberfärbung .....	40
2.4	<i>Direkter Mutationsnachweis</i> .....	41
2.4.1	Restriktionsverdau .....	41
2.4.1.1	Mutageneseprimer .....	43
2.4.2	Direkte Sequenzierung nach Sanger .....	44
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>45</b>
1.	PROBENAUFARBEITUNG .....	47
2.	ETABLIERUNG DER PCR-BEDINGUNGEN .....	47
3.	METHODEN DES MUTATIONSSCREENINGS .....	47
3.1	<i>SSCP-Analyse</i> .....	47
3.2	<i>Direkter Mutationsnachweis mittels Restriktionsverdau</i> .....	50
3.3	<i>Direkter Mutationsnachweis mittels Sequenzierung</i> .....	50
4.	ERGEBNISSE DES MUTATIONSSCREENINGS .....	50
4.1	<i>Detektion von Mutationen im Gen RIC3</i> .....	53
4.1.1	c.-61G>A, ncr .....	53
4.1.2	c.-35G>A, ncr .....	54
4.1.3	K25R (c.74A>G), Exon 1 .....	54
4.1.4	Polymorphismen in Exon 3 des Gens <i>RIC3</i> .....	55
4.1.4.1	L118L (c.354C>A) .....	56
4.1.4.2	G121A (c.362G>C) .....	56
4.1.4.3	C130Y (c.389G>A) .....	57
4.1.4.4	P135S (c.403C>T) .....	58
4.1.5	D311N (c.934G>A), Exon 6 .....	58
4.1.6	D351N (c.1054G>A), Exon 6 .....	59
4.1.7	c.1007+149C>G, 3'-UTR .....	60
4.2	<i>Detektion von Mutationen im Gen VSNLI/VILIP1</i> .....	60
4.2.1	c.-390A>C, 5'UTR .....	60
4.2.2	c.149G>A, 5'UTR .....	61
4.2.3	Auffällige SSCP-Ergebnisse in Exon 3 des Gens <i>VSNLI</i> .....	62
4.2.4	Mikrosatellit in der 3'-UTR .....	62
4.3	<i>Detektion von Mutationen im Gen CRH</i> .....	63
4.3.1	g.-1470C>A, Promotorregion .....	63
4.3.2	g.-1404G>A, Promotorregion .....	64
4.3.3	g.-1166G>C, Promotorregion .....	65
4.3.4	G96G (g.288A>C), Exon 2 .....	66
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>67</b>
1.	VALIDITÄT DER ANGEWANDTEN METHODEN .....	67
1.1	<i>PCR</i> .....	67
1.2	<i>SSCP</i> .....	67
1.3	<i>Restriktionsverdau</i> .....	68
1.4	<i>Aktuelle methodische Fortschritte</i> .....	68
2.	ERGEBNISSE DES MUTATIONSSCREENINGS .....	72
3.	DISKUSSION DER DETEKTIERTEN GENETISCHEN VARIANTEN .....	73
3.1	<i>Polymorphismen im Gen RIC3</i> .....	73

3.1.1	c.-61G>A, ncr.....	73
3.1.2	c.-35G>A, ncr.....	74
3.1.3	K25R (c.74A>G), Exon 1 .....	74
3.1.4	Polymorphismen in Exon 3 des Gens <i>RIC3</i> .....	75
3.1.4.1	L118L (c.354C>A), Exon 3 .....	75
3.1.4.2	G121A (c.362G>C), Exon 3.....	75
3.1.4.3	C130Y (c.389G>C), Exon 3.....	76
3.1.4.4	P135S (c.403C>T), Exon 3 .....	76
3.1.5	D311N (c.934G>A), Exon 6 .....	76
3.1.6	D351N (c.1054G>A), Exon 6 .....	77
3.1.7	c.1007+149C>G, 3'-UTR .....	77
3.2	<i>Polymorphismen im Gen VSNI1/VILIP1</i> .....	77
3.2.1	c.-390A>C, 5'UTR.....	77
3.2.2	c.149G>A, 5'UTR.....	78
3.3	<i>Polymorphismen im Gen CRH</i> .....	78
3.3.1	g.-1470C>A, Promotorregion .....	78
3.3.2	g.-1404G>A, Promotorregion .....	79
3.3.3	g.-1166G>C, Promotorregion .....	81
3.3.4	G96G (g.-288A>C), Exon 2 .....	81
4.	AUSBLICK.....	82
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>83</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>86</b>
1.	ZITIERTE LITERATUR.....	86
2.	INTERNETQUELLEN.....	93
3.	INTERNETTOOLS .....	93
4.	VERÖFFENTLICHUNGEN (KONGRESSBEITRAG) .....	93

**DANKSAGUNG**

## I. Einleitung und Fragestellung

Die Autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie (ADNFLE) umschreibt ein erbliches, idiopathisches Epilepsiesyndrom, das entweder sporadisch, aufgrund einer Neumutation oder durch eine in der Familie bereits vorhandene Mutation in Genen, welche für Untereinheiten des neuronalen, nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) kodieren, auftritt (Scheffer et al. 1994; Steinlein et al. 1995).

Sie stellt eine sehr seltene Erkrankung des epileptischen Formenkreises dar und manifestiert sich häufig in den ersten beiden Lebensdekaden mit Clustern nächtlicher, motorischer Anfälle, die dem Frontallappen entspringen. Derartige Episoden zeichnen sich durch einen kurzen, stereotypischen Verlauf aus und variieren von einfachen Weckreaktionen während des Schlafes bis hin zu dramatischen, bizarren, hyperkinetischen Ereignissen mit tonischen oder dystonischen Elementen. Die Minderheit der Patienten beschreibt eine vorausgehende Aura (Scheffer et al. 1995; Provini et al. 1999).

Krankheitsverursachend sind Mutationen in Untereinheiten des nAChRs, die vermutlich zu einer erhöhten Sensitivität für agonistische Liganden führen. Bisher identifizierten Forscher in weltweit mehreren Familien Mutationen in Genen, welche in der Expressierung eines veränderten  $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs resultieren. Dieser Rezeptortyp gehört zu den im menschlichen Gehirn dominierenden. Die mutierten Untereinheiten  $\alpha 4$  und  $\beta 2$  können allerdings auch mit weiteren Untereinheiten funktionelle Rezeptoren bilden. Deshalb ist es möglich, dass auch seltener vorkommende nAChR-Subtypen an der Entstehung der ADNFLE beteiligt sind.

Für einige Mutationen im  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR ergab sich in funktionellen Studien eine reduzierte Kalzium-permeabilität, eine veränderte Desensibilisierungsdauer oder Offenwahrscheinlichkeit des Ionenkanals im nAChR (Steinlein et al. 1995; Steinlein et al. 1997; Hirose et al. 1999; Phillips et al. 2001; Leniger et al. 2003; Diaz-Otero et al. 2008; El Helou et al. 2008; Chen et al. 2009).

Molekulargenetischen Analysen zufolge können bisher diverse Mutationen in den Genen *CHRNA4*, *CHRNA2* und möglicherweise auch *CHRNB2* zur Krankheitsentstehung beitragen. Hierbei erfolgt die Vererbung autosomal-dominant. Die Penetranz weist eine erhebliche Spannweite auf und lässt die Beteiligung anderer, modifizierender Gene vermuten. Die Mutationsdetektionsrate ist gering, was darauf hinweist, dass die erblichen Formen bei den Frontallappenepilepsien insgesamt nur einen kleinen Teil ausmachen.

Combi et al. beschrieben zudem einen Zusammenhang zwischen Varianten im *CRH* (*corticotropin-releasing hormone*-) Gen und der Erkrankung ADNFLE, welcher möglicherweise auf den mit der

Kortisolausschüttung assoziierten Wirkungen auf den Schlafrhythmus, sowie Angst- und Stressreaktionen beruht (Combi et al. 2004; Combi et al. 2005).

Aufgrund der klinischen Variabilität, der reduzierten Penetranz sowie des fehlenden Nachweises von Mutationen in den bekannten ADNFLE-Genen bei vielen familiären und den meisten sporadischen Fällen von nächtlicher Frontallappenepilepsie, vermuten wir weitere Gene bzw. Umweltfaktoren, welche die Pathogenese beeinflussen können.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautete daher, inwieweit sich verschiedene Mutationen bzw. Polymorphismen in ausgewählten Kandidatengenen an der Pathogenese und Ausprägung der ADNFLE beteiligen.

Das Patientenkollektiv, bestehend aus 68-70 Individuen unterschiedlicher Herkunft, wurde auf Mutationen bzw. Polymorphismen in den Kandidatengenen *RIC3* (*resistance to inhibitors of cholinesterase 3 homolog (C. elegans)*) und *VSNL1* (*VILIP-1; visinin-like protein-1*) überprüft. Desweiteren analysierten wir den Promotorbereich und die kodierende Region des *CRH*-Gens, um die von Combi und Kollegen bereits detektierten Polymorphismen sowie neue Varianten auch in unserem Kollektiv nachzuweisen (Combi et al. 2008).

Das Kandidatengen *RIC3* verstärkt die Oberflächenexpression sowohl homomerer, als auch heteromerer nAChR in Säugerzellen. In *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *RIC3*-Gen in einer intrazellulären Akkumulation von nAChR-Proteinen resultieren.

Die Koexpression von *VSNL1* mit rekombinantem  $\alpha\beta 2$ -nAChR führte in *tsA201*-Zellen zur Hochregulierung der Oberflächenexpression des Rezeptors um das Zweifache. Die Agonisten-Sensitivität gegenüber Acetylcholin erhöhte sich dreifach. Mutanten hingegen zeigten eine abgeschwächte Wirkung.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden die zu untersuchenden DNA-Sequenzen unter Anwendung eines Touchdown-PCR-Protokolls amplifiziert und ein Screeningverfahren zur Detektion von Mutationen und Polymorphismen etabliert. Bereits identifizierte Varianten wurden mittels direkter Sequenzierung exakter analysiert.

Um mögliche Assoziationen zwischen den entdeckten Polymorphismen und den klinischen Phänotypen zu erfassen, wurden unter Anwendung verschiedener Restriktionsassays die Frequenzen der Polymorphismen im vorhandenen ADNFLE-Kollektiv ermittelt und mit denen eines deutschen Kontrollkollektivs verglichen.

## II. Grundlagen

### 1. Definitionen

#### 1.1 Epilepsie

“A seizure is a sudden alteration of electrical activity in the brain of sufficient magnitude to alter motor or sensory function, behavior, or consciousness. Epilepsy is a chronic disorder characterized by recurrent seizures. An epileptic syndrome is a constellation of seizures, EEG patterns, family histories, and age-specific characteristics sufficient to produce a reproducible and recognizable seizure pattern with predictable outcome.” (Freeman 1995)

#### 1.2 Genetische Variante

Der verallgemeinernde Begriff „genetische Variante“ wird in dieser Arbeit, bei Unklarheit hinsichtlich der Einordnung eines Nukleotidaustausches als Polymorphismus bzw. Mutation verwendet.

#### 1.3 Polymorphismus vs. Mutation

Als Polymorphismus (griechisch πολυμορφισμός *Polymorphimos*, Vielgestaltigkeit) bezeichnet man im Fachgebiet Genetik das Auftreten einer oder mehrerer Genvarianten, d. h. eines oder mehrerer Allele innerhalb einer Population. Definitionsgemäß muss die Auftrittshäufigkeit der Genvariante (Allelfrequenz) größer als ein Prozent sein, andernfalls wird von einer Mutation gesprochen (Groth 2004). Da diese allerdings nicht krankheitsverursachend sein müssen, wird immer häufiger auch der Begriff „rare variants“ verwendet. Diese können entweder funktionell sein oder hinsichtlich der Funktion von Genen keine Rolle spielen.

##### 1.3.1 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Mit Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) werden Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang bezeichnet (DNA BASER).

### 2. Krankheitsbild und Genetik der Autosomal-dominanten nächtlichen Frontallappenepilepsie

Die Autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie (OMIM 600513, 603204, 605375, 610353) als eine seltene, häufig erblich bedingte Erkrankung des epileptischen Formenkreises, führt zu idiopathischen, partiellen Anfällen, welche bevorzugt im Kindes- oder jungen Erwachsenenalter beginnen und dem Frontallappen entspringen (Scheffer et al. 1994; Scheffer et al. 1995). Diese zeichnen sich durch ein vorwiegend nächtliches Auftreten während der NREM-Schlafphase aus (Oldani et al. 1996). Veröffentlichungen der vergangenen Jahre zeigen eine enge Korrelation von

Krankheitsentstehung und Mutationen in Genen, welche für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR) kodieren und sehr wahrscheinlich eine Funktionsänderung des ligandengesteuerten Rezeptors hervorrufen (Steinlein et al. 1995). Bisher konnten Defekte des  $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptors als krankheitsverursachend ermittelt werden. Dieser Rezeptor ist ein heteropentamerer, ligandengesteuerter Ionenkanal und wird von den Genen *CHRNA4* für die  $\alpha 4$ - und *CHRNA2* für die  $\beta 2$ -Untereinheit kodiert (Diaz-Otero et al. 2008). Das *CHRNA2*-Gen, welches möglicherweise ebenfalls ADNFLE verursacht, kodiert für die  $\alpha 2$ -Untereinheit des nAChR (Aridon et al. 2006).

Bei vielen Familien konnten keine Mutationen in den vorher genannten Genen nachgewiesen werden. Phillips et al. beschrieben einen weiteren Genlocus - die Chromosomenregion 15q24, in welcher sich die Gene *CHRNA3*, *CHRNA5* und *CHRNA4* befinden. Bisher konnten allerdings noch keine ADNFLE-Mutationen in einem dieser Gene nachgewiesen werden (Phillips et al. 1998). Combi und Kollegen identifizierten zwei Promotorvarianten im *CRH*-Gen und postulierten einen wissenschaftlichen Zusammenhang hinsichtlich der Molekularbiologie der ADNFLE (Combi et al. 2008). Hierfür bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, da bisher nur ein Kollektiv analysiert wurde.

## 2.1 Häufigkeit

Etwa 10 % aller Menschen weisen eine erhöhte Krampfbereitschaft, welche sich teilweise im EEG nachweisen lässt, auf. 4 – 5 % aller Menschen erleiden mindestens einmal in ihrem Leben unter besonderen Einwirkungen einen epileptischen Anfall, der sich ohne Provokation nicht reproduzieren lässt. Von derartigen Gelegenheitskrämpfen unterscheidet man eine aktive Epilepsie, auch fortschreitendes Krampfleiden genannt, worunter in Deutschland 0,5–1 % der Bevölkerung leiden (Baumgartner 2001).

Die NFLE ist kein homogenes epileptisches Syndrom. Es gibt symptomatische und genetische Formen. Die Rate der familiären Form der ADNFLE variiert, abhängig vom Patientenkollektiv, zwischen 8 und 43 Prozent (Ryvlin et al. 2006). Circa 80 % der betroffenen Individuen entwickeln die Erkrankung in den ersten beiden Lebensdekaden (Oldani et al. 1998; Picard et al. 2000). Aufgrund der Untersuchung nur kleiner Patientengruppen, lässt sich in der Literatur keine genaue Angabe zur Frequenz der ADNFLE finden. Man weiß allerdings, dass es sich hierbei um eine sehr seltene Form der schlafgebundenen Störungen handelt. Männer erkranken mit einer Frequenz von 7:3 häufiger als Frauen. Befragte, bisher nicht therapierte Patienten einer Studie siedelten die Anfallshäufigkeit pro Monat zwischen neun und 31, pro Nacht bei einer bis 20 Episoden an (Provini et al. 1999).

## 2.2 Klinik

Die Klinik der ADNFLE kennzeichnet sich durch vorwiegend nächtliche, idiopathische und partielle Anfälle, welche zwischen fünf Sekunden bis fünf Minuten andauern und mit Dystonien (choreatiform



und ballistisch), Dyskinesien, sowie tonischen Bewegungen der Arme, Beine und des Rumpfes, die vorwiegend stereotyp ablaufen, einhergehen (Oldani et al. 1996; Thomas et al. 1998; Nakken et al. 1999; Provini et al. 1999; Ito et al. 2000; Picard et al. 2000). Derartigen Episoden können eine Aura und Vokalisation vorangehen. Sie treten häufig im Stadium II, aber auch in den Stadien III und IV des NREM-Schlafes auf. Als Folge des fragmentierten Schlafes kann es zu einer erhöhten Tagesmüdigkeit kommen. Ein Großteil der Patienten verliert das Bewusstsein nicht, scheint dennoch das pathologische Geschehen nicht kontrollieren bzw. durchbrechen zu können. Es besteht die Möglichkeit der sekundären Generalisierung. Ein kleiner Teil der von der ADNFLE Betroffenen erleiden auch tagsüber auftretende Anfälle (Scheffer et al. 1995).

Magnusson und Kollegen beschrieben ein häufigeres Auftreten psychiatrischer Symptome in einer erkrankten Familie (Magnusson et al. 2003). Auch mentale Retardierung und intellektuelle Defizite können als mögliche Konsequenz hochfrequenter Anfälle nicht ausgeschlossen werden (Cho et al. 2003; Picard et al. 2009). Die Evaluation eventueller, kognitiver Störungen bedarf jedoch weiterer neuropsychologischer Analysen.

### 2.3 Diagnose

Die adäquate Diagnose der nächtlichen Frontallappenepilepsie (NFLE) fällt, aufgrund einer lückenhaften Familien- und Eigenanamnese, oft schwer. Eine Fremdanamnese ist hierbei immer erforderlich. Um Differentialdiagnosen wie z. B. benigne nächtliche Parasomnien oder psychogene Pseudoanfälle auszuschließen, bedient sich der Kliniker neben einer fundierten, neurologisch orientierten, körperlichen Untersuchung, der Bildgebungsverfahren wie MRT- und CT-Analysen des Kopfes, der Elektro- und Stereoenzephalografie, sowie der Video-Polysomnografie (Provini et al. 1999; Picard et al. 2000). Die Magnetresonanztomografie unterstützt nur selten die Arbeitsdiagnose ADNFLE. Nur in einigen Patienten aus verschiedenen Familien zeigten sich Atrophien oder noch seltener Zysten in Hirnarealen, welche in keinem Zusammenhang mit den klinischen Symptomen standen (Callenbach et al. 2003; Ryvlin et al. 2006). Das nuklearmedizinische PET-Verfahren stellt eine ergänzende Diagnostikmethode dar. PET-Untersuchungen unter Verwendung des Tracers [18F]-A-85380 veranschaulichten bei fünf Patienten eine erhöhte AChR-Dichte in Epithalamus, ventralem Mesencephalon und Zerebellum, aber eine verminderte Dichte im rechten dorsolateralen, präfrontalen Areal. Picard et al. demonstrierten mit dieser Arbeit die Umverteilung und quantitative Veränderung der nAChR bei Mutationsträgern (Picard 2006). In einem weiteren Erkrankten entdeckte man einen links mesiofrontal akzentuierten, herabgesetzten Stoffwechsel (Ryvlin et al. 2006).

Bezüglich der Untersuchung mittels EEG ließen sich in 50 % der ADNFLE-Patienten keine interiktalen Anomalien nachweisen. Ein Großteil iktaler Messungen verliert, aufgrund bewegungsassoziiertes Artefakte, bedingt durch den Beginn des Anfalls, an diagnostischem Gehalt und liefert somit häufig keine aussagekräftige Information. Artefaktfreie Aufnahmen von einigen Untersuchten wiesen allerdings auf den frontalen Ursprung und das Auftreten der neurologischen Symptome

vorwiegend im Stadium II des NREM-Schlafes hin (Marini and Guerrini 2007). K-Komplexe, langsame <1 Hz-Oszillationen mit kortikalem Ursprung und positivem Ausschlag bei 350-550 ms, sowie einem negativen Ausschlag bei 900 ms und Schlafspindeln, 11-15Hz-Oszillationen, generiert vom retikulären Kern des Thalamus, dominieren in dieser Phase des Schlafrhythmus (Parrino et al. 2006; Cash et al. 2009). Intrazerebrale EEG-Messungen zeigten ein verlängertes Auftreten von Schlafspindeln kurz vor Anfallsbeginn bei zwei Patienten, welches auf eine anormale Spindelaktivität hinwies (Picard et al. 2007). K-Komplexe entstehen zufällig während des zweiten Schlafstadiums und können durch Geräusche initiiert werden. Sie dienen der Unterdrückung kortikaler Aktivität und des Erwachens, um das Gehirn weiterhin im Schlafmodus zu belassen und es vor harmlosen Stimuli abzuschirmen (Cash et al. 2009). El Helou et al. untersuchten einen Patienten mit einer bekannten *CHRNA4*-Mutation, dessen Anfälle größtenteils mit K-Komplexen im EEG einhergingen. Hierbei fielen die Episoden zeitlich auf die abklingenden K-Komplexe (El Helou et al. 2008). Diese Erkenntnis stützt die Vermutung, dass K-Komplexe im ictalen EEG, neben den für die Epilepsie typischen Mustern wie „spikes und waves“, sowie rhythmischen Theta-Wellen, eine entscheidende Rolle in der Anfallsinitiierung spielen (Provini et al. 1999; Picard et al. 2000). Die elektrophysiologische Diagnostik bedarf in manchen Fällen der Einbeziehung anderer Entstehungsursprünge und die Anwendung zusätzlicher Elektroden zur besseren Ermittlung der Anfallspathogenese.

Bei Verdacht auf eine der Mendel'schen Vererbung folgenden Mutation in einem der krankheitsverursachenden Gene *CHRNA2*, *CHRNA4* oder *CHRNA2* kann die molekulargenetische Testung mittels Sequenzanalyse herangezogen werden. Diese ermittelt allerdings nur in 10-20 % der Betroffenen mit positiver Familienanamnese und in weniger als 5 % jener ohne familiären Hintergrund eine ursächliche Mutation (Hirose et Kurahashi, gene reviews NCBI).

Zusammenfassend folgen im Anschluss klinische Diagnosekriterien der ADNFLE (Hayman et al. 1997; Tassinari CA 1997; Provini et al. 1999; Tenchini et al. 1999; Steinlein et al. 2000; Combi et al. 2004):

- Cluster von vorwiegend nächtlichen Anfällen mit frontaler Semiologie
- Auftreten von Anfällen bevorzugt während des Schlafes
- Abwesenheit anderer neurologischer Symptome
- Physiologische Radiologiebefunde
- Physiologisches bzw. nur durch Bewegungsartefakte verändertes, ictales EEG
- Interiktales EEG mit unregelmäßigen, epileptiformen Ableitungen
- Auftreten ähnlicher Störungen bei einem anderen Familienmitglied mit Evidenz für einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus

Die Diagnose der ADNFLE begründet sich demzufolge auf den genannten klinischen Kriterien und/oder dem Nachweis einer krankheitsverursachenden Genmutation in *CHRNA2*, *CHRNA4* oder *CHRNB2*.

## 2.4 Metaphylaxe und Therapie

Etwa 70 % der ADNFLE-Patienten sprechen auf eine antikonvulsive Therapie, welche sowohl die Frequenz, als auch den Schweregrad der Anfälle mindert, an. Einige Betroffene erreichen sogar Anfallsfreiheit (Sutor and Zolles 2001). Eines der am häufigsten eingesetzten Medikamente stellt Carbamazepin (CBZ), aber auch sein Abkömmling Oxacarbazepin, dar (Di Resta et al. 2010). Weitere Anwendung zur Verbesserung der Anfallskontrolle findet z. B. Acetazolamid (ACZ), ein Carboanhydrasehemmer, welcher normalerweise zur Senkung des Augen-, Hirn und Blutdruckes eingesetzt wird (Varadkar et al. 2003). Valproat (VPA), das erregende Ionenkanäle blockiert und eine Wirkungssteigerung des hemmenden Neurotransmitters GABA durch Hemmung des Abbaus und Aktivierung von dessen Synthese erzielt, scheint ineffektiv (Picard et al. 1999). Erst im August 2010 belegten Zheng et al. in einer weiteren Studie den therapeutischen Effekt von Lamotrigin hinsichtlich mutierter  $\alpha 4\beta 2$ -AChR. Lamotrigin inhibiert den Rezeptor hierbei durch eine Offen-Kanal-Blockierung (Zheng et al. 2010). Auch Nikotin als nAChR-Agonist und Cannabinoide, welche die präsynaptische GABA-Freisetzung reduzieren oder sogar inhibieren, könnten in Zukunft eine Rolle in der Behandlung von ADNFLE-Patienten spielen (Mann and Mody 2008). Im Folgenden wird auf die bisher wichtigsten, therapeutischen Substanzen eingegangen.

CBZ agiert als Natriumkanalblocker durch die Herabsetzung der Aktionspotentialfrequenz. Eine zusätzliche Funktion erfüllt dieses Antikonvulsivum an Kalziumkanälen, NMDA-, GABA- und nACh-Rezeptoren. Letztere inhibiert es mittels nichtkompetitiver Hemmung. CBZ ermöglicht eine dreifach, in anderen Studien eine bis zu 12fach stärkere Hemmung 776ins3- oder S248F-mutierter  $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptoren (Picard et al. 1999). Die erhöhte Inhibitionsfähigkeit bei S248F-Mutanten erklärt sich durch eine Zunahme möglicher Bindungsstellen in dem mutierten Ionenkanal. Durch genaue Analyse ihres molekularen Modells unterstellen die Wissenschaftler, dass dieser Effekt aus einer aromatisch-aromatisch-Interaktion zwischen CBZ und dem mutierten Phe248-Nukleotid resultiert (Ortells and Barrantes 2002). Die stärkere Rezeptorenhemmung lässt auf eine effektivere Behandlungsmöglichkeit bei Trägern hypersensitiver nAChR schließen, doch weiß man bisher nicht, ob dieses Modell auch auf humane nAChR angewendet werden kann. Bisher findet man in der Literatur nur den Nachweis für eine höhere CBZ-Ansprechrates bei zwei Mutationen, was mit der Beobachtung vereinbar ist, dass die CBZ-Therapie bei Trägern anderer Mutationen versagt.

Nikotin, in niedriger Dosierung, könnte sich als eine neue Therapieoption für an ADNFLE Erkrankte mit bestimmten Mutationen etablieren. Beobachtungen eines Patienten demonstrierten einen deutlichen Rückgang der Anfälle nach Administration eines dermalen Nikotinplasters (Willoughby et al.

2003). Brodtkorb und Picard untersuchten 22 weitere Individuen aus zwei Familien mit den  $\alpha$ -Mutationen 776ins3 bzw. S248F, deren Anfallsfrequenz signifikant mit dem Nikotinkonsum korrelierte. Zehn von 14 Tabakkonsumenten erlangten Anfallsfreiheit, während sieben Nichtraucher schwerwiegendere, häufiger auftretende Episoden angaben. Die Raucher, welche keine Symptomverbesserung verspürten, konsumierten zu dieser Zeit eine geringere Dosis an Nikotin. Drei weitere Betroffene äußerten Fluktuationen, bedingt durch einen veränderten Nikotingebrauch. Sie bemerkten sogar eine deutliche Verschlechterung nach Aufgabe des Rauchens. Diese Ergebnisse interpretierten die Autoren dahingehend, dass Nikotin eine entscheidende Rolle als modulierender Umweltfaktor hinsichtlich einer positiven Krankheitsbeeinflussung spielt (Brodtkorb and Picard 2006). Weitere Studien veranschaulichen, dass die Applikation von niedrigen Dosen Nikotin (10 nM) eine effektive Desensitivierung von  $\alpha$ 4 $\beta$ 2-nAChR verursacht. Man transfizierte  $\alpha$ 4- und  $\beta$ 2-Untereinheiten in *HEK*-Zellen, nahm daraufhin elektrophysiologische Messungen an einer -100 mV-Voltage-clamp während der Applikation von Nikotin oder ACh vor und zeigte somit, dass prolongierte Zugabe von Nikotin den Rezeptor effizienter desensitiviert als ACh. Zudem war die benötigte Regenerationszeit nach Nikotin-induzierter Desensitivierung länger als nach der gegenübergestellten Desensitivierung durch Acetylcholin. Nach dem Genuss einer Zigarette erreicht das Nikotinlevel im zentralen Nervensystem 100 nM. Diese Menge genügt um eine Desensitivierung auszulösen (Paradiso and Steinbach 2003). Aufgrund der mit dem Tabakkonsum assoziierten Nebenwirkungen, empfiehlt sich in der therapeutischen Anwendung eventuell nur die transdermale Applikation. Die Erforschung des exakten Nebenwirkungsprofils bedarf weiterer molekularbiologischer und klinischer Untersuchungen. Insbesondere ist hierbei zu berücksichtigen, dass der oben beschriebene Effekt von Nikotin nur bei bestimmten Mutationen auftritt. Andere Mutationen hingegen zeigten einen gegenteiligen Mechanismus, so dass Nikotin bei Trägern solcher Genveränderungen möglicherweise sogar epileptogen wirken könnte.

Obwohl die nächtliche Frontallappenepilepsie zu den benignen Störungen zählt, reagieren 30 % der erkrankten Individuen nicht auf eine medikamentöse Therapie (Provini et al. 1999). In diesen Fällen verbleibt häufig nur die chirurgische Resektion des betroffenen Hirnareals. Nobili et al. erreichten in einer chirurgischen Studie bei 76 % der 21 operativ versorgten Patienten eine Remission (Engel's Class Ia), bei 24 % bewirkte man eine deutliche Verbesserung der Symptomatik (Engel's Class II oder III). Den hier beschriebenen Heilungserfolg führen die Autoren auf eine hohe Inzidenz von fokalen, kortikalen Dysplasien Typ Taylor bei den Operierten zurück (Nobili et al. 2007). Einen günstigeren Verlauf bei Vorhandensein dieser Prädisposition postulieren auch Tassi und Kollegen (Tassi et al. 2002). Aufgrund der Seltenheit der ADNLFLE gibt es bei dieser erblichen Form der NFLE bisher keine Daten zur Wirksamkeit einer chirurgischen Intervention.

## 2.5 Klassifikation

Der Epilepsie-Klassifikation durch die Internationale Liga gegen Epilepsie (ILAE) folgend, differenziert man fokale, einem bestimmten Hirnareal entspringende Epilepsien von Epilepsien mit generalisierten Anfällen, welche sich nicht auf eine spezifische Region des Gehirns beschränken. Die ADNFE gilt als hereditäre Form der nächtlichen Frontallappenepilepsie, einer idiopathischen fokalen Anfallsart, welche simple oder komplexe Muster beinhalten kann. Die Zusätze simpel und komplex beziehen sich auf das Vorhandensein bzw. den Verlust von Bewusstsein und Gedächtnisleistungen. Desweiteren verkompliziert sich die Diagnose abermals durch die spezielle Anatomie des Frontallappens. Hierbei wird dieser in einen präzentralen und einen präfrontalen Kortex unterteilt. Beide können hinsichtlich ihrer Funktionen deutlich voneinander abgegrenzt werden. Der präzentrale Kortex vereint das primär-motorische und das supplementär-motorische Areal, welche sowohl sensorische Stimuli integrieren, als auch die Vorbereitung und Ausführung motorischer Bewegungen kontrollieren.

Der präfrontale Kortex fungiert als Persönlichkeitsbildner, einschließlich der Antizipation, Planung, Auslösung, Beurteilung, dem Erinnern und der Kontrolle eines Entscheidungsprozesses. Zu diesem Teil der Großhirnrinde zählen das frontale Augenfeld, das sakkadische, kontrallaterale und konjugierte Augenbewegungen steuert und das Broca-Zentrum, welches motorische Bewegungen der Zunge und des Larynx zur Sprachbildung vereint.

Zu funktionellen Schwerpunktarealen in dieser Region gehören zudem der dorsolaterale präfrontale sowie der orbitofrontale Kortex mit Funktionen wie der Verhaltensregulation, der Formierung des Langzeitgedächtnisses, der Entwicklung der Entscheidungsfähigkeit und dem Unterscheidungsvermögen zwischen richtig und falsch (Lesser et al. 1984; Luppino and Rizzolatti 2000; Helmstaedter 2001).

Das detaillierte Verständnis dieser Frontallappenregionen und -funktionen ermöglicht dem Behandelnden die Zuordnung der auftretenden Symptome zu dem jeweils geschädigten bzw. funktionell veränderten Hirnabschnitt.

Neben diesen anatomischen Gegebenheiten erlangt das Wissen über die Subtypen innerhalb der insgesamt heterogenen Gruppe der Frontallappenepilepsien, welche während des NREM-Schlafes erst periodisch, später in Clustern auftreten, zunehmend an Bedeutung. Zu diesen gehören (Provini et al. 1999; Happe 2009):

- *Paroxysmale Aufwachreaktionen (PA)*, gekennzeichnet durch plötzliches Erwachen aus dem NREM-Schlaf, assoziiert mit stereotypen motorischen Bewegungen (Rumpf- und Kopf heben) und Vokalisationen, sowie angsterfüllte Ausrufe von einer Dauer  $\leq 20$  Sekunden.

Anfälle dieser Art treten repetitiv und hochfrequent auf. Die Betroffenen amnesieren diese Anfälle oft vollständig.

- *Anfälle mit nächtlichen paroxysmalen Dystonien (NPD)*, ebenfalls gekennzeichnet durch abruptes Erwachen aus dem NREM-Schlaf, assoziiert mit stereotypen (Dysknesien, Dystonien) oder bizarren motorischen (choreatiformen oder ballistischen) Bewegungsmustern der Arme und Beine für die Dauer von 20 - 30 Sekunden.
- *Episodische nächtliche Wanderattacken (ENW)*, gekennzeichnet durch plötzliches Erwachen aus dem NREM-Schlaf, assoziiert mit nächtlichem Wandeln und Angst, sowie bizarrem, oftmals aggressivem, agitiertem Verhalten für die Dauer mehrerer Minuten.

Diese Subtypen können einzeln oder kombiniert und demnach als unterschiedliche Ausprägungsgrade eines singulären, epileptischen Prozesses auftreten.

Eine weitere Einteilung der ADNFLE lässt sich aufgrund der bis heute gefundenen Mutationen vornehmen. Man unterscheidet hierbei bisher vier Typen, von welchen sich drei durch mutationsbedingte Veränderungen in verschiedenen Genen voneinander abgrenzen lassen (Tab. 1).

Bei der Typ-I-ADNFLE liegen Mutationen im *CHRNA4*-Gen vor, welches für die  $\alpha 4$ -Untereinheit des neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptors kodiert.

Typ II hingegen bezieht sich auf einen vor jüngerer Zeit in einer Familie gefundenen, potentiellen Genlocus auf Chromosom 15q24. Dieser beinhaltet das Gencluster (*CHRNA3*, *CHRNA5* und *CHRNA4*), welches die Untereinheiten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\beta 4$  exprimiert. Jedoch bestehen Zweifel an diesem Forschungsergebnis, da man in weiteren Studien keinen Zusammenhang zwischen Erkrankung und der Chromosomenregion 15q24 belegen konnte. Man unterstellt allerdings das Vorhandensein weiterer krankheitsverursachender Gene (Phillips et al. 1998; Tenchini et al. 1999; Cho et al. 2003).

*CHRNA2* hingegen kodiert für die  $\beta 2$ -Untereinheit des nAChR und ist assoziiert mit Typ-III-ADNFLE.

Aridon et al. fanden eine Mutation im *CHRNA2*-Gen, welches für die  $\alpha 2$ -Untereinheit kodiert (Aridon et al. 2006). Gu und Kollegen untersuchten dieses Gen ebenfalls, konnten jedoch keine Mutation nachweisen (Gu et al. 2007). Es ist bisher unklar, ob *CHRNA2* tatsächlich ADNFLE verursacht oder ob es sich bei der in der Familie von Aridon et al. aufgetretenen Epilepsie um eine andere Form der schlafgebundenen Anfallserkrankungen handelt. Eine weitere Untersuchung durch Combi et al. zeigte ebenfalls keine Mutationen, konnte jedoch nicht ausschließen, dass sich in der nichtanalysierten, kodierenden Region doch eine Mutation befinden könnte (Combi et al. 2009).

