Aus der Klinik für Neurologie
des Universitätsklinikums Charité
der Humboldt Universität zu Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. K. M. Einhäupl)

Molekulargenetische Kartierung von genetischen Determinanten bei idiopathisch generalisierten Epilepsien

Kumulative Habilitationsschrift zur
Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurologie

vorgelegt von:
Dr. med. Thomas Sander
Klinik für Neurologie
Universitätsklinikum Charité
Humboldt Universität zu Berlin

Juni 2000

Die in dieser kumulativen Habilitation zusammengefaßten Befunde basieren auf folgenden ausgewählten Originalarbeiten:

Molekulargenetische Analysen bei der juvenilen myoklonischen Epilepsie

Durner M, Sander T, Greenberg D, Johnson K, Beck-Mannagetta G, Janz D (1991): Localization of idiopathic generalized epilepsy on chromosome 6p in families of juvenile myoclonic epilepsy patients. Neurology 41: 1651-1655

Sander T, Hildmann T, Janz D, Wienker TF, Neitzel H, Bianchi A, Bauer G, Sailer U, Berek K, Schmitz B (1995) The phenotypic spectrum related to the human epilepsy susceptibility gene "EJM1". Ann. Neurol. 38: 210-217

Sander T, Bockenkamp B, Hildmann T, Blasczyk R, Kretz R, Wienker TF, Volz A, Schmitz B, Beck-Mannagetta G, Riess O, Epplen JT, Janz D, Ziegler A (1997) Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. Neurology 49: 842-847

Peters HC, Kammer G, Volz A, Kaupmann K, Ziegler A, Bettler B, Epplen JT, Sander T, Riess O (1998) Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABABR1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy. Neurogenetics 2: 47-54

Sander T, Peters C, Kammer G, Samochowiec J, Zirra M, Mischke D, Ziegler A, Kaupmann K, Bettler B, Epplen JT, Riess O (1999) Association analysis of exonic variants of the gene encoding the $GABA_B$ receptor and idiopathic generalized epilepsy. Am. J. Med. Genet. 88: 305-310

Molekulargenetische Analysen von Kandidatengenregionen

Kandidatengenregion 20q13

Sander T, Hildmann T, Wienker TF, Ramel C, Beck-Mannagetta G, Bianchi A, Sailer U, Berek K, Bauer G, Neitzel H, Schmitz B, Durner M, Johnson KJ, Janz D (1996) Common subtypes of idiopathic generalized epilepsies: lack of linkage to D20S19 close to candidate loci (EBN1, EEGV1) on chromosome 20. Am. J. Med. Genet. 67: 31-39

Steinlein O, Sander T, Stoodt J, Kretz R, Janz D, Propping P (1997) Possible association of a silent polymorphism in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha4 with common idiopathic generalized epilepsies. Am. J. Med. Genet. 74: 445-449

Steinlein O, Stoodt J, Biervert C, Janz D, Sander T (1999) The voltage gated potassium channel KCNQ2 and idiopathic generalized epilepsy. NeuroReport 10: 1163-1166

Kandidatengenregion 8q24

Sander T, Kretz R, Schulz H, Sailer U, Bauer G, Scaramelli A, Epplen JT, Riess O, Janz D (1998) Replication analysis of a putative susceptibility locus (EGI) for idiopathic generalized epilepsy on chromosome 8q24. Epilepsia 39: 715-720

Kandidatengenregion 15q14

Sander T, Schulz H, Vieira-Saeker AM, Bianchi A, Sailer U, Bauer G, Scaramelli A, Wienker TF, Saar K, Reis A, Janz D, Epplen JT, Riess O (1999) Evaluation of a putative major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q14. Am. J. Med. Genet. 88: 182-187

Kandidatengene *CACN1A4* und *CACNB4*

Sander T, Peters C, Janz D, Bianchi A, Bauer G, Wienker TF, Hildmann T, Epplen JT, Riess O (1998) The gene encoding the alpha1A-voltage-dependent calcium channel (CACN1A4) is not a candidate for causing common subtypes of idiopathic generalized epilepsy. Epilepsy Res. 29: 115-122

Escayg A, De Waard M, Lee DD, Wolf P, Mayer T, Baloh R, Sander T, Meisler MH (2000) Mutations of the human $ß_4$ subunit gene *CACNB4* in idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. Am. J. Hum. Genet. 66: 1531-1539

Systematische Genomanalyse bei idiopathisch generalisierten Epilepsien

Janz D, Beck-Mannagetta G, Sander T (1992) Do idiopathic generalized epilepsies share a common susceptibility gene? Neurology 42: 48-55

Sander T (1996) The genetics of idiopathic generalized epilepsy: implications for the understanding of its aetiology. Mol. Med. Today 2: 173-180

Sander T, Schulz H, Saar K, Gennaro E, Riggio C, Bianchi A, Zara F, Luna D, Bulteau C, Kaminska A, Ville D, Cieuta C, Picard F, Prud'homme J-F, Dulac O, Bate L, Sundquist A, Gardiner RM, Janssen AMAJ, de Haan G-J, Kasteleijn-Nolst-Trenité DGA, Bader A, Lindhout D, Riess O, Wienker TF, Janz D, Reis A (2000) Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. Hum. Mol. Genet. 9: 1465-1472

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Epidemiologische Genetik der Epilepsien

1.2 Idiopathisch generalisierte Epilepsien (IGE)

1.2.1 Klassifikation

1.2.2 Klinische Genetik

1.2.3 Vererbungsmodus

1.3 Positionelle Klonierung

1.4 Genstörungen bei monogenen idiopathischen Epilepsien

1.5 Kopplungsbefunde bei den genetisch komplexen IGE

1.6 Neurogenetische Hypothesen

2 Ergebnisse der molekulargenetischen Studien

2.1 Molekulargenetische Analysen bei der juvenilen myoklonischen Epilepsie

2.1.1 Feinkartierung des IGE-Locus *"EJM1"*

2.1.2 Kandidatengenanalyse des *GABA-BR1* Gens

2.1.3 Fazit

2.2 Molekulargenetische Analysen von Kandidatengenregionen

2.2.1 Kandidatengenregion 20q13

2.2.2 Kandidatengenregion 8q24

2.2.3 Kandidatengenregion 15q14

2.2.4 Kandidatengene *CACNA1A* und *CACNB4*

2.2.5 Fazit

2.3 Systematische Genomanalyse bei idiopathisch generalisierten Epilepsien

2.3.1 Studiendesign

2.3.2 Ergebnisse und Schlußfolgerungen

2.3.3 Fazit

2.3.4 Ausblick

3 Zusammenfassung

4 Literaturverzeichnis

5 Danksagung

1 Einleitung

1.1 Epidemiologische Genetik der Epilepsien

Das Krankheitsbild ″Epilepsie″ ist klinisch durch das wiederholte Auftreten ″unprovozierter″ epileptischer Anfälle gekennzeichnet, denen neurophysiologisch eine paroxysmal auftretende, synchronisierte zerebrale Erregungssteigerung zugrunde liegt. Epilepsie ist die häufigste chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems. Ca. 3% der Bevölkerung erkranken im Laufe ihres Lebens an einer Epilepsie, meistens jedoch nur vorübergehend. Die Punktprävalenz aktiver Epilepsien liegt bei 0,7% in den europäischen Ländern. Inklusive der häufigen epileptischen Gelegenheitsanfälle (Fieberkrämpfe, Alkoholentzugsanfälle, etc.) erleiden ca. 6% der Allgemeinbevölkerung mindestens einmal einen epileptischen Anfall. Aus den oft lebenslangen Erkrankungsverläufen und einer Therapieresistenz bei ca. 20% aller Betroffenen resultiert der bedeutende Stellenwert der Epilepsien in der neurologischen Praxis. Ein Schwerpunkt der wissenschaftlichen Forschung ist es deshalb, die molekularen Mechanismen der Epileptogenese aufzuklären, um effiziente Therapieansätze zur Epilepsie-Behandlung zu entwickeln und diese differentiell bei Epilepsie-Patienten einzusetzen.

