

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekulargenetische Identifizierung von Determinanten
der Photoparoxysmalen Reaktion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Susanne Lorenz

aus Finsterwalde

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ortrud Steinlein
2. Prof. Dr. med. Wilhelm Rimpau

Datum der Promotion: 28.04.06

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Susanne Lorenz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Molekulargenetische Identifizierung von Determinanten der Photoparoxysmalen Reaktion, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Unterschrift

Datum

Publikationsliste:

1. Tauer U, **Lorenz S**, Lenzen KP, Heils A, Muhle H, Gresch M, Neubauer BA, Waltz S, Rudolf G, Mattheisen M, Strauch K, Nürnberg P, Schmitz B, Stephani U, Sander T
Molecular genetic dissection of photosensitivity and exploration of its relationship to idiopathic generalized epilepsy.
Annals of Neurology, 57: 866-873, 2005 IPF: 7.717
 2. Taylor KP, Heils A, **Lorenz S**, Gehrman A, Prud'Homme J, Nabbout R, Dulac O, Rudolf G, Zara F, Bianchi A, Robinson R, Gardiner RM, Covanis A, Lindhout D, Stephani U, Elger CE, Nürnberg P, Sander T
Exploration of the genetic architecture of idiopathic generalized epilepsies.
Epilepsia, submitted, 2006
 3. **Lorenz S**, Heils A, Taylor KP, Gehrman A, Muhle H, Gresch M, Becker T, Tauer U, Stephani U, Sander T
Candidate gene analysis of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (ALDH5A1) in patients with idiopathic generalized epilepsy and photosensitivity.
Neuroscience Letters, in press, 2006a IPF: 1.967
 4. **Lorenz S**, Taylor KP, Gehrman A, Becker T, Muhle H, Gresch M, Tauer U, Sander T, Stephani U
Association of photoparoxysmal response with BRD2 polymorphisms.
Neuroscience Letters, in press, 2006b IPF: 1.967
 5. Lenzen KP, Heils A, **Lorenz S**, Hempelmann A, Sander T
Association of the Arg220His variation of the human gene encoding the GABA δ subunit with idiopathic generalized epilepsy.
Epilepsy Research. 65:53-57, 2005a IPF: 2.430
 6. Lenzen KP, Heils A, **Lorenz S**, Hempelmann A, Hofels S, Lohoff FW, Schmitz B, Sander T
Supportive evidence for an allelic association of the human KCNJ10 potassium channel gene with idiopathic generalized epilepsy.
Epilepsy Research, 63:113-118, 2005b IPF: 2.430
 7. Lenzen KP, Heils A, **Lorenz S**, Hempelmann A, Sander T
Association analysis of the malic enzyme 2 gene polymorphisms with idiopathic generalized epilepsy.
Epilepsia. 46:1637-1641, 2005c IPF: 3.549
- Kumulativer IPF: 20.060

Zusammenfassung

Die Photoparoxysmale Reaktion (PPR) oder Photosensitivität ist elektrophysiologisch durch eine synchronisierte Erregungssteigerung des visuellen Kortex infolge intermittierender Lichtreize gekennzeichnet. Die standardisierte, intermittierende Photostimulation eröffnet einen experimentellen Ansatz, die individuelle Anfälligkeit für eine gesteigerte kortikale Synchronisation zu bestimmen und Mechanismen zu untersuchen, die den Übergang in eine epileptogene Aktivität induzieren. Familienstudien belegen, dass die PPR eine genetisch komplexe Disposition aufweist. Visuell induzierte Anfälle treten bei bis zu 10% der Kinder mit Epilepsien auf. Besonders häufig (bis zu 30%) ist die PPR mit den idiopathisch generalisierten Epilepsien (IGE) assoziiert. Die PPR repräsentiert somit einen geeigneten Endophänotyp, um die pathogenetische Komplexität der IGE zu reduzieren und auf einfachere Phänotyp-Genotyp-Beziehungen zurückzuführen.

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die molekulargenetische Identifizierung von PPR-Determinanten durch die Analyse von positionellen Kandidatengenen. Initial wurde dazu eine genomweite Kopplungsstudie bei 60 PPR-Multiplexfamilien mit mindestens zwei betroffenen Geschwistern durchgeführt. Bei dem Gesamtkollektiv ergab die nicht-parametrische Kopplungsanalyse einen Kopplungshinweis in der chromosomalen Region 13q13. Um den genetischen Zusammenhang von PPR und IGE zu untersuchen, wurden die Familien in zwei distinkte, phänotypisch homogenere Subgruppen unterteilt. Bei 25 Familien mit photosensitiver IGE fand sich ein signifikanter IGE/PPR-Locus in der Region 13q31, während sich bei 19 Familien mit PPR und visuell induzierten Anfällen ohne IGE ein signifikanter PPR-Locus im Bereich 6p21 positionell eingrenzen ließ. Ein signifikanter Kopplungsbefund in der Region 13q31 zeigte sich ebenfalls in unserem Genome scan bei 93 europäischen IGE-Multiplexfamilien. Unsere explorativen post hoc Analysen sprechen dafür, dass der 13q31-Locus auf einen Geneffekt hinweist, der am ehesten zu photosensitiven IGE disponiert. Der Locus auf Chromosom 6p21 ist dagegen eher PPR-spezifisch.

Zwei positionell und funktionell interessante Kandidatengene für den 6p21-Locus sind die Gene für die Succinatemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH, Gen-Symbol: *ALDH5A1*) und das Bromodomain-containing Protein 2 (*BRD2*).

Unsere Sequenzanalyse des *ALDH5A1* Gens bei 35 Studienteilnehmern mit PPR und IGE identifizierte 17 Sequenzvarianten, von denen drei einen Aminosäureaustausch (His180Tyr, Pro182Leu, Ala237Ser) bedingen. Die nachfolgende Assoziationsstudie von

sechs *ALDH5A1*-Polymorphismen (u.a. His180Tyr, Ala237Ser) ergab jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf einen substantiellen Effekt dieses Gens bei der Pathogenese der Photosensibilität oder häufiger IGE-Syndrome.

Ein Genort für die juvenile myoklonische Epilepsie (JME) wurde in der Region 6p21.3 kartiert und ein Kopplungsungleichgewicht zwischen *BRD2* Polymorphismen und JME nachgewiesen. Ca. 30% der IGE Patienten mit JME sind photosensitiv. Unsere Studie ergab eine signifikante Assoziation von sechs *BRD2*-Polymorphismen mit PPR. Die Funktion von *BRD2* bei der Epileptogenese ist noch unklar. Es wird angenommen, dass es sich hier um einen neuronal exprimierten Transkriptionsregulator handelt, dessen Fehlfunktion zu zerebralen Entwicklungsstörungen führt, die bei JME-Patienten in mesiofrontalen Hirnabschnitten häufiger zu finden sind.