Die fortführende Analyse des *CRH*-Gens stellt eventuell die Grundlage für die Ergänzung um einen fünften ADNFLE-Typen dar. Eine detailliertere Zusammenstellung der bisher analysierten Gene und Familien schließen sich in einem späteren Kapitel an.

Klassifizierung (MIM ID)	Gen/Locus (MIM ID)	nAChR- Untereinheiten
Typ I (# 600513)	CHRNA4 (# 118504)	$\alpha 4$
Typ II (# 603204)	15q24 (nahe CHRNA3, CHRNA5, CHRNB4)	$\alpha 3$ , $\alpha 5$ und $\beta 4$
Typ III (# 605375)	CHRNB2 (# 118507)	$\beta 2$
Typ IV (#610353)	CHRNA2 (# 118502)	$\alpha 2$

Tab. 1 Klassifizierung der ADNFLE nach Hirose et al. (Gene Reviews, Update vom 5. April 2010).

## 2.6 Manifestationsalter

Als Manifestationsalter der ADNFLE gilt das Alter, in dem die ersten Anfälle auftreten bzw. der Zeitpunkt, an welchem Betroffene diese erstmalig wahrnehmen. Die Mehrzahl betroffener Individuen erkrankt in der Spanne zwischen Kindheit und Erwachsenenalter. Etwa 80 % der ADNFLE-Patienten durchleben die zuvor beschriebenen Episoden während der ersten zwei Lebensdekaden. Ein sehr viel späteres erstmaliges Auftreten hingegen scheint nicht ungewöhnlich (Steinlein 2004). Das durchschnittliche Manifestationsalter jedoch beträgt neun bis elf Jahre. In circa 55 % der Fälle beginnt die Erkrankung noch vor dem zehnten Lebensjahr, 90 % der Betroffenen waren jünger als 20 Jahre (Scheffer et al. 1995; Provini et al. 1999; Gambardella et al. 2000; Sutor and Zolles 2001). Innerhalb einer Familie können der Zeitpunkt der Erstmanifestation und der Schweregrad der Anfälle maßgeblich variieren (Scheffer et al. 1995; Steinlein 2000). Einige Patienten äußern symptomfreie Intervalle, welche Jahre, sogar Jahrzehnte umfassen und durch hormonelle Ereignisse wie die Menarche, Pubertät oder Schwangerschaft ausgelöst oder aber auch unterbrochen werden können. Die Erkrankung begleitet Betroffene oft lebenslang, zeigt jedoch keine Progression. Es besteht die Möglichkeit der vollständigen Remission. In fortgeschrittenem Alter reduzieren sich die Symptome häufig auf eine mildere, niederfrequente Form (Steinlein 2004). Bis heute beschreibt die Literatur keine Korrelation zwischen Art und Vorhandensein eines genetischen Defekts und Manifestationsalter bzw. Schweregrad.

## 3. Molekularbiologie des nikotinischen Acetylcholinrezeptors

Nikotinische AChR gehören wie die GABA<sub>A</sub>-, GABA<sub>C</sub>-, Glycin- und 5-HT<sub>3</sub>-Serotonin-Rezeptoren der Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle an (Dani and Bertrand 2007). Hierbei unterscheidet man den muskulären vom neuronalen Typ hinsichtlich ihrer Lokalisation im zentralen und peripheren Nervensystem bzw. in der Skelettmuskulatur (neuromuskuläre Endplatte) sowie hinsichtlich ihrer Zusammensetzung. Auch nichtneuronale Strukturen wie Gliazellen, Epithelzellen in den Atemwegen, dem Verdauungstrakt, der Epidermis, endotheliale Zellen, Plazenta- und zirkulierende Blutzellen weisen AChR auf und gewinnen zunehmend an Bedeutung (Steinlein and Bertrand 2008).

### 3.1 Subtypen

Die nAChRs untergliedern sich in eine Vielzahl von Subtypen, welche durch verschiedenartige Kompositionen einzelner Untereinheiten entstehen und eine pentamere Struktur einnehmen. Ein solches Pentamer setzt sich aus fünf gleichen oder unterschiedlichen Untereinheiten zusammen. Bisher konnte man 16, für die Kodierung neuronaler sowie muskulärer Rezeptoren verantwortliche Gene im Säugetiergenom identifizieren und klonieren (Albuquerque et al. 2009). Neuronale Rezeptoren formieren sich aus  $\alpha 2$ - $\alpha 10$  und  $\beta 2$ - $\beta 4$  Untereinheiten, deren Expression entweder in homo- oder aber in heteropentamerer Form erfolgt.  $\alpha 1$ -,  $\beta 1$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -, und  $\epsilon$ -Untereinheiten hingegen befinden sich ausschließlich in muskulären AChR (Plazas et al. 2005; Dani and Bertrand 2007). Hieraus resultieren nur zwei Kompositionen mit einer Stöchiometrie von 2:1:1:1.

Homopentamere können nach heterologer Expression nur aus  $\alpha 7$ - $\alpha 10$  bestehen, wobei die  $\alpha 8$ -Untereinheit nur in Vögeln, jedoch nicht in Säugetieren existiert. Vielfältige Kombinationen von  $\alpha 2$ - $\alpha 6$ - mit  $\beta 2$ - $\beta 4$ -Untereinheiten oder eine Vereinigung von  $\alpha 7$  mit  $\alpha 9$  oder  $\alpha 10$  ermöglichen hierbei das Entstehen eines funktionstüchtigen Rezeptors. Neuronale AChR, mit einer Zusammensetzung aus fünf identischen  $\alpha$ -Untereinheiten, zeichnen sich durch fünf Bindungsstellen für Agonisten wie zum Beispiel Nikotin oder Acetylcholin (ACh) aus - eine an jeder Verbindungsstelle zwischen zwei Untereinheiten. Ausnahmen hiervon stellen  $\alpha 5$ - und  $\alpha 10$ -Untereinheiten dar, denen die Ausbildung einer derartigen Bindungstasche verwehrt bleibt (Albuquerque et al. 2009). Konträr dazu beschreibt die Literatur einen heteropentameren, neuronalen Rezeptor, welcher nur zwei Bindungsstellen zwischen jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufweist (Corringer et al. 2000; Le Novere et al. 2002). Die Stöchiometrie der exprimierten Untereinheiten bestimmt nun die biophysiologicalen und funktionellen Fähigkeiten des Rezeptors, sowie sein pharmakologisches Profil (Cooper et al. 1991; Gotti et al. 2006; Kuryatov et al. 2008; Steinlein and Bertrand 2008). Letzteres betreffend scheint auch die Differenzierung zwischen  $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -BgTx)-sensitiven und -nichtsensitiven Rezeptoren eine entscheidende Rolle zu spielen. Mit der Entdeckung von  $\alpha$ -BgTx, einem Inhaltsstoff des Gifts der Natter *Bungarus multicinctus*, gelang es die im zentralen Nervensystem befindlichen nAChR nochmals zu unterteilen. Das Toxin bindet kovalent an AChR vom Muskeltyp, inhibiert deren Funktion und bewirkt die Paralyse an der motorischen Endplatte (Barnard et al. 1977). Eine Klasse bindet Nikotin und andere nikotinerge Agonisten mit einer nM-Affinität, jedoch nicht das  $\alpha$ -BgTx. Die andere hingegen zeigt sich sensitiv für  $\alpha$ -BgTx im nM-Bereich, aber nur minimal bindungsfreudig ( $\mu$ M) für Nikotin und andere Agonisten (Gotti et al. 2009). Daraus resultiert die pharmakologische und strukturelle Unterscheidung dieser beiden Klassen:

a)  $\alpha$ -BgTx-sensitive nAChRs, welche aus  $\alpha 7$ -,  $\alpha 8$ - oder  $\alpha 9$ -Homopentameren bestehen oder sich aus Heterodimeren von  $\alpha 7/\alpha 8$ - bzw.  $\alpha 9/\alpha 10$ -Untereinheiten zusammensetzen.



b) Heteropentamere, welche  $\alpha$ -BgTx nur mit geringer Affinität binden und  $\alpha 2$ - $\alpha 6$  kombiniert mit  $\beta 2$ - $\beta 4$ -Untereinheiten enthalten (Gotti et al. 2009).

### 3.2 Morphologie und Struktur

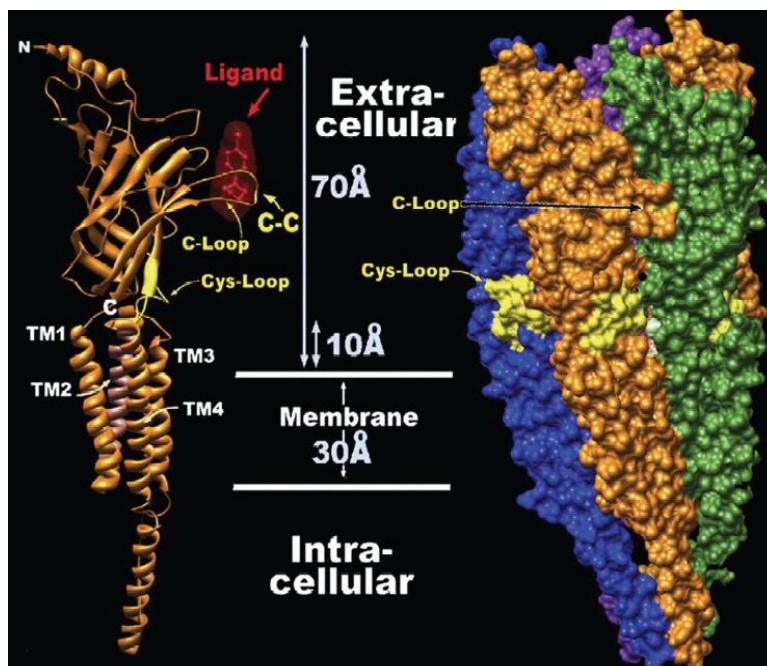
Die genaue Konfiguration der Untereinheiten verdeutlicht sich am Beispiel des Zitterrochens *Torpedo californica*, welcher nAChR in hoher Dichte produziert, so dass eine kristalline Anordnung entsteht, welche wiederum im Elektronenmikroskop zur Darstellung kommt.

Da AChR vom muskulären Typ, hinsichtlich der Struktur der Untereinheiten, nicht von neuronalen differieren, bedient man sich dieses elektronenmikroskopischen Modells (Abb. 1), um auch letztere in ihrer Zusammensetzung zu verstehen.

Fünf Untereinheiten bilden den ionotropen Rezeptor, wobei jede Einzelne die Zellmembran mit jeweils vier Transmembrandomänen (TM1-TM4) durchspannt. Jede Untereinheit besitzt ein langes, extrazelluläres,  $NH_2$ -terminales Ende, bestehend aus 200 Aminosäuren, drei Transmembransegmente, eine intrazelluläre Schleife von variabler Größe und Aminosäuresequenz und eine vierte TM-Domäne mit einem relativ kurzen, COOH-terminalen Ende (klassische „3+1“-Konstellation).

Die Extrazellulärdomäne des *Torpedo*-nAChRs bildet eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aus, während die vier TM-Domänen  $\alpha$ -Helices formen. Diese wiederum umgeben die hydrophile, zentrale Pore.

Die TM-Helix 2 umgibt den zentralen Kanal, TM4 interagiert mit der Lipiddoppelschicht und TM1 und 3 vervollständigen das Helixbündel durch ihre einander gegenüberliegende Position sowie eine 90°-Rotation zu TM2 und TM4. Eine in der ersten TM-Domäne (TM1) befindliche Cystein-Schleife entsteht aus zwei Cysteinen, welche von 13 dazwischenliegenden Aminosäuren (AS) getrennt werden. Die Definition einer  $\alpha$ -UE erfordert das Vorhandensein dieses Cystein-Cystein-Paares, eine für die Agonistenbindung verantwortliche, hydrophobe Struktur (Albuquerque et al. 2009).



**Abb. 1** *Dreidimensionale Rekonstruktion des muskulären nAChR (Torpedo) basierend auf dessen elektronenmikroskopischer Struktur (Unwin 2005).*

*(Modifiziert durch (Albuquerque et al. 2009))*

**Links:** *Sekundärstruktur einer  $\alpha$ -Untereinheit mit Transmembrandomänen (TM1-TM4), N- und C-terminalen Enden und Cys-Cys-Schleife sowie daran gebundenem Liganden.*

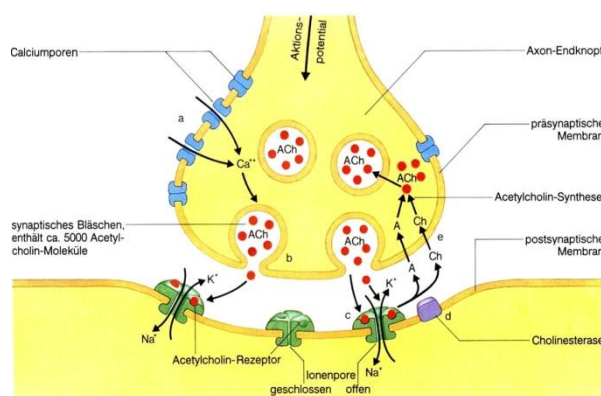
**Rechts:** *Vollständiger Rezeptorkomplex bestehend aus  $\alpha$ - (orange),  $\beta$ - (blau),  $\delta$ - (violett),  $\gamma$ - / $\epsilon$ - Untereinheiten (grün).*

Die Vereinigung der Untereinheiten zu einem speziellen Rezeptorsubtypen führt zur Veränderung der funktionellen und pharmakologischen Charaktereigenschaften. Im menschlichen, zentralen Nervensystem gibt es vier beschriebene Typen.

Den am häufigsten im Säugergehirn auftretenden und bei ADNFLE-Erkrankten betroffenen Subtyp stellt der  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR dar. Dieser existiert in variabler Stöchiometrie.  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ ,  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$  und  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_2(\alpha 5)$  binden Nikotin mit hoher Affinität, jedoch hebt sich ersterer deutlich durch seine ausgeprägte Sensitivität hinsichtlich der Hochregulation durch Nikotin ab. Messungen der Leitfähigkeit und der Desensibilisierung untermauerten diese Erkenntnis (Albuquerque et al. 2009). Andere Subtypen bilden sich aus  $\alpha 7$ -Untereinheiten, welche bekanntermaßen schnell desensibilisieren und eine hohe Kalzium:Natrium-Permeabilitätsrate aufweisen (Steinlein and Bertrand 2009). Diese übersteigt sogar die des Glutamat-NMDA-Rezeptors und die 3-4:1-Rate vieler anderer nAChR (Quik et al. 1997). Neben diesen gibt es eine große Anzahl weiterer Kombinations- bzw. Expressionsmöglichkeiten, auf welche in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen wird. Die Heterogenität der Untereinheiten und die Verschiedenheit hinsichtlich ihrer Expressionsmuster eröffneten in den vergangenen Jahren neue Interessengebiete für zahlreiche Wissenschaftler und werden diese auch zukünftig zu beschäftigen wissen.

### 3.3 Rezeptorfunktion

Der ionotrope, neuronale nAChR fungiert zum einen als Kanalkomplex, zum anderen stellt er Ligandenbindungsstellen für Agonisten wie Nikotin oder ACh. Entsteht nun ein Aktionspotential, so erfolgt die Öffnung spannungsaktivierter Kalziumkanäle, die fortlaufend zum Einstrom von Kalzium in die Zelle führt (Abb. 2). Diese Ionenbewegung löst daraufhin die Freisetzung von ACh aus Transporter-vesikeln in den synaptischen Spalt aus ( $10^7$  Moleküle pro Impuls).



**Abb. 2** *Schema der synaptischen Transmission am Beispiel des neuronalen nAChRs.*  
(Modifiziert nach Didaktik Chemie der Universität Bayreuth)

<http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/alkaloide/alkaloide.htm>

Der Neurotransmitter bindet an den Rezeptor der postsynaptischen Membran und stimuliert einen Natriumein-, sowie einen Kaliumausstrom, was in einer Ladungsverschiebung und somit in einer vorübergehenden Depolarisation der Postsynapse resultiert. Das entstandene exzitatorische postsynaptische Potential (EPSP) trägt zur Aktionspotentialbildung an der Empfängerzelle bei. Hydrolysierende Acetylcholinesterasen (AChE) ermöglichen nun eine Repolarisierung der Zelle durch Abbau von ACh zu Cholin (Ch) und Azetat (A). Durch Rücktransport der Zerfallprodukte in die Präsynapse stehen diese der erneuten Veresterung mit Acetyl-CoA zur Verfügung.

Katz und Thesleff entwickelten ein Modell zur Erklärung des Aktivierungsmechanismus verschiedener nAChR ausgehend vom muskulären Rezeptortyp, welches prinzipiell auch auf neuronaler Ebene Anwendung findet. So existieren drei funktionelle Zustände dessen.

Der Ruhezustand kennzeichnet sich durch einen geschlossenen Ionenkanal mit nicht besetzten Bindungsstellen. Nach Agonistenbindung befindet sich der Rezeptor in aktiviertem (offenem) Zustand. Die Öffnungsphase (ca. 1-10 ms), in welcher der Kanal Kationen leitet, mündet in einem desensibilisierten Zustand mit geschlossenem, nicht aktivierbarem Rezeptor. Mit der Neurotransmitterexposition endet der Desensibilisierungsvorgang. Auch ohne primäre Aktivierung des Ionenkanals besteht die Möglichkeit der Desensibilisierung (Katz and Thesleff 1957; Paradiso and Steinbach 2003). Während der Rezeptor diese Phasen wiederholt durchläuft, entscheiden der involvierte Subtyp, die

verwendeten Agonisten und deren Konzentrationen über die Geschwindigkeit dieser Zustandsänderungen (Katz and Thesleff 1957).

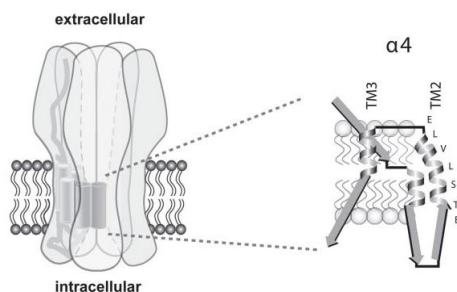
Die Manipulation des Kanalproteins durch verschiedene Modulatoren (Agonisten oder Antagonisten) oder aber Mutationen in kodierenden Genen ermöglichen eine Veränderung der Leitfähigkeit, der Offenzeit bzw. -wahrscheinlichkeit, der Desensitisierungsgeschwindigkeit und der Ionenselektivität.

### 3.4 Genetik des nikotinischen neuronalen Acetylcholinrezeptors

Bisher konnten Mutationen und Polymorphismen in vier Genen identifiziert werden, die sich für die Ausprägung der ADNFE verantwortlich zeigen. Die Gene *CHRNA4*, *CHRNA2* und *CHRNA2* kodieren für Untereinheiten, des bei der Erkrankung defekten, neuronalen, nikotinischen Acetylcholinrezeptors (Steinlein et al. 1995; De Fusco et al. 2000; Aridon et al. 2006). Combi und Kollegen identifizierten ein neues Kandidatengen, welches für ein aus 41 Aminosäuren (AS) bestehendes Peptid im zentralen Nervensystem kodiert. Dieses *CRH*-Gen brachten Wallace et al. bereits mit der benignen familiären neonatalen Konvulsion in Verbindung (Wallace et al. 1996; Combi et al. 2005).

#### 3.4.1 *CHRNA4*-Gen

Das *CHRNA4*-Gen (MIM 118504), das erste mit ADNFE assoziierte Gen, liegt in der Chromosomenregion 20q13.2-q13.3 und kodiert für die  $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR (Abb. 3) (Phillips et al. 1995). Die kodierende Sequenz besteht aus sechs Exons, welche sich auf 17 kb genomischer DNA verteilen. Exon 5 beinhaltet den die entscheidenden Transmembrandomänen enthaltenden kodierenden Bereich (Steinlein et al. 1996). Wie bereits vorher erwähnt, dienen die Cys-Cys-Paare (Cys161 und Cys175 der  $\alpha$ -Untereinheiten als Bindungstaschen, welche bei der Vereinigung von  $\alpha 4$ - mit dazugehörigen  $\beta 2$ - oder  $\beta 4$ -Untereinheiten zu einem heteropentameren Rezeptor entstehen (Abb. C) (Figl et al. 1998).



**Abb. 3**

**Links:** *Schematische Repräsentation des nAChRs, eingebettet in die Zellplasmamembran (high-resolution elektronenmikroskopische Aufnahme).*

**Rechts:** *Putative Transmembranorganisation der  $\alpha 4$ -nAChR-UE (Unwin 1993; Le Novere et al. 1999).*

In den vergangenen Jahren wiesen verschiedene Forschungsgruppen Mutationen in *CHRNA4* nach. Eine Missense-Mutation, bei welcher ein neutrales Serin durch ein aromatisches Phenylalanin in Kodon 248 (S280F, entsprechend Referenzsequenz) ersetzt wird, verändert die AS-Zusammensetzung von TM2. Die Umwandlung eines Cytosins in einen Thymin-Rest führt zum Austausch der AS Serin. Die Serine der fünf Untereinheiten des nAChR erzeugen einen engen Ring im transmembranösen Ionenkanal und bilden eine Bindungsstelle für nichtkompetitive Inhibitoren. Mutationen von Serin248 zu Valin oder Thyrosin verringerten die Leitfähigkeit für Natrium und Kalium, wohingegen der Austausch durch Alanin die Dissoziationsrate von Kanalblockern veränderte. Die Substitution durch Phenylalanin in dieser Region schien eine ähnlich funktionseinschränkende Wirkung zu haben. So desensibilisierten diese mutierten Rezeptoren nach ACh-Bindung schneller und zeitlich verlängert (Steinlein et al. 1995). Die beschriebene Mutation identifizierten inzwischen auch andere Forschungsgruppen in weiteren Familien (Saenz et al. 1999; Steinlein et al. 2000; McLellan et al. 2003). Mit 67 publizierten Mutationsträgern stellt diese Mutation die häufigste der für die ADNFLE verantwortlichen Genveränderungen dar.

In einer norwegischen Familie fand sich eine Mutation, welche drei Nucleotide (GCT) an Position 776, der kodierenden Region für das C-terminale Ende von TM2 einfügt. Die Insertion eines zusätzlichen Leucinrests erhöhte die ACh-Affinität des Rezeptors um das Zehnfache und resultierte in einer reduzierten Kalziumpermeabilität, was wiederum zu einem indirekten „loss-of-function“-Effekt führte. Man zeigte mittels *Xenopus*-Oozyten, dass die Bildung funktioneller nAChR nicht unter der  $\alpha 4(776\text{ins}3)\beta 2$  litt. Zudem ließen sich keine Desensibilisierungsdefekte bei mutierten Rezeptoren beobachten. Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass sich diese und die zuvor identifizierte Missense-Mutation S248F in ähnlichen Phänotypmustern äußerten, die Erkrankung jedoch in Abhängigkeit der Anzahl mutierter Rezeptoren unterschiedliche Schweregrade und Verläufe aufwies (Steinlein et al. 1997). Magnusson und Kollegen postulierten zudem multiple psychiatrische Symptomkomplexe, welche mit der beschriebenen Insertion korrelieren könnten (Magnusson et al. 2003).

Hirose und Kollegen identifizierten eine Missense-Mutation in einer japanischen Familie, welche durch einen c.755C>T-Austausch in Exon 5 des Gens, einen Serinrest an Position 252 des Proteins (S252L Torpedo-Nummerierung; in TM2 lokalisiert) durch ein Leucin substituiert. Serin befindet sich neben Leucin 251, welches einen hydrophilen Ring ausbildet und die Kanalpore umgibt. Es vereinigt sich mit Threonin 244 und Serin 248 zu einer Achse, die um die Bindungsstelle für ACh rotiert. Die dabei entstehende Kraft öffnet und schließt den Leucinring. Somit kommt Serin 252 eine nicht unerhebliche Rolle hinsichtlich der Rezeptorfunktion zu (Hirose et al. 1999). Phillips et al. detektierten diesen AS-Austausch in einer australischen Patientin libanesischer Herkunft und in deren betroffenem Sohn als *de novo*-Mutation (Phillips et al. 2000). Bei einer anderen Untersuchung neun betroffener Individuen einer koreanischen Familie detektierte die Gruppe um Cho et al. die gleiche, in heterozygoter Form vorliegende Mutation, welche im gesamten Kollektiv mit mentaler Retardierung einher-

ging. In der F18-PET zeigte sich eine verminderte Glukoseaufnahme in der linken superioren und mittleren Frontallappenregion. Desweiteren konnte man eine vollständige Penetranz und eine nur geringe Ansprechrate auf Carbamazepin ermitteln (Cho et al. 2003). Die identifizierte c.755C>T-Substitution resultiert in einer Mutation, welche zu einer Akzeleration der Desensibilisierungsrate, zu einer Erniedrigung der Ionenpermeabilitäts-Ratio und somit zu einem „loss-of-function“-Effekt des Rezeptors führt (Rozycka et al. 2003).

Im gleichen Jahr entdeckten Wissenschaftler eine weitere krankheitsverursachende Mutation in einer deutschen Familie, welche eine sehr niedrige Penetranz (29 bzw. 57 %) aufwies und einen ausschließlich autosomal-dominanten Erbgang in Frage stellte (Leniger et al. 2003). In vorhergehenden Analysen ADNFLE-Erkrankter zeigte sich bis dato eine Erkrankungsrate von 70-80 % bei vorliegender Mutation (Berkovic and Scheffer 1997). Leniger und Kollegen beschrieben eine heterozygote  $\alpha$ 4-T265I-Substitution am extrazellulären Ende der zweiten Transmembrandomäne (TM2). Diese korreliert nicht mit einer erhöhten Carbamazepinsensitivität, wie für andere Mutationen beschrieben (S248F oder 776ins3). 16 Familienmitglieder wurden untersucht. Unter diesen diagnostizierte man zwei betroffene Individuen, fünf nicht erkrankte Mutationsträger (davon drei Träger höheren Alters und zwei eventuell prämanifeste Träger). Die Anwesenheit der Mutation in *Xenopus*-Expressionsexperimenten verursachte keine zeitliche Verschiebung hinsichtlich der durch Acetylcholin ausgelösten Ströme, jedoch erhöhte sich die Rezeptorsensitivität für ACh. Ein leicht erniedrigter Strom zeigte sich nur bei gesättigten ACh-Konzentrationen (>100  $\mu$ M). Hieraus schlussfolgerte man einen „gain-of-function“-Effekt (Leniger et al. 2003).

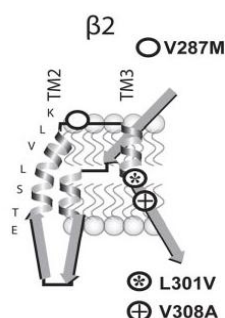
Bei einer 18-jährigen, mittels Video-EEG überwachten ADNFLE-Patientin identifizierten El Helou et al. in einer sekundären molekulargenetischen Analyse eine weitere Mutation, welche bisher nicht beschrieben wurde. Hierbei handelte es sich um einen Austausch von Leucin durch Valin an Position 290 (L290V) in TM2. Die Erkrankte zeigte einen besonders schweren, therapieresistenten Verlauf mit etwa 30 Anfällen pro Nacht, deren Beginn zu 90 % K-Komplexe initiierten (El Helou et al. 2008). Da in dieser Studie neurologische Untersuchungen im Vordergrund standen, entzieht sich der exakte genetische Hintergrund meiner Kenntnis.

Die letzte, bisher beschriebene Mutation identifizierten Chen und Kollegen in einem Patientenkollektiv bestehend aus 33 unverwandten Chinesen mit sporadischer NFLE. In einem männlichen Betroffenen detektierte die Gruppe nach bidirektionaler Sequenzierung einen  $\alpha$ 4-R308H-Austausch (c.923G>A in Exon 5) außerhalb der TM-Domäne, in der zweiten intrazellulären Schleife, zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne. Diese Missense-Mutation fiel ebenso bei der Mutter des an ADNFLE Erkrankten auf, wobei man diese nach ausgiebiger elektrophysiologischer Diagnostik als asymptomatisch einstufte (Chen et al. 2009).

### 3.4.2 *CHRNA2*-Gen

Anand und Lindstrom isolierten die  $\beta 2$ -nAChR-Untereinheit durch Analysen humaner fetaler cDNA-Banken und ordneten das verantwortliche Gen zwei Jahre später Chromosom 1 zu (Anand and Lindstrom 1990; Anand and Lindstrom 1992). Wiederum einige Jahre später präziserte eine andere Gruppe unter Anwendung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung die Region, legte sich auf den Genlocus 1q21 fest und identifizierte sechs Exons. Das Gen umfasst 9 kb genomischer DNA. Die hydrophoben TM1-3 sind in Exon 5 lokalisiert, während sich die vierte TM in Exon 6 ansiedelt (Rempel et al. 1998). Das *CHRNA2*-Gen (MIM 118507) kodiert, *Xenopus*-Oozyten-Studien folgend, für einen funktionellen Rezeptor, wenn es mit  $\alpha 2$ -,  $\alpha 3$ - oder  $\alpha 4$ -Untereinheiten koexprimiert wird (Elliott et al. 1996). Champiaux und Kollegen identifizierten weitere Rezeptorkonfigurationen mit einer  $\alpha 6$ -Untereinheit, welche nach Nikotinadministration eine endogene, cholinerge Modulation der Dopaminausschüttung vermitteln können (Champiaux et al. 2003). Diesem Gen gebührt Beachtung, aufgrund der im menschlichen Gehirn dominierenden nAChR-Zusammensetzung aus  $\alpha 4$ - und  $\beta 2$ -Untereinheiten.

Wegen der Lokalisation des Gens auf Chromosom 1, welchem man eine Form der ADNFLE zuordnet und der nur für eine Minderheit der Erkrankten zutreffenden *CHRNA4*-Mutationen, sequenzierten De Fusco et al. in einem Patientenkollektiv die gesamte kodierende Region des *CHRNA2*-Gens, um die Ätiologie des seltenen Epilepsiesyndroms gründlicher zu beleuchten. Man detektierte eine aus einer C>T-Transversion resultierende V287L-Missense-Mutation bei den Untersuchten. Alle betroffenen Familienmitglieder und vier phänotypisch unauffällige Individuen wiesen die heterozygote Mutation auf. Dieses Ergebnis bestätigte die einhellige Meinung über eine unvollständige Penetranz (75 % in dieser Studie) hinsichtlich des Vererbungsmechanismus. Der Valinrest an Position 287 befindet sich in TM2 der  $\beta 2$ -nAChR-Untereinheit (Abb. 4).



**Abb. 4** *Putative Transmembraneorganisation der  $\beta 2$ -nAChR-UE* (Unwin 1993; Le Novere et al. 1999) mit den im Folgenden beschriebenen Mutationen.

Unter Zuhilfenahme der Patch-clamp-Methode an *HEK293*-Zellen demonstrierte man eine Retardierung der Kanaldesensibilisierung bei der mutierten Rezeptorform. Somit könnte die prolongierte Aktivierung des präsynaptischen Rezeptors zu einer erhöhten Neurotransmitterfreisetzung oder

zu einer anormalen, postsynaptischen Aktivierung führen. Die folgende Hyperexzitabilität triggert wiederum die neuronale Reaktion (De Fusco et al. 2000).

An gleicher AS-Position entdeckte eine weitere Forschungsgruppe eine V287M-Substitution (c.1025G>A) in einer schottischen Familie. Unter den acht Familienmitgliedern befanden sich sechs mutationspositive Individuen mit ADNFLE-spezifischen Symptomen und ein obligater Träger. Die Wissenschaftler unterstrichen die elektrophysiologischen, mutationsbedingten Rezeptorveränderungen der vorangegangenen Studie (Phillips et al. 2001). In einer weiteren spanischen Familie identifizierte man bei fünf noch lebenden, betroffenen Individuen die von Phillips beschriebene Mutation und konnte zudem vier obligate, nichterkrankte Träger ausmachen, welche sich durch eine negative Anamnese bezüglich epileptischer Anfälle auszeichneten. Die Penetranz bestimmte man mit 60 %. Carbamazepin inhibierte den mutierten Rezeptor effektiv (Diaz-Otero et al. 2008).

Bertrand und Kollegen beschrieben in ihrer Studie zu *CHRNA2*-Genmutationen einen I312M-Austausch in der dritten Transmembrandomäne (TM3), außerhalb des bekannten ADNFLE-Mutationsclusters. Sie charakterisierten diese als eine *de novo*-Mutation in Zwillingen und wiesen neben typischen ADNFLE-Symptomen auch Gedächtnisdefizite bei den Betroffenen nach. Desweiteren beobachteten sie eine höhere Rezeptorsensitivität und -offenwahrscheinlichkeit nach ACh-Applikation (Bertrand et al. 2005; Cho et al. 2008).

Weitere Mutationen in TM3, welche mit dieser zweiten Studie zunehmend an Bedeutung gewann, fand man in drei Familien türkisch-zypriotischer, schottischer und englischer Herkunft.

Drei betroffene Individuen der türkisch-zypriotischen Familie zeigten eine  $\beta 2$ -L301V-Mutation (c.901C>G), zwei Angehörige der schottischen Familie und vier englische Familienmitglieder (Mutter und Tochter) wiesen eine  $\beta 2$ -V308A-Mutation (c.923T>C) auf.

Die Genotypisierung dreier SNPs (single strand nucleotide polymorphism, rs2072659, rs2072660, rs2072661), welche nahe letzterer liegen, ergab einen gemeinsamen Haplotyp.

Mutationen in der TM3-Region erhöhen die Rezeptorsensitivität für ACh und führen zu einem „gain-of-function“-Effekt. Sie beeinflussen die Leitfähigkeit des Ionenkanals nicht. Dennoch beobachtete man Unterschiede hinsichtlich der Nikotinsensitivität und eine höhere Offenwahrscheinlichkeit verschiedener, mutierter Rezeptoren (Hoda et al. 2008).

### 3.4.3 *CHRNA2*-Gen

Das *CHRNA2*-Gen (MIM 118502) siedelt sich in der Region 8p21.2 an und kodiert für die  $\alpha 2$ -Untereinheit des nAChR (Anand and Lindstrom 1992). Diese besteht aus 529 Aminosäuren. Das Gen besitzt sieben Exons, welche sich auf 19 kb genomischer DNA erstrecken.

Aridon et al. identifizierten in einer italienischen Familie mit zehn Betroffenen eine heterozygote c.836T>A-Transversion in Exon 6 des Gens, die auf Proteinebene in einer AS-Substitution von Isoleucin durch Asparagin an Position 279 (I279N) resultiert. Ein Familienmitglied zeigte sich symptomfrei, jedoch ließ sich die Mutation nachweisen. Daher vermutet die Gruppe eine unvoll-



ständige Penetranz (Aridon et al. 2006). Funktionelle *in vitro*-Expressionsstudien deuteten auf eine erhöhte Rezeptorsensitivität für Acetylcholin durch eine gesteigerte Ionenleitfähigkeit des Kanals und damit verbundener veränderter Signaltransduktion zwischen einzelnen Neuronen hin (Kuryatov et al. 1997; Steinlein et al. 1997; Bertrand et al. 1998; Bertrand 1999; De Fusco et al. 2000; Phillips et al. 2001). Der so erzeugte „gain-of-function“-Effekt stellt den wichtigsten Mechanismus in der Ätiologie der ADNFLE dar, wobei noch diskutiert wird, ob es sich bei den Phänotypen tatsächlich um ADNFLE handelt.

#### 3.4.4 *CRH*-Gen

Im Jahr 2005 definierten Combi und Kollegen zwei weitere ADNFLE-Genloci in den Chromosomenregionen 3p22-p24 und 8q11.2-q21.1 ohne allerdings verantwortliche Gene zu identifizieren. Die Autoren postulierten in diesem Artikel einen möglichen digenen Vererbungsmechanismus bei ADNFLE-Patienten.