Bei ca. 50% aller Epilepsien lassen sich exogene Faktoren (Hirntrauma, perinatale Hirnschädigung, Encephalitis, Hirnmißbildung, Tumor, etc.) als auslösende Ursache der Epilepsie ermitteln. Genetische Einflüsse spielen bei diesen symptomatischen Epilepsien eine untergeordnete Rolle. Die Ätiologie der übrigen Epilepsien erscheint überwiegend genetisch determiniert. Dies gilt besonders für die idiopathischen Epilepsien, bei denen eine exogene Ursache nicht eruierbar ist und epileptische Anfälle das einzige Erkrankungssymptom darstellen. Allerdings sind nur ca. 2% aller Epilepsien auf das Vorliegen eines einzelnen Gendefekts zurückzuführen. Bei der Mehrzahl genetisch determinierter Epilepsien sind mehrere genetische Faktoren an der Epileptogenese beteiligt. Die raschen Fortschritte in der Molekulargenetik erlauben es, die Genstörungen von genetisch determinierten Epilepsien zu identifizieren und deren molekulare Pathogenese aufzuklären. Die idiopathisch generalisierten

Epilepsien (IGE) bieten für molekulargenetische Forschungsansätze die besten Voraussetzungen.

1.2 Idiopathisch generalisierte Epilepsien

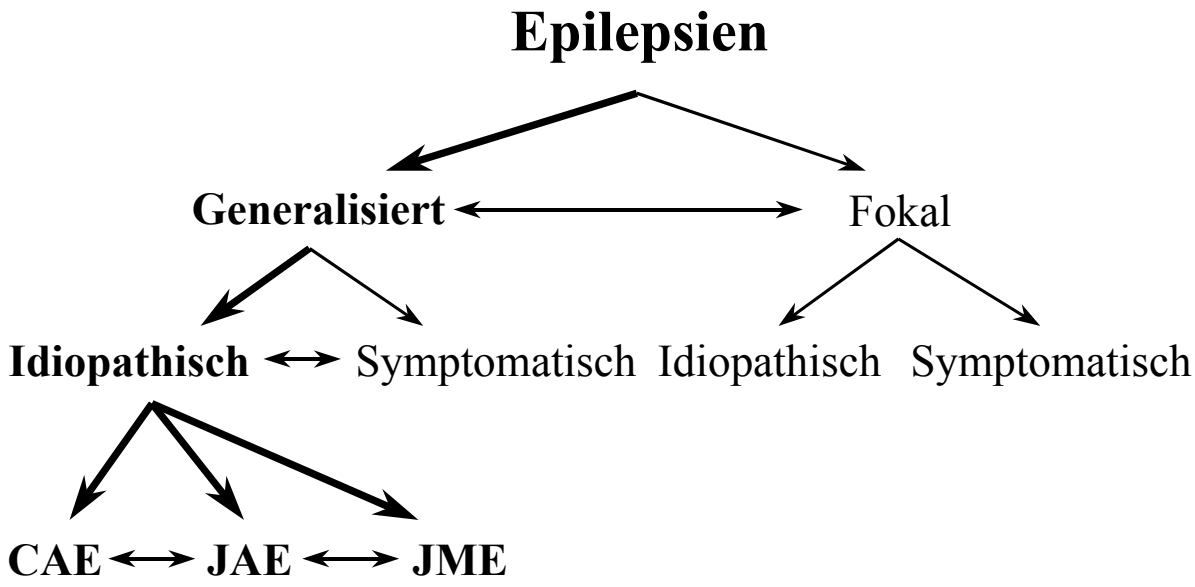
Die idiopathisch generalisierten Epilepsien (IGE) repräsentieren ca. 40% aller Epilepsien. Klinisch weisen das Anfallsbild und das Elektroencephalogramm (EEG) auf einen bilateral synchronen Beginn der zerebralen Erregungssteigerung in beiden Hirnhemisphären hin. Elektroencephalographisch finden sich generalisierte spike-wave Komplexe während der Anfälle. Abgesehen von epileptischen Anfällen sind IGE-Patienten neurologisch unauffällig, und ihre psychomotorische Entwicklung verläuft normal. Neurophysiologisch liegt der generalisierten zerebralen Erregungssteigerung eine Aktivierung thalamo-cortico-thalamischer Erregungsbahnen zugrunde, die durch synchronisierte Entladungssalven von Neuronen im Nucleus reticularis thalami initiiert werden (Avanzini et al., 1999). Pharmakologische Studien deuten auf eine besondere Rolle von T-Typ Kalziumströmen bei der Generierung von exzitatorischen Erregungssalven in den Neuronen des Nucleus reticularis thalami (Tsakiridou et al., 1995).

1.2.1 Klassifikation

Die aktuelle Klassifikation der Internationalen Liga Gegen Epilepsie (ILAE) unterscheidet sieben IGE-Syndrome anhand des Anfallstyps, des Manifestationsalters und des Erkrankungsverlaufs (Commission on Terminology and Classification, 1989). Die vorliegenden molekulargenetischen Analysen befassen sich mit den drei häufigsten IGE-Syndromen (Abb. 1): der Absence-Epilepsie des Kindesalters (CAE), der juvenilen Absence-Epilepsie (JAE) und der juvenilen myoklonischen Epilepsie (JME) (Janz, 1997). Die typische Anfallsform der idiopathischen Absence-Epilepsien (CAE, JAE) ist eine kurze, scharf

abgegrenzte Bewußtseinsunterbrechung während der der Patient in seiner Tätigkeit innehält. Der Erkrankungsbeginn der CAE liegt zwischen dem 2. und 12. Lebensjahr und ist durch häufige Absencen (> 10/Tag; pyknoleptische Absencen) gekennzeichnet. Bei der JAE treten Absence-Anfälle eher sporadisch auf. Der Erkrankungsbeginn liegt zwischen dem 8. und 20. Lebensjahr. Die JME ist durch bilaterale Myoklonien meist der Schultern und Arme charakterisiert, die das Bewußtsein nicht merklich beeinträchtigen. Der Erkrankungsbeginn liegt zwischen dem 8. und 26. Lebensjahr. Sowohl die Absence-Anfälle, aber besonders die myoklonischen Anfälle, treten tageszeitlich gehäuft nach dem Erwachen auf. Wegen des zeitlich aufeinander folgendenden Auftretens von Absencen und myoklonischen Anfällen bei ca. 20% der IGE-Patienten und dem gemeinsamen Vorkommen von CAE, JAE und JME in Familien werden diese IGE-Syndrome des Kindes- und Jugendalters auch als ein neurobiologisches Spektrum aufgefaßt (Berkovic et al., 1987; Janz et al., 1992).

Abb. 1: Klassifikation der IGE des Kindes- und Jugendalters.



CAE: Absence-Epilepsie des Kindesalters;
JAE: juvenile Absence-Epilepsie;
JME: juvenile myoklonische Epilepsie.

1.2.2 Klinische Genetik

Zwillings- und Familienstudien belegen, daß die Ätiologie der IGE vorwiegend genetisch determiniert ist (Übersicht in: Sander, 1996). Konkordanzraten von 80% bei eineiigen Zwillingen und von 5-15% bei zweieiigen Zwillingen sind jedoch auch hinweisend für die Beteiligung mehrerer genetischer Faktoren (Berkovic et al., 1998). Da konkordante eineiige Zwillinge stets den gleichen IGE-Subtyp aufweisen, während die Subtypen bei konkordanten zweieiigen Zwillingen häufig variieren, ist ebenfalls von einer genetischen Determinierung der einzelnen IGE-Syndrome auszugehen (Berkovic et al., 1998). Das familiäre Wiederholungsrisiko beträgt bei erstgradigen Verwandten ca. 5-10% (Beck-Mannagetta und Janz, 1991; Schmitz et al., 2000). Bei mehr als 90% der erkrankten Familienangehörigen finden sich wieder IGE-Syndrome und ca. 20-50% der Erkrankten weisen den gleichen IGE-Subtyp wie der Index-Patient auf (Beck-Mannagetta und Janz, 1991; Schmitz et al., 2000). Generalisierte ″spike and wave″ Entladungen sind regelmäßig im Elektroencephalogramm (GSW-EEG) von IGE-Patienten und bei ca. 10-30% ihrer klinisch gesunden Familienangehörigen ersten Grades nachweisbar (Pedley, 1991). Das GSW-EEG könnte demnach eine subklinische Manifestation der genetischen Störungen darstellen.