Funktionell plausible Kandidatengene sind ebenfalls die Gene der GABA-Rezeptor δ -Untereinheit (*GABRD*), des Kaliumkanals *KCNJ10* und des Malat-Enzyms 2 (*ME2*). Für funktionelle Sequenzvarianten des *GABRD* Gens (Arg220His), des *KCNJ10* Gens (Arg271Cys) und einem Risiko-Haplotyp des *ME2* Gens waren zuvor Assoziationen mit IGE oder anderen Epilepsie-Syndromen berichtet worden. Unsere Assoziationsstudie ergab keinen Hinweis auf einen substantiellen epileptogenen Effekt der *GABRD* His220-Variante bei unserem Fall-Kontroll Kollektiv (660 IGE, 76 PPR, 666 Populationskontrollen). Dagegen konnten wir einen protektiven Einfluss der *KCNJ10* Cys271-Variante bei der Ätiologie der IGE bestätigen. Keinen Assoziationshinweis ergab unsere Replikationsstudie für einen *ME2*-Risikohaplotyp mit häufigen IGE-Syndromen und PPR.

Unsere Forschungsergebnisse bestätigen, dass die PPR sich als Endophänotyp für die häufigen IGE-Syndrome eignet. Die chromosomale Kartierung von zwei PPR-Loci (6p21, 13q31) ermöglicht es, gezielt positionelle Kandidatengene auf deren pathogenetische Beteiligung bei der PPR und photosensitiven IGE-Syndromen zu überprüfen. Unsere Assoziationsstudien weisen daraufhin, dass das *BRD2* Gen an der Pathogenese der PPR beteiligt ist.

Einleitung

Die Photoparoxysmale Reaktion (PPR) oder Photosensibilität ist ein elektroenzephalographisches Merkmal, das durch eine abnormale Erregbarkeit und Synchronisationstendenz des visuellen Kortex infolge einer intermittierenden Photostimulation (IPS) charakterisiert ist [39]. Der Ausprägungsgrad der provozierten kortikalen Reaktion (PPR Typ I-IV) reicht von okzipitalen Spikes bis hin zu generalisierten Spike-Wave-Entladungen (GSW) [21,45]. Visuell induzierte Anfälle treten bei ca. 10% der Epilepsien im Kindesalter und bei etwa 5% erwachsener Epilepsie-Patienten auf [21]. Besonders häufig sind idiopathisch generalisierte Epilepsien (IGE) mit einer Photosensibilität assoziiert. Etwa 13-18% der Fälle mit idiopathischer Absence-Epilepsie (IAE) und 30-35% der Fälle mit juveniler myoklonischer Epilepsie (JME) sind photosensitiv [17]. Die IPS bietet somit einen experimentellen Ansatz, die individuelle Anfälligkeit für eine gesteigerte kortikale Synchronisation zu bestimmen und Mechanismen zu untersuchen, die den Übergang in eine epileptogene Aktivität induzieren [33].

Familienstudien belegen, dass die PPR genetisch determiniert ist und eine alters- und geschlechtsabhängige Penetranz aufweist [9,45,46]. Die familiären Vererbungsmuster sprechen für eine genetisch komplexe Disposition, bei der mehrere genetische Faktoren an der Ätiologie beteiligt sind. Den vier Ausprägungsgraden der PPR scheinen gemeinsame genetische Dispositionen zugrunde zu liegen [9]. Die enge Assoziation der PPR Typ-IV mit IGE eröffnet die Möglichkeit, PPR als neurogenetischen Endophänotyp zu verwenden, um genetische Determinanten der IGE zu ermitteln.

Die Aufgabenstellung der vorliegenden molekulargenetischen Studien war es, mittels genomweiter Kopplungsanalysen bei 60 PPR-Multiplexfamilien (mindestens zwei betroffene Geschwister mit PPR), PPR-Genorte chromosomal einzugrenzen [41] und anschließend positionelle und funktionelle Kandidatengene auf deren pathogenetische Beteiligung bei der PPR und photosensitiven IGE zu überprüfen. Hierzu wurden Sequenzanalysen und Assoziationsstudien von Kandidatengenen durchgeführt [24-28]. Die molekulargenetische Identifizierung von PPR-Genen könnte einen wesentlichen Beitrag leisten, die genetisch komplexe Disposition der photosensiblen IGE aufzuklären und dadurch einen Einblick in die molekularen Mechanismen der kortikalen Erregungsregulation zu erhalten.

Methoden

Die Rekrutierung der PPR-Familien und des Fall-Kontroll Kollektivs erfolgte in der Abteilung für Neuropädiatrie der Universität Kiel, dem Universitätsklinikum für Epileptologie in Bonn und der Neurologischen Klinik der Charité Universitätsmedizin in Berlin. Die Ethik-Kommissionen der beteiligten Universitätskliniken haben der Durchführung der Studien zugestimmt. Der Einschluss eines Studienteilnehmers setzte allerorts die Aufklärung und schriftliche Einverständniserklärung voraus.

Klinische Charakterisierung

Die anonymisierten klinischen Daten der Studienteilnehmer wurden anhand standardisierter Erhebungsbögen dokumentiert. Die Klassifikation von epileptischen Anfällen und Syndromen erfolgte gemäß den Vorschlägen der Kommission für Terminologie und Klassifikation der Internationalen Liga gegen Epilepsie [20].

Das PPR-Merkmal wurde anhand eines standardisierten EEG-Protokolls für die IPS bestimmt [21]. Aktuell werden vier Ausprägungsgrade der PPR unterschieden [21,45]: Typ-I mit eingelagerten Spikes innerhalb des okzipitalen α -Rhythmus, Typ-II mit parieto-okzipitale Spikes mit biphasischen slow Waves, Typ-III mit parieto-okzipitale Spikes mit biphasischen slow Waves, die sich in die Frontalregion ausbreiten und Typ-IV mit generalisierten Spike-Wave Entladungen.