Die Gruppe legte in folgenden Publikationen Augenmerk auf das *CRH*-Gen (MIM 122560) auf Chromosom 8q, da bisherige Untersuchungen der zuvor genannten Genloci nicht zur Aufschlüsselung der Erkrankung und deren Genotyp-Phänotyp-Korrelation führten (Combi et al. 2005). Das *CRH*-Gen kodiert für ein aus 41 AS bestehendes Peptid, welches im gesamten Nervensystem exprimiert wird (Cummings et al. 1983). CRH fungiert als Neurotransmitter und -modulator in extrahypothalamischen Bahnen und generiert eine Multisystemantwort auf Stress, die zahlreiche Verhaltenseigenschaften wie lokomotorische Aktivität, Angst, Nahrungsaufnahme, Sexualverhalten, Schlaf, Weckreaktionen und das Lernen kontrolliert (Radulovic et al. 1999; Combi et al. 2005). Ursprünglich assoziierte man dieses Gen mit familiären, neonatalen Konvulsionen (Wallace et al. 1996). 45 ADNFLE-Patienten (20 sporadische, 25 familiäre Fälle) unterzogen sich einer umfangreichen video-polysomnografischen Analyse, um die Diagnose NFLE zu bestätigen. In einer italienischen Familie (neun Probanden) detektierte man eine heterozygote g.-1470C>A-Transversion in vier klinisch diagnostizierten Individuen, in vier obligaten Trägern und in einem asymptomatischen Angehörigen. Die erweiterte Studie zeigte diese Promotorvariante ebenfalls in anderen Familien entstammenden ADNFLE-Patienten (zwei familiäre, zwei sporadische Fälle). Zudem entdeckte man einen weiteren Nukleotidaustausch (g.-1166G>C) in einem Betroffenen, welcher jedoch bei keinem anderen Erkrankten identifiziert werden konnte. Zur Bestimmung der Allelfrequenz sequenzierte die Gruppe DNA von 115 gesunden Kontrollen. Für ersteren Polymorphismus resultierte eine Frequenz von 3,35%, wohingegen die g.-1166G-C-Substitution in keiner der Kontrollen nachzuweisen war. Mittels funktioneller Analysen demonstrierte man eine veränderte Proteinexpression (Combi et al. 2005). Frühere Untersuchungen an Ratten stützen Combis Vermutung hinsichtlich der wichtigen Bedeutung des CRHs in der Ätiopathologie verschiedener Epilepsiesyndrome. So entdeckte man in Ratten, dass picomolare Mengen an CRH schwerwiegende und verlängerte Anfälle in den ersten beiden Lebenswochen hervorrufen können (Baram and Schultz 1995). Es induziert exzitatorische Effekte an einzelnen,

hippocampalen CA3-Pyramidenzellen und ist in der Lage die Frequenz spontaner, exzitatorischer, postsynaptischer Ströme zu erhöhen. Die resultierenden verstärkten Aktionspotentiale führen zur Steigerung der Glutamatausschüttung in einen fehlerhaften Kreislauf und damit zu epileptischen Anfällen (Aldenhoff et al. 1983; Hollrigel et al. 1998). CRH besitzt im Vergleich zu adulten Lebensabschnitten ein größeres, prokonvulsives Potential während der ersten Lebensperiode, was den juvenilen Krankheitsbeginn bei ADNFLE-Individuen erklären könnte (Baram and Schultz 1991). Auch die in diesen Patienten beschriebene Schlaffragmentation und das bevorzugt nächtliche Auftreten der Symptome könnten auf einen hormonellen Zusammenhang, insbesondere auf eine Korrelation mit CRH deuten (Zucconi et al. 2000). In unseren molekulargenetischen Analysen ADNFLE-Betroffener berücksichtigen wir deshalb das *CRH*-Gen und untersuchten ein ausgewähltes Patientenkollektiv ebenfalls auf von Combi und Kollegen beschriebene Promotorvarianten, sowie eventuelle Mutationen bzw. Polymorphismen im kodierenden Bereich.

Gen	Mutation	Ethnische Herkunft	Anzahl klinisch betroffener Individuen (w/m)	Neurologische/psychiatrische Anamnese neben der ADNFLE (Anzahl Pat./Gesamtkollektiv)	Referenz	
<i>CHRNA4</i>	S248F (S280F)	Britisch-Australisch	27 (18/9)	-	(Steinlein et al. 1995)	
		Spanisch	11 (7/4)	-	(Saenz et al. 1999)	
		Norwegisch	22 (10/12)	Milde mentale Retardierung (1/22) Nicht klassifizierte psychiatrische Erkrankung (1/22)	(Steinlein et al. 2000)	
			Schottisch	7 (4/3)	Psychiatrische Probleme	(McLellan et al. 2003)
	S252L (S284L)	Japanisch	5 (2/3)	Milde mentale Retardierung (3/5) Early-onset-Epilepsie im Kindesalter (3/5)	(Hirose et al. 1999; Ito et al. 2000)	
		Libanesisch	2 (1/1)	Eingeschränkter Intellekt (1/2) Early-onset-Epilepsie im Kindesalter (2/2)	(Phillips et al. 2000)	
		Koreanisch	9 (7/2)	Milde bis mittelschwere mentale Retardierung (7/7 mgl. Testpersonen)	(Cho et al. 2003)	
		Polnisch	3 (1/2)	Early-onset-Epilepsie im Kindesalter (2/3)	(Rozycka et al. 2003)	
		776ins3 (865-873insGCT)	Norwegisch	11 (5/6)	Schizophrenie (1/11) Negativsymptome bei Schizophrenie (1/11) Rekurrente Psychose (1/11) Nicht klassifizierte psychiatrische Erkrankung (3/11) – 5 FM nicht verfügbar für Testung	(Steinlein et al. 1997; Magnusson et al. 2003)
		T265I (T293I)	Deutsch	2 (0/2)	-	(Leniger et al. 2003)
	R308H (R336H)	Chinesisch	1 (0/1)	Nicht bekannt	(Chen et al. 2009)	
<i>CHRNA2</i>	V287L	Italienisch	8 (2/6)	-	(De Fusco et al. 2000; Gambardella et al. 2000)	
		Schottisch	10 (6/4)	Psychologische Probleme, Anzahl unbekannt	(Phillips et al. 2001; McLellan et al. 2003)	
		Spanisch	6 (3/3)	-	(Diaz-Otero et al. 2008)	
	L301V	Türkisch-Zypriotisch	3 (2/1)	-	(Hoda et al. 2008)	
	V308A	Schottisch	5 (4/1)	-	(Hoda et al. 2008)	
		Deutsch	4 (2/2)	-		
	I312M	Englisch	2 (2/0)	Eingeschränkter Intellekt mit signifikanten Gedächtnisdefiziten (verbal) (2/2)	(Bertrand et al. 2005)	
		Koreanisch	2 (2/0)	Psychotische Episode mit wahnhaften Ideen (1/2) Normale Intelligenz mit mittelgradigen Gedächtnisdefiziten (verbal) (1/2) Normale Intelligenz mit signifikanten Gedächtnisdefiziten (verbal/visuell) (1/2)	(Cho et al. 2008)	
<i>CHRNA2</i>	I279N	Italienisch	10 (8/2)	Nicht bekannt	(Aridon et al. 2006)	

**Tab. 2** *Zusammenfassung bisher detektierter Mutationen und klinischer Daten für ADNFLE-Familien, inkl. Referenzliteratur (Modifiziert nach Steinlein 2011, unpublished). (FM: Familienmitglieder; m: männlich; w: weiblich; Mutationsbezeichnungen in Klammern bei CHRNA4 gelten für Referenzsequenzen NP\_000735.1 und NP\_000739.1))*

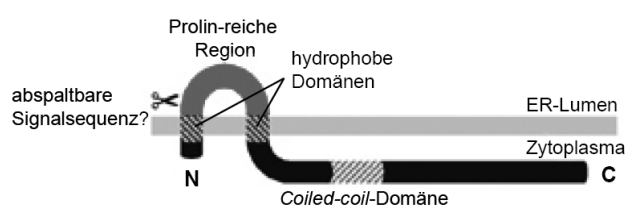
### 3.5 Weitere Kandidatengene

Vergleicht man bisher detektierte Mutationen in häufig kleinen Patientenkollektiven, deren Genotyp-Phänotyp-Korrelation und die verminderte Penetranz, so lässt dies vermuten, dass die Wirkung der bekannten nAChR-Mutationen durch Varianten in bisher unbekannt Genen, sowie durch Umweltfaktoren moduliert wird. Hinzu kommt, dass in mutationsnegativen, familiär an ADNFLE Erkrankten weitere Gene zur Aufklärung des Pathomechanismus in Betracht gezogen werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wurden neben dem bereits beschriebenen *CRH*-Gen zwei weitere Kandidatengene ausgewählt, welche sowohl als potentielle Modulatoren der Genfunktion von nAChR, als auch als potentiell ursächliche Gene für ADNFLE in Betracht kommen. Bei diesen Genen handelt es sich um *RIC3* und *VSNL1*.

#### 3.5.1 *RIC3*-Gen

Nguyen und Kollegen identifizierten erstmalig das Gen *RIC3* (MIM 610509) im hermaphroditen Fadenwurm *Caenorhabditis (C.) elegans* (Nguyen et al. 1995). Das humane *RIC3*-Gen befindet sich in der Chromosomenregion 11p15.4, beinhaltet sechs Exons und erstreckt sich über 60 kb (Halevi 2003). Es kodiert für ein aus 369 AS bestehendes Protein, welches sich als Chaperon an der Maturation (Faltung und Assemblierung) von nACh- und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beteiligt und sich sowohl im Muskel, als auch in Neuronen ansiedelt. Genmutationen in *RIC3* resultierten in einer Resistenz des adulten Wurms gegen Inhibitoren der Acetylcholinesterase, was zur Namensgebung (*resistance to inhibitors of cholinesterase homolog 3*) maßgeblich beitrug (Nguyen et al. 1995; Miller et al. 1996; Halevi et al. 2002).

Das Transmembranprotein *RIC3* (Abb. 5) setzt sich aus zwei hydrophoben Transmembran- und einer oder mehrerer Coiled-coil-Domänen zusammen (Halevi et al. 2002; Lansdell et al. 2008). Im humanen Protein herrscht ganz im Gegenteil zum *C. elegans*-Protein keine einhellige Meinung hinsichtlich der N-terminalen, hydrophoben Domäne, da es sich hierbei entweder um eine abspaltbare Signalsequenz oder eine Transmembrandomäne handeln könnte (Castillo et al. 2005; Cheng et al. 2007; Castelan et al. 2008). Die am C-terminalen Ende befindlichen Coiled-coil-Domänen scheinen nicht essentiell für die Chaperonaktivität, wohingegen die Prolin-reiche Domäne zwischen beiden hydrophoben Segmenten die Funktion des Proteins wesentlich mitbestimmt (Ben-Ami et al. 2005; Cheng et al. 2007; Lansdell et al. 2008).



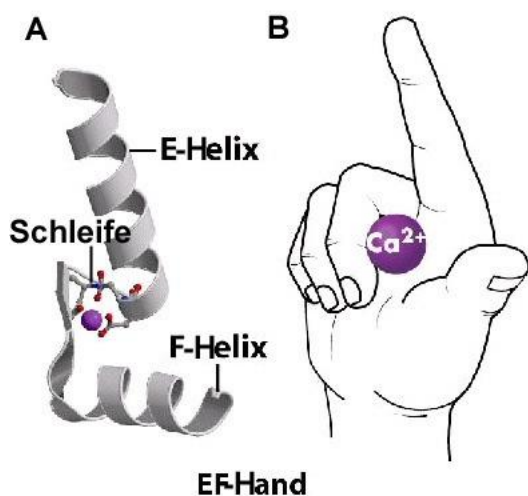
**Abb. 5** Bisheriges Verständnis der Membrantopologie von *RIC3* (Millar 2008).

Das Chaperon RIC3 interagiert wahrscheinlich mit unassemblierten nAChR-Rezeptoruntereinheiten im endoplasmatischen Retikulum (ER), der Hauptlokalisierung des Proteins, und unterstützt somit die Faltung und Koassemblierung dieser Untereinheiten (Halevi et al. 2002; Castillo et al. 2005; Lansdell et al. 2005; Cheng et al. 2007). Studien der vergangenen Jahre demonstrierten einen steigernden Effekt bei der Expression funktioneller Rezeptoren an Zelloberflächen durch Koexpression von RIC3 mit verschiedenen nACh- bzw. 5HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (Halevi et al. 2002; Halevi 2003; Cheng et al. 2005; Lansdell et al. 2005; Williams et al. 2005). Diese Funktion verdeutlicht sich exemplarisch in der Interaktion des Chaperons mit  $\alpha 7$ -Untereinheiten in nichtneuronalen Zelllinien wie HEK293-Zellen, in welchen ohne RIC3 keine effektive Ionenkanalbildung erfolgt (Lansdell et al. 2005; Williams et al. 2005; Roncarati et al. 2008). Die experimentelle Koexpression mit  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR wurde beschrieben, lässt jedoch hinsichtlich widersprüchlicher Ergebnisse noch keine exakten Schlüsse zu (Halevi 2003; Lansdell et al. 2005).

Aufgrund dieser Vermutung über eine mögliche Interaktion, wählten wir RIC3 als Kandidatengen für eine molekulargenetische Mutationsanalyse im ausgewählten ADNFLE-Patientenkollektiv. Die Expression von GABA<sub>A</sub>- und Glycinrezeptoren scheint unabhängig von RIC3 (Halevi et al. 2002; Halevi 2003; Cheng et al. 2005; Lansdell et al. 2005).

### 3.5.2 VSNI1 (VILIP-1)-Gen

Das VSNI1-Gen (MIM 600817) kodiert für das Visinin-ähnliche Protein 1, welches zur Gruppe der neuronalen Kalzium-Sensor- (NCS-) Proteine gehört und sich auf Chromosom 2p befindet. NCS-Proteine ordnen sich den EF-Hand-Kalziumbindenden Proteinen (CBP) unter, welche im Nervensystem die Signaltransduktion kalziumabhängig regulieren. Der daraus resultierenden Freisetzung von Neurotransmittern folgt die neuronale Aktivität.



**Abb. 6** Strukturelemente des EF-Hand-Motivs.  
(Modifiziert nach Universität Maine,  
Institut für Chemie)

**Links:** Zwei  $\alpha$ -Helices (E und F) und eine Schleife aus 12 AS, die diese miteinander verbindet. Die Schleife bildet die hochaffine Kalzium-Bindungsstelle.

**Rechts:** Ihre Anordnung lässt sich als eine Hand beschreiben, deren Zeigefinger (E-Helix) und Daumen (F-Helix) senkrecht aufeinander stehen, während die anderen Finger eine zirkuläre Struktur (Kalzium-Bindungsstelle) formen.

<http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Proteins8.html>

Die EF-Hand formiert sich aus zwei senkrecht aufeinander stehenden  $\alpha$ -Helices, deren Verbindungsschleife 12 aneinandergereihte AS bilden (Abb. 6). Diese stellen die eigentliche Kalzium-Bindungsstelle dar. Die entstandene handähnliche Struktur schlägt sich in der Namensgebung nieder (Ikura and Ames 2006). Charakteristischerweise besitzen die NCS-Proteine vier EF-Hand-Motive als putative Bindungsstellen für Kalzium. Die EF-Hand 1 fungiert hierbei allerdings nicht als eine solche, sondern integriert sich vielmehr in einen Kalzium-Myristoyl-Switch (Braunewell and Gundelfinger 1999). Hierbei handelt es sich um eine weitere NCS-Protein-spezifische Eigenschaft.

Ein N-terminal gebundener Myristoyl-Rest rotiert nach Kalzium-Bindung an die Oberfläche des Proteins und bedingt die Exposition hydrophober AS, welche zur Erweiterung des Bindungscharakters führt. Nun schließt sich eine Bindungsreaktion an zelluläre Membranen oder ein anderes Protein an (Zozulya et al. 1992). Der Übergang von einer zuvor instabilen in eine stabile, jedoch reversible Anheftung an Zell- bzw. intrazelluläre Membranen betont die funktionelle Bedeutung dieses Vorganges. Dank dieses essentiellen Mechanismus erfolgt die Vermittlung von Kalziumsignalen durch VSNL1 ungestört (Heizmann 1993; Burgoyne 2007).

VILIP-1, als einer der Hauptvertreter dieser Proteingruppe (neben VILIP-2, VILIP-3, Hippocalcin und Neurocalcin  $\delta$ ), zeigt einen kalziumabhängigen Einfluss auf die zyklischen Nukleotide Adenylatzyklase und Guanylatzyklase (Braunewell et al. 1997; Braunewell et al. 2001).

Die maßgebliche Interaktion dieses Proteins mit dem  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR wiesen Lin et al. anhand einer *Xenopus*-Oozyten- und einer *tsA201*-Zell-Expressionsanalyse nach. VSNL1 koimmunopräzipitiert mit rekombinanten  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, die in *tsA201*-Zellen exprimiert wurden, sowie mit nativem  $\alpha 4$  aus dem Gehirn. In kultivierten Zellen aus dem Zerebellum kolokalisiert das Protein mit  $\alpha 4$ -nAChR an der Zellmembran. Die Koexpression von VSNL1 mit rekombinantem  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR führte zur Hochregulierung der Oberflächenexpression um das Zweifache, der Agonisten-Sensitivität um das Dreifache. Mutanten, welche nicht mehr myristoyliert werden bzw. kein Kalzium mehr binden können, zeigten eine abgeschwächte Wirkung auf den Rezeptor (Lin et al. 2002). Über den nAChR eingeströmte Kalziumionen triggern vermutlich den Kalzium-Myristoyl-Switch von VSNL1. Myristoyliertes VSNL1 rekrutiert an der Membran und verändert nach Assoziation mit  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR dessen turnover-Rate und dessen Sensitivität gegenüber Agonisten. Diese Untersuchungen unterstreichen die oberflächenexpressionssteigernde Wirkung des Proteins auf den Rezeptor (Lin et al. 2002; Lin et al. 2002). Braunewell und Kollegen untermauerten dies, maßen jedoch vorwiegend  $\alpha 7$ -nAChR, deren Kalziumpermeabilität wesentlich höher liegt als die der  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren, eine entscheidende Bedeutung als Interaktionspartner bei (Ragozzino et al. 1998; Fucile 2004; Zhao and Braunewell 2008; Zhao et al. 2009). Die Interaktion von VSNL1 mit dem  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR stellt einen interessanten molekularbiologischen Ansatz hinsichtlich des Pathomechanismus der Schizophrenie und der Alzheimer-Erkrankung dar (Braunewell et al. 2001; Schnurra et al. 2001; Gierke et al. 2008). Bisher beschreibt die Literatur keine Assoziation mit der ADNFLE und es bedarf daher einer genetischen

Analyse auf mögliche Mutationen im *VSNLI*-Gen (vier Exons), welche in dieser Arbeit an einem ausgewählten Patientenkollektiv durchführt wurde.

### III. Material und Methoden

#### 1. Material

##### 1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 68-70 Individuen aus unterschiedlichen Familien und verschiedener Herkunft zusammen. Sie entstammten einem bereits auf *CHRNA4*- und *CHRNA2*-Genmutationen untersuchten Patientenkreis. Um einzelne Promotorvarianten des *CRH*-Gens exakter zu analysieren, wurden elf weitere Familienangehörige vierer Patienten untersucht. Die Vollständigkeit der vorhandenen anamnestischen Daten und klinischen Diagnostik variierte stark.

Proband	Ethnische Herkunft	Familienanamnese (Anfälle in Familie)
A1	Deutschland	Schwester des Vaters, Schwester von A1
A4	Deutschland	Vater
A7	Deutschland	Mutter, Halbbruder
A9	Deutschland	Tochter
A10	USA	Mutter, 3/3 Kindern (2 Söhne, 1 Tochter), Cousin ms u. dessen Tochter
A11	Deutschland	Vater, 3/5 Geschwistern
A12	Spanien	Mutter
A16	Deutschland	Großmutter
A17	Deutschland	Tante, Großmutter, Cousin, Cousine vs
A18	Belgien	-
A19	Deutschland	-
A24	Nicht Deutschland	Schwester (Anfälle + Migräne), Mutter (Migräne, k. Anfälle)
A27	Spanien	Beide Tanten ms
A28	Österreich	Eineiiger Zwillingbruder, Cousin vs
A32	Deutschland	Keine FA bekannt
A34	Deutschland	Schwester, Onkel ms
A36	Deutschland	Mutter, Schwester
A41	Schweiz	Mutter u. deren Großvater
A42	Schweden	Vater, Großmutter
A44	Deutschland	Keine FA bekannt
A50	Deutschland	Großvater ms, Onkel dessen ms
A52	Deutschland	Vater, Bruder
A60	Österreich	Vater, Bruder
A62	Deutschland	Vater
A63	Argentinien	
A64	Portugal	Vater, 2 Schwestern
A65	Belgien	2 Tanten ms
A67	Schweiz	Bruder
A70	Deutschland	Mutter, Schwester
A72	Deutschland	Bruder, Onkel vs, Tochter
A76	Deutschland	Mutter, Onkel ms, Halb- schwester der Mutter
A77	Schweden	Großmutter, Onkel, Sohn
A78	Großbritannien/Schweiz	Mutter, Bruder, Großmutter u. Urgroßmutter ms
A79	Großbritannien	Schwester
A81	Nicht Deutschland	Mutter
A83	Großbritannien	Tante der Mutter u. deren

A84	Deutschland	Tochter, Großvater vs Mutter, Großmutter, Großonkel, Großtante
A85	Deutschland	Keine FA bekannt
A86	Großbritannien	Mutter (beide Temporallappenepilepsie), Bruder, Cousin ms
A87	Österreich	Keine FA bekannt
A88	Deutschland	Mutter, Schwester der Großmutter ms
A89	Deutschland	Bruder des Großvaters vs, Tochter, Sohn, Nefte,
A91	Schweiz	Mutter, Großmutter ms
A92	Deutschland	Keine FA bekannt
A96	Schweiz	Keine FA bekannt
A97	Deutschland	Vater
A98	Zypern (türkisch)	Mutter, Vater
A101	Norwegen	Schwester, Onkel vs
A102	Großbritannien	Keine FA bekannt
A104	USA	Keine FA bekannt
A105	Dänemark	Keine FA bekannt
A107	Deutschland	-
A108	Neuseeland	Keine FA bekannt
A109	Brasilien	Keine FA bekannt
A110	Dänemark	Keine FA bekannt
A111	Deutschland	Vater
A112	Deutschland	Keine FA bekannt
A114	Holland (V)/Thailand (M)	Vater, Onkel vs, Tante u. Onkel des Vaters, Großmutter vs (Migräne, keine Epilepsie)
A115	Deutschland	Keine FA bekannt
A116	Großbritannien	Tante und Großmutter vs
A117	Spanien	Keine FA bekannt
A118	Deutschland	1/4 Schwestern, Nefte (Sohn der erkrankten Schwester), Nichte (Tochter des gesunden Bruders), Onkel u. Tante vs
A119	Deutschland	Keine FA bekannt
A120	Deutschland	Keine FA bekannt
A121	Norwegen	
A122	Deutschland	
A123	Kanada	Keine FA bekannt
A124	Deutschland	Keine FA bekannt
A125	Deutschland	Keine FA bekannt
A126	Nicht Deutschland	Keine FA bekannt

**Tab. 3** *Herkunft und Familienanamnese der untersuchten Patienten.  
(FA: Familienanamnese; M: Mutter; ms: mütterlicherseits;  
V: Vater; vs: väterlicherseits)*

Das Kollektiv stammte aus Einsendungen neurologischer Kliniken oder niedergelassener Neurologen, welche bei ihren Patienten eine Diagnostik hinsichtlich ADNFLE wünschten. Die Blutproben wurden von 1995-2004 im Humangenetischen Institut der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und seitdem im Humangenetischen Institut des Klinikums der LMU München untersucht.

Das Kontrollkollektiv bestand aus anonymisierten DNA-Proben gesunder deutscher Probanden.

## 1.2 Elektrische Geräte und Arbeitsutensilien

Autoklav

Bioclav t-1463343, Schütt GmbH, Göttingen, D

Brutschrank

Heraeus, Hanau, D



Elektrophoresegeräte	Multigel-Long-Gelkammer, Biometra, Göttingen, D Agarosekammer Maxi blu (120V/200mA), biotech service blu, Schauenburg, D
Elektrophoresezubehör	Gelträger 20x21cm, biotech service blu, Schauenburg, D 30-Zahn-Kämme, biotech service blu, Schauenburg, D
Geldokumentation	BDA digital, Biometra, Göttingen, D PowerShot G10, Canon, Tokyo, Japan FinePix F20 Digital Camera, Fujifilm, Tokyo, Japan
Heizblock	UNO-Thermoblock, Biometra, Göttingen, D
Magnetrührer	Ikamag REO, IKA Labortechnik, Staufen, D
Mikrowelle	M 638 EL, Miele & Ci. KG, Gütersloh, D
Photometer	Gene Quant, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Pipetten	Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Villiersle-Bel, F
Schüttelapparate	GFL 3016, Burgwedel, D Mini-Rocker Shaker MR-1, lab4you GmbH, Berlin, D
Spannungsgeräte	Elektrophoresis Power Supply LKB-GPS 200/400, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D Elektrophoresis Power Supply EPS 200, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
SSCP-Zubehör	Glasplatten mit fixierten 1,0mm Spacern, Biometra, Göttingen, D Glasplatten ausgeschnitten mit geradem Schliff, Biometra, Göttingen, D Kämme 24-zählig, 1,0mm-18µl/Tasche, Biometra, Göttingen, D Silikonabdichtung 1,0mm, Biometra, Göttingen, D Klammern, Biometra, Göttingen, D
Thermocycler	PTC 200 DNA Engine, MJ Research, Bio-Rad, München, D
Thermomixer	Compact, Eppendorf, Hamburg, D
Vortex	Genie 2 TM, Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waage	AC-100, Mettler-Toledo GmbH, Giessen, D
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, D Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA

### 1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien trugen die Qualitätsbezeichnung p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

- AppliChem GmbH, Darmstadt, D
- Bio-Rad, Hercules, USA
- Merck, Darmstadt, D
- Serva, Heidelberg, D
- Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

### 1.4 Primer

Die verwendeten Oligonukleotidprimer (Tab. 4-6) wurden von der Firma MWG-Biotech AG Ebersberg synthetisiert. Die Primersequenzen für die drei untersuchten Gene (*RIC3*, *VSNL1*, *CRH*) wurden anhand der veröffentlichten DNA-Sequenz mithilfe des Internetprogramms Primer3 eigenständig konstruiert.

Gen-region	Exon-größe [bp]	Produkt-größe [bp]	Primer-bezeichnung	Primersequenz 5'-3'
<b>Exon 1</b>	178			
<b>1.1</b>		298 Start	RIC3 1.1F RIC3 1.1R	ACTCCCGACAGTGGAGGTG TGGCCTGCTCTTACCTTCAG
<b>1.2</b>		226	RIC3 1.2F RIC3 1.2R	CTCCACAGTGCAGAGAGTCCG GGTGGATATTTCGGTGAAGG
<b>Exon 2</b>	227			
<b>2.1</b>		272	RIC3 2.1F RIC3 2.1R	ACCTTAATGATTGGTGTGTTTCA CCCAAAACCGTAGATTGGAA
<b>2.2</b>		205	RIC-3 2.2n F RIC-3 2.2n R	TTCCAGAGGTCTCACCTTGC TTGCCATATTAGATTTTCATTGATGT
<b>Exon 3</b>	76	206	RIC3 3F RIC3 3R	TTCCGTGACTGAGGTTCTGA ACAGACTGTCCCTGTGGCTA
<b>Exon 4</b>	94	202	RIC3 4F RIC3 4R	AAATTTGTGGTCTCTTTAACAGGTTT TGAGAAATAGTCTGAGTCCCGTTAC
<b>Exon 5</b>	146	224	RIC3 5F RIC3 5R	CCACTAAATGGTTGGATTGTCTG TGGGCTGACAGCTAACAAAA
<b>Exon 6</b>	5088			
<b>6.1</b>		247	RIC-3 6.1n F RIC-3 6.1n R	GGAGACATTCTTTGTAATACTTTGTGC GAATTATCTTCTGGGCTCTG
<b>6.2</b>		199	RIC-3 6.2n F RIC-3 6.2n R	TCATTTGGGTTGGGAAAGTC TTGGGACCACTCTTCTTTGG
<b>6.3</b>		216 Stopp	RIC3 6.3F RIC3 6.3R	TGTCTTGGCAGAGAATGCTG GAGGTCACCTTGGGACTTGA
<b>6.4</b>		206	RIC-3 6.4n F RIC-3 6.4n R	GAGTGAAAACAGCCAGTCTGAA TGTTCACACTAATGTCCGTGTTT
<b>6.5</b>		268	RIC-3 6.5n F RIC-3 6.5n R	ATCCTTCCTGGTGCTCACAC TGAAATCTTCATTCTTGCAACC

Tab. 4 *Primersequenzen für das Gen RIC3.*

Genregion	Exon- größe [bp]	Produkt- größe [bp]	Primer- bezeichnung	Primersequenz 5'-3'
<b>Exon 1</b>	266			
1.1		250	VILIP-1-1.1F VILIP-1-1.1R	AAAATCTGGAGACGTGGAATC GCTCGGGTAAATCTCTGCTG
1.2		286	VILIP-1-1.2F VILIP-1-1.2R	CCCTAGGTTTTCTATGGGATTC ACATGCAGAAATGCAACGAA
<b>Exon 2</b>	167	249	VILIP-1-2F	ATCACAGCCACAGCGCTAAT
		Start	VILIP-1-2R	TGGCCTAAGGAATAAAAACAAGG
<b>Exon 3</b>	216	295	VILIP-1-3F VILIP-1-3R	ACCTGACTGCGCGTGTCT GTGGGGTCTCCTTCTGTGC
		350	VILIP-1-3Fn* VILIP-1-3R	TGTGATGCCGTCATTAGGAA GTGGGGTCTCCTTCTGTGC
<b>Exon 4</b>	1243			
4.1		249	VILIP-1-4.1F VILIP-1-4.1R	TCTGTCCTCCTGGGTTTCTG CATTCTGGATGTCGCACTG
4.2		288	VILIP-1-4.2F VILIP-1-4.2R	AAGAGCGACCCTTCCATTGT TCACATTGTGGCAGGTTGTT
4.3		242	VILIP-1-4.3F VILIP-1-4.3R	CACTCGTGTGCATGAGAATGT AAGTTACATTACCATGGGGTCT
4.4		221	VILIP-1-4.4F VILIP-1-4.4R	TTCATGTTTTGCTAATGCTCGT ACCCAAAAGGCATGCAAAT
4.5		269	VILIP-1-4.5F VILIP-1-4.5R	GTCTGGTCCACACACCACAG TTGAAAATTCAAACAGAAACCAA

\*alternativer Sequenzierprimer

Tab. 5 *Primersequenzen für das Gen VSNLI (VILIP-1).*

Genregion	Exon- größe [bp]	Produkt- größe [bp]	Primerbezeichnung	Primersequenz 5'-3'
<b>Promotor</b>		542	CRH-Promotor F CRH-Promotor R	GTTCTGCACACCCCTCTC CACGCAGCATTTGCCTAATA
<b>Exon 2</b>	1107			
2.1		280	CRH-2.1-F CRH-2.1-R	CTCTCCCCTCTCTCATTCC GGAAGTACTCCTCTCCCATGC
2.2		230	CRH-2.2-F CRH-2.2-R	ACCCTCAGCCCTTGGATTT CAGCAACACGCGGAAAAA
2.3		268	CRH-2.3-F CHR-2.3-R	GGGGAACCTCAACAAGAGC GAAGGTGAGATCCAGGGAGA
2.4		252	CRH-2.4-F CRH-2.4-R	GCACCGGAGAGAGAAAGG AAACAAATGGCATAAGAGCAG

Tab. 6 *Primersequenzen für das Gen CRH.*

## 1.5 Feinchemikalien und Enzyme

Längenstandard	50bp-Leiter, 0,5µg/µl, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D 100bp-Leiter, 0,5µg/µl, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D 6x DNA Loading Dye, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Dinukleotide	(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 100mM, Fermentas, St. Leon-Rot, D

PCR-Reinigungskit	my-Budget Double Pure Kit, Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, D Invisorb® Fragment CleanUp, Invitek, Berlin, D
Polymerasen	GoTaq® DNA Polymerase, 5 U/µl, Promega, Madison, USA
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D New England Biolabs, Frankfurt/Main, D

## 2. Methoden

### 2.1 DNA-Isolation

#### 2.1.1 Salzfällung

In der Regel werden von jedem Probanden 2-3 ml, mit EDTA versetztes Frischblut benötigt. Mittels Salzfällung wird aus den peripheren Lymphozyten die genomische DNA isoliert (Miller et al. 1988). Diese Methode findet Anwendung, wenn eine ausreichende Menge des Ausgangsmaterials vorhanden und eine große DNA-Ausbeute zu erwarten ist.

Die extrahierte DNA eignet sich nun für molekulargenetische Untersuchungen.

#### Reagenzien

Frischblutlysispuffer	155mM NH <sub>4</sub> Cl 10mM KHCO <sub>3</sub> 0,1mM EDTA
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0)
Pronase	20mg/ml
SDS	10% in A. dest
NaCl-Lösung	gesättigt (ca.5M)
Ethanol	70% und 100%
<i>TE</i> <sup>-4</sup>	10mM Tris (pH 7,4) 0,1mM EDTA (pH 7,4) (autoklaviert)

Um der Gerinnungsaktivität entgegenzuwirken, wird das eingesandte Blut mit dem Antikoagulant EDTA versetzt. Die gesamte Menge Frischblut (2-3 ml) wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und mit kaltem Frischblutlysispuffer auf 15 ml aufgefüllt, bis zur vollständigen Lyse geschwenkt und für 15 min auf Eis gestellt. Dieser Schritt dient dem Aufplatzen der Erythrozyten. Anschließend gelingt es durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4°C/1200 rpm die Leukozytenkerne

von den übrigen Blutbestandteilen zu trennen. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und die Röhrenwand mit 8 ml Lysispuffer nochmals durch Schütteln und Zentrifugieren abgespült. Fortführend wird das Pellet mit den darin enthaltenen Zellkernen mit 2 ml SE-Puffer resuspendiert und 100 µl 10% SDS, sowie 12 µl Pronase hinzugefügt. Dies führt zur Zerstörung der Leukozytenkernmembran und macht die Proteine dem Verdau zugänglich. Der Verdau der Proben erfolgt über Nacht bei 37°C.

Zeigt sich die Suspension am Folgetag klar, werden 800 µl gesättigter NaCl-Lösung (5 M) zum Ausfällen der Proteine und restlichen Kernbestandteile addiert. Nach anfänglichem Vortexen und zweimaliger Zentrifugierung für 10 min bei 3500 rpm und Raumtemperatur wird der die DNA enthaltende Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 8 ml 100%igem Ethanol schwenkt man das Röhrchen leicht bis zur Ausfällung der fädig weißen DNA. Eine umgebogene Pasteurpipette dient der Herausnahme der DNA, die im nächsten Schritt mit 70%igem Ethanol gereinigt wird. Nach über 5-minütigem Trocknen, resuspendiert man diese abschließend in einer angemessenen Menge  $TE^{-4}$  (50-300 µl) und löst sie über Nacht bei Raumtemperatur.

### 2.1.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten DNA wird photometrisch bestimmt. Dazu verdünnt man diese 1:50 mit A.dest und justiert das Photometer für die Messung auf eine Wellenlänge von 260 nm, da sich bei diesem Wert das Absorptionsmaximum doppelsträngiger DNA befindet. Als Referenzmarke zieht man den Leerwert von A.dest heran.