1.2.3 Vererbungsmodus

Der Vererbungsmodus der häufigen IGE entspricht keinem einfachen Mendelschen Erbgang. Mehrere genetische Faktoren scheinen bei der Epileptogenese der IGE beteiligt zu sein (Greenberg et al., 1992). Die Anzahl und Zusammensetzung der beteiligten genetischen Faktoren sowie die Einflußgröße der Einzelfaktoren variieren zwischen den IGE-Erkrankten beträchtlich. Nur bei wenigen IGE-Erkrankten deutet das familiäre Vererbungsmuster auf eine Disposition durch einen einzelnen genetischen Faktor. Bei Familien mit mehreren IGE-Erkrankten ist die Beteiligung einiger weniger Genstörungen anzunehmen (oligogene Vererbung). Bei Familien mit sporadischen IGE-Erkrankten ist das Vorliegen einer polygenen Disposition am wahrscheinlichsten. Dabei sind eine Vielzahl von Genvarianten mit geringem

pathogenetischen Einfluß an der Epileptogenese beteiligt. Die genetische Disposition bei IGE-Erkrankten stellt demnach ein genetisches Spektrum in Bezug auf die Effektstärke des bedeutendsten genetischen Faktors dar. Für molekulargenetische Studien sind Familien mit mehreren IGE-Erkrankten besonders aussichtsreich, da hier das Vorliegen eines Hauptgeneffekts angenommen werden kann. Aufgrund der klaren Phänotyp-Genotyp Beziehung bei den IGE mit monogenem Erbgang konnten hier bereits Genmutationen identifiziert werden (Übersicht in: McNamara, 1999). Es besteht ebenfalls die Aussicht, daß sich durch das molekulargenetische Verfahren der positionellen Klonierung die bedeutendsten Genvarianten bei den IGE-Syndromen mit komplexer genetischer Disposition ermitteln lassen.

1.3 Positionelle Klonierung

Zur positionellen Klonierung von Erkrankungsgenen wird zuerst die chromosomale Region der verantwortlichen Genstörung bestimmt, darauffolgend werden potentielle Erkrankungsgene in der Kandidatengenregion kloniert und die verantwortliche Genmutation durch Sequenzierung ermittelt. Die chromosomale Kartierung von Erkrankungsgenen erfolgt durch Kopplungsanalysen in Familienstudien. Das Prinzip der Kopplungsanalyse basiert auf einem strukturellen Umbau der Chromosomen durch den Austausch homologer Chromosomenabschnitte während der Keimzellbildung. Aufgrund der linearen Anordnung der Gene auf der chromosomalen DNS werden nur dicht nebeneinander liegende Genorte eines Chromosoms gemeinsam (physikalisch gekoppelt) vererbt. Die Austauschhäufigkeit zwischen zwei Genorten eines Chromosoms stellt ein Maß für deren positionellen Entfernung dar. Bei der molekulargenetischen Kopplungsanalyse erfolgt die Lokalisation des Erkrankungsgens durch den statistischen Nachweis einer gemeinsamen familiären Vererbung mit einem genetischen Markerpolymorphismus, dessen chromosomale Position bekannt ist. Als Standardverfahren der statistischen Kopplungsanalyse gilt die Lod score Methode (Lathrop & Lalouel, 1984), die als parametrisches Verfahren die Festlegung eines Erbgangs voraussetzt und ideal bei den monogenen Erbkrankheiten eingesetzt werden kann. Die Kopplungsevidenz wird als dekadischer Logarithmus des Quotienten der Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung

zwischen dem genetischen Marker und dem Erkrankungsmerkmal im Verhältnis zu der Wahrscheinlichkeit gegen eine Kopplung angegeben. Ein Verhältnis von 1000 : 1 zugunsten einer Kopplung entspricht einem Lod score von Z = 3, welcher als signifikanter Kopplungshinweis bei monogenen Erkrankungen akzeptiert wird. Da bei Erkrankungen mit komplexer genetischer Disposition ein Erbgang nicht eindeutig festlegbar ist, werden hier parameter-freie Analyseverfahren bevorzugt. Angewandt werden Testmethoden, die auf einem Häufigkeitsvergleich von gemeinsamen elterlichen Chromosomenabschnitten bei erkrankten Geschwistern beruhen (″affected sibpair″ Analysen). Voraussetzung für die systematische Suche nach einem Erkrankungsgen ist die Kartierung der menschlichen Chromosomen mit genetischen Marker-Polymorphismen. Derzeit verfügen die Marker-Karten über ein Auflösungsvermögen von durchschnittlich einem centiMorgan (1 cM entspricht ungefähr einer Million Basenpaare) (Dib et al., 1996). Die positionelle Klonierung von Genstörungen bei Erkrankungen mit einfachem Mendelschen Erbgang ist heutzutage ein Routineverfahren. Eine Herausforderung stellt noch die Aufklärung von Erkrankungen mit genetisch komplexer Disposition dar. Hier ergeben sich zahlreiche analytische Probleme, die die statistische Erfassung einzelner genetischer Determinanten erschweren. Von besonderer Bedeutung sind die komplexe genetische Disposition und die genetische Heterogenität, da Kopplungsanalysen nur häufige Hauptgeneffekte erfassen können (Lander & Schork, 1994). Infolge der komplexen genetischen Disposition ist vor allem bei kleineren Familien nicht erkennbar, ob ein Hauptgeneffekt an der Erkrankungsentstehung beteiligt ist, oder ob eine polygene Dispostion vorliegt. Bei der genetischen Heterogenität wird eine Erkrankung durch verschiedene Gene mit unterschiedlicher chromosomaler Lokalisation bedingt, ohne daß dies à priori durch klinische Hinweise differenzierbar ist. Durch die raschen Fortschritte der Molekulargenetik und die Verbesserung analytischer Methoden werden die Voraussetzungen geschaffen, auch bei den genetisch komplexen Erkrankungen, die beteiligten genetischen Determinanten zu ermitteln.

1.4 Genstörungen bei monogenen idiopathischen Epilepsien

Durch die positionelle Klonierung von Genstörungen bei einigen idiopathischen Epilepsien mit monogenem Erbgang fanden sich erste Anhaltspunkte, daß Mutationen in Genen von Ionenkanälen zur Epileptogenese beitragen (Tab. 1) (Cooper & Jan, 1999). Allerdings beschränken sich diese Befunde noch auf einige wenige Großfamilien mit autosomal dominant vererbten idiopathischen Epilepsien. Bei zwei Familien mit autosomal dominanter nächtlicher Frontallappen-Epilepsie fanden sich Mutationen im Gen der α_4-Untereinheit des neuronalen Acetylcholin-Rezeptors (*CHRNA4*, 20q13), bei den benignen familiären Neugeborenenanfällen wurden Mutationen in den Genen von zwei spannungsabhängigen Kaliumkanälen (*KCNQ2*, 20q13; *KCNQ3*, 8q24) ermittelt, und bei einer Familie mit generalisierten und febrilen Anfällen wurde eine Genstörung eines Natriumkanals (*SCN1B*, Chromosom 19q13.1) identifiziert (Übersicht in: McNamara, 1999). Ebenfalls bei vier Mausmutanten mit autosomal-rezessiv vererbter Absence-Epilepsie (*tottering*, *lethargic*, *stargazer* und die *slow wave* Mutante) fanden sich Genmutationen bei drei Untereinheiten neuronaler Kalziumkanäle (*Cch1a, Cchb4, Cacng2*) sowie bei einem Natrium-Hydrogen Ionenaustauscher (*Nhe1*) (Übersicht in: Puranam & McNamara, 1999). Es ist davon auszugehen, daß die Mutationen von Ionenkanalgenen Sonderfälle repräsentieren, bei denen eine besonders schwerwiegende Störung an einer kritischen Stelle der Erregungsbildung oder -ausbreitung im Gehirn die Manifestation eines Einzelfaktors zuläßt. Diese wegweisenden Schlüsselbefunde erlauben erste konkrete Einblicke in die funktionellen Störungen bei der Epileptogenese (Steinlein, 1998; McNamara, 1999). Es bleibt vorerst jedoch unklar, inwieweit vergleichbare genetische Funktionsstörungen an der Pathogenese der genetisch komplexen IGE beteiligt sind.