Genome scan nach PPR Determinanten

In die genomweite Kopplungsstudie wurden 60 Familien (295 Individuen) eingeschlossen, bei denen mindestens zwei Geschwister eine PPR Typ I-IV aufwiesen. Zur Differenzierung von PPR-spezifischen und IGE-assoziierten PPR-Determinanten wurden die Familien in zwei distinkte, phänotypisch homogenere Subgruppen unterteilt. Die PPR-Subgruppe schloss 19 Familien (98 Individuen) mit PPR allein oder visuell induzierten Anfällen ohne IGE ein. Die PPR/IGE-Subgruppe umfasste 25 Familien (121 Individuen) mit photosensitiver IGE.

Die Mikrosatelliten-Genotypisierung erfolgte als Multiplex-PCR mit Fluoreszenzmarkierten Markern mit dem Qiagen Multiplex Amplification Kit. Als Thermocycler wurden GeneAmp PCR System 9700 verwendet. Die PCR-Fragmente wurden mittels ABI3730 DNA-Sequencer aufgetrennt und mit Hilfe des Programms GENEMAPPER (Version 3.0)

ausgewertet. Insgesamt wurden 455 Marker aus dem "Marshfield Marker Set" [4] für die genomweite Kartierung eingesetzt sowie 123 weitere Marker zur Feinkartierung.

Für die statistischen Kopplungsanalysen wurden nicht-parametrische und parametrische Methoden angewandt. Die nicht-parametrischen Linkage-scores (NPL) und die korrespondierenden nominalen Typ-I Fehlerraten (P) wurden mit dem Programm GENEHUNTER berechnet [22]. Sie beruhen auf dem Vergleich eines beobachteten Vererbungsmusters eines Chromosomenabschnittes mit den Erwartungswerten einer zufälligen Mendelschen Verteilung (allele sharing). Die parametrischen Analysen wurden mit dem GENEHUNTER-MODSCORE Programm durchgeführt [40]. Bei einer MOD-score Analyse wird der LOD-score (logarithm of the odds) nicht nur über die genetische Position des Erkrankungslocus maximiert, sondern auch in Hinsicht auf die Penetranz der Genotypen und der Allelfrequenzen des Erkrankungsgens. Die mit dem MOD-score korrespondierenden Typ-I Fehlerraten (P_{emp}) wurden empirisch durch Simulationsstudien unter der Annahme einer zufälligen Allel-Segregation ermittelt. Nominale Typ-I Fehlerraten (P_{emp}) kleiner als 1.7×10^{-3} wurden als kopplungshinweisender und ab 4.9×10^{-5} als signifikanter Kopplungsbefund definiert [23].

Kandidatengenstudien

Sequenzanalyse des *ALDH5A1* Gens

Die Sequenzanalyse des *ALDH5A1* Gens wurde bei 35 unverwandten PPR/IGE-Probanden (23 IGE, 12 PPR Typ I-IV mit und ohne visuell induzierten Anfällen jedoch ohne IGE) und vier gesunden Populationskontrollen durchgeführt. Insgesamt 31 der 35 PPR/IGE-Probanden waren photosensitiv (PPR Typ I-IV). Die enzymatische DNA-Sequenzierung erfolgte mittels der Kettenabbruch-Methode nach Sanger [35]. Für den PCR Ansatz wurde der ABI Variant Seq Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Die Sequenzreaktion wurde mit dem BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Die Sequenzreaktionen wurden auf einem ABI3730 DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) aufgetrennt und mit Hilfe des Programms SeqMan ausgewertet.

Assoziationsstudien

Das Studienkollektiv für die Assoziationsanalysen umfasste insgesamt 736 deutsche unverwandte IGE/PPR-Patienten und 666 gesunde Kontrollen deutscher Herkunft. Das IGE/PPR-Kollektiv setzte sich aus 660 IGE-Patienten (244 JME, 301 IAE, 115 Epilepsien mit

Aufwach-Grand-mal (EGMA) sowie 76 Patienten mit PPR (Typ I-IV) oder visuell induzierten Anfällen ohne IGE zusammen. Insgesamt 187 Individuen des IGE/PPR-Kollektivs waren photosensitiv (Typ I-IV). Unterschiede in den Fallzahlen der einzelnen Studien resultierten aus der fortlaufenden Rekrutierung von Studienteilnehmern.

Basierend auf positionellen und funktionellen Hinweisen wurden folgende Gene für die Kandidatengen-Assoziationsstudien ausgewählt: *ALDH5A1* und *BRD2* (6p21), *GABRD* (1p36), *KCNJ10* (1q22) und *ME2* (18q21). Vorrangig wurden Missense-Variationen überprüft, da diese potentiell funktionell bedeutsamen Aminosäure-Variationen (*ALDH5A1*: His180Tyr, Ala237Ser; *GABRD*: Arg220His; *KCNJ10*: Arg271Cys) einen direkten disponierenden Effekt bedingen können.

Die Genotypisierung der Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) erfolgte mittels eines TaqMan 5'-Nuklease PCR Assay (Applied Biosystems, Foster City, USA). Statistische Vergleiche der Allel- und Genotypfrequenzen (χ^2 -Test, Odds Ratio (OR), 95%-Konfidenzintervall und das Hardy-Weinberg Equilibrium) wurde mit dem SAS-Programm durchgeführt [36]. Für die Haplotypanalysen wurden die Programme COCAPHASE 2.35 (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk>) [10] und FAMHAP [2] angewendet.

Ergebnisse

Genome scan nach PPR Determinanten (Tauer et al., 2005)

Die genomweite Kopplungsanalyse der 60 PPR-Multiplexfamilien ergab einen maximalen NPL-score von 2.94 ($P = 0.0018$) in der chromosomalen Region 13q13.2. Für die phänotypisch homogeneren Familien-Subgruppen fand sich bei den 19 PPR-Familien ein maximaler NPL-score von 2.66 ($P = 0.0048$) in der chromosomalen Region 6p21.2 und bei den 25 PPR/IGE-Familien lag der maximale NPL-score bei 3.06 ($P = 0.0013$) in der Region 13q31.3.

Die Ergebnisse der MOD-score Analysen der Familienkollektive sind in der Tabelle 1 dargestellt. Für das Gesamtkollektiv konnte ein MOD-score von 2.25 in der chromosomalen Region 13q13.2 in Verbindung mit einem rezessiven Vererbungsmodus beobachtet werden. Für die Subgruppe der 19 PPR-Familien fand sich ein signifikanter MOD-score von 4.30 ($P_{\text{emp}} = 0.00004$) in der chromosomalen Region 6p21.2 unter einem rezessiven Vererbungsmodus. Bei den PPR/IGE-Familien konnten wir einen signifikanten MOD-score von 3.64 ($P_{\text{emp}} = 0.00015$) in der chromosomalen Region 13q31.3 unter rezessivem Vererbungsmodus beobachten.