Die Berechnung der DNA-Konzentration gelingt mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$\text{Konzentration } C \text{ [}\mu\text{g/ml]} = \frac{\text{Optische Dichte } A_{260} \times \text{Verdünnung (Faktor 70)}}{\text{Extinktionskoeffizient für DNA (Faktor 50)}}$$

## 2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Das Verfahren der PCR stellt eine der bedeutendsten Methoden zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten dar. Hierbei bedient man sich der de- und renaturierenden Eigenschaften dieser unter bestimmten Temperaturbedingungen. Kurze Oligonukleotide, welche als Polymerisationsstart für das Enzym DNA-Polymerase fungieren, begrenzen Anfang und Ende des zu amplifizierenden Fragments. Diese sogenannten Primer besitzen eine Länge von ca. 18-27 bp und werden komplementär zu dem Anfangs- und Endbereich des zu amplifizierenden Fragments gewählt. Erst durch die Anlagerung der Primer wird die Polymerase zur Katalysation der Neusynthese des DNA-Stranges befähigt.

Der erste Schritt der PCR kennzeichnet sich durch die hitzebedingte Denaturierung des DNA-Doppelstranges, welche die Anlagerung der Primer bei deren Annealingtemperatur an die entstandenen DNA-Einzelstränge ermöglicht. Diese werden zuvor über das Primerdesigntool Primer3 kon-

struiert. Hierbei gilt es zu beachten, dass die Länge 30 bp nicht überschreitet. Zudem sollte ein geringer GC-Gehalt erreicht werden, um die Schmelztemperatur vorzugsweise zwischen 55 und 65°C zu halten.

Die spezifische, für die Anlagerung notwendige Temperatur lässt sich zusammenfassend unter Berücksichtigung ihrer Länge, Basenzusammensetzung und ihres Schmelzpunktes bestimmen. Hierzu kann folgende Formel herangezogen werden:

$$T_A = \text{Anzahl (A+T)} \times 2^\circ\text{C} + \text{Anzahl (G+C)} \times 4^\circ\text{C}$$

Die eingesetzte *Taq*-Polymerase, ein hitzeresistentes Enzym, ermöglicht die Durchführung der Reaktion in einem Durchgang. Die Hitzeresistenz rührt von der Isolierung dieser aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus*. Während des Elongationsprozesses katalysiert das Enzym die Synthese des gewünschten Fragments bei 72°C. Desweiteren unterstützt und beschleunigt es die Replikation des DNA-Fragments.

Die Schrittfolge – Denaturierung, Annealing und Elongation – wiederholt sich zwischen 30- und 40mal. Nach 30 Zyklen beobachtet man ein exponentiell um das  $10^7$ -fache amplifiziertes DNA-Fragment. Bei mehr als 40 Zyklen verliert die Polymerase ihre Aktivität und es kommt zum vermehrten Auftreten unerwünschter Nebenprodukte. Eine finale, 10-minütige Extension schließt die Reaktion ab. Das angewandte Touchdown-Verfahren beinhaltet eine innerhalb der ersten sechs Zyklen stattfindende Erniedrigung der Annealingtemperatur um 1°C.

Um eventuelle Kontaminationen der beteiligten Reagenzien mit Fremd-DNA auszuschließen, erfolgt simultan immer auch eine Untersuchung einer Wasserprobe.

#### Ausgangsreagenzien

Green <i>GoTaq</i> Flexi Buffer	5x (pH 8,5)
(incl. MgCl <sub>2</sub> )	7,5 mM)
dNTPs	100 mM dATP
	100 mM dCTP
	100 mM dGTP
	100 mM dTTP
Primer	100 µM
<i>GoTaq</i> -Polymerase	5 Units/µl
DNA	20 ng/µl
A.dest	sterifiltriert

Die genannten Reagenzien werden in folgenden Finalkonzentrationen eingesetzt:

Reagenzien für 25µl-Ansatz

5x Green GoTaq Flexi Buffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	200 µM
Primer F (forward)	10 µM
Primer R (reverse)	10 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	1 U
DNA	40 ng
A.dest	Restvolumen

Standard-PCR-Programm

1.	2 min	95°C	Denaturierung
2.	25 s	95°C	Denaturierung
3.	30 s	T <sub>A</sub>	Primerannealing
4.	45 s	72°C	Elongation
5.	10 min	72°C	Finale Elongation
6.	Unendlich	15°C	in Thermocycler

Für die Template-Amplifizierung werden die Schritte 2-4 34-35mal wiederholt. Für jedes Exon werden individuelle PCR-Bedingungen etabliert (Tab. 7 - 9). Die Amplifizierung erfolgt in einem Thermocycler.

Gen-region	Exon-größe [bp]	Produkt-größe [bp]	Primer-bezeichnung	PCR-Bedingungen	Zyklen
<b>Exon 1</b>	178				
1.1		298 Start	RIC3 1.1F RIC3 1.1R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
1.2		226	RIC3 1.2F RIC3 1.2R	95°C 25'', 61°C-56°C 30'', 72°C 45''	35
<b>Exon 2</b>	227				
2.1		272	RIC3 2.1F RIC3 2.1R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
2.2		205	RIC-3 2.2n F RIC-3 2.2n R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
<b>Exon 3</b>	76	206	RIC3 3F RIC3 3R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
<b>Exon 4</b>	94	202	RIC3 4F RIC3 4R	95°C 25'', 61°C-56°C 30'', 72°C 45''	35
<b>Exon 5</b>	146	224	RIC3 5F RIC3 5R	95°C 25'', 61°C-56°C 30'', 72°C 45''	35
<b>Exon 6</b>	5088				
6.1		247	RIC-3 6.1n F RIC-3 6.1n R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
6.2		199	RIC-3 6.2n F RIC-3 6.2n R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
6.3		216 Stopp	RIC3 6.3F RIC3 6.3R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
6.4		206	RIC-3 6.4n F RIC-3 6.4n R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
6.5		268	RIC-3 6.5n F RIC-3 6.5n R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35

Tab. 7 PCR-Bedingungen für das Gen RIC3.

Gen-region	Exon-größe [bp]	Produkt-größe [bp]	Primer-bezeichnung	PCR-Programm	Zyklen
<b>Exon 1</b>	266				
1.1		250	VILIP-1-1.1F VILIP-1-1.1R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35
1.2		286	VILIP-1-1.2F VILIP-1-1.2R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35
<b>Exon 2</b>	167	249	VILIP-1-2F VILIP-1-2R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35
<b>Exon 3</b>	216	295	VILIP-1-3F VILIP-1-3R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35
		350	VILIP-1-3Fn* VILIP-1-3R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35
<b>Exon 4</b>	1243				
4.1		249	VILIP-1-4.1F VILIP-1-4.1R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35
4.2		288	VILIP-1-4.2F VILIP-1-4.2R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35
4.3		242	VILIP-1-4.3F VILIP-1-4.3R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35
4.4		221	VILIP-1-4.4F VILIP-1-4.4R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35
4.5		269	VILIP-1-4.5F VILIP-1-4.5R	95°C 25'', 60°C-55°C 30'', 72°C 45''	35

\*alternativer Sequenzierprimer

Tab. 8 PCR-Bedingungen für das Gen VSNL1 (VILIP-1).



Gen-region	Exon-größe [bp]	Produkt-größe [bp]	Primer-bezeichnung	PCR-Programm	Zyklen
<b>Promotor</b>		542	CRH-Promotor F CRH-Promotor R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
<b>Exon 2</b>	1107				
<b>2.1</b>		280	CRH-2.1-F CRH-2.1-R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
<b>2.2</b>		230	CRH-2.2-F CRH-2.2-R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
<b>2.3</b>		268	CRH-2.3-F CHR-2.3-R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35
<b>2.4</b>		252	CRH-2.4-F CRH-2.4-R	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45''	35

Tab. 9 PCR-Bedingungen für das CRH-Gen.

### 2.3 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

PCR-Produkte lassen sich mithilfe verschiedener Verfahren auftrennen. Zur Anwendung kommen entweder Agarose- oder Polyacrylamidgele. Aufgrund des negativgeladenen Phosphat-Rückgrats der DNA wandern die Proben bei Anlegen einer Spannung zur Anode. Hinsichtlich ihrer Größe legen große Fragmente kürzere Strecken als kleine zurück. Die Gelmatrix bestimmt die Genauigkeit und Länge der Auftrennung. Je höher der Vernetzungsgrad eines Gels bzw. die Engmaschigkeit der Matrix, desto besser gestaltet sich die Produktauftrennung.

#### 2.3.1 Agarosegele

Zur Überprüfung der Qualität und Spezifität der PCR-Produkte empfehlen sich 1%ige Agarosegele. Die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid ermöglicht durch Interkalierung dessen zwischen die Basenpaare der DNA die Detektion der PCR-Produkte unter UV-Licht. Die Sensitivitätsgrenze liegt bei einem DNA-Gehalt von etwa 10 ng.

#### Reagenzien

Agarose

10x TBE

1,0 M Tris

0,9 M Borsäure

0,01 M EDTA

pH 8,4

Ethidiumbromid

10 mg/ml

Der Agarosegelträger fasste 300 ml.

Zusammensetzung des Gels

Agarose	1% bzw. 2%
TBE	1x
Ethidiumbromid	0,001 mg/ $\mu$ g

Zum vollständigen Auflösen der Agarose kocht man diese in 1xTBE in einer Mikrowelle auf. Bei Erreichen einer Temperatur von ca. 60-65°C wird Ethidiumbromid hinzugegeben. Nach nochmaligem Abkühlen auf 45°C gießt man diese in den bereits vorbereiteten, abgeklebten und mit Kämmen versehenen Gelträger. Nach Erstarren des Gels werden 5  $\mu$ l des zu analysierenden PCR-Produkts aufgetragen. Die vorherige Verwendung des 5x Green GoTaq Flexi-Puffers im PCR-Gemisch, welcher der Visualisierung und Beschwerung des PCR-Fragments im Agarosegel dient, vereinfacht das Auftragen der Probe erheblich. Er enthält sowohl einen blauen, als auch einen gelben Farbstoff und erhöht außerdem die Dichte des in die Geltaschen pipettierten Produkts. Eine zusätzlich aufgetragene 100-Basenpaarleiter ermöglicht die Größenbestimmung der Fragmente.

Bei Verwendung dieser Gele zur Überprüfung eines mittels des PCR-Aufreinigungskits aufbereiteten, gereinigten Produkts versetzt man diese zur Beschwerung und besseren Sichtbarkeit mit einem speziellen Blaupuffer.

Agarose-Blaupuffer

TBE	10x	10 ml
Ficoll 400	20x	40 ml
Bromphenolblau	0,1%	20 ml
A.dest		ad 100 ml

5  $\mu$ l der zu analysierenden PCR-Fragmente werden mit 5  $\mu$ l des Puffers gemischt und aufgetragen. Auch hierbei nutzt man die Basenpaarleiter als Referenz zur Größenangabe.

Die Elektrophorese läuft zwischen 40 und 45 min bei einer Spannung von 120 V in 1xTBE. Nach Ablauf dieses Vorgangs wird das Gel unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert.

**2.3.2 Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele)**

Um PAA-Gele herzustellen, benötigt man ein bestimmtes Mischungsverhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid. Abhängig von deren Konzentration, sowie deren Verhältnis zueinander, variieren der Vernetzungsgrad und die Trennbereiche der Gele. Die Polymerisationsreaktion verläuft in Gegenwart von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED. Letzteres katalysiert die Bildung freier Radikale aus dem Persulfat, welche diesen Prozess initiieren und beschleunigt auf diese Weise die Reaktion (Ibelgaufts 1993).

### 2.3.2.1 Single-Strand-Conformation-Polymorphism Analysis (SSCP/SSCA)

Die SSCP ist eine unspezifische Screeningmethode zur Detektion von Mutationen oder genetischen Varianten in DNA-Fragmenten. Sie bedarf, der Namensgebung folgend, einzelsträngiger DNA, welche sequenzspezifische Konformationen ausbilden kann und mithilfe von PAA-Gelen visualisiert wird (Orita et al. 1989). Die ausgebildeten Bandenmuster variieren in Abhängigkeit von einer von der Wildtyp-Sequenz abweichenden Basenzusammensetzung des untersuchten Fragments.

Das SSCP-Muster liefert nur einen Hinweis auf das Vorhandensein von Sequenzvarianten, nicht aber über deren Art oder Position. Das beschriebene Verfahren eignet sich zur Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs.

Die optimale Fragmentgröße für die SSCP-Analyse bewegt sich zwischen 200 und 300 bp. Die Detektionsrate für Mutationen in Produkten bis zu einer Größe von 300 bp beträgt ca. 90 % (Sheffield et al. 1993). Aufgrund einiger, zu großer Exons in den drei Genen werden diese mithilfe interner Primer nochmals aufgeteilt. Dies betrifft die Exons 1, 2 und 6 des Gens *RIC3*, die Exons 1 und 4 des *VSNI1*-Gens und Exon 2 des *CRH*-Gens.

Die PCR-Fragmente werden unter Zugabe eines speziellen SSCP-Probenpuffers denaturiert. Dieser enthält deionisiertes Formamid, um den Denaturierungszustand zu erhalten. Da sich je nach Laufbedingung unterschiedliche Resultate ergeben, untersucht man das Laufverhalten unter vier verschiedenen, von Temperatur und Glycerolkonzentration abhängigen, Voraussetzungen.

<u>Reagenzien für die PAA-Gel-Stocklösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Acrylamid/Bisacrylamid (49:1)	10%
(Acrylamid 40%/Bisacrylamid 2%)	
10x TBE	0,5x
10% APS	1%
TEMED	0,05%
Glycerol	5%
A.dest	
Ethanol	70%

#### SSCP-Probenpuffer

(Agaroseblaupuffer/Formamid 1:5)

TBE	10x	10 ml
Bromphenolblau	0,1%	20 ml
Ficoll 400	20x	40 ml

A. dest	ad 100 ml
Deion. Formamid	95%

Die Vermischung der obengenannten Reagenzien ergibt ein PAA-Gel mit einem Acrylamidgehalt von 10 %. Vor dem Zusammenfügen der verwendeten Gelplatten (14cm x 15cm) erfolgt die Reinigung dieser mit 70%igem Ethanol. Auf den gläsernen Platten befinden sich 1 mm dicke Spacer, welche zur Abdichtung mit Silikongummis gleicher Dicke umzogen werden. Vier Klammern stabilisieren das Konstrukt. Das aus dem Stock hergestellte Gel fasst etwa 20 ml. Um nun unterschiedliche Bedingungen für den Versuch zu schaffen, werden vier Gele, von welchen zwei mit 5%igen Glycerol versetzt sind, gegossen. Der Polymerisationsstarter APS wird dem Gemisch erst kurz vor dem Gießen zwischen die Platten zugegeben. Ein Gel liegt, um ein angemessenes Verfestigungsergebnis zu erzielen, etwa eine Stunde bevor es in eine Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit 0,5x TBE-Laufpuffer befüllt wird. Im weiteren Verlauf werden 3 µl des zu analysierenden PCR-Fragments mit 5 µl SSCP-Probenpuffer versetzt und die Ansätze für 5 min bei 94°C denaturiert. Anschließend erfolgt eine Abkühlung dieser auf Eis. Dieser Vorgang und die vorherige Beimischung von dem im Ladepuffer enthaltenen Formamid verhindern die Renaturierung und Konformationsveränderung der DNA. Im Anschluss werden die PAA-Geltaschen mit 8 µl des Probengemisches, sowie 4 µl einer 100bp-Leiter (1µg/µl) befüllt.

Je ein Gel mit und ohne Glycerol läuft nun bei Raumtemperatur unter 180 V-Spannung, während die anderen beiden ebenfalls mit und ohne Glycerol für ca. drei Stunden im Kühlschrank (4°C) unter 200 V-Spannung laufen.

### 2.3.2.2 Detektion der Fragmente mithilfe der Silberfärbung

Für die Detektion der Fragmente stehen verschiedene Färbetechniken zur Auswahl. Diese beruhen auf dem Interkalationsvermögen eines jeweiligen Farbstoffes mit der DNA. Neben der Färbung mit Ethidiumbromid stellt die Silberfärbung eine attraktive, vergleichsweise sensitivere und weniger toxische Alternative dar. Die Detektionsgrenze für DNA hierbei siedelt sich bei unter 0,03ng/mm<sup>2</sup> an. Diesem Verfahren liegt eine Redoxreaktion der Reaktionspartner Silber und einem Natriumcarbonat/Formaldehyd-Gemisch zugrunde. Die gelösten noch unsichtbaren, freien Silberkationen binden an die DNA. Bei der Entwicklung mit Natriumcarbonat/Formaldehyd erfolgt eine Reduktion dieser zu schwarzbraunem, elementarem Silber.

#### Reagenzien

Ethanol	10%
HNO <sub>3</sub>	1%
AgNO <sub>3</sub>	0,2%
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3%

Formaldehyd	0,05% in Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Essigsäure	10%

#### Ablauf der Silberfärbung

Um die DNA-Fragmente nach dem Elektrophoresedurchgang im PAA-Gel zu fixieren, wird dieses für 10 min in eine spezielle Färbeschale gegeben, welche mit 10%igem Ethanol aufgefüllt wird. Im nächsten Schritt erfolgt die zehnmütige Ansäuerung mittels 1%iger Salpetersäure. Eine sich anschließende Phase von 30 min gilt nun der Anlagerung der Silberionen an die DNA. Hierzu kommt eine 0,2%ige Silbernitratlösung zur Anwendung. Mithilfe jeweils drei 1-minütiger Waschprozesse mit A.dest werden überschüssige, ungebundene Silberionen entfernt, um eine detektionsmindernde Hintergrundfärbung zu vermeiden. Eine mit Formaldehyd versetzte Natriumcarbonatlösung fungiert im weiteren Verlauf als Entwickler, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Diese treten erst nach mehrfachem, ebenfalls kurzem Waschen mit dem Reagenz zum Vorschein. Im letzten Vorgang ermöglicht die Zugabe von Essigsäure das Beenden der Reaktion.

Zur Dokumentation werden die Gele nach etwa zehnmütiger Essigsäureexposition fotografiert und auf dem hausinternen Laborcomputer archiviert.

## **2.4 Direkter Mutationsnachweis**

Zu den direkten Mutationsnachweisen zählen der Restriktionsverdau, die direkte Sequenzierung sowie die Hybridisierung von spezifischen Oligonukleotiden mit DNA. Sie ermöglichen die direkte DNA-Analyse, sowohl auf bekannte, als auch, mithilfe der Sequenzierung, auf unbekannte Mutationen.

### **2.4.1 Restriktionsverdau**

Bei diesem Verfahren binden und schneiden Typ II-Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungssequenzen der DNA. So vermag es eine Mutation, Schnittstellen zu schaffen oder sogar zu zerstören. Eine Analyse der DNA-Sequenz am PC erlaubt das Vorhersagen von Schnittstellen. Für diese werden die Internetprogramme NEBcutter und Restrictionmapper kombiniert genutzt. Letzteres stellt ein Programm zur Ermittlung von Schnittstellen in DNA-Sequenzen dar und bietet zudem eine virtuelle Verdaufunktion, welche einen Verdau der ausgewählten Sequenz mit einem gewünschten Enzym ermöglicht.

Genregion	Polymorphismus [bp] (Reference SNP)	Primer	Enzym	Wildtyp [bp]	Polymorphismus [bp]
ncr außerhalb ncr im 5'UTR	c.-61G>A	RIC3 1.1F	<i>SduI</i>	194-104	k. Schnittstelle
	c.-35G>A	RIC3 1.1R	<i>Cac8I</i>	165-55-46-27-5	220-46-27-5
Exon 1.2	K25R	RIC3 1.2F RIC3 1.2R	<i>StuI</i>	155-68	k. Schnittstelle
Exon 6.2	D311N	RIC-3 6.2n F RIC-3 6.2n R	<i>MboI</i>	87-67-45	132-67
Exon 6.3	D351N* (rs11826236)	RIC-3 6.3Fmut RIC-3 6.4n R	<i>TaqI</i>	259-17	k. Schnittstelle

\*Mutageneseprimer erforderlich

Tab. 10 Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das Gen *RIC3*.

Genregion	Polymorphismus/ Mutation (Reference SNP)	Primer	Enzym	Wildtyp [bp]	Polymorphismus [bp]
5'UTR	c.-390A>C (nicht beschrieben)	VILIP-1-1.1F, VILIP-1-1.1R	<i>BccI</i>	181-69	k. Schnittstelle
	c.149G>A (rs1802174)	VILIP-1-1.2F, VILIP-1-1.2R	<i>Fnu4HI</i>	133-51-39-31-26-3-3	172-51-31-26-3-3

Tab. 11 Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das Gen *VSNL1 (VILIP-1)*.

Genregion	Polymorphismus/ Mutation (Reference SNP)	Primer	Enzym	Wildtyp [bp]	Polymorphismus [bp]
Promotor	g.-1470C>A (rs12721510)	CRH-Promotor F, CRH-Promotor R	<i>ScrFI</i>	367-73-39-33-30	367-103-39-33 401-103-39
	g.-1404G>A (nicht beschrieben)	CRH-Promotor F, CRH-Promotor R	<i>ScrFI</i>	401-73-39-30	358-127-57
	g.-1166G>C (Combi et al. 2005)	CRH-Promotor F, CRH-Promotor R	<i>HinfI</i>		485-57
Exon 2.2	g.288A>C* (rs6159)	CRH 2.2 F RV, CRH 2.2 R MUT	<i>BsmAI</i>	186-161-25	161-25

\*Mutageneseprimer erforderlich

Tab. 12 Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das *CRH*-Gen.

### Reagenzien

PCR-Produkt	5 µl
Restriktionsenzym	1 U
10x Enzypuffer	1x
BSA	(wenn nötig)
A.dest	ad Endkonzentration

Die Mehrheit der Verdauungen gelingt bei 37°C und ca. drei Stunden im Thermocycler. Bestimmte Enzyme erfordern zur Entfaltung ihrer Aktivität andere Temperaturbedingungen. Hierbei wird sich an

den Angaben des Herstellers orientiert. 2,5 oder 5 µl der Verdauprodukte, 6 µl einer 50bp-Leiter und 5 µl eines unverdauten Produkts werden auf ein 10%iges, mit 5% Glycerol versetztes PAA-Gel aufgetragen. Die Gele laufen 1,5 Stunden bei einer Spannung von 200 V und Raumtemperatur, bevor man sie mittels der Silberfärbung weiterverarbeitet. Zur Geldokumentation wird eine Digitalkamera mit Stativ eingesetzt.

Die unterschiedlichen Fragmentlängen, sowie deren Intensitäten geben Aufschluss über vorhandene Mutationen.

#### 2.4.1.1 Mutageneseprimer

Lässt sich in einer Datenbank kein geeignetes Enzym mit Schnittpotential für eine bestimmte Region, in welcher eine Mutation liegt, finden, benötigt man einen sogenannten Mutagenese-/Mismatch- primer. Dieser kann gezielt eine Basenänderung im zu amplifizierenden PCR-Produkt und somit eine detektierbare Schnittstelle erzeugen. Der Primer sollte eine Länge von 25 bp nicht überschreiten und keine überlappenden Enden, welche in einem Ringschluss resultieren könnten, aufweisen. Desweiteren empfiehlt es sich, die Basensubstitution, welche bei der PCR-Amplifikation auch in das Fragment eingebaut wird, wenige Basen vor dem 3'-Ende des Primers zu lokalisieren (Sequenzen der Mutageneseprimer in Tab. 13).

Um bekannte Mutationen zu detektieren, werden die PCR-Produkte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen versetzt und verdaut. Die Fragmente werden anschließend auf ein PAA-Gel aufgetragen und ihre Größen miteinander verglichen. Als Referenz dienen hierbei ein unverdautes Produkt und eine 50bp-Leiter. Je nachdem, ob ein Verdau erfolgt oder nicht, handelt es sich um eine Mutation oder einen Polymorphismus (Tab. 10-12).

Gen/ Variante	Produkt- größe [bp]	Primer- bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	PCR-Bedingungen
RIC3/ D351N	276	RIC-3	GGGTTGGGCATCAGCATC	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45'' (35 Zyklen)
		6.3Fmut* RIC-3 6.4n R	TGTTCACTAATGTCCGTGTTT	
CRH/ g.288A>C	372	CRH 2.2 F RV CRH 2.2 R MUT*	CCTCAGCCCTTGGATTTCTT AAGGGCGGCTGACGCTGTC	95°C 25'', 62°C-57°C 30'', 72°C 45'' (35 Zyklen)

\*Mutageneseprimer

Tab. 13 *Verwendete Mutageneseprimer und PCR-Bedingungen für die Gene RIC3 und CRH.*

### 2.4.2 Direkte Sequenzierung nach Sanger

Das Sequenzierverfahren nach Sanger, eine nichtradioaktive Methode, ermöglicht die exakte Aufschlüsselung der Basenabfolge eines DNA-Fragments. Als Grundlage dient hierbei eine Kettenabbruchreaktion. Zum Einsatz kommen vier verschiedene 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs), welche jeweils eine unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung tragen. Erfolgt bei der PCR der Einbau eines solchen Nukleotids, kann die DNA-Polymerase, aufgrund des fehlenden 3'-Hydroxylendes, an dieses keine weitere Base anknüpfen. Es verliert somit die Fähigkeit mit einem weiteren Nukleotid eine Phosphodiesterbindung einzugehen. Im statistischen Mittel entstehen durch ein abgestimmtes dNTP- und ddNTP-Verhältnis Abbruchfragmente jeglicher Länge. Auch die radioaktive Sequenzierung basiert auf diesen Gegebenheiten.

Die Auftrennung der Fragmente im Polymer ereignet sich mit einer Genauigkeit von einem Basenpaar. Ein Laser regt hierbei die markierten Endnukleotide an, was die Detektion ihrer Fluoreszenz erlaubt. Durch computergestützte Analysemethoden erhält man die DNA-Sequenz für das untersuchte Produkt.

Als Grundlage für die Sequenzierreaktion wird ein 100 µl- bzw. 25 µl-PCR-Ansatz des zu sequenzierenden Fragments vorbereitet. Das Produkt wird über den myBudget Double Pure Kit von Primerresten und anderen niedermolekularen Substanzen gereinigt und anschließend mit 10-20 µl HPLC-gereinigtem Wasser eluiert. Das Produkt wird daraufhin auf einem Agarosestestgel nochmals auf seine Reinheit und den DNA-Gehalt überprüft. Davon ausgehend werden 40 ng Template in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Im Gegensatz zur gewöhnlichen PCR wird nur ein Primer genutzt, man spricht von einer asymmetrischen PCR. So können nur Einzelstränge gebildet werden. Der Primer wird auf 2 pmol/µl verdünnt und mit 2 ng/µl des gereinigten PCR-Produkts eingeschickt. Die Sequenzierreaktion und die Sequenzierung erfolgen durch die Firma Eurofins MWG Operon.



## IV. Ergebnisse

Insgesamt wurde ein Kollektiv bestehend aus 68-70 Patienten aus ebenso vielen verschiedenen Familien untersucht, davon waren 41 Probanden Männer (58,6%) und 29 Frauen (41,4%). Die Patienten wiesen inhomogene Eigen- und Familienanamnesen, sowie ungleiche Symptomausprägungen auf und entstammten 18 verschiedenen Ländern. Der jüngste Patient war 4 Jahre, der älteste 94 Jahre alt. Bei fünf Patienten fehlte eine Altersangabe vollständig. Das Durchschnittsalter betrug 27,8 Jahre. Im Folgenden aufgelistet die Aufschlüsselung der Altersgruppen:

**1-20 Jahre:** 30/65 (46,2%)

**21-40 Jahre:** 22/65 (33,8%)

**41-60 Jahre:** 10/65 (15,4%)

**Über 60 Jahre:** 3/65 (4,6%)

Das Kollektiv wurde in vorangegangenen, molekulargenetischen Analysen auf Mutationen in den Genen *CHRNA4* und *CHRNA2* untersucht und zeigte sich, bis auf eine Patientin, hierfür negativ.

Pat.Nr.	Geschlecht	Aktuelles Alter	Herkunft	Manifestationsalter	Anfallsfrequenz/ Anfallsdauer
A1	M	29	Deutsch	-	-
A4	M	55	Deutsch	42. LJ	-/5-6 s
A7	W	18	Deutsch	4. LJ	-/25-40 s
A9	W	60	Deutsch	27. LJ	
A10	M	62	Nordamerikanisch	-	-
A11	M	20	Deutsch	6. LJ	10/Nacht/2-3 min
A12	W	15	Spanisch	1. LJ	5-10/Nacht/-
A16	W	-	Deutsch	-	-
A17	M	-	Deutsch	-	-
A18	M	29	Belgisch	6. LJ	2-3/Nacht/10 s
A19	W	50	Deutsch	38. LJ	10-15/Nacht/30 s
A24	W	-	Nicht Deutsch	7. LJ	-
A27	M	17	Spanisch	4. LJ	2-3/Nacht/10-15 s
A28	M	26	Österreichisch	3. LJ	6 pro 15 min/ 1 min
A32	M	17	Deutsch	-	-
A34	W	-	Deutsch	-	-
A36	M	19	Deutsch	-	-
A41	W	12	Schweizerdeutsch	3. LJ	16-17/Nacht/ 1 min
A42	M	16	Schwedisch	-	-
A44	M	18	Deutsch	8. LJ	-
A50	W	44	Deutsch	-	-
A52	W	-	Deutsch	-	-
A60	M	49	Österreichisch	8. LJ	3-4/Monat/-

A62	M	12	Deutsch		
A63	W	17	Italienisch	9. LJ	-
A64	M	63	Portugiesisch	-	-
A65	M	23	Belgisch	-	-
A67	W	25	Schweizer- deutsch	-	-
A70	W	23	Deutsch	-	-
A72	M	49	Deutsch	8. LJ	1/Woche/mehr-mals pro Nacht
A76	W	19	Deutsch	-	-
A77	W	39	Schwedisch	-	-
A78	M	13	Britisch	5. LJ	-
A79	M	15	Britisch	3. LJ	-
A81	M	28	Nicht Deutsch	-	-
A83	M	28	Britisch	10. LJ	4-6/Monat/ 1-2 min
A84	W	13	Deutsch	6. LJ	2-3/Nacht/10-30 s
A85	W	14	Deutsch	-	-
A86	W	22	Britisch	13. LJ	10/Tag/-
A87	M	19	Österreichisch	11. LJ	2-5/Nacht/5 min
A88	M	19	Deutsch	12. LJ	8/Monat/-
A89	M	56	Deutsch	-	-
A91	M	27	Schweizer- deutsch	13. LJ	-
A92	M	38	Deutsch		
A96	M	22	Schweizer- deutsch	15. LJ	-
A97	M	18	Deutsch	5. LJ	mehrmals/Nacht/-
A98	W	17	Türkisch- Zypriotisch	8. LJ	mehrmals/Nacht/-
A101	M	37	Norwegisch	-	3/Nacht/-
A102	M	94	Britisch	-	-
A104	W	7	Nordameri- kanisch	-	-
A105	M	38	Dänisch	-	-
A107	W	30	Deutsch	24. LJ	5-7/Jahr
A108	W	23	Neusee- ländisch	-	-
A109	M	4	Südameri- kanisch	-	-
A110	M	51	Dänisch	-	-
A111	W	29	Deutsch	13. LJ	-
A112	M	11	Deutsch	-	-
A114	W	20	Holländisch (V)/Thai- ländisch (M)	-	-
A115	W	32	Deutsch	-	-
A116	M	17	Britisch	-	-
A117	W	11	Spanisch	-	-
A118	W	45	Deutsch	1. LJ	2-6/Nacht/ mehrere Min.
A119	M	24	Deutsch	-	-
A120	W	24	Deutsch	-	-
A121	M	16	Norwegisch	-	-
A122	M	17	Kasachstan	4. LJ	-
A123	W	58	Nordameri- kanisch	-	-
A124	M	8	Deutsch	-	-
A125	M	13	Deutsch	-	-
A126	M	24	Nicht Deutsch	-	-

Tab. 14

*Patientenliste unter Berücksichtigung des Geschlechts, des aktuellen Alters des Manifestationsalters, sowie der Anfallsfrequenz und -dauer falls bekannt. (LJ: Lebensjahr, M: männlich, (M): Mutter, Min.: Minute, (V): Vater, W: weiblich)*

## 1. Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung aller Blutproben erfolgte über die Salzfällung. Die DNA der Patienten war größtenteils bereits isoliert und wurde bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für alle weiteren Patienten lagen zwischen 2 und 10 ml Frischblut vor, so dass die DNA nach der Fällung in einem Volumen von 50-300  $\mu\text{l TE}^{-4}$ -Puffer aufgenommen und gelöst werden konnte. Die DNA-Konzentrationen bewegten sich zwischen 22 und 3721  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

## 2. Etablierung der PCR-Bedingungen

Alle drei analysierten Gene erforderten, aufgrund der individuellen Primerkonstruktion mittels Primer3, die Etablierung neuer PCR-Bedingungen (Tab. 7-9, Kap. III. 2.2). Anhand der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperaturen  $T_m$  und unter Berücksichtigung des GC-Gehalts berechnete man die Annealingtemperatur (Kap. III. 2.2) und nutzte das Ergebnis als Richtwert für die Gestaltung des PCR-Programms. In der Mehrheit der Fälle ließ sich eine schrittweise Etablierung nicht umgehen.

Die Annealingtemperaturen für die Fragmente des Gens *RIC3* bewegten sich zwischen  $56$  und  $74^{\circ}\text{C}$  ( $T_m$ :  $53,2$ - $61,4^{\circ}\text{C}$ ), für das Gen *VSNLI* zwischen  $54$  und  $66^{\circ}\text{C}$  ( $T_m$ :  $51,7$ - $61,4^{\circ}\text{C}$ ) und für *CRH* zwischen  $58$  und  $66^{\circ}\text{C}$  ( $T_m$ :  $54,0$ - $61,6^{\circ}\text{C}$ ) (Tab. 7-9, Kap. III. 2.2). Die DNA von Patient A113 ließ sich häufig nicht amplifizieren und lag zudem nur in niedriger Stockkonzentration vor. Desweiteren neigten sich einige DNA-Stöcke (A38, A117) dem Ende und standen von daher keiner weiteren Analyse zur Verfügung. Bis zum Abschluss der vorliegenden Untersuchungen kam keine neue Patienten-DNA zum ausgewählten Kollektiv hinzu.

## 3. Methoden des Mutationsscreenings

### 3.1 SSCP-Analyse

Um die kodierenden Abschnitte und Intron/Exon-Übergänge der Gene *RIC3*, *VSNLI* und *CRH* aller Patienten zu untersuchen, erfolgte zunächst ein Mutationsscreening mittels der SSCP-Analyse. Bisher gab es von dem Patientenkollektiv noch keine molekulargenetischen Daten hinsichtlich dieser Gene. Allerdings beschrieben Combi und Kollegen bereits Varianten im *CRH*-Gen in einem von ihnen gewählten Patientenkreis, so dass für dessen Promotorregion keine SSCP-Analyse durchgeführt wurde, sondern ein direkter Mutationsnachweis unter Anwendung zweier Restriktionsverdau zur Anwendung kam. Die Untersuchung gesunder Kontrollpersonen erfolgte nicht auf den SSCP-Gelen, sondern erst bei Bandenmuster auffälligkeiten in einem zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführten Restriktionsverdau.

Die Detektionsrate der SSCP-Analyse variiert stark in Abhängigkeit von der Fragmentgröße – je kleiner das Fragment, desto sensitiver ist das Verfahren in der Regel (Hayashi 1991). Demzufolge empfahl es sich, die mehr als 300 bp großen Fragmente der Exons 1,2 und 6 des Gens *RIC3*, der Exons

1 und 4 des Gens *VSNI*, sowie des Exons 2 des *CRH*-Gens durch im Exon lokalisierte Primer nochmals zu unterteilen (Tab. 4-6, Kap. III. 1.4).

Die verschiedenen Bandenmuster, welche sich durch die vier unterschiedlichen Bedingungen im SSCP-Lauf (4°C, Raumtemperatur, mit und ohne Glycerol) ergaben, wurden anschließend untereinander verglichen.