Tab. 1: Genmutationen bei monogenen idiopathischen Epilepsien

idiopathische Epilepsien	Erbgang	Locus	Genort	Gen
Benigne familiäre	AD	*EBN1*	20q13.3	*KCNQ2*
Neugeborenenanfälle	AD	*EBN2*	8q24	*KCNQ3*
Autosomal dominante nächtliche Frontallappenepilepsie	AD	*ADNFLE*	20q13.3	*CHRNA4*
Generalisierte Epilepsien mit Fieberkrämpfen	AD	*GEFS+1*	19q13.3	*SCN1B*

AD: autosomal dominant
CHRNA4: Gen der α_4-Untereinheit des nikotinergen Acetylcholinrezeptors;
KCNQ2, *KCNQ3*: Gene spannungsabhängiger Kaliumkanäle;
SCN1B: Gen der β_1-Untereinheit von spannungsabhängigen Natriumkanälen.

1.5 Kopplungshinweise bei den genetisch komplexen IGE

Kopplungsstudien bei häufigen IGE-Syndromen haben zur Lokalisation einer Reihe von potentiellen Erkrankungsloci geführt (Tab. 2), die in der Mehrzahl als ungenügend bestätigt gelten und derzeit noch kontrovers diskutiert werden (Übersicht in: Gardiner, 1999). Erkrankungsloci wurden für die JME in den chromosomalen Regionen 6p21.3 (*EJM1*) (Greenberg et al., 1988, 1995, 2000; Durner et al., 1991; Sander et al., 1995, 1997), 6p11 (Serratosa et al., 1996; Liu et al., 1996) und 15q14 (Elmslie et al., 1997) kartiert. In einem Kollektiv von Familien mit CAE-Erkrankten und in Familien mit IGE-Erkrankten wurden Erkrankungsloci in der chromosomal Region 8q24 identifiziert (Zara et al., 1995; Fong et al., 1998). In Familien mit IGE-Erkrankten, aber ohne JME-Angehörige, fand sich ein signifikanter Kopplungsbefund mit dem chromosomalen Segment 8p11 (Durner et al., 1999). Bisher konnte bei keiner der aufgeführten Kandidatenregionen eine verantwortliche Genveränderung ermittelt werden. Die Hauptgründe für die noch ungeklärten und scheinbar widersprüchlichen Befunde sind die komplexe genetische Ätiologie der häufigen IGE und die

genetische Heterogenität der beteiligten Hauptgeneffekte (Lander & Schork, 1994), deren Bedeutung und Ausmaß derzeit nicht sicher eingeschätzt werden können. Anhand klinischer Kriterien lassen sich keine eindeutigen Phänotyp-Genotyp Beziehungen ableiten, so daß die bisherigen Kopplungsstudien als explorative Analysen durchgeführt wurden. Simulationsstudien deuten darauf hin, daß wesentlich größere Familienkollektive, als bisher untersucht, nötig sein werden, um komplexe genetische Einflüsse und deren interaktives Zusammenspiel erfassen zu können (Goldin et al., 1991; Badner et al., 1998). Solche Projekte können nur im Rahmen multizentrischer und multidisziplinärer Kollaborationen realisiert werden. Eine Voraussetzung dafür ist die exakte Erfassung der Epilepsie-Phänotypen anhand definierter Forschungskriterien, die eine uniforme und differenzierte Klassifikation des Erkrankungsmodells gestatten. Diese Rahmenbedingungen wurden von unserer Forschergruppe durch die Konstitution des ″European Consortiums on the Genetics of Idiopathic Generalised Epilepsy″ geschaffen.

Tab. 2: Kopplungshinweise bei IGE mit komplexer genetischer Disposition

IGE-Syndrom	Erbgang	Erkrankungslocus	Kandidatengen
IGE und FC	AR	8q24 (*EGI*)	unbekannt
CAE	AR	8q24	unbekannt
IGE ohne JME	AR	8p11	*CHRNB3 ?*
JME	AD	6p21.3 (*EJM1*)	*GABA-BR1 ?*
	AD	6p11 (*EJM2*)	unbekannt
	AR	15q14 (*EJM3*)	*CHRNA7 ?*

AD: autosomal dominant; AR: autosomal rezessiv;
FC: Fieberkrämpfe
CHRNB3: Gen der $ß_3$ Untereinheit des neuronalen, nikotinergen Acetylcholin Rezeptors;
CHRNA7: Gen der α_7 Untereinheit des neuronalen, nikotinergen Acetylcholin Rezeptors;
GABA-BR1: Gen der R1-Untereinheit des $GABA_B$ Rezeptors

1.6 Neurogenetische Hypothesen

Die häufigen IGE-Syndrome (CAE, JAE und JME) sind als Prototypen einer Erkrankung mit komplexer genetischer Disposition für molekulargenetische Studien besonders geeignet, aufgrund:

1) ihrer klinisch eindeutigen Charakterisierung;
2) ihrer nahezu ausschließlichen genetischen Ätiologie;
3) dem fehlenden Anhalt für exogene Einflüsse;
4) dem Vorkommen von charakteristischen EEG-Veränderungen als neurophysiologische Determinante.

Die genetische Disposition dieser IGE-Syndrome wird durch das interaktive Zusammenspiel mehrerer genetischer Faktoren bestimmt. Es ist anzunehmen, daß die Anzahl und Effektstärke von Einzelfaktoren interindividuell stark variieren. Familien mit mehreren erkrankten Angehörigen bieten die besten Chancen für die Erfassung von häufigen Hauptgeneffekten (Goldin et al., 1991; Badner et al., 1998). Das häufige, zeitlich aufeinanderfolgende Auftreten von Absence-Anfällen und bilateralen myoklonischen Anfällen bei ca. 20% der IGE-Patienten sowie das gemeinsame familiäre Vorkommen von CAE, JAE und JME deuten auf das Vorliegen einer gemeinsamen genetischen Disposition hin. Das Ziel der vorliegenden molekulargenetischen Studien ist es, genetische Faktoren der IGE chromosomal zu lokalisieren, um ihre positionelle Klonierung zu ermöglichen. Durch die Funktionsanalyse der ermittelten Genstörungen werden die Grundlagen geschaffen, die molekularen Mechanismen der Epileptogenese aufzuklären.

2 Ergebnisse der molekulargenetischen Studien

2.1 Molekulargenetische Analysen bei der juvenilen myoklonischen Epilepsie

Die juvenile myoklonische Epilepsie (JME) repräsentiert ca. 7% aller Epilepsien. Das Erkrankungsbild ist gekennzeichnet durch bilaterale Myoklonien in den Schultern und Armen ohne Einschränkung des Bewußtseins (Janz, 1997). Die myoklonischen Anfälle beginnen zwischen dem 8. und 26. Lebensjahr und ereignen sich tageszeitlich vorwiegend nach dem Aufwachen. Ca. 30% der Patienten haben zusätzlich Absencen und in 95% Aufwach-Grand mal. Das familiäre Wiederholungsrisiko für Epilepsien beträgt bei erstgradigen Verwandten ca. 5% (Beck-Mannagetta & Janz, 1991). Bei mehr als 90% der erkrankten Familienangehörigen finden sich erneut IGE-Syndrome. Davon erkranken ca. 30% wiederum an einer JME und weitere 30% an einer CAE oder JAE (Beck-Mannagetta & Janz, 1991; Schmitz et al., 2000). Die JME ist aufgrund ihrer eindeutigen klinischen Charakterisierung, der ausschließlich genetischen Ätiologie und der neurogenetischen Überschneidung mit anderen IGE-Syndromen für die molekulargenetische Identifizierung von häufigen IGE-Genen besonders geeignet.