Zur Ermittlung des disponierenden Spektrums des 13q31-Locus wurden im PPR/IGE-Kollektiv explorative MOD-score Analysen durchgeführt. Unter dem Betroffenheitsmodell PPR+IGE (entweder PPR oder GSW/IGE) stieg der MOD-score auf 4.62 ($P = 0.00003$; signifikant). Wenn nur IGE-Probanden als betroffen klassifiziert wurden, (Betroffenheitsmodell IGE) ergab sich ein MOD-score von 4.83 ($P < 10^{-5}$; signifikant).

Tab.1: Ergebnisse der Kopplungsanalysen

Familienkollektiv ¹	N	Betroffenheitsmodell	Chrom. Region	NPL	P	MOD-score	Penetranzen ⁼			Allelfrequenz	P _{emp} *
							f _{+/+}	f _{m/+}	f _{m/m}		
PPR/All	60	PPR	13q13	2.93	0.0018	2.25	0.00, 0.00, 0.01	0.49	0.0084		
PPR	19	PPR	6p21	2.66	0.0048	4.3	0.00, 0.00, 0.07	0.11	0.00004		
PPR/IGE	25	PPR	13q31	3.06	0.0013	3.64	0.01, 0.01, 0.57	0.2	0.00015		
PPR/IGE	25	PPR+IGE	13q31	2.94	0.002	4.62	0.01, 0.01, 0.46	0.06	0.00003		
PPR/IGE	25	IGE	13q31	3.18	0.0007	4.83	0.01, 0.01, 0.65	0.02	< 10 ⁻⁵		

¹ Familienkollektiv: PPR/All = gesamtes Familienkollektiv
 PPR = 19 PPR Multiplexfamilien ohne IGE
 PPR/IGE = 25 PPR Multiplexfamilien mit IGE/GSW

* P_{emp}: empirische Typ-I Fehlerrate

⁼ Penetranzen des Erkrankungsgenotyps; + = Wildtypallel, m = mutiertes Allel

Positionelle Kandidatengene in der Region 6p21

Im Bereich des PPR-Locus in der Region 6p21.2 befinden sich zwei positionell und funktionell interessante Kandidatengene: *ALDH5A1* und *BRD2*.

Kandidatengen *ALDH5A1* (Lorenz et al., 2006a)

Die Sequenzanalyse der kodierenden Region, der Exon/Intron-Übergänge und der 5'-regulatorischen Sequenz von *ALDH5A1* identifizierte 17 Sequenzvarianten (7 davon in der 5'-regulatorischen Region, 4 exonische und 6 intronische) bei 35 PPR/IGE-Patienten. Drei von ihnen bewirken einen Aminosäure-Austausch (His180Tyr, Pro182Leu, Ala237Ser). Die Missense-Varianten His180 und Pro182 kodieren nicht für konservierte Aminosäure-Reste, das Ala237-Allel ist dagegen hoch konserviert [3]. Keiner der identifizierten intronischen Polymorphismen scheint eine Splice-Site Variation hervorzurufen und die synonyme Variation in Exon 9 (Asp463Asp) bewirkt höchst wahrscheinlich keine funktionelle Veränderung. Von den untersuchten kodierenden Varianten trat nur das Ser237-Allel gehäuft

in der IGE/PPR-Gruppe auf. In der anschließenden Assoziationsstudie fand sich jedoch keine Evidenz für eine allelische Assoziation.

In einer populationsbasierenden Assoziationsstudie des *ALDH5A1* Gens wurden sechs intragene SNPs und ein Trinukleotid-Repeat (TNR) Polymorphismus, die über die genomische *ALDH5A1* Sequenz mit einem durchschnittlichen Abstand von 6.5 kb verteilt sind, auf ein Kopplungsungleichgewicht mit PPR oder IGE untersucht. Die Allel- und Genotypfrequenz der *ALDH5A1* Polymorphismen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Kontrollen und der PPR- bzw. IGE-Gruppe ($P > 0.078$), mit Ausnahme von SNP4 (rs2252525, IVS5) in der JME-Gruppe. Die Frequenz des Minor-Allels war bei 218 JME-Patienten im Vergleich zu den 662 Kontrollen signifikant erhöht ($P = 0.012$, $\chi^2 = 6.28$, $df = 1$; $OR(A+) = 1.49$; 95%-CI: 1.06 – 2.10). Die Assoziationsanalyse des Zwei-Marker-Haplotyps, bestehend aus SNP1 (rs1883415) und dem TNR-Polymorphismus, zeigte im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante Abweichung der Haplotyp-Verteilung in der IGE-Gruppe ($P = 0.009$, $\chi^2 = 11.65$, $df = 3$) und der JME-Gruppe ($P = 0.048$, $\chi^2 = 9.56$, $df = 4$). Da Erberkrankungen von Enzym-Defekten häufig einem rezessiven Vererbungsmodus unterliegen, führten wir zusätzlich ein Homozygoten-Screening mit dem multiallelischen TNR-Polymorphismus durch. Dieses ergab keinen Anhalt für eine signifikante Frequenzerhöhung von homozygoten TNR-Genotypen in der IGE-, JME- und PPR-Gruppe.

Kandidatengen *BRD2* (Lorenz et al., 2006b)

In einer Assoziationsstudie wurde an unserem Fall-Kontroll Kollektiv (187 photosensitive Individuen, 666 Kontrollen) untersucht, ob *BRD2* Variationen an der genetischen Disposition von PPR beteiligt sind. Es wurden die Genotypen von sieben SNPs und einem Dinukleotid-Repeat (DNR) Polymorphismus bestimmt, die über die gesamte genomische Sequenz von *BRD2* mit einem durchschnittlichen Abstand von 3 kb verteilt sind. Die Allelfrequenz von fünf *BRD2* SNPs differierte dabei signifikant zwischen den PPR-Fällen und den Kontrollen ($P: 0.0075 - 0.035$). Auch der DNR-Polymorphismus wies eine signifikant abweichende Allel-Verteilung bei den PPR-Fällen im Vergleich zu den Kontrollen ($P = 0.011$, $\chi^2 = 14.88$, $df = 5$) auf. Die stärkste Assoziation fanden wir bei SNP7 (rs188245) ($P = 0.0075$, $\chi^2 = 7.14$, $df = 1$). Träger des SNP7 G/G Genotyps wiesen ein signifikant erhöhtes Risiko für die PPR auf ($OR = 1.64$, 95%-CI: 1.13 – 2.38).