Gen, Genregion und Proband	Auffälliges SSCP-Muster	Nachweis durch Restriktionsverdau	Bestätigung durch Sequenzierung
<b><i>CRH</i></b>			
2.1.A34	+		-
2.1.A120	+		-
2.2.A7	+	+	
2.2.A11	+	+	
2.2.A17	+	+	
2.2.A19	+	+	
2.2.A60	+	+	
2.2.A64	+	+	
2.2.A78	+	+	
2.2.A79	+	+	
2.2.A84	+	+	+
2.2.A91	+	+	
2.2.A97	+	+	
2.2.A108	+	+	
2.2.A109	+	+	
2.2.A111	+	+	
2.2.A120	+	+	+
2.2.A122	+	-	-
2.2.A126	+	+	
2.3.A98	+		+
2.4.A62	+		-
2.4.A67	+		-
g.288A>C	+	+	+
<b><i>RIC3</i></b>			
1.1.A7	+	+	+
1.1.A67	-		-
1.1.A72	+		-
1.1.A86	+		-
1.1.A88	+	+	+
1.2.A86	+	+	+
2.2.A60	-		-
2.2.A78	+		-
3.A1	+		+
3.A9	+		+
3.A24	+		+
3.A34	-		-
3.A36	+	+	+
3.A41	+		+
3.A42	+	+	+
3.A44	+		+
3.A52	+		+
3.A81	+		+

3.A88	+		+
3.A96	+		-
3.A116	+		+
3.A118	+		+
6.2.A83	+	+	+
6.3.A41	+	+	+
6.3.A44	-		-
6.3.A116	+	+	+
6.4.A32	-		-
6.4.A44	+		-
6.4.A65	+		+
6.4.A126	+		-
c.-61G>A	+	+	+
c.-35G>A	+	+	+
K25R	+	+	+
c.354C>A (p.=)	+	+	+
G121A	+	+	+
R130Y	+		+
D311N	+	+	+
D351N	+	+	+
IVS6+149C>G	+		+
<i>VSNL1</i>			
1.1.A24	-		-
1.1.A27	+		-
1.1.A50	+	+	+
1.1.A52	-		-
1.1.A77	+		-
1.1.A118	+	+	+
1.2.A12	+	+	+
1.2.A65	+		+
1.2.A111	+		+
1.2.A115	+		+
3.A10	+		Artefakte
3.A104	+		-
4.1.A10	-		-
4.2.A17	+		+ (Mikrosatelliten)
4.2.A27	+		+ (Mikrosatelliten)
4.2.A32	+		+ (Mikrosatelliten)
4.2.A83	+		+ (Mikrosatelliten)
4.2.A107	+		+ (Mikrosatelliten)
4.5.A102	-		-
c.-390A>C	+	+	+
c.149G>A	+	+	+

Tab. 15 *Ergebnisse und Validität der SSCP-Analyse.*

Bei der Analyse der aufgetragenen Proben ergaben sich oft widersprüchliche Ergebnisse unter den einzelnen Bedingungen, so dass, dem auffälligen Bandenmuster folgend, eine Sequenzierung notwendig wurde, um Fehlinterpretationen auszuschließen. Hierbei stellten einige Auffälligkeiten Artefakte dar, die durch erneutes Auftragen und Sequenzieren nicht reproduziert werden konnten. Andere zeigten sich in der Sequenzierung als Mikrosatelliten, welche die Bandenmusterabweichungen erklärten (Tab. 15). In vielen Fällen litt die Auswertung unter qualitativen Färbe- oder Konzentrationsdifferenzen.

Wurde eine Variante mittels einer Kontrollsequenzierung detektiert, überprüfte man anhand der bekannten cDNA-Sequenz, ob diese einen Aminosäureaustausch bewirkt.

Desweiteren erfolgten vergleichende Restriktionsverdau in einem ausgewählten Kontrollkollektiv, um Allelfrequenzen zu bestimmen und Mutationen von Polymorphismen zu unterscheiden. Man verglich hierzu die Häufigkeiten der Varianten unter Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen. Anschließende statistische Analysen ermöglichten nun eine Korrelation zwischen den Polymorphismen und dem Auftreten der ADNPLE zu demonstrieren bzw. auszuschließen.

### **3.2 Direkter Mutationsnachweis mittels Restriktionsverdau**

Bereits bekannte Mutationen oder Polymorphismen erforderten Restriktionverdau, um die Vielzahl an Patienten und Kontrollen in kurzer Zeit auf diese zu untersuchen. Jedoch galt dies nur für die Promotorvarianten im *CRH*-Gen. Bei der Analyse der anderen Gene und bei Exon 2 des *CRH*-Gens wurde die SSCP zur Orientierung und vorläufigen Varianten-Detektion angewandt, um nach der Sequenzierung einer auffälligen Probe, einen Restriktionsverdau unter Kontrollen durchzuführen. Für die neu identifizierten Varianten in den Genen wurden mithilfe der DNA-Sequenz geeignete Enzyme gesucht, welche für die Varianten-Allele spezifische Kennsequenzen besaßen und nur dann schnitten, wenn diese vorlagen (Tab. 10-12, Kap. III. 2.4.1.1). Somit erleichterte man sich die Analyse der zur Verfügung stehenden Kontrollen erheblich. In manchen Fällen benötigte man für die Integration einer solchen Schnittstelle Mutageneseprimer (Tab. 13, Kap. III. 2.4.1.1).

### **3.3 Direkter Mutationsnachweis mittels Sequenzierung**

Fielen bei SSCP-Analysen anormale Bandenmuster auf, so untersuchte man diese unter Anwendung der direkten Sequenzierung, um die Varianten genau zu lokalisieren.

Während einige dieser Auffälligkeiten, welche von den restlichen Patienten abwichen, als Artefakte imponierten, wiesen andere den vermuteten Basenaustausch auf (Tab. 14, Kap. IV. 3.1). Um einen Zusammenhang zwischen auffälligem SSCP-Ergebnis und der notwendigen Sequenzierung zu verdeutlichen, schloss sich fortführend die Gegenüberstellung beider Ergebnisse für alle detektierten Varianten an.

## **4. Ergebnisse des Mutationscreenings**

Insgesamt wurden 68-70 Patienten aus verschiedenen Familien auf Varianten oder Mutationen in den Genen *RIC3*, *VSNL1*, sowie *CRH* hin untersucht. Bisher erfolgte keine molekulargenetische Analyse des Kollektivs hinsichtlich dieser Gene, jedoch wurde bereits eine Routinediagnostik auf Mutationen in den Genen *CHRNA4* und *CHRNA2* durchgeführt. Hierbei wurde nur bei Patientin A84, sowie bei deren Mutter und Großmutter mütterlicherseits die Mutation *CHRNA4*-Ser248Phe detektiert. Alle anderen Patienten zeigten sich negativ für Mutationen in den beiden Genen.

Im Folgenden werden die detektierten Polymorphismen bzw. Mutationen aufgezeigt und näher erläutert (Tab. 16). Auffällige Ergebnisse, welche aus den angewandten Methoden hervorgingen, werden dargestellt.

Patient	Polymorphismen in RIC3	Polymorphismen in VSNL1	Polymorphismen in CRH
A1	c.354C>A/-	-	g.-1470C>A/-
A1 <sup>a1</sup>			-
A1 <sup>b2</sup>			g.-1470C>A/-
A1 <sup>c1</sup>			-
A1 <sup>c2</sup>			-
A4	-	-	-
A7	c.-61G>A/-	-	g.288A>C/-
A9	c.354C>A/c.354C>A	-	-
A10	-	-	-
A11	-	-	g.288A>C/-
A12	c.354C>A/c.354C>A	c.149G>A/-	-
A16	-	-	g.-1470C>A/-
A16 <sup>d</sup>			g.-1470C>A/-
A17	-	-	g.288A>C/-
A18	-	-	-
A19	-	-	g.288A>C
A24	c.354C>A/c.354C>A	-	-
A27	-	-	-
A28	c.354C>A/-	-	-
A32	-	-	-
A34	-	-	-
A36	c.354C>A/- C130Y/- D351N/-	-	-
A38		-	
A41	C130Y/- D351N/-	-	-
A42	c.354C>A/- G121A/- C130Y/- D351N/-	-	-
A44	c.354C>A/c.354C>A	-	-
A50		c.-390A>C/-	
A52	c.354C>A/c.354C>A C130Y/- D351N/-	-	-
A60	c.-61G>A/- c.354C>A/-	-	g.-1404G>A/- g.288A>C/-
A60 <sup>a1</sup>			-
A60 <sup>a2</sup>			g.-1470C>A/g.-1404G>A
A60 <sup>b1</sup>			g.-1470C>A/-
A60 <sup>e</sup>			-
A62	c.354C>A/-	-	-
A63	c.354C>A/-	-	-
A64	-	-	g.288A>C/-
A65	C130Y/-	c.149G>A/-	-
A67	C130Y/-	-	-
A70	-	-	-
A72	c.354C>A/-	-	-
A76	c.354C>A/-	-	-
A77	-	-	-
A78	-	-	g.288A>C/-
A79	-	-	g.288A>C/-

A81	C130Y/-	-	-
A83	c.354C>A/- D311N/-	-	-
A84	c.354C>A/-	-	g.288A>C/-
A85	-	-	-
A86	K25R	-	g.-1470C>A/-
A86 <sup>a1</sup>			g.-1470C>A/-
A86 <sup>a2</sup>			-
A87	-	-	-
A88	c.-35G>A/- c.354C>A/-	-	-
A89	-	-	-
A91	c.-61G>A	-	g.288A>C/-
A92	c.354C>A/-	-	g.-1470C>A/-
A96	-	-	g.-1470C>A/-
A97	C130Y/- D351N/-	-	g.288A>C/-
A98	C130Y/-	-	-
A101	C130Y/-	-	-
A102	-	-	-
A104	c.354C>A/-	-	-
A105	-	-	-
A107	C130Y/- D351N/-	-	-
A108	c.354C>A/-	-	g.288A>C/-
A109	-	-	g.288A>C/-
A110	c.354C>A/-	-	-
A111	-	c.149G>A/-	g.288A>C/-
A112	c.354C>A/-	-	-
A114	-	-	-
A116	c.354C>A/c.354C>A C130Y/- D351N/-	-	g.-1470C>A/-
A117		-	
A118	c.354C>A/c.354C>A		g.-1470C>A/g.-1470C>A
A119	-	-	-
A120	-	-	g.288A>C/-
A121	c.354C>A/- C130Y/-	-	-
A122	c.354C>A/- C130Y/-	-	-
A123	c.354C>A/-	-	-
A124	c.354C>A/- C130Y/-	-	-
A125	c.-61G>A/-	-	-
A126	-	-	g.288A>C/-

**Tab. 16** *Detektierte Varianten in RIC3, VSNL1 und CRH im analysierten Patientenkollektiv.  
(a1: Vater; a2: Mutter; b1: Bruder; b2: Schwester; c1: Tante vs.; c2: Tante vs.;  
d: Großmutter; e: Sohn)*

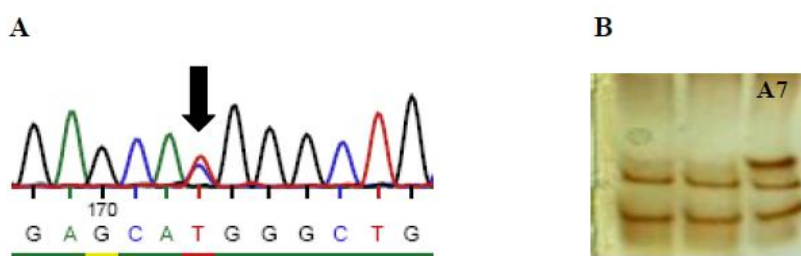


## 4.1 Detektion von Mutationen im Gen *RIC3*

### 4.1.1 c.-61G>A, ncr

Die Untersuchung des Exons 1 zeigte den Polymorphismus c.-61G>A, welcher sich in der nicht-kodierenden Region (ncr) des Gens befindet.

Im Rahmen der SSCP-Analyse fielen sieben Patienten-Fragmente mit abweichendem Muster auf. Um diese exakter zu definieren, erfolgte nach PCR-Aufreinigung die Sequenzierung von fünf dieser Proben über die Firma MWG Biotech. Mithilfe dieses Verfahrens gelang es den Polymorphismus bei Patientin A7 in heterozygoter Form nachzuweisen (Abb. 7). Die Patienten A72 und A86 zeigten trotz des auffälligen Bandenmusters keinen Nukleotidaustausch. Bei Patient A88 konnte eine andere als die in A7 detektierte Variante nachgewiesen werden, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird. Die Probe A67 diente als Negativreferenz, da sie das Bandenmuster der Mehrzahl der Untersuchten repräsentierte. So konnte bei dieser Patientin kein Polymorphismus detektiert werden. Durch Anwendung des Sequenzierungsergebnisses bei A7 auf das restliche Patientenkollektiv war es möglich, auch die Patienten A60, A91 und A125 dieser Variante zuzuordnen.



**Abb. 7** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmustersauffälligkeit bei Patient A7 (B) für die Variante c.-61G>A in der nichtkodierenden Region des Gens *RIC3*.

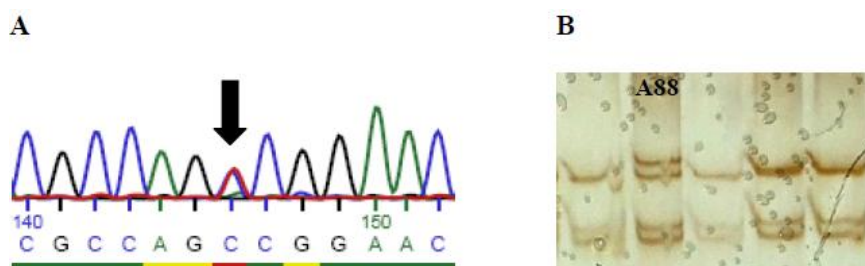
Mittels des Verdauens mit dem Restriktionsenzym *SduI* konnte dieser Polymorphismus auch bei zwei Personen in einem aus 56 deutschen Probanden bestehenden Kontrollkollektiv nachgewiesen werden. Das PCR-Fragment besitzt 298 bp und wird durch das Enzym im Wildtyp in zwei Fragmente der Längen 194 und 104 bp geschnitten. Liegt die Variante vor, fällt diese Schnittstelle weg.

ncr/c.-61G>A	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
G/G	65/69 (94,2%)	31/33 (93,9%)	54/56 (96,4%)
G/A	4/69 (5,8%)	2/33 (6,1%)	2/56 (3,6%)
A/A	0/69	0/33	0/56
Allelfrequenz	0,971/0,029	0,970/0,030	0,982/0,018

**Tab. 17** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.-61G>A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

#### 4.1.2 c.-35G>A, ncr

Die SSCP-Analyse des Exons 1 zeigte die in 4.1.1 aufgeführten Bandenmustersauffälligkeiten, jedoch wich das Muster der Patientenprobe A88 von den Übrigen ab und wurde mittels Sequenzierung bestätigt (Abb. 8). Es ergab sich der Nukleotidaustausch c.-35G>A in der nichtkodierenden Region des Gens, welcher nur in dem Patienten A88 heterozygot nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 8** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmustersauffälligkeit bei Patient A88 (B) für die Variante c.-35G>A in der nichtkodierenden Region des Gen RIC3.

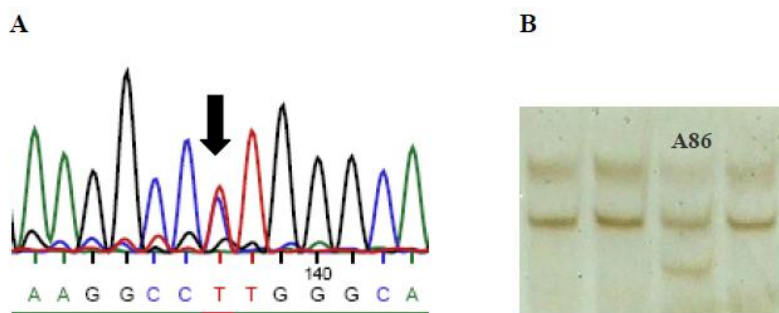
Der Restriktionsverdau mit dem Enzym *Cac8I* ermöglichte die Überprüfung von 56 deutschen Kontrollpersonen. Dabei fand sich die Variante c.-35G>A heterozygot bei einem Probanden. Das PCR-Fragment besitzt 298 bp und wird durch das Enzym im Wildtyp in fünf Fragmente der Längen 165, 55, 46, 27 und 5 bp geschnitten. Liegt die Variante vor, fällt eine Schnittstelle weg und es entstehen Produkte mit 220, 46, 27 und 5 bp Länge.

ncr/c.-35G>A	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
G/G	68/69 (98,6%)	32/33 (97%)	55/56 (98,2%)
G/A	1/69 (1,4%)	1/33 (3%)	1/56 (1,8%)
A/A	0/69	0/33	0/56
<b>Allelfrequenz</b>	0,993/0,007	0,985/0,015	0,991/0,009

**Tab. 18** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.-35G>A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

#### 4.1.3 K25R (c.74A>G), Exon 1

Die Variante wurde anfänglich mittels der SSCP-Analyse bei der Patientin A86 detektiert, welche sich von den restlichen Patientenproben durch ein auffälliges Bandenmuster abgrenzte. Die anschließende Sequenzierung ergab den heterozygoten Nukleotidaustausch c.74A>G in Exon 1 der kodierenden Region des Gens (Abb. 9). Diese Variante resultiert in dem Aminosäureaustausch K25R.



**Abb. 9** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmuster auffälligkeit bei Patient A86 (B) für die Variante *c.74A>G* in Exon 1 des Gens *RIC3*.

Um auch das Kontrollkollektiv, bestehend aus 77 deutschen Probanden, auf die Variante hin zu analysieren, erfolgte ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *StuI*. Das PCR-Fragment besitzt 226 bp und wird durch das Enzym im Wildtyp in zwei Fragmente der Längen 155 und 68 bp geschnitten. Liegt die Variante vor, fällt diese Schnittstelle weg. Der Nukleotidaustausch *c.74A>G* konnte im Kontrollkollektiv nicht nachgewiesen werden.

<i>c.74A&gt;G</i>	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
A/A	67/68 (98,5%)	33/33 (100%)	77/77 (100%)
A/G	1/68 (1,5%)	0/33	0/77
G/G	0/68	0/33	0/77
<b>Allelfrequenz</b>	0,993/0,007	1/0	1/0

**Tab. 19** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante *c.74A>G* unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

#### 4.1.4 Polymorphismen in Exon 3 des Gens *RIC3*

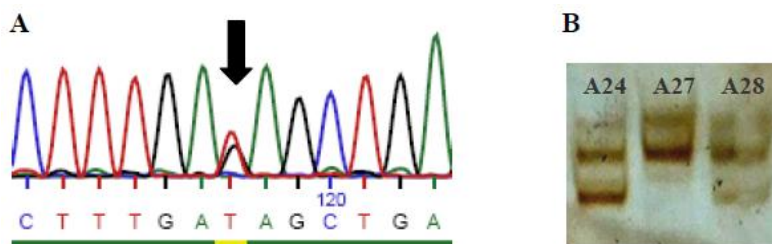
Die SSCP-Analyse des Exons 3 wies multiple Bandenmuster auffälligkeiten (Abb. 10) auf, was die genaue Einschätzung des Ergebnisses erschwerte. Insgesamt zeigten 37 Patienten abweichende Muster, wobei diese zum Teil mehr als einen Polymorphismus vermuten ließen. Eine anschließende Sequenzierung von Proben der Patienten mit verschiedenen Bandenkonformationen und einer möglichen Negativreferenz ergab wie erwartet mehrere Varianten.



**Abb. 10** Bandenmustervariabilität bei Exon 3 des Gens *RIC3*.

#### 4.1.4.1 L118L (c.354C>A)

Der stille, bereits in Datenbanken erfasste Polymorphismus c.354C>A (rs10839976) konnte nach auffälliger SSCP-Analyse durch direkte Sequenzierung heterozygot in den Patienten A1, A28, A36, A42, A60, A62, A63, A72, A76, A83, A84, A88, A92, A104, A108, A110, A112, A121, A122, A123 und A124 detektiert werden (Abb. 11). Bei den analysierten Patienten A9, A12, A24, A44, A52, A116 und A118 lag Homozygotie vor.



**Abb. 11** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmustersauffälligkeit bei den Patienten A24 (A/A), A27 (C/C), A28 (C/A)(B) für die Variante c.354C>A in Exon 3 des Gens RIC3.

Das Kontrollkollektiv bestand aus 104 deutschen Probanden und wurde nach PCR-Aufreinigung mittels Sequenzierung bei Eurofins MWG Operon auf den Polymorphismus untersucht. Auch im Kontrollkollektiv fand sich dieser sowohl in heterozygoter, als auch in homozygoter Form.

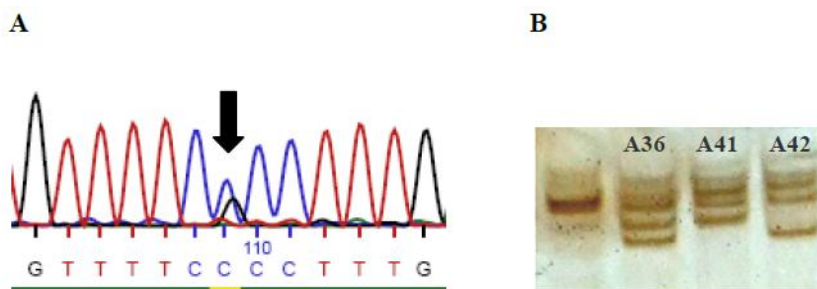
c.354C>A	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
C/C	40/68 (58,8%)	19/33 (57,6%)	42/104 (40,4%)
C/A	21/68 (30,9%)	10/33 (30,3%)	54/104 (51,9%)
A/A	7/68 (10,3%)	4/33 (12,1%)	8/104 (7,7%)
<b>Allelfrequenz</b>	0,743/0,257	0,727/0,273	0,663/0,337

**Tab. 20** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.354C>A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

Diese Daten korrespondierten mit den Allelfrequenzen einer europäischen HapMap-Kontrollpopulation (MAF 75,0 %).

#### 4.1.4.2 G121A (c.362G>C)

Der bekannte Polymorphismus G121A (rs80168649) wurde nur bei einem der mittels SSCP-Analyse untersuchten Patienten sowie einer Kontrollperson gefunden. Die Probe A42 unterschied sich deutlich von den anderen, bereits analysierten DNA-Fragmenten. Die Sequenzierung zeigte insgesamt vier Varianten, welche zu dieser auffälligen Bandenkonformation führten (Abb. 12). Neben den vorher beschriebenen, konnten zudem die Nukleotidaustausche c.354C>A und c.389G>A nachgewiesen werden.



**Abb. 12** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmuster auffälligkeit bei Patient A42 (A36 u. A41 zwei bzw. eine gleiche Variante) (B) für die Variante *c.362G>C* in Exon 3 des Gens *RIC3*.

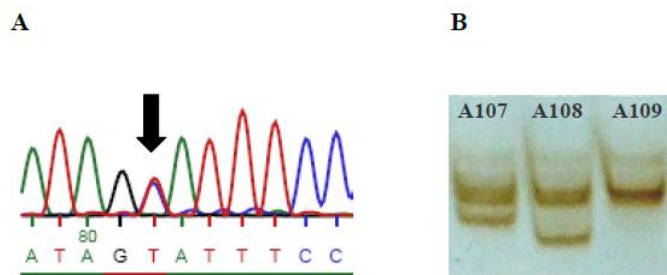
Das Kontrollkollektiv bestand aus 104 deutschen Probanden und wurde nach PCR-Aufreinigung mittels Sequenzierung bei Eurofins MWG Operon auf die Variante untersucht.

<i>c.362G&gt;C</i>	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
G/G	67/68 (98,5%)	33/33 (100%)	103/104 (99,0%)
G/C	1/68 (1,5%)	0/33	1/104 (1%)
C/C	0/68	0/33	0/104
<b>Allelfrequenz</b>	0,993/0,007	1/0	0,995/0,005

**Tab. 21** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante *c.362G>C* unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

#### 4.1.4.3 C130Y (*c.389G>A*)

Anhand der SSCP-Analyse und der überprüfenden Sequenzierung einiger Patientenproben konnte bei insgesamt 15 Patienten der bekannte Polymorphismus *c.389G>A* (rs55990541) detektiert werden (Abb. 13). Dieser führt zu dem Aminosäureaustausch C130Y. Die Patienten A36, A41, A42, A52, A65, A67, A81, A97, A98, A101, A107, A116, A121, A122 und A124 wiesen den Polymorphismus in heterozygoter Form auf.



**Abb. 13** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmuster auffälligkeit bei Patienten A107 (G/A), A108 (G/G) und A109 (G/G) (B) für die Variante *c.389G>A* in Exon 3 des Gens *RIC3*.

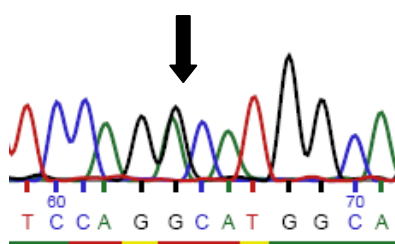
Das Kontrollkollektiv bestand aus 104 deutschen Probanden und wurde nach PCR-Aufreinigung mittels Sequenzierung bei Eurofins MWG Operon auf den Polymorphismus untersucht. In diesem Kollektiv fand sich der SNP rs55990541 sowohl in heterozygoter, als auch in homozygoter Form.

c.389G>A	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
G/G	53/68 (77,9%)	28/33 (84,8%)	93/104 (89,4%)
G/A	15/68 (22,1%)	5/33 (15,2%)	10/104 (9,6%)
A/A	0/68	0/33	1/104 (1%)
Allelfrequenz	0,890/0,110	0,924/0,076	0,942/0,058

**Tab. 22** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.389G>A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

#### 4.1.4.4 P135S (c.403C>T)

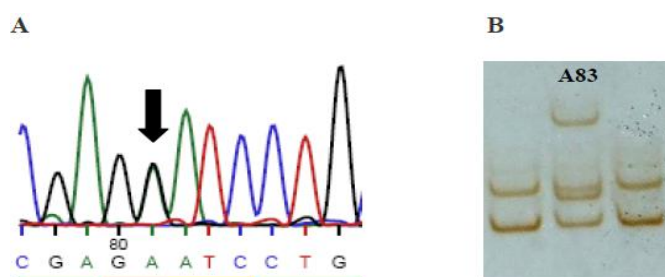
Bei der Sequenzierung der 104 Kontrollpersonen zur Bestimmung der Genotyp- und Allelfrequenzen konnte bei acht Probanden (ca. 7,7 %) eine weitere, bereits bekannte Variante heterozygot detektiert werden (Abb. 14). Der Polymorphismus c.403C>T (rs73411617), welcher in einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Serin an Position 135 des Proteins resultiert, konnte nicht in unserem Patientenkollektiv nachgewiesen werden.



**Abb. 14** Sequenzierungsausschnitt von einer Kontrollperson mit der Variante c.403C>T im Exon 3 des Gens RIC3.

#### 4.1.5 D311N (c.934G>A), Exon 6

Bei der SSCP-Analyse des Exons 6 zeigte sich eine Bandenmusterabweichung bei Patient A83. Die Sequenzierung bestätigte den Verdacht auf das Vorliegen einer Variante (Abb. 15). Der Polymorphismus c.934G>A resultiert in dem Aminosäureaustausch D311N.



**Abb. 15** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmuster auffälligkeit bei Patient A83 (B) für die Variante c.934G>A in Exon 6 des Gens RIC3.

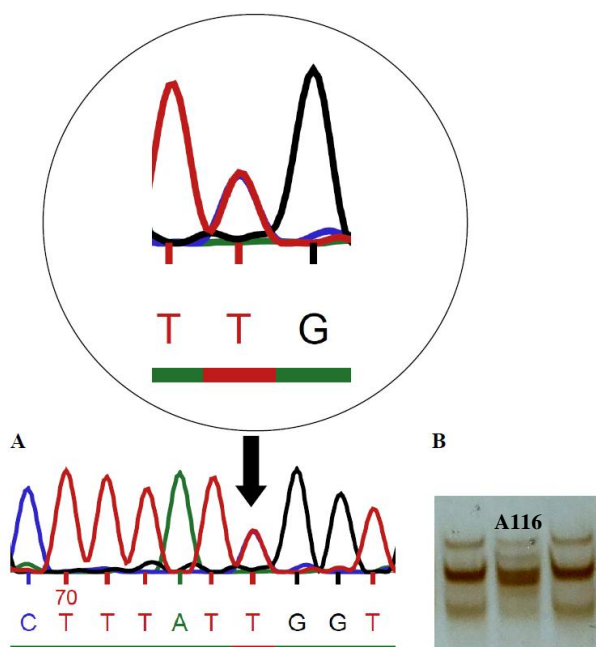
Mithilfe eines Restriktionsverdau mit dem Enzym *Mbo*I gelang es, 53 deutsche Kontrollpersonen auf diesen Polymorphismus hin zu untersuchen. Auch in diesem Kollektiv ließ sich der Aminosäureaustausch nachweisen. Das PCR-Fragment besitzt 199 bp und wird durch das Enzym im Wildtyp in drei Fragmente der Längen 87, 67 und 45 bp geschnitten. Liegt die Variante vor, entfällt eine Schnittstelle und es entstehen zwei Fragmente der Längen 132 und 67 bp.

c.934G>A	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
G/G	67/68 (98,5%)	33/33 (100%)	51/53 (96,2%)
G/A	1/68 (1,5%)	0/33	2/53 (3,8%)
A/A	0/68	0/33	0/53
Allelfrequenz	0,993/0,007	1/0	0,981/0,019

**Tab. 23** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.934G>A unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

#### 4.1.6 D351N (c.1054G>A), Exon 6

Die SSCP-Analyse des Exons 6 zeigte bei den Patienten A36, A41, A42, A52, A97, A107, A116 ein vom restlichen Kollektiv abweichendes Bandenmuster. In der anschließenden Sequenzierung konnte der Polymorphismus c.1054G>A (rs11826236) nachgewiesen werden (Abb. 16), welcher in dem Aminosäureaustausch D351N resultiert. Die sieben Individuen wurden als heterozygot eingeordnet.



**Abb. 16** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmuster auffälligkeit bei Patient A116 (B) für die Variante c.1054G>A in Exon 6 des Gens *RIC3*. Dargestellt ist die Sequenzierung des Gegenstranges, wobei das C-Allel nahezu vollständig durch das T-Allel überlagert wird (siehe Ausschnittsvergrößerung).

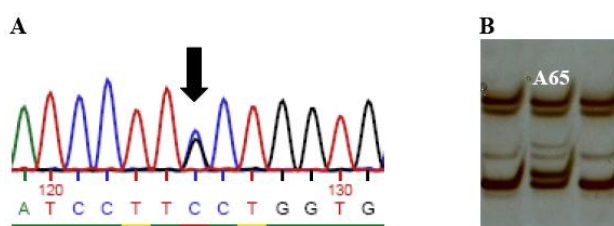
Ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *TaqI* ermöglichte die Überprüfung eines aus 55 Probanden bestehenden Kontrollkollektivs, in welchem ebenfalls einige Personen den bereits bekannten SNP rs11826236 aufwiesen. Um ein Unterscheidungsmerkmal zwischen Wildtyp und Variante zu schaffen, bedurfte es eines Mutageneseprimers (Tab. 13, Kap. III. 2.4.1.1). Das entstandene PCR-Produkt bestand aus 275 bp. Der Wildtyp wies zwei Schnittstellen mit den Fragmentlängen 259 und 17 auf. Der Polymorphismus konnte anhand einer fehlenden Schnittstelle detektiert werden.

c.1054G>A	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
G/G	61/68 (89,7%)	29/33 (87,9%)	52/55 (94,5%)
G/A	7/68 (10,3%)	4/33 (12,1%)	3/55 (5,5%)
A/A	0/68	0/33	0/55
Allelfrequenz	0,949/0,051	0,939/0,061	0,973/0,027

**Tab. 24** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante *c.1054G>A* unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

#### 4.1.7 c.1007+149C>G, 3'-UTR

Desweiteren wurde die Variante *c.1007+149C>G* in der 3'-UTR detektiert. Da Varianten wie diese technisch relativ schwer zu analysieren und nur selten funktionell sind, wurde ihre Anwesenheit registriert, jedoch nicht weiteruntersucht. Nur der Patient A65 wies eine Bandenmusterabweichung auf. Diese wurde im Anschluss mittels direkter Sequenzierung überprüft und konnte als genetische Variante bestätigt werden (Abb. 17). Es erfolgte kein Screening eines Kontrollkollektivs.



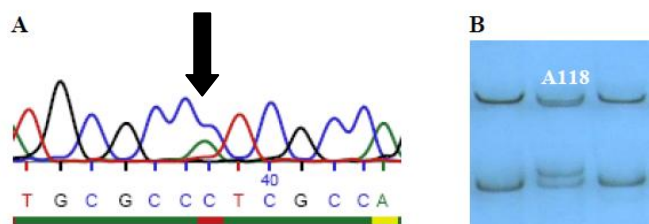
**Abb. 17** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmuster auffälligkeit bei Patient A65 (B) für die Variante *c.1007+149C>G* in der 3'-UTR des Gens *RIC3*.

## 4.2 Detektion von Mutationen im Gen *VSNLI/VILIP1*

### 4.2.1 c.-390A>C, 5'UTR

In der 5'UT-Region des Gens *VSNLI* konnte anhand einer SSCP-Analyse bei den Probanden A50 und A118 die Variante *c.-390A>C* detektiert werden. Die Überprüfung der Bandenmuster auffälligkeit erfolgte nach PCR-Aufreinigung mittels direkter Sequenzierung durch die Firma Eurofins MWG Operon (Abb. 18). Die Patienten zeigten sich heterozygot für den Polymorphismus.





**Abb. 18** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmuster auffälligkeit bei Patient A118 (B) für die Variante c.-390A>C in der 5'UT-Region des Gens VSNL1.

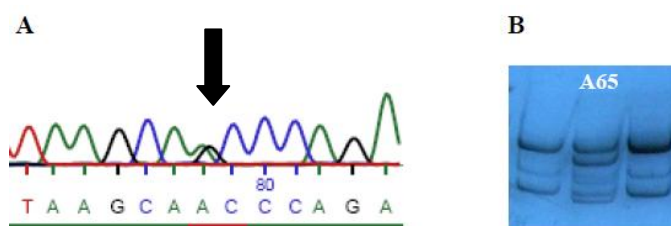
Um auch Kontrollpersonen auf diesen Nukleotidaustausch hin zu überprüfen, schloss sich ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *BccI* an. Das PCR-Fragment besitzt 250 bp und wird durch das Enzym im Wildtyp in zwei Fragmente der Längen 181 und 69 bp geschnitten. Liegt die Variante vor, verschwindet die Schnittstelle vollständig. Dies zeigte sich bei einer Kontrollperson.

5'UTR c.-390A>C	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
A/A	67/69 (97,1%)	31/33 (93,9%)	69/70 (98,6%)
A/C	2/69 (2,9%)	2/33 (6,1%)	1/70 (1,4%)
C/C	0/69	0/33	0/70
Allelfrequenz	0,986/0,014	0,970/0,030	0,993/0,007

**Tab. 25** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante c.-390A>C unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

#### 4.2.2 c.149G>A, 5'UTR

In der 5'UTR-Region des Gens konnte ein weiterer Polymorphismus in vier Patienten aufgezeigt werden. Die Patienten A12, A65, A111 und A115 zeigten vom restlichen Kollektiv abweichende Bandenkonformationen, welche mittels direkter Sequenzierung als heterozygote Variante c.149G>A (rs1802174) bestimmt werden konnten (Abb. 19).



**Abb. 19** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmuster auffälligkeit bei Patient A65 (B) für die Variante c.149G>A in der 5'UTR-Region des Gens VSNL1.

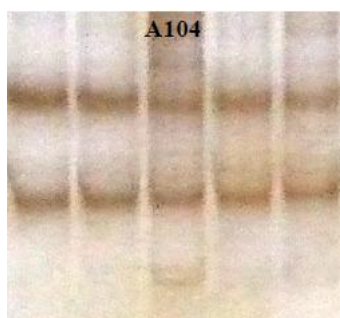
Anschließend erfolgte die Analyse von 54 Kontrollen unter Anwendung eines Restriktionsverdau mit dem Enzym *Fnu4HI*. Das PCR-Fragment besitzt 286 bp und wird durch das Enzym im Wildtyp in sieben Fragmente der Längen 133, 51, 39, 31, 26, 3 und 3 bp geschnitten. Liegt die Variante vor, schließen sich zwei Fragmente zu einem zusammen und es entstehen sechs Produkte mit 172, 51, 31, 26, 3 und 3 bp Länge. Dies zeigte sich bei mehreren Kontrollen.