Bereits 1988 publizierten Greenberg & Mitarb. eine signifikante Kopplung von JME sowie assoziierten IGE und generalisierten EEG-Paroxysmen mit Proteinmarkern in der chromosomalen Region des *HLA*-Komplexes (Chromosomenabschnitt 6p21.3). Unsere molekulargenetischen Kopplungsstudien konnten diesen Kopplungsbefund mit DNS-Markern im Bereich des *HLA-DQ* Locus bestätigen (Durner et al., 1991; Sander et al., 1995, 1997, 2000). In unserer ersten Studie waren 21 Familien von JME-Patienten mit 143 Familienangehörigen eingeschlossen worden (Durner et al., 1991). Bei 122 Familienmitgliedern wurden zwei Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) im Bereich des *HLA-DQ* Locus genotypisiert. Ein signifikanter Kopplungsbefund (Z_{max} = 3,9 am *HLA-DQ* Locus) fand sich unter der Annahme eines autosomal dominanten Erbgangs mit 70% Penetranz, wenn Familienangehörige mit unprovozierten generalisierten Anfällen als Merkmalsträger einer IGE klassifiziert wurden. Unter Einbeziehung des GSW-EEG als

subklinisches Erkrankungsmerkmal lag die maximale Kopplungsevidenz geringfügig höher (Z_{max} = 4,1), jedoch zeigte der Anstieg der Rekombinationfraktion an, daß nicht alle GSW-EEG Träger einer engen Kopplung mit dem *HLA*-Locus folgten und wahrscheinlich eine genetische Heterogenität für dieses häufige EEG-Merkmal (Prävalenz: 2,7%) vorliegt (Pedley, 1991). In der jüngsten Studie von Greenberg & Mitarb. (2000) wurde der Kopplungsbefund zwischen JME-assoziierten IGE und dem *HLA*-Locus bestätigt, wenn eine vorwiegend maternale Vererbung des Erkrankungsgens angenommen wurde. Die signifikanten Kopplungsbefunde beider Arbeitsgruppen bestätigen übereinstimmend einen IGE-Locus in der chromosomalen Region 6p21.3, der zu einem breiten IGE-Spektrum in Familien von JME-Patienten disponiert. Aufgrund unserer unabhängigen Bestätigung wurde diesem IGE-Locus das Locus-Symbol *"EJM1"* zuerkannt. Zusätzlich konnten Greenberg & Mitarb. (1995) zeigen, daß Familien von Angehörigen mit Aufwach-Grand mal eine Kopplung zur *HLA*-Region aufwiesen, während Familien von Angehörigen mit Grand mal ohne tageszeitliche Bindung keinen Anhalt für eine Kopplung zur *HLA*-Region zeigten. Diese Befunde implizieren, daß der *EJM1*-Locus an der Epileptogenese eines breiten IGE-Spektrums von JME, Absence-Epilepsien und Epilepsien mit Aufwach-Grand mal beteiligt ist. Weitere Bestätigung erhielt der *EJM1*-Locus durch den Nachweis einer allelischen Assoziation von JME mit *HLA-DR13* bzw. *HLA-DRw6* in drei unabhängigen Studienkollektiven (Durner et al., 1992; Obeid et al., 1994; Greenberg et al., 1996). Da bisher kein Anhalt für eine HLA-vermittelte Pathogenese bei den IGE vorliegt, sprechen die Assoziationsbefunde für ein Erkrankungsgen, das in unmittelbarer Nähe des *HLA-DR* Locus lokalisiert ist.

Zur Eingrenzung des phänotypischen Spektrums des *EJM1*-Locus führten wir Kopplungsanalysen mit zwei RFLPs am *HLA-DQ* Locus in 44 Familien von Probanden mit JAE oder CAE durch (Sander et al., 1995). Die parametrischen Kopplungsanalysen ergaben keinen Hinweis auf eine Kopplung ($Z < -2$) für eine Region von 10 cM beiderseits des *HLA-DQ* Locus beim gesamten Familienkollektiv. Ein Kopplungshinweis fand sich allein in einer Untergruppe von 14 Familien, in denen auch ein Familienangehöriger an einer JME erkrankt war. Unter der Annahme eines autosomal dominanten Erbgangs mit 70% Penetranz lag die maximale Kopplungsevidenz (Z_{max} = 1,91) ca. 5 cM vom *HLA-DQ* Locus entfernt, wenn

unprovozierte generalisierte Anfälle als Erkrankungsmerkmal klassifiziert wurden. Der *EJM1*-Locus ist demnach an der Pathogenese eines breiten Spektrums von IGE-Syndromen beteiligt, jedoch ist dazu ein genetischer Hintergrund erforderlich, der an die Manifestation einer JME gebunden ist. Das *EJM1*-assoziierte phänotypische Spektrum umfaßt IGE-Syndrome mit adoleszenten Erkrankungsbeginn, bei denen eine tageszeitliche Bindung der Anfälle während der Aufwach-Phase vorliegt. Bei Absence-Epilepsie Familien ohne JME-Angehörige spielte in unserer Studie der *EJM1*-Locus keine bedeutsame Rolle. Diese Befunde belegen eine genetische Heterogenität bei den idiopathischen Absence-Epilepsien. Diese Annahme wird durch den Nachweis von zwei weiteren Erkrankungsloci auf dem Chromosom 8 erhärtet. Bei Familien mit adoleszenten IGE-Syndromen (JAE, Epilepsie mit Grand mal), aber ohne JME-Familienmitglieder, fand sich eine signifikante Kopplung mit der chromosomalen Region 8p11 (Durner et al., 1999). In Familien mit persistierender CAE wurde eine Kopplung mit dem chromosomalen Segment 8q24 nachgewiesen (Fong et al., 1998).