Replikationsstudien von positionellen und funktionellen Kandidatengen

***GABRD* Arg220His-Variation (Lenzen et al., 2005a)**

In einer Assoziationsstudie wurde an unserem Fall-Kontroll Kollektiv (562 IGE, 78 PPR, 664 Kontrollen) die Hypothese getestet, ob das *GABRD* His220-Allel an der Disposition von häufigen IGE-Syndromen oder PPR beteiligt ist [8]. Die Frequenz des His220-Allels zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und der IGE- bzw. PPR-Gruppe ($P > 0.46$). Auch für die einzelnen IGE-Syndrome (JME, IAE) ergab sich kein Hinweis auf eine allelische Assoziation.

***KCNJ10* Arg271Cys-Variation (Lenzen et al., 2005b)**

In dieser Replikationsstudie überprüften wir eine publizierte Assoziation, die einen protektiven Effekt der *KCNJ10* Cys271-Variante bei einer heterogenen Gruppe von Epilepsien impliziert [6]. Unsere Assoziationsanalyse bestätigte eine signifikante Verringerung der Cys271-Allelfrequenz bei 563 IGE-Patienten im Vergleich zu 660 Kontrollen ($P = 0.030$, $\chi^2 = 3.52$, $df = 1$; einseitig getestet; ($P = 0.030$, $\chi^2 = 3.52$, $df = 1$; einseitig getestet). Die Cys271-Frequenz war am niedrigsten in der JME-Gruppe ($P = 0.011$, $\chi^2 = 5.20$, $df = 1$, einseitig getestet; $OR_{Cys271+} = 0.69$; 95%-CI: 0.50–0.95).

***ME2*-Risikohaplotyp (Lenzen et al., 2005c)**

Positionelle Kandidatengen Analysen in der chromosomalen Region 18q21.1 identifizierten einen Risikohaplotyp des *ME2* Gens, der homozygot das Risiko für IGE um das sechsfache erhöht [16]. In unserer Replikationsstudie überprüften wir die Hypothese, ob eine rezessiv vererbte *ME2* Mutation einen epileptogenen Effekt zur ätiologischen Varianz der IGE und PPR beiträgt. Sieben *ME2* Polymorphismen (durchschnittlicher Abstand: 20 kb) wurden in unserem Fall-Kontroll Kollektiv (660 IGE, 78 PPR, 666 Kontrollen) genotypisiert. Weder die Allel- noch die Genotypfrequenzen aller getesteter *ME2*-Polymorphismen zeigten signifikante Abweichungen zwischen den Kontrollen und der IGE- bzw. PPR-Gruppe ($P > 0.22$). Es gab keinen Hinweis für eine Assoziation des homozygoten Risikohaplotyps mit IGE-Syndromen oder PPR.

Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulargenetische Identifizierung von PPR-Determinanten. Hierzu wurde von uns der molekulargenetische Ansatz der positionellen Kandidatengenanalyse angewandt [14]. Bei diesem Ansatz wird initial eine genomweite Kopplungsstudie durchgeführt, um einzelne Hauptgeneffekte chromosomal zu lokalisieren. In den Kopplungsregionen werden anschließend funktionell plausible Kandidatengene ausgewählt. Danach werden Sequenzvarianten dieser Kandidatengene in Assoziationsstudien auf ein Kopplungsungleichgewicht mit dem vermuteten Erkrankungslocus überprüft (Linkage Disequilibrium Mapping). Abschließend wird durch Sequenzanalysen der assoziierten Kandidatengene direkt nach den verantwortlichen Genmutationen gesucht. Dieses molekulargenetische Vorgehen begünstigt die Identifizierung von häufigen Genvarianten mit substantiellem Effekt.

Familienstudien belegen, dass die PPR genetisch determiniert ist [9,45,46] und häufig (bis zu 30%) mit den IGE assoziiert auftritt [17]. Die standardisierte IPS bietet einen experimentellen Ansatz, die individuelle Anfälligkeit für eine erhöhte kortikale Synchronisation zu bestimmen und Mechanismen zu untersuchen, die an dem Übergang in eine epileptische Aktivität beteiligt sind [33]. Die enge Assoziation der Photosensibilität mit JME im Speziellen und den IGE im Allgemeinen, sowie das gemeinsame EEG-Merkmal generalisierter spike-wave Entladungen stützen die Hypothese, dass die PPR einen geeigneten Endophänotyp für die IGE darstellt [17].

Genome scan nach PPR Determinanten (Tauer et al., 2005)

Unser Genom scan bei 60 PPR-Multiplexfamilien identifizierte zwei PPR-Loci (6p21, 13q31), die sich in ihrer neurogenetischen Beziehung zu den IGE unterschieden [41]. Bei 25 Familien mit photosensitiven IGE fand sich ein signifikanter IGE/PPR-Locus in der chromosomalen Region 13q31, während sich bei 19 Familien mit PPR und visuell induzierten Anfällen ohne IGE ein signifikanter PPR-Locus in der Region 6p21 positionell eingrenzen ließ. Die Aufteilung der Familien in klinisch homogenere Subgruppen war ausschlaggebend für die Dissektion unterschiedlicher PPR-Determinanten. Während der PPR-Locus in der Region 6p21 eher spezifisch für PPR zu sein scheint, ist der PPR-Locus in der Region 13q31 am ehesten an der Disposition von photosensitiven IGE beteiligt. Unser aktueller Genome scan bei 93 europäischen IGE-Multiplexfamilien bestätigt einen IGE-Locus in der Region 13q31 [42]. Unsere Studie belegt, dass PPR sich als Endophänotyp eignet, um die komplexe

Pathogenese der häufigen IGE Syndrome auf einheitliche epileptogene Mechanismen einzugrenzen, die die Dissektion einzelner IGE-Gene erleichtert. Ein zweiter unabhängiger Genome scan bei 16 PPR-Multiplexfamilien, die primär durch Indexfälle mit JME rekrutiert wurden, fand signifikante Kopplungsbefunde in den Regionen 7q32 und 16p13 [34]. Damit ergeben sich eindeutige Hinweise für eine genetische Heterogenität, die offensichtlich mit der Untersuchung differenter Phänotyp-Genotyp-Beziehungen korreliert. Aktuell werden kombinierte Genom-weite Kopplungsanalysen beider Datensätze durchgeführt.