5'UTR c.149G>A	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
G/G	66/70 (94,3%)	31/33 (93,9%)	48/54 (88,9%)
G/A	4/70 (5,7%)	2/33 (6,1%)	6/54 (11,1%)
A/A	0/70	0/33	0/54
Allelfrequenz	0,971/0,029	0,970/0,030	0,944/0,056

**Tab. 26** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante *c.149G>A* unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

### 4.2.3 Auffällige SSCP-Ergebnisse in Exon 3 des Gens *VSNLI*

Bei der SSCP-Analyse des Exons 3 trat bei acht Patienten eine identische, von den Bandenmustern des restlichen Kollektivs abweichende Konformation auf (Abb. 20). Die direkten Sequenzierungen der aufgereinigten PCR-Fragmente von den Patienten A10, A63, A65, A81, A86, A98, A104 und A107 zeigten, mit hoher Wahrscheinlichkeit artefaktbedingt, ungleiche Ergebnisse. Aufgrund dessen erfolgte die Bestellung eines neuentwickelten Vorwärtsprimers VILIP-1-3Fn, um die gewünschte Nukleotidposition besser zu erfassen. Die erneuten Sequenzierungen zeigten weder die vorher detektierten Artefakte, noch eine Nukleotidvariante, so dass in diesem Falle keine weiteren Aussagen zu möglichen Polymorphismen erfolgen konnten. Dennoch wurden die SSCP-Muster zur Vervollständigung beigefügt. Wir vermuten schlussfolgernd eine artefaktbedingte SSCP-Musterveränderung – möglicherweise verursacht durch eine zu hohe DNA-Konzentration.



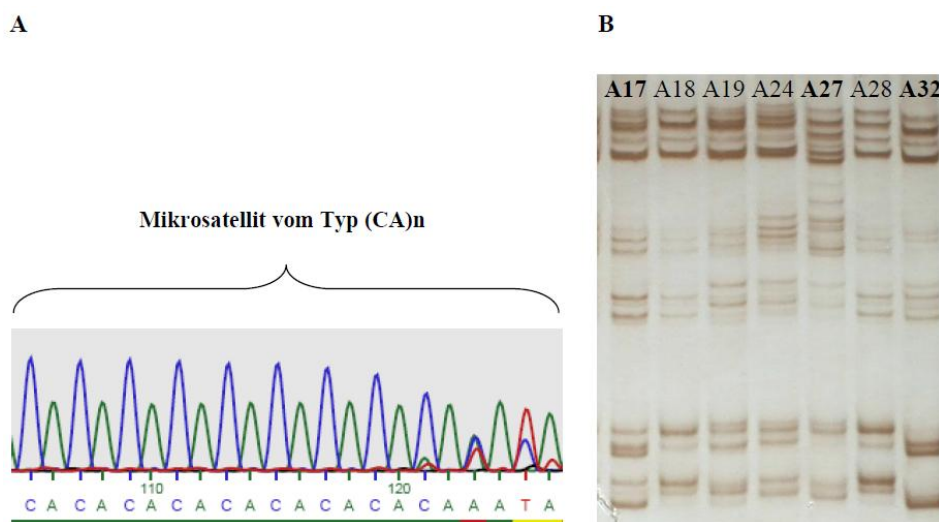
**Abb. 20** Auffälliges SSCP-Muster bei Patient A104, repräsentativ für sieben weitere Patienten. Mit neuem Vorwärtsprimer VILIP-1-3Fn und damit erhöhter Produktgröße keine Detektion einer Nukleotidvariante bei direkter Sequenzierung.

### 4.2.4 Mikrosatellit in der 3'-UTR

In der 3'-untranslatierten Region des Gens *VSNLI* ließen sich mithilfe der SSCP-Analyse komplexe Bandenmuster bei allen Patienten nachweisen. Repräsentativ wurden einige Proben nach Aufreinigung zur direkten Sequenzierung eingeschickt, welche die SSCP-Auffälligkeiten erklärte. Es konnten in allen eingesandten PCR-Fragmenten ein Mikrosatellit vom Typ (CA)<sub>n</sub> detektiert werden (Abb. 21). Mikrosatelliten sind kurze, nichtkodierende DNA-Sequenzen und stellen die häufigste Form repetitiver DNA dar. Die Dinukleotidwiederholungen vom Typ (CA)<sub>n</sub> machen etwa 0,5 % des Genoms aus und finden Anwendung in der Genanalyse, da sich die Anzahl der Wiederholungen bei verschiedenen

Individuen unterscheidet und aufgrund dessen bei Restriktionsverdauen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge hervorbringt.

Da der detektierte Mikrosatellit technisch ebenfalls nur schwer zu analysieren und nur selten funktionell ist, wurde seine Anwesenheit registriert, jedoch nicht weiteruntersucht.



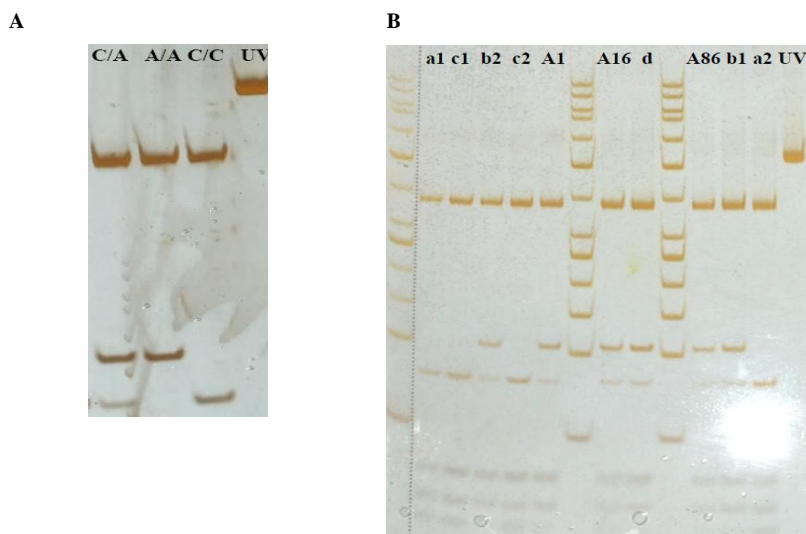
**Abb. 21** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten komplexen Bandenmusterkonformation (B) in der 3'-UTR des Gens VSNL1, bedingt durch Dinukleotidwiederholungen vom Typ (CA)<sub>23</sub>.

### 4.3 Detektion von Mutationen im Gen CRH

Die Analyse des CRH-Gens erfolgte in unserem Patientenkollektiv basierend auf vorangegangenen Untersuchungen durch Combi und Kollegen aus dem Jahr 2005 und wurde um das Screening der bisher nicht untersuchten, kodierenden Region des Gens mittels SSCP-Analyse ergänzt. Die beiden zuvor beschriebenen Promotorvarianten wurden sowohl in unserem Patienten-, als auch in einem größeren Kontrollkollektiv unter Anwendung zweier Restriktionsverdauere überprüft.

#### 4.3.1 g.-1470C>A, Promotorregion

Der Polymorphismus g.-1470C>A wurde bereits in der SNP-Datenbank des NCBI (rs12721510) beschrieben und daher in unserem Patienten- und einem ausgewählten Kontrollkollektiv mittels des Restriktionsverdauens mit dem Enzym *SrfI* überprüft. Das entstandene PCR-Produkt besitzt 542 bp und wird durch das Enzym bei Vorliegen des Wildtyps in fünf Fragmente der Längen 367, 73, 39, 33 und 30 bp geschnitten. Liegt die Variante vor, schließen sich zwei Fragmente zu einem zusammen und es entstehen vier Produkte mit 367, 103, 39 und 33 bp Länge. Die Patienten A1, A16, A86, A92, A96 und A116 zeigten sich heterozygot für die Variante, während bei der Patientin A118 Homozygotie vorlag (Abb. 22). Die Promotorvariante fand sich auch in der Kontrollpopulation.



**Abb. 22** Restriktionsverdau mit *SrfI* zur Detektion der Promotorvariante **g.-1470C>A** im Patientenkollektiv (vergleichend: Heterozygotie=C/A, Homozygotie=A/A und Patient ohne Polymorphismus=C/C) (A) und bei Familienmitgliedern der betroffenen Patienten A1, A16 und A86 (a1: Vater; a2: Mutter; b1: Bruder; b2: Schwester; c1: 1. Tante vs.; c2: 2. Tante vs.; d: Großmutter) (B).

Promotor/ g.-1470C>A	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
C/C	63/70 (90%)	29/33 (87,9%)	119/131 (90,8%)
C/A	6/70 (8,6%)	3/33 (9,1%)	12/131 (9,2%)
A/A	1/70 (1,4%)	1/33 (3%)	0/131
Allelfrequenz	0,943/0,057	0,924/0,076	0,954/0,046

**Tab. 27** Genotyp- und Allelfrequenzen für die Promotorvariante **g.1470C>A** unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

Die anhand der ermittelten Ergebnisse berechneten minimalen Allelfrequenzen (MAF von 5,7% bei Patienten, 4,6% bei Kontrollen) korrespondierten mit den bereits veröffentlichten Daten für eine europäische HapMap-Kontrollpopulation (MAF 6,7%).

#### 4.3.2 g.-1404G>A, Promotorregion

Bei der Untersuchung der Variante g.1470C>A wurde mittels des Restriktionsverdaus mit *SrfI* zufällig ein weiterer Nukleotidaustausch in der Promotorregion des Gens *CRH* detektiert. Dieser kennzeichnete sich durch eine zusätzliche Bande bei dem Patienten A60. Das Enzym schnitt das 542 bp große Produkt bei Vorliegen des Wildtyps in vier Fragmente der Längen 401, 73, 39 und 30 bp. Bei Auftreten der Variante verblieben nur noch drei Fragmente mit 401, 103 und 39 bp Länge.

Zur besseren Beurteilung dieser erfolgte nach PCR-Aufreinigung die direkte Sequenzierung der Patientenprobe und ergab den Polymorphismus bzw. die Mutation g.-1404G>A in heterozygoter Form (Abb. 23).

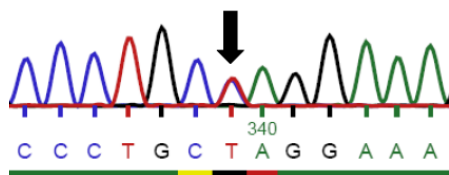


Abb. 23

Bestätigung der Promotorvariante **g.-1404G>A** mittels direkter Sequenzierung bei Patient A60.

Da diese Variante bisher nicht beschrieben wurde und nur bei einem einzigen Patienten auftrat, wurde diese in einem erweiterten Kontrollkollektiv, bestehend aus 131 Probanden und in der Familie des Betroffenen überprüft (Abb. 24).

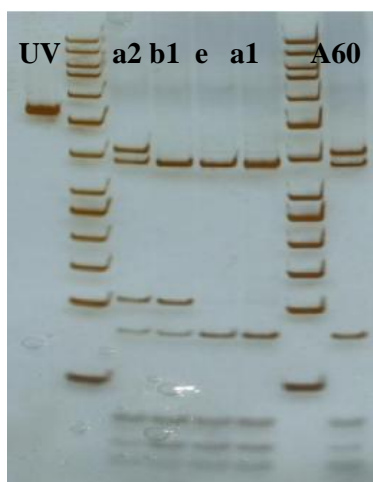


Abb. 24

Restriktionsverdau mit *SfrfI* für Familie des Indexpatienten A60 zur Überprüfung der Promotorvarianten **g.-1404G>A** und **g.-1470C>A**.

**UV** = unverdaute Probe  
**Vater a1** : g.-1404G/G; g.-1470C/C  
**Mutter a2** : g.-1404G/A; g.-1470C/A  
**Bruder b1** : g.-1404G/G; g.-1470C/A  
**Sohn e** : g.-1404G/G; g.-1470C/C  
**Patient A60** : g.-1404G/A; g.-1470C/C

Nur der Patient A60 und seine Mutter wiesen den neu detektierten Polymorphismus bzw. die neu detektierte Mutation in heterozygoter Form auf. Zudem zeigte sich der Nukleotidaustausch g.-1470C>A bei Mutter und Bruder heterozygot, jedoch nicht bei A60. Vater und Sohn des Betroffenen wurden für beide Varianten negativ getestet.

Promotor/ g.-1404G>A	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
G/G	69/70 (98,6%)	33/33 (100%)	131/131 (100%)
G/A	1/70 (1,4%)	0/33	0/131
A/A	0/70	0/33	0/131
<b>Allelfrequenz</b>	0,993/0,007	1/0	1/0

Tab. 28 Genotyp- und Allelfrequenzen für die Promotorvariante **g.1404G>A** unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

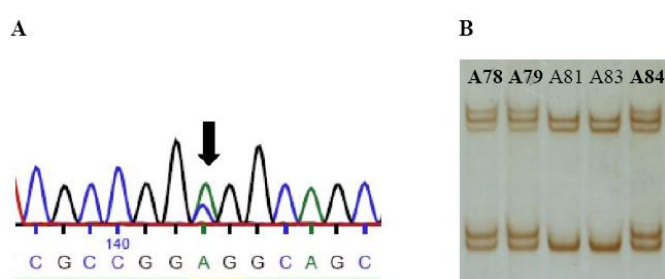
### 4.3.3 g.-1166G>C, Promotorregion

Die zweite von Combi und Kollegen identifizierte Variante g.-1166G>C konnte in unserem Patientenkollektiv nicht detektiert werden. Es erfolgte dementsprechend keine Überprüfung einer Kontrollgruppe. Der Restriktionsverdau erfolgte unter Verwendung des Enzyms *HinfI*. Das entstandene PCR-Produkt besitzt 542 bp und wird durch das Enzym bei Vorliegen des Wildtyps in drei Fragmente der

Längen 358, 127 und 57 bp geschnitten. Liegt eine Variante vor, fällt eine der Kennsequenzen weg und es entstehen Produkte mit 485 und 57 bp Länge.

#### 4.3.4 G96G (g.288A>C), Exon 2

Bei der SSCP-Analyse des Exons 2 konnten Bandenmustersauffälligkeiten bei insgesamt 17 Patienten detektiert werden. Die Patienten A7, A11, A17, A19, A60, A64, A78, A79, A84, A91, A97, A98, A108, A109, A111, A120 und A126 zeigten eine identische Bandenkonformation, welche mittels direkter Sequenzierung als stiller SNP G96G bestimmt werden konnte (Abb. 25). Dieser Polymorphismus wurde bereits in der SNP-Datenbank der NCBI veröffentlicht (rs6159).



**Abb. 25** Gegenüberstellung des Sequenzierungsergebnisses (A) und der in der SSCP detektierten Bandenmustersauffälligkeit bei den Patienten A78, A79 und A84 (B) für die Variante g.288A>C in Exon 2 des Gens CRH.

Um die im Patientenkollektiv aufgetretene Variante auch in einem Kontrollkollektiv zu überprüfen, erfolgte ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *BsmAI*. Um ein Unterscheidungsmerkmal zwischen Wildtyp und Variante zu schaffen, bedurfte es eines Mutageneseprimers (Tab. 13, Kap. III. 2.4.1.1). Das entstandene PCR-Produkt bestand aus 372 bp. Der Wildtyp wies drei Schnittstellen mit den Fragmentlängen 186, 161 und 25 auf. Der Polymorphismus konnte anhand einer fehlenden Schnittstelle detektiert werden und verdeutlichte sich durch das Vorhandensein von nur zwei Fragmenten der Längen 161 und 25 bp. Auch im Kontrollkollektiv erwies sich rs6159 als häufiger SNP.

Exon 2.2/ g.288A>C	Patienten	Deutsche Patienten	Kontrollen
A/A	52/69 (75,4%)	25/33 (75,8%)	39/55 (70,9%)
A/C	17/69 (24,6%)	8/33 (24,2%)	15/55 (27,3%)
C/C	0/69 (0%)	0/33 (0%)	1/55 (1,8%)
Allelfrequenz	0,877/0,123	0,879/0,121	0,845/0,155

**Tab. 29** Genotyp- und Allelfrequenzen für die genetische Variante g.288A>C unter allen Patienten, deutschen Patienten und Kontrollen.

## V. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, ein bereits auf Mutationen in den Genen *CHRNA4* und *CHRNA2* untersuchtes Patientenkollektiv, für welche es sich negativ zeigte, auf andere, eventuell krankheitsverursachende, Polymorphismen bzw. Mutationen in den Kandidatengen *RIC3* und *VSNL1* zu analysieren. Ergänzend hierzu wurde das Kollektiv auf von Combi und Kollegen bereits 2005 detektierte genetische Varianten im Gen *CRH* analysiert.

### 1. Validität der angewandten Methoden

#### 1.1 PCR

Zur Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen war die Etablierung der PCR-Bedingungen für die einzelnen Fragmente nötig. Dies geschah durch Optimierung der Annealingtemperatur, der Zyklenzahl sowie der Dauer der einzelnen PCR-Schritte. Einige Male bedurfte es einer erneuten Etablierung, um ein adäquates Produkt zu erhalten. Häufig lag dies an der Verwendung verschiedener Thermocycler oder an der Qualität der genutzten Primer, so dass die Konstruktion und Bestellung neuer Primer notwendig wurde.

#### 1.2 SSCP

Um genetische Varianten bzw. Mutationen zu detektieren, wurde das Verfahren der SSCP-Analyse angewandt, wobei sich deren Validität von Fragmentgröße und Laufbedingungen abhängig zeigte. Von Sheffield und Kollegen wurde 1993 die Sensitivität bei Produkten mit bis zu 300 bp Länge mit 90 % angegeben (Sheffield et al. 1993). In dieser Arbeit konnte aufgrund der Anwendung vierer verschiedener Laufbedingungen eine Detektionsrate von etwa 81,4 % erzielt werden. Die exakte Durchführung der sich anschließenden Silberfärbung spielte für die Beurteilung der verschiedenen Einzelstrangkongformitäten eine maßgebliche Rolle, so dass bei qualitativ minderwertiger Arbeit mit einer erhöhten Fehlerquote gerechnet werden musste. Die SSCP stellt zusammenfassend ein kostengünstiges, von technischer Seite mäßig aufwendiges Verfahren zur Analyse vor allem großer Kollektive auf eventuelle Polymorphismen bzw. Mutationen dar. Es dient bei sauberer Ausführung zur Detektion unbekannter, aber auch bekannter Varianten, die jedoch immer erst mithilfe einer Sequenzierung verifiziert bzw. spezifiziert werden können (Sunnucks et al. 2000). Seit der praktischen Durchführung der hier diskutierten Ergebnisse entwickelten sich verschiedene neue Methoden, welche die Reproduzierbarkeit und Detektionsrate der SSCP-Analyse deutlich übertreffen. Hierzu gehören beispielsweise verschiedene Techniken des „next generation sequencing“ oder die „SNP arrays“. Diese Verfahren haben die SSCP und die Sequenzierung nach Sanger inzwischen als Screeningmethode für bekannte oder auch unbekannte Polymorphismen abgelöst (Schuster 2008; LaFramboise 2009).

### 1.3 Restriktionsverdau

In der vorliegenden Arbeit diene diese Methode sowohl zur Überprüfung der in der SSCP und Sequenzierung detektierten Varianten in einem ausgewählten Kontrollkollektiv, als auch der Identifizierung bereits bekannter SNPs bzw. Mutationen im Patientenkollektiv. Letzteres wurde sich bei der Suche nach von Combi und Kollegen beschriebenen Promotorvarianten im Gen *CRH* zunutze gemacht. Restriktionsverdaue ermöglichen im Falle bereits beschriebener Varianten eine Analyse großer Kollektive. Die Kosten für das Verfahren orientieren sich hierbei vor allem an Art und Menge des benötigten Enzyms. Die von Enzymeigenschaften abhängige, zeit- und technisch aufwendige Durchführung limitiert die Anwendungsoptionen. Unter Einbeziehung dieser Faktoren würde die direkte Sequenzierung von zu untersuchenden DNA-Proben, wie sie mit heutigen Methoden kostengünstig möglich ist, effektiver und effizienter sein.

### 1.4 Aktuelle methodische Fortschritte

Wie bereits in Kapitel V.1.2 angesprochen, hat die Entwicklung neuer molekulargenetischer Methoden seit Abschluss des praktischen Teils der vorliegenden Studie rasante Fortschritte gemacht. Würde die Studie heute nochmals begonnen, so kämen für das Screening nach unbekanntem Varianten neuere Sequenzieretechniken zum Einsatz. Die folgenden Ausführungen sollen nur einen kleinen Einblick in die heutigen Möglichkeiten der DNA-Sequenzierung und SNP-Detektion gewähren.

Das 2005 eingeführte Verfahren von 454 Life Sciences/ Roche orientiert sich an der von Ronaghi und Kollegen beschriebenen Pyrosequenzierung (Ronaghi et al. 1996; Mardis 2008). Wie bei der Methode nach Sanger dient hier ein Einzelstrang des zu sequenzierenden DNA-Moleküls als Vorlage und wird unter Verwendung eines Primers und einer Polymerase zum Doppelstrang ergänzt („sequencing-by-synthesis“). Wenn nun ein Nukleotid komplementär zum Vorlagenstrang eingebaut wird, kann das dabei freigesetzte Pyrophosphat (PPi) mithilfe eines Enzymsystems, bestehend aus einer ATP-Sulfonylase und einer Luziferase, zunächst in den Energielieferanten ATP und dann in einen zu messenden Lichtblitz umgewandelt werden (Margulies et al. 2005). Gerade für *de novo*-Sequenzierungen bisher unbekannter DNA stellt das Verfahren eine attraktive Technologie dar (Shendure and Ji 2008). Nachteile der Methode liegen beim Lesen langer Homopolymerabschnitte, da es sich schwierig gestaltet, die Lichtintensität nach Einbau von z. B. 20 C-Nukleotiden gegenüber nur 19 Bausteinen zu diskriminieren. Dennoch liegt die Lesegenauigkeit bei ausreichend hoher Redundanz bei etwa 99 % (Mardis 2008).

Auch die 2006 von Illumina eingeführte Solexa-Technologie bedient sich der „sequencing-by-synthesis“-Methode. Das Verfahren basiert auf einer PCR-Vervielfältigung auf einem soliden Träger („bridge PCR“) und nicht wie beim 454 Roche-System an Kügelchen (Fedurco et al. 2006). Hierbei wird an einem einzelsträngigen DNA-Molekül unbekannter Sequenz, welches als Vorlage fungiert,

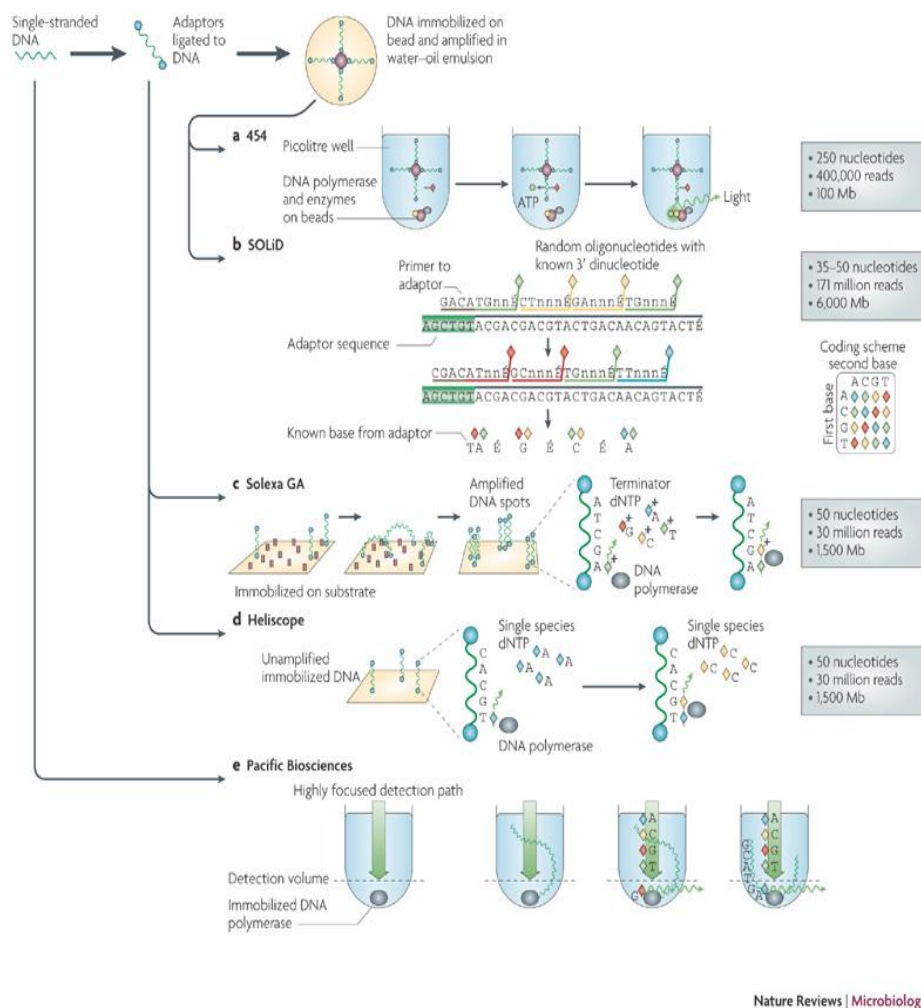


der komplementäre Strang repliziert und somit ein terminierendes Nukleotid eingefügt. Dieses stoppt die DNA-Synthese und induziert die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes. Es kommen vier verschiedene Farben für die vier Nukleotide zum Einsatz. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie wird die eingebaute Base für jedes Cluster bestimmt. Anschließend erfolgt die Entfernung des Terminator-Nukleotids und der Fluoreszenzmarkierung, um eine erneute Sequenzierunde einzuleiten (Shendure and Ji 2008; Turcatti et al. 2008). Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der geringeren Leseweite des Verfahrens, trotz einer höheren Produktion an Datenmenge. Daraus resultiert eine Anwendung dieser Methode meist nur bei vorhandener Referenzsequenz als Vorlage. Die Sequenzierung von Homopolymerabschnitten allerdings gestaltet sich mithilfe der Solexa-Technologie recht einfach (Mardis 2008).

Der SOLiD-Genome-Analyzer (Sequencing by Oligo Ligation and Detection von ABI) erschien erstmals im Oktober 2007 und differiert hinsichtlich seiner Funktion deutlich von den beiden zuvor beschriebenen Geräten. Das System basiert auf einer Sequenzierung durch Ligation (Shendure et al. 2005; Mardis 2008).

Ähnlich dem Sequenzierverfahren von Roche werden hier die zu sequenzierenden Moleküle einzeln an 1 µm-Kügelchen gebunden und daraufhin durch Amplifikation unter Durchführung einer Emulsions-PCR klonal vermehrt. Anschließend erfolgt das Auftragen der Kügelchen-Matrizen-Einheit auf einen Glaträger. Das Zugabe fluoreszenzmarkierter Oktamernukleotide zum Vorlagenstrang ermöglicht daraufhin durch Ligation die Identifizierung der DNA-Sequenz. Im nächsten Zyklus wird der Fluoreszenzfarbstoff entfernt und ein neues Oligonukleotid, das eine weitere Base detektiert, gebunden. Jeder Lauf dieses Verfahrens benötigt ca. fünf Tage und produziert drei bis vier Gigabyte an Sequenzierdaten mit einer durchschnittlichen Leselänge von 25-35 bp (Hankeln 2008; Mardis 2008). Diese Technologie eignet sich aufgrund dessen eher für Resequenzierungen von bekannten Sequenzen und erzielt hierbei hohe Detektionsraten.

Neueste Systeme, Verfahren des sogenannten „next-next generation sequencing“, ermöglichen die DNA-Sequenzierung ohne vorherige Amplifikation durch PCR. Sich in Entwicklung befindende Methoden der Firmen Pacific Biosciences, Visigen, Complete Genomics oder Oxford Nano ermöglichen erstmals neben der fortschrittlichen Kosten- und Arbeitsreduktion eine Einzelmolekülsequenzierung. In Tabelle 30 werden weitere funktionelle und wirtschaftliche Vor- und Nachteile der drei wichtigsten „next generation sequencing“- und eines „next-next generation sequencing“-Verfahren vergleichend gegenübergestellt. Abbildung 26 stellt die beschriebenen Methoden schematisch dar.



Nature Reviews | Microbiology

**Abb. 26** Vergleichende schematische Darstellung verschiedener NGS- und NNGS-Verfahren (MacLean et al. 2009).

Verfahren	Funktionsweise	Sequenzierung durch Synthese	Kosten/Mb	Kosten/Gerät	Paired ends?	1° error modality	Lese-länge	Referenz
454	Emulsions-PCR	Polymerase (Pyrosequenzierung)	\$60	\$500.000	Ja	Insertion od. Deletion	250 bp	(Dressman et al. 2003; Margulies et al. 2005)
Solexa	Bridge-PCR	Polymerase (reversible Terminatoren)	\$2	\$430.000	Ja	Substitution	36 bp	(Bentley 2006; Fedurco et al. 2006)
SOLiD	Emulsions-PCR	Ligase (Oktamere mit Zwei-Basen-Kodierung)	\$2	\$591.000	Ja	Substitution	35 bp	(Shendure et al. 2005; McKernan 2006)
HeliScope	Einzel-molekül	Polymerase (asynchrone Extension)	\$1	\$1.350.000	Ja	Deletion	30 bp	(Braslavsky et al. 2003; Harris et al. 2008)

**Tab. 30** Gegenüberstellung verschiedener NGS- und NNGS-Verfahren unter Einbeziehung ihrer Funktionsweisen und wirtschaftlicher Aspekte (Shendure and Ji 2008).

Wenn es um die Bestimmung der Frequenz bekannter Varianten geht, so hätte man heute die Wahl zwischen der Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) oder einem Array-gestützten Verfahren. Bei der MLPA (Abb. 27) handelt es sich um ein Verfahren, das die Detektion von Dosisunterschieden von bis zu 45 verschiedenen Nukleinsäurefragmenten in einem Ansatz, mit nur einem einzigen Primerpaar ermöglicht und 2002 das erste Mal von Schouten et al. beschrieben wurde (Schouten et al. 2002). Die Menge der sequenzspezifisch hybridisierten und ligierten Oligonukleotide ist dabei proportional zur Kopienzahl der Zielsequenz. Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte der Größe nach erfolgt anschließend durch Kapillarelektrophorese. Dosisunterschiede zeichnen sich hierbei durch Reduktion oder Vergrößerung der Peakhöhen und Peakflächen aus ([www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001](http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001)). Die MLPA eignet sich besonders für die Bestimmung einer kleinen Zahl von Varianten mit hoher methodischer Zuverlässigkeit. Sie lässt sich schnell, kostengünstig und einfach durchführen.

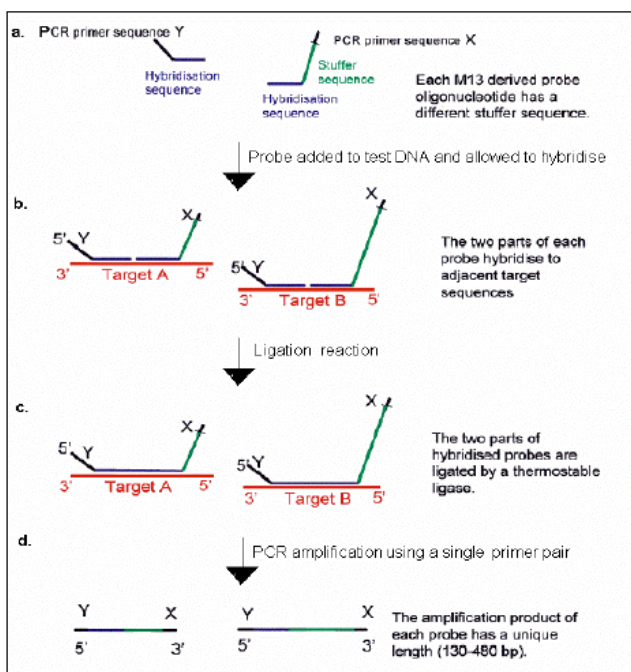
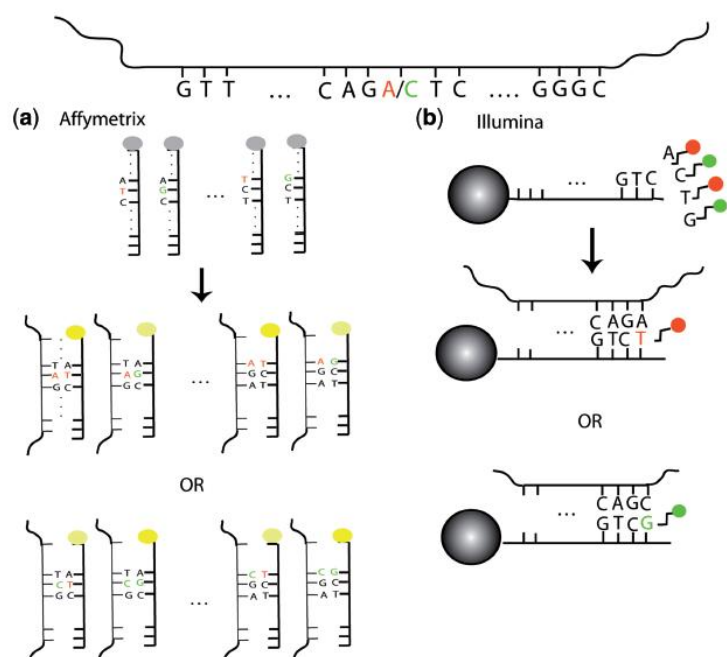


Abb. 27 Schematische Darstellung des groben Ablaufs einer MLPA.

[http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit5/trials/MLPA\\_validation\\_summary.pdf](http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit5/trials/MLPA_validation_summary.pdf)

Für die Analyse einer größeren Zahl von Varianten oder des gesamten Genoms kommt eher die Array-Technik infrage. SNP-Arrays sind Oligonukleotidarrays mit hoher Dichte, die zum Nachweis von SNPs innerhalb eines Genoms dienen. Heute erlauben kommerzielle SNP-Array-Plattformen eine Genotypisierung von ca. einer Million SNPs in einem Individuum mit 99%iger Genauigkeit und das in nur einem Assay (Affymetrix und Illumina) (LaFramboise 2009). Abbildung 28 zeigt beide Verfahrensabläufe in schematischer Darstellung.



**Abb. 28** Vergleichende schematische Darstellung des Ablaufs zweier SNP-Array-Technologien (LaFramboise 2009).

Am Anfang wird das mittels beider Verfahren zu untersuchende DNA-Fragment, welches einen A/C SNP aufweist, dargestellt (Abb. 28). Beim Affymetrix-Assay (a) gibt es 25-mer Sonden für beide Allele. In diesen variiert die Lokalisation des SNPs. Die DNA bindet an beide Sonden unabhängig davon, welches Allel sie tragen. Am effizientesten passiert dies allerdings, wenn sie sich zu allen 25 Basen komplementär verhält (hellgelb). Schlechtere Ergebnisse gewinnt man, wenn die Sonden nicht zum SNP passen (dunkelgelb). Die dadurch verhinderte Bindung manifestiert sich in einem dunkleren Signal. An jedes Illumina-Kügelchen (b) wird eine 50-mer-Sequenz komplementär zu benachbarten SNP-Region gebunden. Die Einzelbasenanlagerung (T oder G), welche komplementär zu dem von der DNA getragenen Allel (A oder C) erfolgt, resultiert dann in einem entsprechenden Farbsignal (rot oder grün). Bei beiden Verfahren (a) und (b) wandelt ein Computersystem die rohen Signale in Interferenzen um, die die An- bzw. Abwesenheit jedes der beiden Allele bestätigen (LaFramboise 2009).