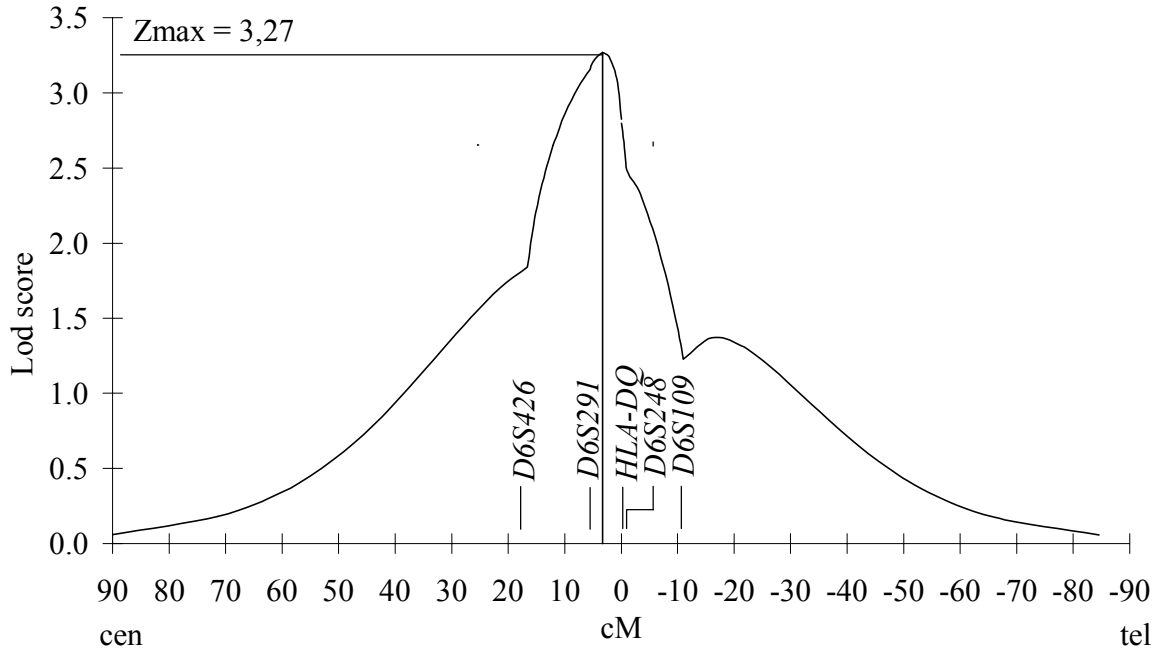
Bei der genetischen Disposition der JME ist ebenfalls von einer genetischen Heterogenität auszugehen. Weitere signifikante Kopplungshinweise für JME-assoziierte Epilepsien fanden sich in den chromosomalen Regionen 6p11 (*EJM2*) (Serratosa et al., 1996; Liu et al., 1996) und auf dem Chromosomenabschnitt 15q14 (*EJM3*) im Bereich des Gens der α_7 Untereinheit des neuronalen, nikotinergen Acetylcholinrezeptors (*CHRNA7*) (Elmslie et al., 1997). In den untersuchten Familien waren zuvor keine Kopplungshinweise mit dem *EJM1*-Locus gefunden worden (Whitehouse et al., 1993; Liu et al., 1996; Elmslie et al., 1996). Die Phänotyp-Genotyp Beziehung beider Studien unterscheidet sich jedoch von den Studien, die zur Kartierung des *EJM1*-Locus führten. In der Studie von Liu & Mitarb. (1996) wurden mittelamerikanische Familien von JME-Probanden untersucht, in denen keine Epilepsien mit pyknoleptischen Absencen (CAE) auftraten oder keine für die CAE typischen 3 Hz spike-wave EEG-Erregungsmuster vorlagen. Dieser phänotypische Unterschied veranlaßte die Autoren, diese JME-Sonderform als ″klassisches JME″ zu bezeichnen. In der Studie von Elmslie & Mitarb. (1997) war nur der JME-Phänotyp mit der chromosomalen Region 15q14 gekoppelt. Zwei Studien konnten den Kopplungshinweis in der Region 15q14 bei unabhängigen Familienkollektiven nicht bestätigen (Sander et al., 1999; Durner et al., 2000). Obwohl es

nicht auszuschließen ist, daß einige der publizierten Kopplungsevidenzen bei JME-assoziierten Epilepsien falsch-positive Kopplungsbefunde darstellen, ist der Kopplungshinweis in der Region 6p21.3, aufgrund seiner Bestätigung in drei unabhängigen Familienkollektiven, als der IGE-Locus mit der fundiertesten Kopplungsevidenz anzusehen. Für die Auswahl von funktionell plausiblen Kandidatengenen für den *EJM1*-Locus ist dessen chromosomale Feinkartierung eine wichtige Voraussetzung.

2.1.1 Feinkartierung des IGE-Locus *"EJM1"*

Zur molekulargenetischen Feinkartierung des *EJM1*-Locus in der chromosomalen Region 6p21.3 führten wir eine Kopplungsanalyse in 29 deutschen Familien von JME-Patienten durch (Sander et al., 1997). Insgesamt wurden 277 Familienangehörige in die Untersuchung eingeschlossen, von denen 209 Personen für 16 DNS-Polymorphismen im chromosomalen Segment 6p25 bis 6q13 genotypisiert wurden. In den Zweipunkt-Analysen fand sich eine signifikante Kopplung (Z_{max} = 3,08) am *HLA-DQ* Locus unter der Annahme eines autosomal dominanten Erbgangs mit 70% Penetranz. In dem Erkrankungsmodell wurden alle Familienangehörigen mit unprovozierten generalisierten Anfällen als "betroffen" klassifiziert. Die Mehrpunktanalyse im Bereich der *HLA*-Region ergab einen signifikanten Kopplungshinweis (Z_{max} = 3,27) etwa 3 cM centromer vom *HLA-DQ* Locus entfernt (Abb. 2).

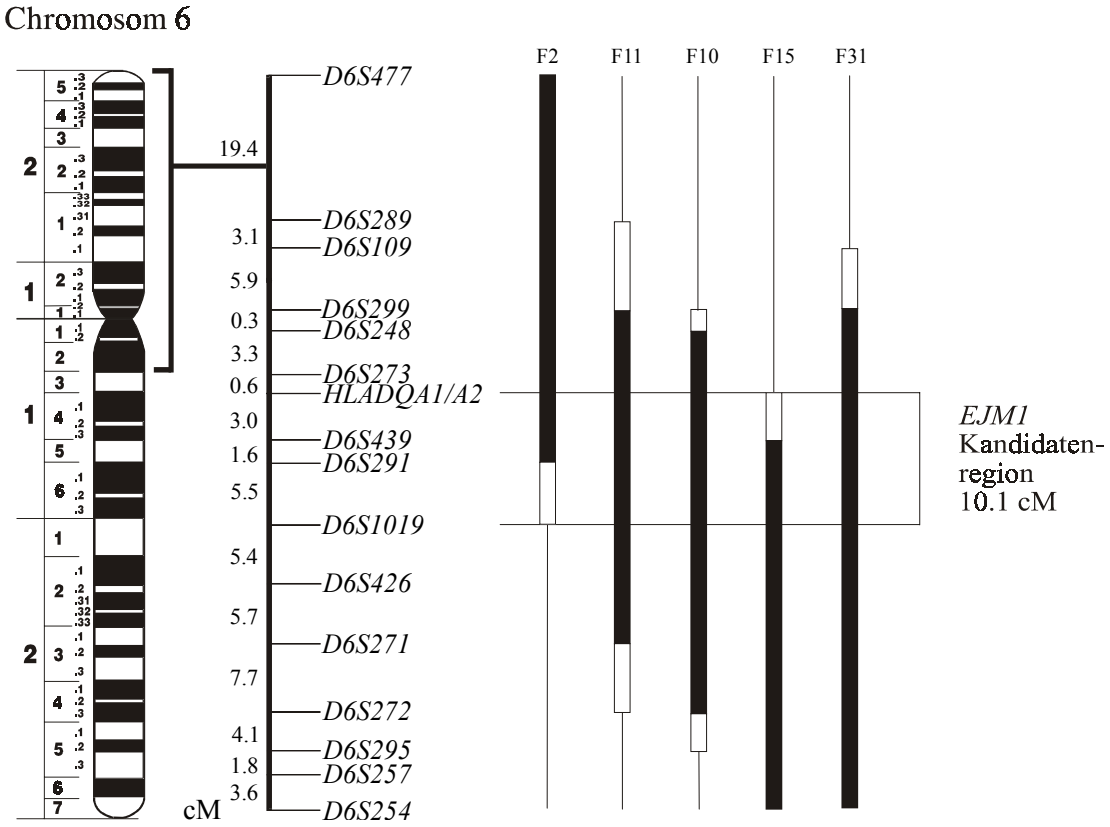
Abb. 2: Kopplungsevidenz des *EJM1*-Locus in der chromosomalen Region 6p21.3.