Zur Ermittlung von aussichtsreichen Kandidatengen in den Regionen 6p21 und 13q31 führten wir Datenbankrecherchen durch. In der Kandidatengenregion 13q31 fanden wir keine offensichtlichen Kandidatengene. Deshalb erfolgt zur Zeit eine systematische Feinkartierung dieser Region mit 200 SNPs. In dem Bereich des PPR-Locus in der Region 6p21 halten wir zwei positionelle Kandidatengene (*ALDH5A1*, *BRD2*) für besonders interessant, da beide Gene mit Epilepsien assoziiert wurden [13,32].

Positionelle Kandidatengen Studien in der Region 6p21 (Lorenz et al., 2006a,b)

Das *ALDH5A1* Gen kodiert für das Enzym Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH), das am Abbau des inhibitorischen Neurotransmitters GABA beteiligt ist. Ein SSADH Mangel führt zu einem verminderten Abbau von GABA und sekundär zu einer Erhöhung von γ -Hydroxybuttersäure (GHB). Ein autosomal rezessiv vererbtes SSADH Defizit verursacht eine schwere psychomotorische Entwicklungsstörung, bei der ca. 50% der Betroffenen eine Epilepsie erleiden [13]. Mäuse ohne *Aldh5a1* Gen sterben frühzeitig infolge eines Status epilepticus [18] und exogen zugeführtes GHB induziert Absence Anfälle [7]. Das *ALDH5A1* Gen stellt somit ein aussichtsreiches Kandidatengen für IGE und PPR dar.

Unsere Sequenzanalyse des *ALDH5A1* Gens bei 35 PPR/IGE Patienten aus Familien mit positiver Kopplungsevidenz am *ALDH5A1* Locus identifizierte 17 Sequenzvarianten, von denen drei einen Aminosäureaustausch bewirken (His180Tyr, Pro182Leu, Ala237Ser) [27]. Die Varianten Tyr180, Leu182 und Ser237 führen zu einer reduzierten SSADH Aktivität verglichen mit dem Wildtyp-Allel [3]. Nach Korrektur für multiple Testungen ergab unsere Assoziationsstudie von sieben *ALDH5A1* Polymorphismen keinen Anhalt für eine allelische Assoziation mit IGE oder PPR. Ein Trend einer Assoziation eines Zwei-Marker-Haplotyps (rs1883415–TNR) mit IGE und JME sollte erneut in einem unabhängigen Studienkollektiv überprüft werden. Der assoziierte Haplotyp schließt die 5'-regulatorische Region ein, in der wir sieben Sequenzvariationen innerhalb eines Abschnitts von 400 bp identifizierten. In

diesem Segment liegen der *ALDH5A1* Promotor und regulatorische Sequenzen [3]. Es bleibt zu überprüfen, ob Sequenzvarianten in der 5'-regulatorischen Region in Kombination mit den bekannten Missense-Variationen (His180Tyr, Pro182Leu, Ala237Ser) die ausgeprägte inter-individuelle Variation der SSSDAH Aktivität erklären.

Ein ebenfalls sehr aussichtsreiches Kandidatengen für den PPR-Locus in der Region 6p21 stellt das ***BRD2* Gen** dar [28]. Durch eine positionelle Kandidatengen Analyse fanden Pal et al. ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen *BRD2* Polymorphismen und JME [15,32]. JME und PPR weisen eine enge klinische Assoziation miteinander auf. Bei einer IPS unter Standardbedingungen findet sich eine PPR bei ca. 30% der JME Patienten [17]. In Abhängigkeit der Intensität der IPS sind sogar bis zu 90% aller JME Patienten photosensitiv [1]. Auch in unserer Kopplungsstudie fanden wir eine signifikante Kopplung zwischen PPR und dem *BRD2*-Locus bei 19 deutschen Familien mit vorwiegend PPR und photosensitiven Anfällen (Mehrpunkt LOD score = 3.365) [41]. Diese Hinweise stützen die Hypothese, dass das *BRD2* Gen sowohl an der Disposition von JME wie auch PPR beteiligt ist.

Unsere Assoziationsstudie bestätigte allelische und haplotypische Assoziationen von sechs *BRD2* Polymorphismen mit PPR. Während in unserer Studie die stärkste Assoziation bei SNPs im 3'-Bereich des *BRD2* Gens lagen, fanden Pal et al. [32] die stärksten Kopplungsungleichgewichte im 5'-Bereich. Im Gegensatz zu der vorherigen Studie konnten wir keine Assoziation mit dem "Promotor" SNP rs3918149 bestätigen. Unsere aktuellen Befunde belegen einerseits eine Beteiligung des *BRD2* Gens an der genetisch komplexen Disposition von PPR und JME, andererseits deuten die unterschiedlich assoziierten SNPs auf eine allelische Heterogenität hin. Bisher konnten keine verantwortlichen *BRD2* Mutationen identifiziert werden. Somit sind die Assoziationsbefunde als vorläufig und hinweisend zu betrachten. Die mögliche Funktion von *BRD2* bei der Epileptogenese bleibt derzeit noch ungeklärt. Es wird angenommen, dass es sich um einen neuronalen Transkriptionsregulator handelt, dessen Fehlfunktion zu diskreten Hirnentwicklungsstörungen führt, wie sie bei vielen JME Patienten zu finden sind [31,47]. Angesichts der eher geringen Effekte ist es schwierig, die Funktionalität von potentiellen *BRD2* Varianten zu testen [44]. Am ehesten sind Rückschlüsse auf die Beteiligung von *BRD2* bei der Epileptogenese von transgenen Tiermodellen zu erwarten.

Replikationsstudien von funktionellen Kandidatengen

Bei drei Kandidatengen (*GABRD*, *KCNJ10*, *ME2*) überprüften wir publizierte Hinweise auf eine pathogenetische Beteiligung an generalisierten Erregungssteigerungen [6,8,15].

***GABRD* Arg220His-Variation (Lenzen et al., 2005a)**

Eine Mutationsanalyse bei IGE- und GEFS+-Patienten identifizierte eine häufige, funktionelle Missense Variation (c.659G>A, Arg220His) im Gen der GABA δ -Untereinheit (*GABRD*) [8]. GABA_A $\alpha_1\beta_2\delta$ Rezeptoren mit der *GABRD* His220-Variante zeigten deutlich niedrigere Spannungsamplituden als GABA_A Rezeptoren mit der Wildtyp-Variante bei HEK293T Zelllinien [8,29]. Eine Pilotstudie fand einen Trend für eine höhere Allelfrequenz der His220-Variante bei 203 IGE-Patienten (4,9%) im Vergleich zu 96 Populationskontrollen (2,1%) [8].