## 2. Ergebnisse des Mutationscreenings

Die Tabelle 16 (Kap. IV.4.) zeigt die Ergebnisse des Mutationscreenings für alle 70 Patienten. Desweiteren beinhaltet sie Daten zu untersuchten Familienangehörigen einiger Patienten (A1, A16, A60 und A86) mit Promotorvarianten im Gen *CRH*.

17 von 70 (24,3 %) Patienten wiesen in keinem der Gene Varianten auf. Im Großteil des Kollektivs (75,7 %) fanden sich in allen drei Genen ein oder mehrere Nukleotidaustausche. Von diesen zeigten wiederum 75,5 % der Patienten Varianten im Gen *RIC3*, 7,5 % im Gen *VSNI1* und 43,4 % im Gen

*CRH*. Bei keinem der untersuchten Individuen konnten Nukleotidaustausche in allen drei Genen detektiert werden, jedoch kam es vor, dass verschiedene Varianten in einem Gen bzw. in zwei Genen beobachtet werden konnten. Die Variantenkonstellation bei einigen Patienten ließ keine Rückschlüsse hinsichtlich eines möglichen, durch Zusammenwirkung bedingten, krankheitsverursachenden Potentials zu, da kein einheitliches Muster erkennbar wurde. Aus diesem Grund war es sinnvoll, jeden Polymorphismus separat zu beurteilen, um anschließend dessen Relevanz zu diskutieren.

### 3. Diskussion der detektierten genetischen Varianten

Diese Arbeit untersucht erstmalig das Auftreten genetischer Varianten in neuen Kandidatengen, welche die Funktion des nikotinischen Acetylcholinrezeptors beeinflussen und zur Entstehung der ADNFLE beitragen könnten. Schwierigkeiten bei der Beurteilung der identifizierten Variante hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Krankheitsätiologie ergaben sich zum einen aus der ethnischen Inhomogenität, zum anderen aus der großen Variationsbreite bei einer begrenzten Verfügbarkeit diagnostischer und anamnestischer Informationen zum analysierten Patientenkollektiv. Gerade die Komplexität der Diagnosestellung und der Symptomvielfalt erschwerte eine exakte Klassifizierung bzw. Zuordnung der Patienten, so dass zum jetzigen Zeitpunkt noch keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen dem Auftreten eines Nukleotidaustausches und der Krankheitsschwere postuliert werden können. Jedoch befähigen die erhobenen Daten – vor allem die vergleichende Untersuchung des Kontrollkollektivs – zu einer Einschätzung der Relevanz hinsichtlich der Krankheitsentstehung. Im Folgenden werden alle detektierten Varianten diskutiert und Empfehlungen zu fortführenden Analysen aufgezeigt.

#### 3.1 Polymorphismen im Gen *RIC3*

Im *RIC3*-Gen konnten insgesamt zehn verschiedene Polymorphismen identifiziert werden. Die bereits beschriebene Variante L118L (dbSNP NCBI, rs10839976) stellte sowohl im Patienten-, als auch im Kontrollkollektiv den am häufigsten auftretenden Polymorphismus dar.

##### 3.1.1 c.-61G>A, ncr

Die Variante c.-61G>A befindet sich in der 5'-nichttranslatierten Region des Gens und konnte bei vier Patienten in heterozygoter Form detektiert werden. Diese unterschieden sich hinsichtlich ihrer Herkunft, wobei zwei Patienten deutschstämmig, einer österreichisch und ein anderer schweizerdeutsch war. Auch das Alter und Geschlecht der Betroffenen differierte. Über die Patienten A7 (W), A60 (M) und A91 (M) lagen uns, die Familienanamnese betreffend, weitere Informationen vor. Die drei an nächtlichen Anfällen leidenden Individuen kamen aus Familien, in welchen mehrere Verwandte ebenfalls betroffen waren. Da sich die Variante jedoch auch in ähnlicher Frequenz in dem deutschen Kontrollkollektiv zeigte, wurden keine weiteren Analysen der vorhandenen Verwandten-DNA durchgeführt. Homozygote Träger dieses Polymorphismus konnten weder im Patienten-, noch im Kontroll-

kollektiv nachgewiesen werden. Aufgrund der herkunftsbezogenen Unterschiede bedürfte es größerer, angeglicherer Kontrollkollektive, um genauere Aussagen über die Relevanz dieser Variante zu treffen. Desweiteren könnten elektrophysiologische *in vitro*-Studien zur Aufschlüsselung der möglichen Funktion bzw. Auswirkung dieses Polymorphismus beitragen, denn auch SNPs in nichtkodierenden Regionen können beispielsweise eine Änderung der Transkriptionsregulation und RNA-Stabilität bewirken.

### 3.1.2 c.-35G>A, ncr

Bei der SSCP-Analyse des Exons 1 konnte neben der oben genannten, genetischen Variante noch eine weitere bei Patient A88 (M) detektiert und mittels Sequenzierung verifiziert werden. Der Nukleotid-austausch c.-35G>A lag in heterozygoter Form vor und befand sich ebenfalls in der 5'-nicht-translatierten Region des Gens *RIC3*. Der Betroffene war deutscher Herkunft und zeigte hinsichtlich nächtlicher Anfälle eine positive Familienanamnese. Die Mutter des Patienten litt, wie er selbst, unter stereotypen komplex-fokalen Anfällen, welche immer aus dem Schlaf heraus erfolgten. Auch bei der Schwester der Großmutter mütterlicherseits ließen sich ähnliche Angaben eruieren. Die genetische Komponente der Epilepsie zeigte sich hier also deutlich. Die Variante konnte auch bei einer Kontrollperson heterozygot nachgewiesen werden. Da sich bei dieser Analyse die Herkunft des Patienten mit der des Kontrollkollektivs deckte, lässt sich vermuten, dass dieser Polymorphismus nicht zur Krankheitsentstehung beiträgt, sondern vielmehr einen funktionell neutralen SNP darstellt.

### 3.1.3 K25R (c.74A>G), Exon 1

Die Variante K25R befindet sich in der kodierenden Region des Gens *RIC3* und konnte nur bei einer britischen Patientin (A86) in heterozygoter Form identifiziert werden. Die Patientin und deren Mutter litten nachweislich unter einer Temporallappenepilepsie mit Auren, welche in hoher Frequenz tags- und nachtsüber auftraten. Auch der Bruder und der Cousin mütterlicherseits der Indexpatientin A86 zeigten Anzeichen einer Epilepsie. Mutter, Bruder und Patientin sprachen gut auf Carbamazepin an. Trotz der diagnostizierten Temporallappenepilepsie erschien es sinnvoll auch hier auf Polymorphismen bzw. Mutationen im Gen *RIC3* zu screenen, da in früheren Publikationen auch bei diesem Epilepsiesyndrom eine seltene, erbliche Form mit autosomal-dominantem Vererbungsmechanismus bei inkompletter Penetranz postuliert und bereits einige andere Kandidatengene untersucht wurden (Michelucci et al. 2003). In dem analysierten, auf 77 Probanden erweiterten Kontrollkollektiv konnte die Variante weder in hetero-, noch in homozygoter Form detektiert werden. Aufgrund der Abweichung bezüglich der Herkunft zwischen Patienten und Kontrollkollektiv wurden die Familienmitglieder noch nicht untersucht. Dies ist erst sinnvoll, wenn ein geeignetes britisches Kollektiv als passende Kontrolle zur Verfügung steht. Sollte sich der Aminosäureaustausch K25R in einem solchen Kontrollkollektiv nicht nachweisen lassen, wären weiterführende funktionelle *in vitro*-Studien zur Relevanz dieser seltenen Variante bzw. Mutation gerechtfertigt. Vorher sollte zunächst die Häufigkeit

dieser Variante bei Patienten mit Temporallappenepilepsie untersucht werden. Dies insbesondere deshalb, da in der vorliegenden Arbeit die Mutation ausschließlich bei einer Familie gefunden wurde, welche als Einzige im Patientenkollektiv diese Form der Epilepsie aufwies. Aufgrund dessen wäre es interessant, ob diese Mutation häufiger bei Patienten mit Temporallappenepilepsie vorkommt.

### **3.1.4 Polymorphismen in Exon 3 des Gens *RIC3***

Die exakte Aufschlüsselung der komplexen Bandenmusterabweichung bei insgesamt 37 Patienten (Kapitel VI, 4.1.4, Abb. 10) in der SSCP-Analyse gestaltete sich schwierig und konnte nur mittels direkter Sequenzierung gewährleistet werden. Hier zeigten sich daraufhin mehrere Varianten für die multiplen Bandenkonformationen verantwortlich.

#### **3.1.4.1 L118L (c.354C>A), Exon 3**

Der bereits beschriebene, stille Polymorphismus c.354C>A (dbSNP NCBI, rs10839976) konnte bei 21 Patienten in heterozygoter und bei sieben Patienten in homozygoter Form identifiziert werden und stellt die insgesamt am häufigsten detektierte Variante in dieser Arbeit dar. Die Allelfrequenz unter den Patienten glich denen des deutschen Kontrollkollektivs und denen einer europäischen HapMap-Population (MAF 75,0%). Die Zahl homozygoter Träger des Polymorphismus unter Patienten korrespondierte ebenfalls mit den Ergebnissen bei Kontrollen und legte nahe, dass in diesem Fall eine krankheitsverursachende bzw. -modulierende Rolle dieser häufigen Variante ausgeschlossen werden kann.

#### **3.1.4.2 G121A (c.362G>C), Exon 3**

Der in Datenbanken bereits erfasste Polymorphismus c.362G>C (dbSNP NCBI, rs80168649), welcher zu einem Aminosäureaustausch an Position 121 führt, konnte nur in einem schwedischen der 68 untersuchten Patienten heterozygot detektiert werden. Der Patient A42 zeigte somit insgesamt vier verschiedene Varianten, davon drei allein in Exon 3, die das auffällige und vom Rest der Patienten abweichende Bandenmuster in der SSCP erklärten. Der Vater und die Großmutter des Betroffenen wiesen ebenfalls Symptome eines Anfallsleidens auf. Unter den 104 analysierten, deutschen Kontrollpersonen konnte nur ein Proband mit dieser Variante in heterozygoter Form identifiziert werden. Homozygotie lag nicht vor. Obwohl der Nukleotidaustausch unter deutschen Patienten nicht und im Kontrollkollektiv einmal nachgewiesen werden konnte, besteht dennoch die Möglichkeit, dass es sich hierbei um eine Mutation handeln könnte. Um dies zu klären, müsste die Frequenz der Variante in einem passenden Kontrollkollektiv verglichen und mittels elektrophysiologischer Studien auf ihre funktionellen Eigenschaften überprüft werden. Da keine exakten anamnestischen Angaben zu Anfallsart, -frequenz und -häufigkeit des schwedischen Patienten vorhanden waren, ließen sich keine Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen den multiplen, eng benachbarten Nukleotidaustauschen und der Krankheitsschwere ziehen.

### 3.1.4.3 C130Y (c.389G>C), Exon 3

Der ebenfalls zuvor beschriebene SNP c.389G>A (dbSNP NCBI, rs55990541) konnte bei 15 Patienten in heterozygoter Form erfasst werden. Das Geschlecht und die Herkunft (nur ein Drittel deutscher Herkunft) variierten, wohingegen das Alter in der Mehrzahl der Patienten unter 20 Jahren lag. Dennoch zeichnete sich kein homogenes Muster ab. Im Kontrollkollektiv konnten zehn Personen mit heterozygotem und eine mit homozygotem Polymorphismus ausgemacht werden. Berücksichtigt man die abweichenden Genotypfrequenzen in beiden Kollektiven (heterozygot 22,1 % bei Patienten, 9,6 % bei deutschen Kontrollen), könnte dies zum einen durch die unterschiedliche Zusammensetzung beider Gruppen die Herkunft betreffend oder aber durch ein gehäufteres Vorkommen dieser Variante in erkrankten Individuen bedingt sein. Aufgrund des auffällig großen Unterschieds bei den Allelfrequenzen zwischen Patienten und Kontrollen, erscheint es sinnvoll, diesen Polymorphismus in Anschlussprojekten genauer zu analysieren. Hierzu sollte zunächst ein Replikationskollektiv zusammengestellt werden, welches aus ADNFLE-Patienten mit einheitlicher Herkunft besteht. Bestätigt sich dabei die Differenz zwischen den Allelfrequenzen, könnte rs55990541 oder eine mit diesem SNP im gleichen Haplotypblock lokalisierte Variante einen genetischen Risikofaktor für die ADNFLE darstellen.

### 3.1.4.4 P135S (c.403C>T), Exon 3

Die Variante c.403C>T (dbSNP NCBI, rs73411617) wurde zufällig bei der Sequenzierung der 104 deutschen Kontrollpersonen im Rahmen der Analyse des Exon 3 detektiert und ließ sich im Patientenkollektiv nicht nachweisen, so dass dieser keine pathologische Bedeutung beigemessen werden kann. Sie wurde bereits zuvor in Datenbanken erfasst.

### 3.1.5 D311N (c.934G>A), Exon 6

Die Variante c.934G>A zeigte sich heterozygot bei nur einem britischen Patienten (A83), bei welchem anamnestisch hochfrequente, z.T. therapieresistente, komplex-fokale Konvulsionen in Clustern auftraten. Die bildgebende und elektrophysiologische Diagnostik wies keine pathologischen Ergebnisse auf, was für Patienten mit ADNFLE nicht untypisch ist. Hinsichtlich der Genetik wiesen die Tante der Mutter des Patienten und deren Tochter, sowie eventuell der väterliche Großvater familienanamnestisch Epilepsien auf. Die Dauer der Anfälle und das Manifestationsalter beim Indexpatienten A83 deckten sich mit den vorhandenen Daten für an ADNFLE Erkrankte. Unter deutschen Patienten trat dieser Polymorphismus nicht auf, jedoch bei zwei der 53 deutschen Kontrollen in heterozygoter Form, so dass dieser genetischen Variante mit hoher Wahrscheinlichkeit keine pathogene Funktion zukommt. Um jedoch eine exakte Aussage über die Relevanz dieses Aminosäureaustausches in britischen Patienten zu treffen, bedürfte es eines, bezüglich der Herkunft, angeglichenen Kontrollkollektivs.



### 3.1.6 D351N (c.1054G>A), Exon 6

Die Variante c.1054G>A in Exon 6 des Gens *RIC3* konnte bei insgesamt sieben Patienten gefunden werden. Auch diese unterschieden sich hinsichtlich ihres Geschlechts (M:W/4:3) und ihrer ethnischen Herkunft (57,1% Deutsche). Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei ca. 19 Jahren. Der bereits beschriebene Polymorphismus (dbSNP NCBI, rs11826236) fand sich ebenfalls bei drei der 55 untersuchten Kontrollpersonen und wurde demzufolge nicht in einem größeren Kollektiv analysiert. Aufgrund der herkunftsspezifischen Unterschiede ist es möglich, dass die Differenzen in den Allelfrequenzen ein Artefakt darstellen und dass dieser Aminosäureaustausch nicht zur Krankheitsentstehung beiträgt. Andererseits wäre es denkbar, dass eben diese Unterschiede tatsächlich auf einen funktionellen Effekt hindeuten. Da es sich bei rs11826236 zudem um eine kodierende Variante handelt, sollte diese in zukünftige Studien einbezogen werden.

### 3.1.7 c.1007+149C>G, 3'-UTR

Diese nach dem Stoppkodon in der 3'-untranslatierten Region lokalisierte Variante konnte nur bei einem der 68 untersuchten Patienten identifiziert werden. Obwohl in seltenen Fällen auch Varianten im UTR-Bereich funktional sein können, ist eine Untersuchung solcher Varianten technisch sehr aufwendig, so dass hier auf eine fortführende Analyse eines geeigneten Kontrollkollektivs verzichtet wurde. Die 3'-UTR enthält z. B. regulierende Sequenzen, welche die RNA-Stabilität beeinflussen oder regulierende RNAs binden können, weswegen diese Variante sicherlich von Interesse sein könnte. Jedoch war der Patient A65 belgischer Abstammung und es wäre von daher sinnvoll, zunächst Kontrollen zu untersuchen, welche bezüglich der Herkunft passend sind. Nur ein Vergleich mit ethnisch äquivalenten Kontrollpersonen kann eine eindeutige Aussage hinsichtlich der Differenzierung zwischen SNP und Mutation erbringen und eine fortführende funktionelle *in vitro*-Studie rechtfertigen. Die aus der Anamnese zusätzlich bekannte psychomotorische Retardierung des Patienten, welche bei einem kleinen Teil von ADNFLE-Patienten vorkommen kann, bietet eine wissenschaftliche Option für weitere Untersuchungen dieses Nukleotidaustausches (Cho et al. 2003). Interessant wäre es, die Variante in einem Kollektiv von Patienten mit geistiger Behinderung unklarer Genese zu untersuchen. Hierdurch könnte geklärt werden, ob diese unabhängig von der Epilepsie einen Risikofaktor für Intelligenzminderung darstellt.

## 3.2 Polymorphismen im Gen *VSNLI/VILIP1*

### 3.2.1 c.-390A>C, 5'UTR

Die Variante c.-390A>C im 5'UTR konnte bei zwei Patientinnen heterozygot detektiert werden. Das Alter der beiden lag bei 44 bzw. 45 Jahren. Beide waren deutscher Herkunft, so dass hier der direkte Vergleich mit einem deutschen Kontrollkollektiv sinnvoll war. In diesem konnte die Genotypfrequenz für Heterozygotie mit 1,4 % errechnet werden, was dafür spricht, dass es sich bei der identifizierten

Variante um einen Polymorphismus und nicht um eine Mutation handelt. Eine funktionelle Untersuchung jenes SNP's hätte deshalb in zukünftigen Studien keine hohe Priorität, da ein pathophysiologischer Zusammenhang mit der Erkrankung eher unwahrscheinlich ist.

### 3.2.2 c.149G>A, 5'UTR

Bei insgesamt vier Patienten (W:M/3:1) konnte die genetische Variante c.149G>A (dbSNP NCBI, rs1802174) heterozygot in der 5'UTR identifiziert werden. Hiervon kamen zwei aus Deutschland, eine aus Spanien und einer aus Belgien. Das Durchschnittsalter der Untersuchten lag bei 25 Jahren. Im deutschen Kontrollkollektiv konnte die Variante bei sechs von 54 Personen detektiert werden, was trotz des ethnischen Unterschieds die Vermutung nahe legte, dass es sich bei dem gefundenen SNP um keine krankheitsassoziierte genetische Variante handelte. Homozygotie wurde weder im Patienten-, noch im Kontrollkollektiv festgestellt. Dennoch bietet sich auch hier eine fortführende Analyse eines äquivalenten Kollektivs an, um eine Populationspezifität auszuschließen. Erst wenn diese Untersuchung einen Hinweis auf populationsabhängige Differenzen gibt, wäre eine sich anschließende funktionelle *in vitro*-Studie sinnvoll.

## 3.3 Polymorphismen im Gen *CRH*

Die Untersuchung auf von Combi und Kollegen bereits 2005 detektierte Polymorphismen in der Promotorregion des Gens *CRH* erfolgte unter Anwendung verschiedener Restriktionsverdauere sowohl im Patienten-, als auch im deutschen Kontrollkollektiv, um bisherige Erkenntnisse zu bestätigen bzw. zu widerlegen. Desweiteren wurde die kodierende Region des Gens analysiert, da diese hinsichtlich der ADNPLE bis dahin außer Acht gelassen wurde und auch in diesem Bereich funktionale Polymorphismen bzw. Mutationen lokalisiert sein konnten.

### 3.3.1 g.-1470C>A, Promotorregion

Der in Datenbanken bereits beschriebene Polymorphismus rs12721510 (Combi et al. 2005) konnte in sechs von 70 Patienten heterozygot und in einem homozygot detektiert werden. Unter den heterozygoten Trägern (A1, A16, A86, A92, A96 und A116) befanden sich vier männliche und zwei weibliche Patienten. Die Herkunft der Untersuchten variierte. So kamen nur drei der Patienten aus Deutschland, zwei aus Großbritannien und einer aus der Schweiz. Die für diesen SNP homozygote Patientin A118 war ebenfalls deutscher Herkunft. Trotz der inhomogenen Herkunft wurde ein deutsches Kollektiv, bestehend aus 131 Probanden, als Kontrolle herangezogen. In diesem konnte der Polymorphismus bei 12 Personen in heterozygoter Form identifiziert werden, während bei keiner der Kontrollen Homozygotie vorlag. Die Genotypfrequenz für Heterozygotie im ausschließlich deutschen Patientenkollektiv ( $3/33 = 9,1\%$ ) glich der des deutschen Kontrollkollektivs ( $12/131 = 9,2\%$ ). Die minimalen Allelfrequenzen ( $MAF_{\text{Patienten ges.}} = 5,7$ ;  $MAF_{\text{Patient dt.}} = 7,6$ ;  $MAF_{\text{Kontrollen dt.}} = 4,6\%$ ) korrespondierten mit den bereits veröffentlichten Daten für eine europäische HapMap-Kontrollpopulation

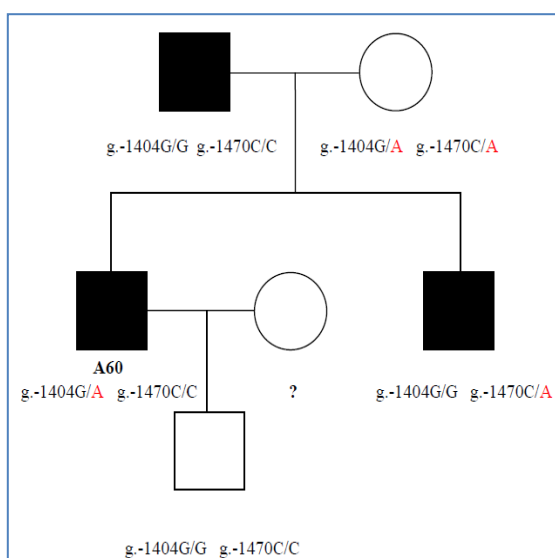
(MAF = 6,7%) (HapMap Project). Zusätzlich wurden die zur Verfügung stehenden DNAs verschiedener Familienmitglieder untersucht. So konnte der Polymorphismus g.-1470C>A bei der Schwester des Patienten A1, jedoch nicht bei dessen Vater und dessen Schwestern detektiert werden. Mütterliche DNA war zur Analyse nicht vorhanden, so dass in diesem Fall über eine Vererbung vonseiten der Mutter nur gemutmaßt werden kann. Die Schwester von A1 wies anamnestisch auf Carbamazepin ansprechende, epileptische Anfälle im Kindesalter auf. Bei Patientin A16 zeigte sich auch eine Großmutter, über welche keine genaueren Angaben eruierbar waren, heterozygot für diese Variante. In der Familie A86 konnte der SNP neben der Indexpatientin, welche nachweislich an einer Temporal-lappenepilepsie litt, auch heterozygot bei dem jüngeren Bruder, jedoch nicht bei der ebenfalls von einer Temporallappenepilepsie betroffenen Mutter nachgewiesen werden. Diese nur partielle Kopplung zwischen der Variante und der Epilepsie spricht gegen einen funktionellen Zusammenhang. Die Anamnese des Bruders der Patientin A86, welcher über Kopfschmerzen und abdominelle Beschwerden mit hochfrequentem Stuhlgang klagte, gab bisher keinen Aufschluss über die zugrundeliegende Erkrankung. Von den Familien der übrigen Patienten mit heterozygotem bzw. homozygotem Polymorphismus standen keine analysierbaren Blutproben zur Verfügung, so dass hier keine Aussagen hinsichtlich eines Vererbungsmechanismus bzw. der Relevanz dieses SNP's getroffen werden konnten. Bei der homozygoten Trägerin A118 wurden habituelle, schlafgebundene, komplex-fokale Anfälle mit einer hypermotorischen Komponente beobachtet. Diese ereigneten sich anamnestisch seit dem zweiten Lebensjahr. Desweiteren lagen bei fünf nahen Familienangehörigen nicht exakter klassifizierbare Epilepsiesyndrome vor. Eine Tante väterlicherseits verstarb sogar in einem Status convulsivus, so dass in dieser Familie von einem schweren Krankheitsverlauf und einer Vererbung mit hoher Penetranz ausgegangen werden kann. Da keine Blutproben betroffener Familienmitglieder zur Untersuchung vorlagen, war es nicht möglich eine Assoziation zwischen Krankheits schwere, -vererbungsmuster und der detektierten Homozygotie herzustellen. Jedoch könnte hier eine fortführende genetische Analyse weiterer familiärer DNA, sowie der Funktion des Nukleotid-austausches in *in vitro*-Studien mehr Aufschluss über die Relevanz dieses Polymorphismus liefern.

Zusammenfassend kann bei der beschriebenen heterozygoten Variante mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem Nukleotidaustausch mit nichtkrankheitsursächlicher Funktion ausgegangen werden, da die Genotypfrequenz im ausgewählten Kontrollkollektiv der des gesamten und der des deutschen Patientenkollektivs gleich. Eventuelle funktionelle Veränderungen durch Homozygotie bedürfen weiterer Untersuchungen.

### 3.3.2 g.-1404G>A, Promotorregion

Die im Gen *CRH* wohl interessanteste, zufällig im Restriktionsverdau mit *ScrfI* entdeckte Variante g.-1404G>A wurde bisher nicht beschrieben und von daher genauer untersucht. Die gewonnenen Daten hierzu wurden in einem Poster veröffentlicht. Der österreichische Indexpatient A60 zeigte sich als einziger der 70 analysierten Patienten in der direkten Sequenzierung heterozygot für den Nukleotid-

austausch. Bei diesem 51-jährigen Patienten bestehen seit dem achten Lebensjahr nächtliche Anfälle, deren Frequenz bei mehr als drei bis vier pro Monat liegt. Die Konvulsionen erwiesen sich als therapieresistent. Unter 131 Kontrollprobanden konnte die Variante g.-1404G>A weder in hetero-, noch in homozygoter Form identifiziert werden, so dass die Vermutung nahe lag, dass es sich hierbei um eine seltene Mutation handeln könnte. Um deren Vererbungsmechanismus genauer beurteilen zu können, wurden vorhandene DNA-Proben naher Verwandter ebenfalls einer Restriktionsanalyse unterzogen und deren erhobene Anamnesen zur Bewertung der Relevanz dieser Mutation herangezogen (Abb. 26).



**Abb. 29** Verteilung der Nukleotidaustausche g.-1404G>A und g.-1470C>A in der Promotorregion des Gens CRH bei Familie A60.

Die Mutation g.-1404G>A konnte weder beim in der Kindheit von nächtlichen Anfällen betroffenen Vater, noch beim erkrankten Bruder des Indexpatienten detektiert werden. Die Anfälle des Vaters sistierten spontan in der Pubertät. Seitdem ist er anfallsfrei. Der Bruder zeigt bei chronischen Alkoholabusus nur selten Anfälle. Bei der gesunden Mutter von A60 konnte die genetische Variante heterozygot detektiert werden, so dass in diesem Fall von einer Vererbung von mütterlicher Seite ausgegangen werden muss. Beim Sohn des Patienten A60, welcher ebenfalls keinen Nukleotidaustausch aufwies, lag bisher keine Erkrankung neurologischer Genese vor.

Eine sich anschließende *in silico*-Transkriptionsfaktor-Bindungs-Analyse demonstrierte, dass sich die Variante an der Bindungsstelle für den Kaiso-Transkriptionsfaktor befindet und somit auch in einer Funktionsänderung resultieren könnte. Man könnte deshalb spekulieren, dass die von der Mutter ererbte Mutation g.-1404G>A als zusätzlicher Risikofaktor für den besonders schweren Verlauf der Erkrankung bei dem Indexpatienten A60 Verantwortung trägt. In einem solchen Modell wären mindestens zwei Gene für die Epilepsie in der Familie A60 verantwortlich. Eines dieser Gene würde bei den drei betroffenen Familienmitgliedern die autosomal-dominant vererbte Frontallappenepilepsie

auslösen. Die Variante g.-1404G>A, welche für sich allein keine Epilepsie verursachen kann, würde den Effekt dieses Gens zusätzlich verstärken. Bevor die genetische Variante in aufwendigen, funktionellen Studien analysiert wird, sollten allerdings zunächst Kontrollpersonen gleicher Herkunft untersucht werden. Da das verwendete Kontrollkollektiv aus deutschen Probanden bestand, war es hinsichtlich der österreichischen Herkunft des Patienten nur eingeschränkt geeignet. Wenn auch eher unwahrscheinlich, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sich auch bei geografisch benachbarten Populationen abweichende Allelfrequenzen bezüglich dieser Variante ergeben könnten.

### 3.3.3 g.-1166G>C, Promotorregion

Die von Combi und Kollegen 2005 identifizierte Mutation g.-1166G>C konnte in unserem herkunftsbezogen gemischten, jedoch größeren Patientenkollektiv nicht detektiert werden. Aufgrund dessen wurden keine deutschen Kontrollpersonen auf diesen in der Promotorregion lokalisierten Nukleotidaustausch hin analysiert. Trotz des von Combi et al. postulierten Effekts bei der Transkriptionsregulierung und der in Transfektionsexperimenten nachgewiesenen Reduktion der Promotoraktivität durch die Mutation, ist eine krankheitsverursachende Relevanz hinsichtlich der ADNFLE aufgrund der Abwesenheit in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv eher unwahrscheinlich (Combi et al. 2005). Wenn überhaupt, könnte es sich nur um eine seltene bei ADNFLE-Patienten vorkommende Mutation handeln. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant, zusätzliche Patientenkollektive mit verschiedenen Formen von Epilepsien zu untersuchen. Dadurch könnte geklärt werden, ob g.-1166G>C die von Combi et al. postulierte funktionelle Bedeutung bei der Pathogenese von Epilepsien zukommt.

### 3.3.4 G96G (g.-288A>C), Exon 2

Insgesamt 17 von 69 untersuchten Patienten zeigten sich heterozygot für den in Datenbanken bereits beschriebenen, stillen Polymorphismus G96G (dbSNP NCBI, rs6159). Homozygote Träger der Variante konnten unter diesen nicht ausgemacht werden. Die Geschlechterverteilung M:W lag bei 10:7. Das Alter bewegte sich durchschnittlich bei 25 Jahren, wobei sich acht der Betroffenen in der Gruppe der 1-20 Jährigen ansiedelten, fünf waren zwischen 21 und 40 Jahren alt, zwei lagen im Bereich zwischen 41 bis 60 Jahren und ein Patient hatte das 60. Lebensjahr bereits überschritten. 47 % der 17 analysierten Patienten waren deutschen Ursprungs. Von einem Patienten waren sowohl Alter, als auch Herkunftsland nicht eruierbar. Desweiteren befanden sich in diesem Kollektiv zwei Briten, ein Österreicher, ein Portugiese, ein Schweizer, eine Patientin türkisch-zyprischer Abstammung, eine Neuseeländerin und ein Südamerikaner. Berücksichtigt man nun die oben dargestellten Angaben, die anamnestisch erfassten Aussagen zu Manifestationsalter und Krankheitsausprägung, lässt sich keine Verbindung zwischen der detektierten Variante und der ADNFLE herstellen. Zudem konnte anhand der Untersuchung eines deutschen Kontrollkollektivs, bestehend aus 55 Probanden, demonstriert werden, dass der Polymorphismus in gesunden Personen sowohl in heterozygoter (15/55), als auch in

homozygoter Form (1/55) vorkommen kann. Trotz des in Bezug auf die Herkunft unterschiedlichen Patienten- und Kontrollkollektivs, ist davon auszugehen, dass der SNP rs6159 keine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielt. Jedoch könnten populationspezifische Analysen andere Daten hervorbringen.

#### 4. Ausblick

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, stellt die molekulargenetische Diagnostik der ADNFLE mittels der angewandten Verfahren eine praktikable Option dar. Durch die Kombination der vorgestellten Mutations-Detektionmethoden lässt sich ein breites Mutationsspektrum erfassen, jedoch bedarf es einiger Veränderungen bei der Zusammenstellung eines geeigneten Patienten- und Kontrollkollektivs. Hierfür empfiehlt es sich, ein einheitliches Anamneseprofil zu erarbeiten und die zu untersuchenden Kollektive hinsichtlich ihrer Herkunft klar aufzugliedern. Die für die Zukunft entscheidenden Parameter hinsichtlich der klinischen und anamnestischen Abklärung müssen auf bereits bekannte für die Diagnose ADNFLE relevante Kriterien (Kap. I. 2.3) zugeschnitten werden. Hervorzuheben gilt hierbei eine möglichst exakte Aussage zu Familienanamnese, Manifestationsalter, Anfallsart und -frequenz, Symptomausprägung, bildgebenden Verfahren sowie EEG-Befunden. Auch Angaben zu Raucheranamnese und angewandten Therapiekonzepten könnten sich gewinnbringend hinsichtlich einer Klassifikation der Patienten auswirken.

Sowohl für häufig detektierte Varianten, als auch für solche, die nur im Patientenkollektiv nachweisbar waren, empfehlen sich fortführende funktionelle *in vitro*-Studien, um mögliche Auswirkungen dieser auf molekularer Ebene zu ermitteln. Die Einbeziehung weiterer Gene und Umweltfaktoren in die wissenschaftliche Erforschung dieser speziellen Form der Frontallappenepilepsien könnte weiteren Aufschluss über die Krankheitsentstehung, den Verlauf sowie den Schweregrad der ADNFLE gewähren.

Aus der vorliegenden Studie kann abgeleitet werden, dass den meisten in den Genen *RIC3*, *VSNLI* und *CRH* untersuchten Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit kein krankheitsverursachendes Potential zukommt. Einige Varianten haben sich allerdings als interessant herausgestellt und würden eine Typisierung in Replikationskollektiven sowie eine funktionelle Charakterisierung rechtfertigen. In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf kodierende Bereiche und Intron/Exon-Übergänge, mit Ausnahme des Gens *CRH*, gelegt. Mögliche pathogene Polymorphismen bzw. Mutationen in nichtkodierenden Abschnitten konnten somit weder bestätigt, noch widerlegt werden. Auch diese sollten in naher Zukunft näher beleuchtet werden, um mehr über die genaue Funktion von Promotorregionen, intronischen Sequenzen und untranslationierten Regionen bei diesen Kandidatengen zu erfahren.

## VI. Zusammenfassung

Die Autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie stellt eine seltene, heterogene Erkrankung des epileptischen Formenkreises dar. In vorausgegangenen molekulargenetischen Analysen der Gene *CHRNA4*, *CHRNA2* und *CHRNA2* bei betroffenen Individuen und deren Familienangehörigen konnten Mutationen mit autosomal-dominantem Vererbungsmuster, jedoch stark variierender Penetranz ermittelt werden. In dem von uns untersuchten ADFLE-Kollektiv konnten allerdings keine Mutationen in den bekannten Genen detektiert werden, so dass nahe lag, weitere, eventuell krankheitsverursachende Gene in die Aufschlüsselung der Erkrankung einzubeziehen. Da *CHRNA4*, *CHRNA2* und *CHRNA2* für verschiedene Untereinheiten des neuronalen nAChR kodieren, richtete sich die Suche auf Kandidatengene, welche als potentielle Modulatoren der Genfunktion von nAChR fungieren können. Für die Proteine RIC3 und VSNL1 war bereits in funktionellen Studien eine Verstärkung der Oberflächenexpression des Rezeptors demonstriert worden, so dass die kodierenden Abschnitte ihrer Gene hinsichtlich eventuell funktionsbeeinträchtigender, genetischer Varianten einer ausführlichen, molekulargenetischen Analyse unterzogen wurden. Desweiteren regte eine 2005 erschienene Publikation von Combi und Kollegen über eine Korrelation zwischen von ihnen identifizierten Promotorvarianten im Gen *CRH* und der ADFLE eine Überprüfung dieser in unserem Patientenkollektiv und ein erweitertes Screening auf Polymorphismen bzw. Mutationen im kodierenden Bereich von *CRH* an.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautete daher, inwieweit sich genetische Varianten an der Pathogenese und Ausprägung der ADFLE beteiligen. Um dies zu beurteilen, wurden aus den gewonnenen Daten sowohl Genotyp-, als auch Allelfrequenzen berechnet und mit denen eines ebenfalls untersuchten, deutschen Kontrollkollektivs verglichen. Zudem wurden die angewandten Analyseverfahren hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf diesem Gebiet kritisch überprüft.