Der Homogenitätstest zeigte keinen statistischen Anhalt für das Vorliegen einer genetischen Heterogenität. Unter der Annahme von genetischer Homogenität erfolgte eine Haplotypanalyse bei Familien mit zwei oder mehr erkrankten Angehörigen. Eindeutige Rekombinationen zwischen erkrankten Familienangehörigen fanden sich in fünf Familien. Der Vergleich der mit der Erkrankung ko-segregierenden Chromosomensegmente wies auf ein gemeinsames Fragment von 10 cM Länge, das centromerwärts durch den Marker *D6S1019* und telomerwärts durch den *HLA-DQ* Locus flankiert wird (Abb. 3). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Eingrenzung dieser Kandidatengenregion für den *EJM1*-Locus auf der spekulativen Annahme einer genetischen Homogenität dieser fünf Familien basiert. Wegen dieser unbelegten Vermutung sollten auch Gene im angrenzenden Bereich der Kandidatenregion bei der Auswahl von Kandidatengenen einbezogen werden. Da Mutationen in Genen, die neuronale Ionenströme regulieren, als Ursache monogener idiopathischer Epilepsien und anderer monogener paroxysmaler Störungen identifiziert wurden (Cooper & Jan, 1999; McNamara,

1999; Ryan, 1999), wurden diese Gene bei der Kandidatengenauswahl in der *EJM1*-Region besonders berücksichtigt. Das positionell und funktionell aussichtsreichste Kandidatengen ist das Gen der *GABA-BR1* Untereinheit des $GABA_B$ Rezeptors. Dieses erst kurz zuvor klonierte Gen (Kaupmann et al., 1997) wurde von uns für eine systematische Mutationsanalyse ausgewählt.

Abb. 3: Feinkartierung des *EJM1*-Locus in der chromosomalen Region 6p21.3.



Genetische Karte von 16 Mikrosatelliten-Polymorphismen in der chromosomalen Region 6p25-6q13. Der schwarze Balken zeigt chromosomale Segmente an, die mit dem *EJM1*-Locus ko-segregieren. Der weiße Balken weist auf die Region, in der Rekombinationsereignisse stattgefunden haben.

2.1.2 Mutationsanalyse des *GABA-BR1* Gens

Das Gen der *GABA-BR1* Untereinheit des heterodimeren $GABA_B$ Rezeptors befindet sich am telomerwärtigen Ende des von uns eingegrenzten Kandidatengenbereichs für den *EJM1*-Locus (Peters et al., 1998). Pharmakologische und tierexperimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, daß der $GABA_B$ Rezeptor an der neurophysiologischen Entstehung von GSW-Entladungen beteiligt ist (Hosford, 1995; Bowery et al., 1999; Charpier et al., 1999). Der $GABA_B$ Rezeptor generiert über eine G-Protein vermittelte Aktivierung von Kaliumkanälen inhibitorische, postsynaptische Potentiale. Präsynaptisch beeinflussen $GABA_B$ Rezeptoren die Neurotransmitterausschüttung. Während der Initiierung von Absence-Anfällen induzieren $GABA_B$ Rezeptoren eine Deaktivierung von T-Typ Kalziumkanälen, durch die synchronisierte Erregungssalven in thalamischen Neuronen angestoßen werden, die ihrerseits zu einer synchronisierten Aktivierung von thalamo-cortico-thalamischen Erregungsschleifen führen (Hosford, 1995; Tsakiridou et al., 1995). Das *GABA-BR1* Gen ist somit ein positionell und funktionell plausibles Kandidatengen für den *EJM1*-Locus.

Nach Aufklärung der genomischen Organisation des *GABA-BR1* Gens führten wir mittels der ″Single Strand Confirmation Analysis″ (SSCA) eine systematische Mutationssuche der kodierenden Sequenzabschnitte und der Exon-Intron Übergänge des *GABA-BR1* Gens durch. Untersucht wurden 18 JME-Patienten aus Familien mit positiver Kopplungsevidenz zum *HLA-DQ* Locus (kumulativer Lod score: Z = 3.17). Dabei wurden 3 häufige Sequenzpolymorphismen in den Exon 1a1, 7 und 11 identifiziert. Die Sequenzpolymorphismen in Exon 1a1 (Ala20Val) und Exon 7 (Gly489Ser) bedingen einen Aminosäurenaustausch und könnten funktionelle Bedeutung haben. Unsere Assoziationsstudie bei 118 IGE-Patienten (72 JME, 46 CAE oder JAE) und 130 gesunden Kontrollen ergab keinen Hinweis auf eine allelische Assoziation für diese drei exonischen Polymorphismen ($P >$ 0,05), weder in der Gesamtgruppe der 118 IGE-Patienten, noch in den zwei Untergruppen von 72 JME-Patienten und 46 Patienten mit CAE oder JAE. Ein Anhalt für einen häufigen und bedeutsamen Effekt des *GABA-BR1* Gens bei der Epileptogenese der IGE besteht deshalb nicht. Da bisher die regulatorischen Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region nicht

untersucht wurden, ist eine pathogenetische Beteiligung des *GABA-BR1* Gens noch nicht ausgeschlossen. Da in der Zwischenzeit die genomische Sequenzierung des Chromosomenabschnittes 6p21 weit fortgeschritten ist, ist mit der Identifizierung weiterer interessanter Kandidatengene in der von uns eingegrenzten Kandidatengenregion zu rechnen. Erst der Nachweis einer IGE-bedingenden Genmutation wird den Kopplungsbefund in der chromosomalen Region 6p21.3 bestätigen können.

2.1.3 Fazit

Zusammengefaßt entsprechen die vorliegenden Kopplungsbefunde der Erwartung, daß mehrere Hauptgeneffekte an der genetisch komplexen Disposition von JME-assoziierten IGE beteiligt sind. Weitere Studien sind erforderlich, um die Validität dieser IGE-Loci zu überprüfen. Angesichts der genetischen Heterogenität der IGE sind multizentrische Studien erforderlich, um die einzelnen Hauptgeneffekte mit ausreichender statistischer Evidenz zu identifizieren. Erst die Einbeziehung von interaktiven Effekten der beteiligten Hauptgene wird es erlauben, präzisere Genotyp-Phänotyp Beziehungen abzugrenzen. Diese Differenzierungen sind möglich, wenn eine systematische Genomanalyse die gleichzeitige Erfassung von interaktiven genetischen Faktoren erlaubt. Darüber hinaus spielen Kriterien der Familienauswahl und auch die ethnische Herkunft der Familien eine relevante Rolle, welche IGE-Loci in dem ausgewählten Familienkollektiv einen Hauptgeneffekt entfalten (Sander et al., 1997; Greenberg et al., 2000). Bei den IGE mit komplexer genetischer Disposition konnte bisher nur der *EJM1*-Locus in der chromosomalen Region 6p21.3 unabhängig bestätigt werden (Greenberg et al., 1988, 1995, 2000; Durner et al., 1991; Sander et al., 1995, 1997). Der *EJM1*-Locus ist deshalb besonders aussichtsreich für Kandidatengenanalysen. Die Feinkartierung des *EJM1*-Locus in zwei voneinander unabhängigen Studien weist darauf hin, daß die zugrunde liegende Genstörung auf einem ca. 10 cM großen chromosomalen Segment lokalisiert ist, das telomerwärts vom *HLA-DQ* Locus und centromer vom Marker *D6S1019* flankiert wird (Sander et al., 1997; Greenberg et al., 2000). Da die genomische Sequenz der chromosomalen Region 6p21.3 bald öffentlich vorliegen wird, können positionell und

funktionell plausible Kandidatengene aus der von uns eingegrenzten Kandidatengenregion gezielt für Mutationsanalysen ausgewählt werden. Erst durch die Ermittlung von IGE-bedingenden Genmutationen läßt sich die Validität des *EJM1*-Locus eindeutig klären.

2.2 Molekulargenetische Analysen von Kandidatengenregionen

Bei der Überprüfung von Kopplungshinweisen werden drei Ziele verfolgt:
(1) den Kopplungsbefund unabhängig zu überprüfen;
(2) die Position des vermuteten Erkrankungsgens einzuengen;
(3) eine Phänotyp-Genotyp Beziehung abzuleiten.