Unsere Überprüfung dieses Trends bei 562 IGE-Patienten und 664 Kontrollen ergab keinen Hinweis auf eine allelische Assoziation der *GABRD* His220-Variante mit IGE oder einzelnen IGE-Subtypen [26]. Unser Studienergebnis spricht gegen einen substantiellen Effekt der *GABRD* His220-Variante bei der genetischen Disposition von häufigen IGE Syndromen.

***KCNJ10* Arg271Cys-Variation (Lenzen et al., 2005b)**

Eine molekulargenetische Kartierung (QTL-Mapping) von Loci für epileptische Anfälle bei Mäusen [5,11] und eine nachfolgende Studie von positionellen Kandidatengen identifizierte in dem Gen des Kaliumkanals *Kcnj10* eine Missense Mutation (Thr262Ser), die eine hohe und niedrige Anfallsdisposition bei verschiedenen Mäusestämmen unterscheidet [12]. Eine Assoziationsstudie einer Arg271Cys Variation des humanen *KCNJ10* Gens bei fokalen und generalisierten Epilepsie-Syndromen belegte einen signifikanten protektiven Effekt der Cys271-Variante [6].

Unsere Replikationsstudie konnte eine signifikant verringerte Frequenz der Cys271-Variante bei der IGE-Gruppe und besonders der JME-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen bestätigen [24]. Eine neurophysiologische Testung der Thr262Ser und Arg271Cys Variationen ergaben keine Hinweise auf funktionelle Veränderungen der intrinsischen Eigenschaften von *KCNJ10* [37]. Angesichts der nur geringen Effekte der Cys271-Variante (OR = 0.69) kann nicht ausgeschlossen werden, dass der pathogenetische Einfluss auf Störungen der Hirnentwicklung oder auf regionale Funktionsstörungen zurückzuführen ist, die erst im Kontext mit weiteren genetischen Faktoren einen epileptogenen Effekt bewirken.

ME2-Risikohaplotyp (Lenzen et al., 2005c)

Greenberg et al. [16] fand ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen einem IGE-Locus in der Region 18q21.1 und SNPs im Bereich des *ME2* Gens. Homozygote Träger eines häufigen *ME2*-Risikohaplotyps wiesen ein sechsfach erhöhtes Risiko für IGE auf [16]. Eine zugrunde liegende *ME2* Mutation konnte bisher nicht identifiziert werden. *ME2* ist ein mitochondriales Enzym, welches Malat zu Pyruvat umwandelt. Ein *ME2* Mangel würde durch eine verringerte Bereitstellung von Pyruvat die neuronale GABA-Synthese vermindern und dadurch eine neuronale Desinhibition begünstigen.

Unsere Replikationsstudie konnte weder eine allelische noch eine genotypische oder haplotypische Assoziation von *ME2* Polymorphismen mit IGE oder PPR bestätigen [25]. Wir fanden auch keinen Hinweis für eine Assoziation des vermeintlichen, homozygoten Risikohaplotyps mit IGE oder PPR. Power-Simulationen belegen, dass unser Studienkollektiv mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90% eine häufige Mutation mit einem relativen Risiko von $RR > 2$ erfassen sollte. Somit ist die verantwortliche *ME2* Mutation entweder zu selten oder die Effektstärke zu gering, um in unserem Studienkollektiv identifiziert zu werden. Unser Studienergebnis dämpft optimistische Erwartungen, dass eine häufige *ME2* Mutation einen substantiellen Effekt zur Pathogenese der häufigen IGE Syndrome beiträgt.

Perspektiven von molekulargenetischen Forschungsansätzen

Während rasche Fortschritte bei der Aufklärung von monogenen Epilepsie-Formen erzielt wurden, liegen bisher keine gesicherten Erkenntnisse von Genveränderungen bei den häufigen, genetisch komplexen Epilepsien vor [38,44]. Aufgrund der meist oligo- bzw. polygenen Disposition und a priori unklaren Phänotyp-Genotyp-Beziehungen ist das bisherige Vorgehen der positionellen Klonierung nur eingeschränkt anwendbar. Assoziationsstudien sind effizienter, um häufige Genvarianten mit moderatem Effekt zu identifizieren [19]. Ein Schlüssel zur Dissektion der genetisch komplexen Epilepsien ist die Verwendung von neurobiologisch determinierten Endophänotypen, wie sie die Photosensibilität darstellt. Rasche Fortschritte in der molekulargenetischen Aufklärung von genetisch komplexen Epilepsien sind durch den wachsenden Erkenntnisstand der genetischen Variabilität des humanen Genoms (International HapMap Project; [43]) und technologischen Weiterentwicklungen in der Hochdurchsatzgenotypisierung von SNPs (z.B. Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Set) zu erwarten. Hierdurch werden erstmals die Voraussetzungen geschaffen, Genom-weite Assoziationsstudien durchzuführen. Gleichzeitig

eröffnet sich die Gelegenheit, das herkömmliche Prinzip der "Locus-by-Locus" Analyse zu verlassen und mit neuen biostatistischen Analyse-Programmen, Konfigurationen von mehreren disponierenden Genvarianten zu erfassen [30]. Eines der Hauptprobleme stellt die hohe Anzahl von zu erwartenden falsch-positiven Assoziationen infolge multipler Testungen dar. Für die umfassende Dissektion der wichtigsten IGE/PPR Gene sind daher sehr große, klinisch einheitlich charakterisierte Studienkollektive (>500 Multiplexfamilien, >2000 Einzelfälle) erforderlich, die sich meist nur im Rahmen von multizentrischen Initiativen rekrutieren lassen (European Consortium on the Genetics of Photosensitivity and Visual Epilepsies). Insgesamt scheinen jetzt erstmals die Voraussetzungen gegeben, eine systematische Aufklärung genetisch komplexer Erkrankungen in Angriff zu nehmen.