Das ausgewählte Patientenkollektiv bestand aus 68-70 Individuen unterschiedlicher Familien und nationaler Herkunft. Zusätzlich wurden elf Familienangehörige vierer Patienten auf zwei Promotorvarianten im Gen *CRH* untersucht, um einen möglichen Vererbungsmechanismus zu erkennen.

Zu den angewandten Methoden zählten die DNA-Extraktion, die Touchdown-PCR, die SSCP-Analyse und die sich anschließende Silberfärbung, der Restriktionsverdau sowie die direkte Sequenzierung.

Da diese Arbeit erstmalig eine mögliche Assoziation genetischer Varianten in den genannten Kandidatengenen mit der ADFLE untersuchte, lagen bisher auch keine Referenzdaten hierzu vor. Das wiederum erschwerte die Beurteilung hinsichtlich ihrer Relevanz, stellte jedoch gleichzeitig eine interessante Herausforderung dar. So konnten in den drei analysierten Genen insgesamt 16 Varianten detektiert werden. Bei einem Großteil dieser ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den berechneten Frequenzen für Patienten- und Kontrollkollektiv, so dass hier ein krankheitsver-

ursachendes Potential eher unwahrscheinlich ist. Die Herkunft der betroffenen Individuen deckte sich allerdings nicht immer mit der des zu vergleichenden Kontrollkollektivs, was in abweichenden Allelfrequenzen bei populationspezifischen Analysen resultieren könnte. In diesen Fällen empfiehlt es sich, bezüglich der Herkunft, äquivalente Replikationsstudien anzuschließen.

Einige der untersuchten Varianten zeigten allerdings in der hier durchgeführten Pilotstudie interessante Frequenzunterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv. So wurde die Variante K25R (c.74A>G) in Exon 1 des Gens *RIC3* nur bei einer britischen Patientin heterozygot detektiert, jedoch nicht im deutschen Kontrollkollektiv. Interessanterweise leidet die Patientin an einer von mütterlicher Seite vererbten Temporallappenepilepsie und war somit die einzige Patientin mit dieser Epilepsieform im analysierten Kollektiv. Deshalb sollte untersucht werden, wie häufig der Aminosäureaustausch K25R bei Patienten mit lateraler oder mesialer Temporallappenepilepsie auftritt. Die Ergebnisse einer solchen Studie sollten mit der Frequenz der Variante in einem geeigneten Kontrollkollektiv verglichen werden. Auch eine Mutationsanalyse bei Verwandten, vor allem bei der Mutter, könnte Aufschluss über den Vererbungsmechanismus geben und weitere funktionelle Studien anregen.

Eine weitere interessante Variante zeigte sich in Exon 6 des Gens *RIC3*, wobei sich diese nach dem Stoppkodon und damit in der nichttranslatierten Region befand. Der Nukleotidaustausch c.1007+149C>G konnte nur bei einem belgischen Patienten detektiert werden, wobei bei diesem neben der Epilepsie eine mentale Retardierung auffällig ist. Letzteres Symptom findet sich bei ADNFLE-Patienten recht selten, so dass unbekannt ist, ob es sich um eine zufällige Koinzidenz oder um einen Teil des Symptompektrums der ADNFLE handelt. Von daher wäre eine Untersuchung dieser Variante in Kollektiven ohne Epilepsie, mit alleiniger geistiger Behinderung hilfreich. Tritt c.1007+149C>G dort häufiger auf, könnte dies auf einen potentiellen Risikofaktor für kognitive Störungen hindeuten.

Zwei weitere Varianten im *RIC3*-Gen, C130Y und D351N, stellen ebenfalls Kandidaten für zukünftige Studien dar. Beide fanden sich signifikant häufiger im Patienten- als im Kontrollkollektiv. Eine solche Häufung ließe sich mit der Rolle eines genetischen Risikofaktors vereinbaren, welcher allein nicht zur Krankheitsentstehung führt, jedoch die Ausprägung verschiedener klinischer Merkmale, z. B. der Anfallsfrequenz oder des Therapieansprechens, modifiziert. Deshalb sollten sich auch für diese Varianten Replikationsstudien in zueinander passenden Kollektiven anschließen.

Eine von Combi und Kollegen postulierte Beteiligung der Polymorphismen g.-1470C>A und g.-1166G>C in der Promotorregion des Gens *CRH* an der Entstehung der ADNFLE konnte anhand der von uns ermittelten Allelfrequenzen unter Patienten und Kontrollen nicht bestätigt werden (Combi et al. 2005). Die zufällige, bei der Restriktionsanalyse dieser Region detektierte Variante g.-1404G>A trat nur bei einem österreichischen Patienten in heterozygoter Form auf. Unter den deutschen Kontrollen konnte sie nicht nachgewiesen werden, so dass sich eine Untersuchung weiterer Familienangehöriger anschloss. Das dabei detektierte Vererbungsmuster könnte auf einen die Epilepsie verstär-



kenden Mechanismus, ausgelöst durch g.-1404G>A, hinweisen. Zunächst empfiehlt es sich deshalb, ein passendes Kontrollkollektiv zu analysieren, um detailliertere Aussagen zu treffen.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die exakte genetische Aufschlüsselung der ADNPLE ein kompliziertes Unterfangen darstellt. Es konnten jedoch mehrere genetische Varianten detektiert werden, welche es sich lohnt genauer zu untersuchen. Für andere konnte keine Beteiligung an der Krankheitsentstehung gezeigt werden, so dass weitere Gene, welche im Zusammenhang mit der Ausbildung eines funktionellen nAChRs stehen, ermittelt und molekular-genetischen Analysen unterzogen werden müssen. Die Zusammenstellung eines hinsichtlich seiner Anamnese und Herkunft homogenen Patientenkollektivs markiert einen der wichtigsten Schritte auf dem Weg zu einer erfolgreichen Datenerhebung.

## VII. Literaturverzeichnis

### 1. Zitierte Literatur

- Albuquerque, E. X., E. F. Pereira, et al. (2009). "Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function." *Physiol Rev* **89**(1): 73-120.
- Aldenhoff, J. B., D. L. Gruol, et al. (1983). "Corticotropin releasing factor decreases postburst hyperpolarizations and excites hippocampal neurons." *Science* **221**(4613): 875-877.
- Anand, R. and J. Lindstrom (1990). "Nucleotide sequence of the human nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit gene." *Nucleic Acids Res* **18**(14): 4272.
- Anand, R. and J. Lindstrom (1992). "Chromosomal localization of seven neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in humans." *Genomics* **13**(4): 962-967.
- Aridon, P., C. Marini, et al. (2006). "Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear." *Am J Hum Genet* **79**(2): 342-350.
- Aridon, P., C. Marini, et al. (2006). "Increased Sensitivity of the Neuronal Nicotinic Receptor  $\alpha$ 2 Subunit Causes Familial Epilepsy with Nocturnal Wandering and Ictal Fear." *The American Journal of Human Genetics* **79**(2): 342-350.
- Baram, T. Z. and L. Schultz (1991). "Corticotropin-releasing hormone is a rapid and potent convulsant in the infant rat." *Brain Res Dev Brain Res* **61**(1): 97-101.
- Baram, T. Z. and L. Schultz (1995). "ACTH does not control neonatal seizures induced by administration of exogenous corticotropin-releasing hormone." *Epilepsia* **36**(2): 174-178.
- Barnard, E. A., V. Coates, et al. (1977). "Binding of alpha-bungarotoxin and cholinergic ligands to acetylcholine receptors in the membrane of skeletal muscle." *Cell Biol Int Rep* **1**(1): 99-106.
- Baumgartner, C. (2001). *Handbuch der Epilepsien: Klinik, Diagnostik, Therapie und psychosoziale Aspekte*. Wien, Springer-Verlag.
- Ben-Ami, H. C., L. Yassin, et al. (2005). "RIC-3 affects properties and quantity of nicotinic acetylcholine receptors via a mechanism that does not require the coiled-coil domains." *J Biol Chem* **280**(30): 28053-28060.
- Bentley, D. R. (2006). "Whole-genome re-sequencing." *Curr Opin Genet Dev* **16**(6): 545-552.
- Berkovic, S. F. and I. E. Scheffer (1997). "Genetics of human partial epilepsy." *Curr Opin Neurol* **10**(2): 110-114.
- Bertrand, D. (1999). "Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: their properties and alterations in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." *Rev Neurol (Paris)* **155**(6-7): 457-462.
- Bertrand, D., F. Elmslie, et al. (2005). "The CHRNB2 mutation I312M is associated with epilepsy and distinct memory deficits." *Neurobiol Dis* **20**(3): 799-804.
- Bertrand, S., S. Weiland, et al. (1998). "Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptor mutants from humans suffering from autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." *Br J Pharmacol* **125**(4): 751-760.
- Braslavsky, I., B. Hebert, et al. (2003). "Sequence information can be obtained from single DNA molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3960-3964.
- Braunewell, K., P. Riederer, et al. (2001). "Abnormal localization of two neuronal calcium sensor proteins, visinin-like proteins (vilips)-1 and -3, in neocortical brain areas of Alzheimer disease patients." *Dement Geriatr Cogn Disord* **12**(2): 110-116.
- Braunewell, K. H., M. Brackmann, et al. (2001). "Intracellular neuronal calcium sensor (NCS) protein VILIP-1 modulates cGMP signalling pathways in transfected neural cells and cerebellar granule neurones." *J Neurochem* **78**(6): 1277-1286.
- Braunewell, K. H. and E. D. Gundelfinger (1999). "Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function." *Cell Tissue Res* **295**(1): 1-12.
- Braunewell, K. H., C. Spilker, et al. (1997). "The neuronal calcium-sensor protein VILIP modulates cyclic AMP accumulation in stably transfected C6 glioma cells: amino-terminal myristoylation determines functional activity." *J Neurochem* **68**(5): 2129-2139.

- Brodtkorb, E. and F. Picard (2006). "Tobacco habits modulate autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." *Epilepsy & Behavior* **9**(3): 515-520.
- Burgoyne, R. D. (2007). "Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup>-signalling." *Nat Rev Neurosci* **8**(3): 182-193.
- Callenbach, P. M., A. M. van den Maagdenberg, et al. (2003). "Familial partial epilepsy with variable foci in a Dutch family: clinical characteristics and confirmation of linkage to chromosome 22q." *Epilepsia* **44**(10): 1298-1305.
- Cash, S. S., E. Halgren, et al. (2009). "The human K-complex represents an isolated cortical down-state." *Science* **324**(5930): 1084-1087.
- Castelan, F., M. Castillo, et al. (2008). "Molecular characterization and localization of the RIC-3 protein, an effector of nicotinic acetylcholine receptor expression." *J Neurochem* **105**(3): 617-627.
- Castillo, M., J. Mulet, et al. (2005). "Dual role of the RIC-3 protein in trafficking of serotonin and nicotinic acetylcholine receptors." *J Biol Chem* **280**(29): 27062-27068.
- Champtiaux, N., C. Gotti, et al. (2003). "Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice." *J Neurosci* **23**(21): 7820-7829.
- Chen, Y., L. Wu, et al. (2009). "A novel mutation of the nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA4 in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy." *Epilepsy Research* **83**(2-3): 152-156.
- Cheng, A., K. A. Bolland, et al. (2007). "Differential subcellular localization of RIC-3 isoforms and their role in determining 5-HT<sub>3</sub> receptor composition." *J Biol Chem* **282**(36): 26158-26166.
- Cheng, A., N. A. McDonald, et al. (2005). "Cell surface expression of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors is promoted by RIC-3." *J Biol Chem* **280**(23): 22502-22507.
- Cho, Y., S. Yi, et al. (2008). "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and mild memory impairment associated with CHRNA2 mutation I312M in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor." *Epilepsy & Behavior* **13**(2): 361-365.
- Cho, Y. W., G. K. Motamedi, et al. (2003). "A Korean kindred with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and mental retardation." *Arch Neurol* **60**(11): 1625-1632.
- Combi, R., L. Dalprà, et al. (2005). "Frontal lobe epilepsy and mutations of the corticotropin-releasing hormone gene." *Annals of Neurology* **58**(6): 899-904.
- Combi, R., L. Dalprà, et al. (2004). "Evidence for a fourth locus for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." *Brain Res Bull* **63**(5): 353-359.
- Combi, R., L. Dalprà, et al. (2004). "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy--a critical overview." *J Neurol* **251**(8): 923-934.
- Combi, R., L. Ferini-Strambi, et al. (2005). "Two new putative susceptibility loci for ADNFLE." *Brain Res Bull* **67**(4): 257-263.
- Combi, R., L. Ferini-Strambi, et al. (2008). "Compound heterozygosity with dominance in the Corticotropin Releasing Hormone (CRH) promoter in a case of nocturnal frontal lobe epilepsy." *Journal of Sleep Research* **17**(3): 361-362.
- Combi, R., L. Ferini-Strambi, et al. (2009). "CHRNA2 mutations are rare in the NFLE population: evaluation of a large cohort of Italian patients." *Sleep Med* **10**(1): 139-142.
- Cooper, E., S. Couturier, et al. (1991). "Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor." *Nature* **350**(6315): 235-238.
- Corringer, P. J., N. Le Novère, et al. (2000). "Nicotinic receptors at the amino acid level." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 431-458.
- Cummings, S., R. Elde, et al. (1983). "Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study." *J Neurosci* **3**(7): 1355-1368.
- Dani, J. A. and D. Bertrand (2007). "Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **47**(1): 699-729.
- De Fusco, M., A. Becchetti, et al. (2000). "The nicotinic receptor beta 2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy." *Nat Genet* **26**(3): 275-276.
- Di Resta, C., P. Ambrosi, et al. (2010). "Effect of carbamazepine and oxcarbazepine on wild-type and mutant neuronal nicotinic acetylcholine receptors linked to nocturnal frontal lobe epilepsy." *European Journal of Pharmacology* **643**(1): 13-20.

- Diaz-Otero, F., M. Quesada, et al. (2008). "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy with a mutation in the CHRNA2 gene." *Epilepsia* **49**(3): 516-520.
- Dressman, D., H. Yan, et al. (2003). "Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 8817-8822.
- El Helou, J., V. Navarro, et al. (2008). "K-complex-induced seizures in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." *Clinical Neurophysiology* **119**(10): 2201-2204.
- Elliott, K. J., S. B. Ellis, et al. (1996). "Comparative structure of human neuronal alpha 2-alpha 7 and beta 2-beta 4 nicotinic acetylcholine receptor subunits and functional expression of the alpha 2, alpha 3, alpha 4, alpha 7, beta 2, and beta 4 subunits." *J Mol Neurosci* **7**(3): 217-228.
- Fedurco, M., A. Romieu, et al. (2006). "BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies." *Nucleic Acids Res* **34**(3): e22.
- Figl, A., N. Viseshakul, et al. (1998). "Two mutations linked to nocturnal frontal lobe epilepsy cause use-dependent potentiation of the nicotinic ACh response." *J Physiol* **513** ( Pt 3): 655-670.
- Freeman, J. (1995). *A clinician's look at the developmental neurobiology of epilepsy*. New York, Oxford University Press.
- Fucile, S. (2004). "Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors." *Cell Calcium* **35**(1): 1-8.
- Gambardella, A., G. Annesi, et al. (2000). "A new locus for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy maps to chromosome 1." *Neurology* **55**(10): 1467-1471.
- Gierke, P., C. Zhao, et al. (2008). "Implication of neuronal Ca<sup>2+</sup> -sensor protein VILIP-1 in the glutamate hypothesis of schizophrenia." *Neurobiol Dis* **32**(1): 162-175.
- Gotti, C., F. Clementi, et al. (2009). "Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors." *Biochem Pharmacol* **78**(7): 703-711.
- Gotti, C., M. Zoli, et al. (2006). "Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance." *Trends Pharmacol Sci* **27**(9): 482-491.
- Groth, J. (2004). *Meine Moleküle. Deine Moleküle Von der molekularen Individualität*. Berlin, RHOMBOS-VERLAG.
- Gu, W., D. Bertrand, et al. (2007). "A major role of the nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA2 in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) is unlikely." *Neurosci Lett* **422**(1): 74-76.
- Halevi, S. (2003). "Conservation within the RIC-3 Gene Family: EFFECTORS OF MAMMALIAN NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR EXPRESSION." *Journal of Biological Chemistry* **278**(36): 34411-34417.
- Halevi, S., J. McKay, et al. (2002). "The *C. elegans ric-3* gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors." *EMBO J* **21**(5): 1012-1020.
- Hankeln, Z., Schmidt (2008). *Technologierevolution in der Genomforschung*. Mainz.
- Happe, S. u. W., BW (2009). *Schlafmedizin in der Praxis*, Hüthig Jehle Rehm GmbH.
- Harris, T. D., P. R. Buzby, et al. (2008). "Single-molecule DNA sequencing of a viral genome." *Science* **320**(5872): 106-109.
- Hayashi, K. (1991). "PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA." *PCR Methods Appl* **1**(1): 34-38.
- Hayman, M., I. E. Scheffer, et al. (1997). "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: demonstration of focal frontal onset and intrafamilial variation." *Neurology* **49**(4): 969-975.
- Heizmann, C. W. (1993). "Calcium signaling in the brain." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **53**(1): 15-23.
- Helmstaedter, C. (2001). "Behavioral Aspects of Frontal Lobe Epilepsy." *Epilepsy Behav* **2**(5): 384-395.
- Hirose, S., H. Iwata, et al. (1999). "A novel mutation of CHRNA4 responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." *Neurology* **53**(8): 1749-1753.
- Hoda, J. C., W. Gu, et al. (2008). "Human Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy: Pharmacogenomic Profiles of Pathogenic Nicotinic Acetylcholine Receptor  $\alpha$ -Subunit Mutations outside the Ion Channel Pore." *Molecular Pharmacology* **74**(2): 379-391.
- Hollrigel, G. S., K. Chen, et al. (1998). "The pro-convulsant actions of corticotropin-releasing hormone in the hippocampus of infant rats." *Neuroscience* **84**(1): 71-79.
- Ibelgauf, H. (1993). *Gentechnologie von A-Z*, Wiley-VCH.

- Ikura, M. and J. B. Ames (2006). "Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1159-1164.
- Ito, M., K. Kobayashi, et al. (2000). "Electroclinical picture of autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy in a Japanese family." Epilepsia **41**(1): 52-58.
- Katz, B. and S. Thesleff (1957). "A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate." J Physiol **138**(1): 63-80.
- Kuryatov, A., V. Gerzanich, et al. (1997). "Mutation causing autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy alters Ca<sup>2+</sup> permeability, conductance, and gating of human alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors." J Neurosci **17**(23): 9035-9047.
- Kuryatov, A., J. Onksen, et al. (2008). "Roles of accessory subunits in alpha4beta2(\*) nicotinic receptors." Mol Pharmacol **74**(1): 132-143.
- LaFramboise, T. (2009). "Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances." Nucleic Acids Res **37**(13): 4181-4193.
- Lansdell, S. J., T. Collins, et al. (2008). "Host-cell specific effects of the nicotinic acetylcholine receptor chaperone RIC-3 revealed by a comparison of human and Drosophila RIC-3 homologues." J Neurochem **105**(5): 1573-1581.
- Lansdell, S. J., V. J. Gee, et al. (2005). "RIC-3 enhances functional expression of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in mammalian cells." Mol Pharmacol **68**(5): 1431-1438.
- Le Novere, N., P. J. Corringer, et al. (1999). "Improved secondary structure predictions for a nicotinic receptor subunit: incorporation of solvent accessibility and experimental data into a two-dimensional representation." Biophys J **76**(5): 2329-2345.
- Le Novere, N., P. J. Corringer, et al. (2002). "The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences." J Neurobiol **53**(4): 447-456.
- Leniger, T., C. Kananura, et al. (2003). "A new Chrna4 mutation with low penetrance in nocturnal frontal lobe epilepsy." Epilepsia **44**(7): 981-985.
- Lesser, R. P., H. Lueders, et al. (1984). "The location of speech and writing functions in the frontal language area. Results of extraoperative cortical stimulation." Brain **107** ( Pt 1): 275-291.
- Lin, L., K. H. Braunewell, et al. (2002). "Functional analysis of calcium-binding EF-hand motifs of visinin-like protein-1." Biochem Biophys Res Commun **296**(4): 827-832.
- Lin, L., E. M. Jeanclos, et al. (2002). "The calcium sensor protein visinin-like protein-1 modulates the surface expression and agonist sensitivity of the alpha 4beta 2 nicotinic acetylcholine receptor." J Biol Chem **277**(44): 41872-41878.
- Luppino, G. and G. Rizzolatti (2000). "The Organization of the Frontal Motor Cortex." News Physiol Sci **15**: 219-224.
- MacLean, D., J. D. Jones, et al. (2009). "Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics." Nat Rev Microbiol **7**(4): 287-296.
- Magnusson, A., E. Stordal, et al. (2003). "Schizophrenia, psychotic illness and other psychiatric symptoms in families with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy caused by different mutations." Psychiatr Genet **13**(2): 91-95.
- Mann, E. O. and I. Mody (2008). "The multifaceted role of inhibition in epilepsy: seizure-genesis through excessive GABAergic inhibition in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Curr Opin Neurol **21**(2): 155-160.
- Mardis, E. R. (2008). "The impact of next-generation sequencing technology on genetics." Trends Genet **24**(3): 133-141.
- Margulies, M., M. Egholm, et al. (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." Nature **437**(7057): 376-380.
- Marini, C. and R. Guerrini (2007). "The role of the nicotinic acetylcholine receptors in sleep-related epilepsy." Biochem Pharmacol **74**(8): 1308-1314.
- McKernan, K., Blanchard, A., Kotler, L. & Costa, G. (2006). "Reagents, methods, and libraries for bead based sequencing." US patent application 20080003571.
- McLellan, A., H. A. Phillips, et al. (2003). "Phenotypic comparison of two Scottish families with mutations in different genes causing autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Epilepsia **44**(4): 613-617.

- Michelucci, R., J. J. Poza, et al. (2003). "Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical spectrum, new epitempin mutations, and genetic heterogeneity in seven European families." Epilepsia **44**(10): 1289-1297.
- Millar, N. S. (2008). "RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone." British Journal of Pharmacology **153**(S1): S177-S183.
- Miller, K. G., A. Alfonso, et al. (1996). "A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12593-12598.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Res **16**(3): 1215.
- Nakken, K. O., A. Magnusson, et al. (1999). "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: an electroclinical study of a Norwegian family with ten affected members." Epilepsia **40**(1): 88-92.
- Nguyen, M., A. Alfonso, et al. (1995). "*Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase." Genetics **140**(2): 527-535.
- Nobili, L., S. Francione, et al. (2007). "Surgical treatment of drug-resistant nocturnal frontal lobe epilepsy." Brain **130**(Pt 2): 561-573.
- Oldani, A., M. Zucconi, et al. (1998). "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A video-polysomnographic and genetic appraisal of 40 patients and delineation of the epileptic syndrome." Brain **121** ( Pt 2): 205-223.
- Oldani, A., M. Zucconi, et al. (1996). "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: electroclinical picture." Epilepsia **37**(10): 964-976.
- Orita, M., Y. Suzuki, et al. (1989). "Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction." Genomics **5**(4): 874-879.
- Ortells, M. O. and G. E. Barrantes (2002). "Molecular modelling of the interactions of carbamazepine and a nicotinic receptor involved in the autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Br J Pharmacol **136**(6): 883-895.
- Paradiso, K. G. and J. H. Steinbach (2003). "Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors." J Physiol **553**(Pt 3): 857-871.
- Parrino, L., P. Halasz, et al. (2006). "CAP, epilepsy and motor events during sleep: the unifying role of arousal." Sleep Med Rev **10**(4): 267-285.
- Phillips, H. A., I. Favre, et al. (2001). "CHRNA2 is the second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Am J Hum Genet **68**(1): 225-231.
- Phillips, H. A., C. Marini, et al. (2000). "A de novo mutation in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy." Ann Neurol **48**(2): 264-267.
- Phillips, H. A., I. E. Scheffer, et al. (1995). "Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q 13.2." Nat Genet **10**(1): 117-118.
- Phillips, H. A., I. E. Scheffer, et al. (1998). "Autosomal dominant nocturnal frontal-lobe epilepsy: genetic heterogeneity and evidence for a second locus at 15q24." Am J Hum Genet **63**(4): 1108-1116.
- Picard, F. (2006). "Alteration of the in vivo nicotinic receptor density in ADNFLE patients: a PET study." Brain **129**(8): 2047-2060.
- Picard, F., S. Baulac, et al. (2000). "Dominant partial epilepsies. A clinical, electrophysiological and genetic study of 19 European families." Brain **123** ( Pt 6): 1247-1262.
- Picard, F., S. Bertrand, et al. (1999). "Mutated nicotinic receptors responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy are more sensitive to carbamazepine." Epilepsia **40**(9): 1198-1209.
- Picard, F., P. Megevand, et al. (2007). "Intracerebral recordings of nocturnal hyperkinetic seizures: demonstration of a longer duration of the pre-seizure sleep spindle." Clin Neurophysiol **118**(4): 928-939.
- Picard, F., A. J. Pegna, et al. (2009). "Neuropsychological disturbances in frontal lobe epilepsy due to mutated nicotinic receptors." Epilepsy & Behavior **14**(2): 354-359.
- Plazas, P. V., E. Katz, et al. (2005). "Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor." J Neurosci **25**(47): 10905-10912.

- Provini, F., G. Plazzi, et al. (1999). "Nocturnal frontal lobe epilepsy. A clinical and polygraphic overview of 100 consecutive cases." Brain **122** ( Pt 6): 1017-1031.
- Quik, M., J. Philie, et al. (1997). "Modulation of alpha7 nicotinic receptor-mediated calcium influx by nicotinic agonists." Mol Pharmacol **51**(3): 499-506.
- Radulovic, J., A. Ruhmann, et al. (1999). "Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2." J Neurosci **19**(12): 5016-5025.
- Ragozzino, D., B. Barabino, et al. (1998). "Ca<sup>2+</sup> permeability of mouse and chick nicotinic acetylcholine receptors expressed in transiently transfected human cells." J Physiol **507** ( Pt 3): 749-757.
- Rempel, N., S. Heyers, et al. (1998). "The structures of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta2- and alpha3-subunit genes (CHRN2 and CHRNA3)." Hum Genet **103**(6): 645-653.
- Ronaghi, M., S. Karamohamed, et al. (1996). "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release." Anal Biochem **242**(1): 84-89.
- Roncarati, R., T. Seredenina, et al. (2008). "Functional properties of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors co-expressed with RIC-3 in a stable recombinant CHO-K1 cell line." Assay Drug Dev Technol **6**(2): 181-193.
- Rozycka, A., E. Skorupska, et al. (2003). "Evidence for S284L mutation of the CHRNA4 in a white family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Epilepsia **44**(8): 1113-1117.
- Ryvlin, P., L. Minotti, et al. (2006). "Nocturnal hypermotor seizures, suggesting frontal lobe epilepsy, can originate in the insula." Epilepsia **47**(4): 755-765.
- Ryvlin, P., S. Rheims, et al. (2006). "Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy." Epilepsia **47**(s2): 83-86.
- Saenz, A., J. Galan, et al. (1999). "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy in a Spanish family with a Ser252Phe mutation in the CHRNA4 gene." Arch Neurol **56**(8): 1004-1009.
- Scheffer, I. E., K. P. Bhatia, et al. (1995). "Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A distinctive clinical disorder." Brain **118** ( Pt 1): 61-73.
- Scheffer, I. E., K. P. Bhatia, et al. (1994). "Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder." Lancet **343**(8896): 515-517.
- Schnurra, I., H. G. Bernstein, et al. (2001). "The neuronal calcium sensor protein VILIP-1 is associated with amyloid plaques and extracellular tangles in Alzheimer's disease and promotes cell death and tau phosphorylation in vitro: a link between calcium sensors and Alzheimer's disease?" Neurobiol Dis **8**(5): 900-909.
- Schouten, J. P., C. J. McElgunn, et al. (2002). "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification." Nucleic Acids Res **30**(12): e57.
- Schuster, S. C. (2008). "Next-generation sequencing transforms today's biology." Nat Methods **5**(1): 16-18.
- Sheffield, V. C., J. S. Beck, et al. (1993). "The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions." Genomics **16**(2): 325-332.
- Shendure, J. and H. Ji (2008). "Next-generation DNA sequencing." Nat Biotechnol **26**(10): 1135-1145.
- Shendure, J., G. J. Porreca, et al. (2005). "Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome." Science **309**(5741): 1728-1732.
- Steinlein, O. and D. Bertrand (2008). "Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: From the genetic analysis to neurological diseases." Biochemical Pharmacology **76**(10): 1175-1183.
- Steinlein, O., S. Weiland, et al. (1996). "Exon-intron structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit (CHRNA4)." Genomics **32**(2): 289-294.
- Steinlein, O. K. (2000). "Neuronal nicotinic receptors in human epilepsy." Eur J Pharmacol **393**(1-3): 243-247.
- Steinlein, O. K. (2004). "Genes and mutations in human idiopathic epilepsy." Brain Dev **26**(4): 213-218.
- Steinlein, O. K. (2004). "Genetic mechanisms that underlie epilepsy." Nature Reviews Neuroscience **5**(5): 400-408.
- Steinlein, O. K. and D. Bertrand (2009). "Nicotinic receptor channelopathies and epilepsy." Pflügers Archiv - European Journal of Physiology **460**(2): 495-503.

- Steinlein, O. K., A. Magnusson, et al. (1997). "An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Hum Mol Genet **6**(6): 943-947.
- Steinlein, O. K., J. C. Mulley, et al. (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**(2): 201-203.
- Steinlein, O. K., J. Stoodt, et al. (2000). "Independent occurrence of the CHRNA4 Ser248Phe mutation in a Norwegian family with nocturnal frontal lobe epilepsy." Epilepsia **41**(5): 529-535.
- Sunnucks, P., A. C. Wilson, et al. (2000). "SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology." Mol Ecol **9**(11): 1699-1710.
- Sutor, B. and G. Zolles (2001). "Neuronal nicotinic acetylcholine receptors and autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: a critical review." Pflügers Archiv European Journal of Physiology **442**(5): 642-651.
- Tassi, L., N. Colombo, et al. (2002). "Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome." Brain **125**(Pt 8): 1719-1732.
- Tassinari CA, M. (1997). Familial frontal and temporal lobe epilepsy. . Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Tenchini, M. L., S. Duga, et al. (1999). "SER252PHE and 776INS3 mutations in the CHRNA4 gene are rare in the Italian ADNFLE population." Sleep **22**(5): 637-639.
- Thomas, P., F. Picard, et al. (1998). "[Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy]." Rev Neurol (Paris) **154**(3): 228-235.
- Turcatti, G., A. Romieu, et al. (2008). "A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis." Nucleic Acids Res **36**(4): e25.
- Unwin, N. (1993). "Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution." J Mol Biol **229**(4): 1101-1124.
- Unwin, N. (2005). "Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution." J Mol Biol **346**(4): 967-989.
- Varadkar, S., J. S. Duncan, et al. (2003). "Acetazolamide and autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Epilepsia **44**(7): 986-987.
- Wallace, R. H., S. F. Berkovic, et al. (1996). "Suggestion of a major gene for familial febrile convulsions mapping to 8q13-21." J Med Genet **33**(4): 308-312.
- Williams, M. E., B. Burton, et al. (2005). "Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells." J Biol Chem **280**(2): 1257-1263.
- Willoughby, J. O., K. J. Pope, et al. (2003). "Nicotine as an antiepileptic agent in ADNFLE: an N-of-one study." Epilepsia **44**(9): 1238-1240.
- Zhao, C., R. Anand, et al. (2009). "Nicotine-induced Ca<sup>2+</sup>-myristoyl switch of neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor VILIP-1 in hippocampal neurons: a possible crosstalk mechanism for nicotinic receptors." Cell Mol Neurobiol **29**(2): 273-286.
- Zhao, C. and K. H. Braunewell (2008). "Expression of the neuronal calcium sensor visinin-like protein-1 in the rat hippocampus." Neuroscience **153**(4): 1202-1212.
- Zheng, C., K. Yang, et al. (2010). "The Anticonvulsive Drug Lamotrigine Blocks Neuronal {alpha}4{beta}2-nicotinic Acetylcholine Receptors." J Pharmacol Exp Ther.
- Zucconi, M., A. Oldani, et al. (2000). "The macrostructure and microstructure of sleep in patients with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." J Clin Neurophysiol **17**(1): 77-86.



## 2. Internetquellen

Abb. 2: <http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/alkaloide/alkaloide.htm>

Abb. 7: <http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Proteins8.html>

DNA BASER:

<http://www.dnabaser.com/articles/SNP/SNP-single-nucleotide-polymorphism.html>

Ensembl: <http://www.ensembl.org/>

Gene Reviews ADNFLE:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=adnfle>

Genome-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>

HapMap Project: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>

Medizinische Genetik: [www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001](http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001)

MLPA-Ablauf:

[http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit5/trials/MLPA\\_validation\\_summary.pdf](http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit5/trials/MLPA_validation_summary.pdf)

OMIM-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Pflanzenforschung: <http://www.pflanzenforschung.de>

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

SNP-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

DNA BASER:

<http://www.dnabaser.com/articles/SNP/SNP-single-nucleotide-polymorphism.html>

## 3. Internettools

Primerdesign:

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

Primerherstellung und direkte Sequenzierung:

<http://www.eurofindna.com/de/home.html>

Restriktionsenzym- und Schnittstellensuche:

<http://www.restrictionmapper.org/>

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

## 4. Veröffentlichungen (Kongressbeitrag)

Hendrich S, Schmidt C, Steinlein O.K, 2009: No evidence for a role of variants in the Corticotropin-Releasing Hormone Gene in the aetiology of Frontal Lobe Epilepsy. Medgen 21:P204

**Vorgestellt auf der 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik**  
(01.04.-03.04.2009, EUROGRESS AACHEN)

## **Danksagung**

Mein bester Dank gilt Frau Prof. Ortrud Steinlein, welche mir an ihrem Institut die Verwirklichung dieser Arbeit ermöglichte. Ich danke ihr für die Überlassung einer sehr interessanten Thematik und für ihre Hilfestellung bei der Überarbeitung der Dissertation.

Desweiteren gebührt Frau Dr. Christa Schmidt Dank für die hervorragende fachliche und zwischenmenschliche Zusammenarbeit, die Einführung in die Welt der Molekulargenetik, ihre Unterstützung bei verschiedenen Fragestellungen und ihre Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Franz Jansen danke ich für seine professionelle Hilfe bei der Einarbeitung in verschiedene wissenschaftliche Methoden und seine Geduld bei der Beantwortung multipler, technischer Fragen.

Frau Juliane Krinner möchte ich für die Übernahme verschiedener Laboraufgaben danken.

Ich verdanke Herrn Dr. Mario Wanischek die fortführende Betreuung meiner Arbeit bezüglich weiterer wissenschaftlicher Aspekte und Beratung nach dem Wechsel von Frau Dr. Christa Schmidt nach Nürnberg.

Ein lieber Dank geht an die Mitarbeiterinnen in der Zytologieabteilung des Instituts für ein allzeit offenes Ohr und die Versorgung mit Speis und Trank.

Meiner lieben Christiane danke ich für ihre Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit, die liebevolle Umsorgung, für ihre unerschütterliche Liebe und das aufgebrachte Verständnis während der gesamten Zeit.

Zu guter Letzt, danke ich meinen Eltern und Großeltern, die mich während des gesamten Studiums sowohl emotional, als auch finanziell unterstützten. Ihr Optimismus in jeder noch so schwierigen Situation und das unerschütterliche Vertrauen in mich und meine Entscheidungen stellten eine wichtige Kraft- und Energiequelle in den vergangenen sechs Studienjahren dar.