Literaturverzeichnis

1. Appleton R, Beirne M, Acomb B (2000) Photosensitivity in juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure* 9(2): 108-11
2. Becker T, Knapp M (2004) A powerful strategy to account for multiple testing in the context of haplotype analysis. *Am J Hum Genet* 75(4): 561-70
3. Blasi P, Boyd PP, Ledda M, et al. (2002) Structure of human succinic semialdehyde dehydrogenase gene: identification of promoter region and alternatively processed isoforms. *Mol Genet Metab* 76(4): 348-62
4. Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL (1998) Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 861-69
5. Buck KJ, Metten P, Belknap JK, Crabbe JC (1997) Quantitative trait loci involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice. *J Neurosci* 17(10): 3946-55
6. Buono RJ, Lohoff FW, Sander T, et al. (2004) Association between variation in the human KCNJ10 potassium ion channel gene and seizure susceptibility. *Epilepsy Res* 58(2-3): 175-83
7. Cortez MA, Wu Y, Gibson KM, Snead OC, 3rd (2004) Absence seizures in succinic semialdehyde dehydrogenase deficient mice: a model of juvenile absence epilepsy. *Pharmacol Biochem Behav* 79(3): 547-53
8. Dibbens LM, Feng HJ, Richards MC, et al. (2004) GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABA_A receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet* 13(13): 1315-9
9. Doose H, Waltz S (1993) Photosensitivity-genetics and clinical significance. *Neuropediatrics* 24(5): 249-55
10. Dudbridge F (2003) Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25(2): 115-21
11. Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, et al. (1999) Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 19(16): 6733-9
12. Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, et al. (2004) Fine mapping of a seizure susceptibility locus on mouse Chromosome 1: nomination of Kcnj10 as a causative gene. *Mamm Genome* 15(4): 239-51
13. Gibson KM, Jakobs C, Pearl PL, Snead OC (2005) Murine succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency, a heritable disorder of GABA metabolism with epileptic phenotype. *IUBMB Life* 57(9): 639-44

14. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ (2002) Finding genes that underlie complex traits. *Science* 298(5602): 2345-9
15. Greenberg DA, Durner M, Keddache M, et al. (2000) Reproducibility and complications in gene searches: linkage on chromosome 6, heterogeneity, association, and maternal inheritance in juvenile myoclonic epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 66(2): 508-16.
16. Greenberg DA, Cayanis E, Strug L, et al. (2005) Malic enzyme 2 may underlie susceptibility to adolescent-onset idiopathic generalized epilepsy. *Am J Hum Genet* 76(1): 139-46
17. Guerrini R, Genton P (2004) Epileptic syndroms and visually induced seizures. *Epilepsia* 45 Suppl 1: 14-18
18. Gupta M, Polinsky M, Senephansiri H, et al. (2004) Seizure evolution and amino acid imbalances in murine succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency. *Neurobiol Dis* 16(3): 556-62
19. Hirschhorn JN, Daly MJ (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6(2): 95-108
20. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30: 389-99
21. Kasteleijn-Nolst Trenite D, Binnie CD, Harding GF, Wilkins A (1999) Photic stimulation: standardization of screening methods. *Epilepsia* 40 Suppl 4: 75-79
22. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am. J. Hum. Genet.* 58(6): 1347-63
23. Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.* 11(3): 241-47
24. Lenzen KP, Heils A, Lorenz S, et al. (2005b) Supportive evidence for an allelic association of the human KCNJ10 potassium channel gene with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res* 63(2-3): 113-8
25. Lenzen KP, Heils A, Lorenz S, Hempelmann A, Sander T (2005c) Association analysis of malic enzyme 2 gene polymorphisms with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 46(10): 1637-41
26. Lenzen KP, Heils A, Lorenz S, Hempelmann A, Sander T (2005a) Association analysis of the Arg220His variation of the human gene encoding the GABA delta subunit with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res* 65(1-2): 53-7

27. Lorenz S, Heils A, Taylor KP, et al. (2006a) Candidate gene analysis of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (ALDH5A1) in patients with idiopathic generalized epilepsy and photosensitivity. *Neurosci Lett*, in press
28. Lorenz S, Taylor KP, Gehrmann A, et al. (2006b) Association of photoparoxysmal response with BRD2 polymorphisms. *Neurosci Lett*, in press
29. Macdonald RL, Gallagher MJ, Feng HJ, Kang J (2004) GABA(A) receptor epilepsy mutations. *Biochem Pharmacol* 68(8): 1497-506
30. Marchini J, Donnelly P, Cardon LR (2005) Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nat Genet* 37(4): 413-7
31. Meencke HJ, Veith G (1999) The relevance of slight migrational disturbances (microdysgenesis) to the etiology of the epilepsies. *Adv Neurol* 79: 123-31
32. Pal DK, Evgrafov OV, Tabares P, et al. (2003) BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* 73(2): 261-70
33. Parra J, Kalitzin SN, Lopes da Silva FH (2005) Photosensitivity and visually induced seizures. *Curr Opin Neurol* 18(2): 155-9
34. Pinto D, Westland B, de Haan GJ, et al. (2005) Genome-wide linkage scan of epilepsy-related photoparoxysmal electroencephalographic response: evidence for linkage on chromosomes 7q32 and 16p13. *Hum Mol Genet* 14(1): 171-8
35. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12): 5463-67
36. SAS (1988) SAS/STAT User's Guide, Release 6.03. Cary, NC
37. Shang L, Lucchese CJ, Haider S, Tucker SJ (2005) Functional characterisation of missense variations in the Kir4.1 potassium channel (KCNJ10) associated with seizure susceptibility. *Brain Res Mol Brain Res* 139(1): 178-83
38. Steinlein OK (2004) Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nat Rev Neurosci* 5(5): 400-8
39. Stephani U, Tauer U, Koeleman B, et al. (2004) Genetics of Photosensitivity (Photoparoxysmal Response): A Review. *Epilepsia* 45 Suppl 1: 19-23
40. Strauch K (2003) Parametric linkage analysis with automatic optimization of the disease model parameters. *Am J Hum Genet* 73(suppl 1):A2624
41. Tauer U, Lorenz S, Lenzen KP, et al. (2005) Genetic dissection of photosensitivity and its relation to idiopathic generalized epilepsy. *Ann Neurol* 57(6): 866-73

42. Taylor KP, Heils A, Lorenz S, et al. (2006) Exploration of the genetic architecture of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, submitted
43. Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD (2005) The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 15(11): 1592-3
44. Turnbull J, Lohi H, Kearney JA, et al. (2005) Sacred disease secrets revealed: the genetics of human epilepsy. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2: 2491-500
45. Waltz S, Christen HJ, Doose H (1992) The different patterns of the photoparoxysmal response--a genetic study. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 83(2): 138-45
46. Waltz S, Stephani U (2000) Inheritance of photosensitivity. *Neuropediatrics* 31(2): 82-5
47. Woermann FG, Free SL, Koepp MJ, Sisodiya SM, Duncan JS (1999) Abnormal cerebral structure in juvenile myoclonic epilepsy demonstrated with voxel-based analysis of MRI. *Brain* 122 (Pt 11): 2101-08