Im Falle der Bestätigung eines Kopplungshinweises dienen die Typisierungsdaten zusätzlich zur Auswahl von Familien mit positiver Kopplungsevidenz, bei denen Mutationsanalysen von Kandidatengenen die besten Erfolgsaussichten aufweisen. Bei der Auswahl von Kandidatengenen werden funktionelle und/oder positionelle Hinweise für eine pathogenetische Bedeutung eines Gens herangezogen. Da Mutationen in Genen, die neuronale Ionenströme regulieren, als Erkrankungsursache von monogen vererbten idiopathischen Epilepsien identifiziert wurden (Übersicht in: McNamara, 1999), bieten sich Gene dieses Funktionsspektrums für direkte Kandidatengenanalysen an. Die rasch voranschreitende Sequenzierung des menschlichen Genoms im Rahmen des ″Human Genome Project″ unterstützt diesen molekulargenetischen Forschungsansatz. Noch in diesem Jahr wird die nahezu vollständige Sequenz des menschlichen Genoms bekannt sein. Über die Suche nach Sequenzhomologien zu bereits identifizierten Epilepsie-Genen lassen sich weitere aussichtsreiche Kandidatengene ermitteln. Die Kenntnis der genomischen Genorganisation erleichtert die Mutationsanalyse von Kandidatengenen. Besonders bei der molekulargenetischen Analyse von Erkrankungen mit genetisch komplexer Disposition wird die Mutationsanalyse bei positionell und funktionell begründeten Kandidatengenen die aussichtsreichste Strategie darstellen, da die positionelle Eingrenzung der verantwortlichen

Genveränderungen durch die beträchtliche phänotypische und genetische Varianz nur unpräzise gelingt (Roberts et al., 1999). Durch die systematische Suche nach Sequenzvariationen bei einer Vielzahl von Genen stehen bereits zahlreiche intragene Sequenzpolymorphismen für Assoziationsstudien zur Verfügung (Nöthen et al., 1993; Propping & Nöthen, 1995). Besonders geeignet sind Sequenzvarianten von Genen, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz an einer funktionell wichtigen Position eines Proteins führen oder durch die Variation von regulatorischen Sequenzabschnitten eine veränderte Genexpression bedingen. Im Falle einer Assoziation mit dem funktionellen Sequenzpolymorphismus ist ein direkter pathogenetischer Einfluß anzunehmen.

2.2.1 Kandidatengenregion 20q13

In der chromosomalen Region 20q13 wurden Genorte von zwei dominant vererbten idiopathischen Epilepsie-Syndromen lokalisiert. Bei zwei Familien mit autosomal dominanter nächtlicher Frontallappen-Epilepsie (ADNFLE) fanden sich Mutationen im Gen der α_4-Untereinheit des neuronalen Acetylcholin-Rezeptors (*CHRNA4*, 20q13) (Steinlein et al., 1995a; Steinlein et al., 1997a). Bei ca. 80% der Familien mit familiären Neugeborenenkrämpfen liegt der Erkrankungslocus in der Region 20q13 (Leppert et al., 1989; Ryan et al., 1991; Ronen et al., 1993; Berkovic et al., 1994). Bisher konnten Mutationen im Gen eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (*KCNQ2*) als Erkrankungsursache identifiziert werden (Biervert et al., 1998; Charlier et al., 1998). Darüber hinaus wurde für das humane Niederspannungs-EEG eine Kopplung zu der Region 20q13 publiziert (Steinlein et al., 1991), ohne daß eine zugrunde liegende Genstörung bisher identifiziert werden konnte. Zusammengenommen zeigen diese Befunde, daß Gene in der chromosomalen Region 20q13 an der Regulation der zerebralen Erregbarkeit beteiligt sind.

Unsere Kopplungsstudie bei 60 Familien von CAE-, JAE- und JME-Patienten testete die Hypothese, ob ein IGE-Locus in der Kandidatengenregion 20q13 zur genetischen Disposition der häufigen IGE-Syndrome beiträgt (Sander et al., 1996). Die Kopplungsanalyse mit den

RFLP-Markern *D20S19* und *D20S20* ergab keinen Kopplungshinweis der IGE-Erkrankung mit der Kandidatengenregion 20q13. Evidenz gegen eine Kopplung ($Z < -2$) fand sich beim gesamten Kollektiv von 60 Familien wie auch bei drei Untergruppen von Familien, die durch ein Familienmitglied mit entweder CAE, JAE oder JME ausgewählt wurden. Die Kopplungsergebnisse widersprechen der Annahme, daß ein Hauptgen in der Region 20q13 auch an der Epileptogenese der häufigen IGE-Syndrome beteiligt ist.

Um eine pathogenetische Beteiligung der beiden Kandidatengene *CHRNA4* und *KCNQ2* abzuklären, wurde bei beiden Genen eine systematische Mutationsanalyse der kodierenden Sequenzabschnitte und der Intron-Exon Übergänge bei IGE-Patienten durchgeführt (Steinlein et al., 1997b, 1999). Die molekulargenetischen Mutationsanalysen des *CHRNA4* und *KCNQ2* Gens erfolgten durch die Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. O. Steinlein am Institut für Humangenetik der Universität Bonn. Beim *CHRNA4* Gen identifizierten wir bei 103 IGE-Patienten insgesamt 10 Sequenzvarianten, von denen keine zu einem Aminosäureaustausch oder zu einer offensichtlichen Alteration beim RNS-Spleißen führte (Steinlein et al., 1997b). Für den Nachweis von vier häufigen Varianten und für die Ser248Phe Mutation der australischen ADNFLE-Familie wurde eine Testmethode etabliert, die die Sequenzvariation durch ein verändertes Schnittmuster eines sequenzspezifischen Restriktionsenzyms identifiziert. Die in der australischen Großfamilie mit autosomal dominanter nächtlicher Frontallappen-Epilepsie nachgewiesene Ser248Phe Mutation konnte in unserer Studie weder bei den IGE-Patienten noch bei den Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Bei drei der vier überprüften Sequenzpolymorphismen (bp1545/*Cfo*I, bp145^{-55}/*Hae*III, bp1674 + 14/*Sty*I) fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen 103 deutschen IGE-Patienten und 92 deutschen Kontrollpersonen ($P > 0.05$). Allein für den in Exon 5 gelegenen bp594/*Cfo*I Polymorphismus lag eine signifikant erhöhte Frequenz des T-Allels bei den IGE-Patienten (8,5%) vor im Vergleich zu den Kontrollen (2,7%; $\chi^2 = 5.28$, df = 1, $P = 0.0216$; OR = 3.57, 95%-CI: 1.31 - 9.72). Da keine Korrektur für multiple Testungen durchgeführt wurde, betrachten wir diesen Hinweis auf eine allelische Assoziation als Hypothesen-generierenden Befund, den es in weiteren Studien zu überprüfen gilt.

Bei der systematischen Mutationsanalyse des *KCNQ2* Gens bei 115 deutschen IGE-Patienten (71 JME, 44 JAE oder CAE) fanden sich mehrere bereits bekannte Sequenzpolymorphismen (C912T, C1419G, C1635T, T2154A), die zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz führen sowie der bekannte Aminosäure-Substitutionspolymorphismus Thr752Asn. Zusätzlich wurde bei einem Patienten eine seltene ″stumme″ Sequenzvariante (G1947) in Exon 16 detektiert sowie bei jeweils einem IGE-Patienten eine bisher unbekannte Sequenzvariante in Exon 13, die zu dem Austausch der Aminosäuren Glutamin gegen Lysin an Position 502 der Aminosäurenkette (Glu502Lys) führt, und eine Sequenzvariante in Exon 16, die den Aminosäureaustausch Ala733Ser bedingt. Beide Aminosäure-Substitutionen sind in der großen intrazellulären C-terminalen Domäne des Kaliumkanals lokalisiert. Beide Aminosäuresubstitutionen fanden sich bei einigen klinisch unbetroffenen Familienangehörigen, aber nicht bei weiteren Familienmitgliedern mit epileptischen Anfällen. Diese Konstellation spricht gegen eine pathogenetische Bedeutung beider Aminosäuresubstitutionen. Unsere Assoziationsanalyse mit dem häufigen Thr752Asn Polymorphismus ergab keinen Hinweis auf eine allelische Assoziation bei den IGE-Patienten, sowie zwei Untergruppen von 71 JME-Patienten und von 44 Patienten mit idiopathischen Absence-Epilepsien ($P > 0{,}05$). *KCNQ2* Genvarianten scheinen demnach keine relevante pathogenetische Rolle bei der Epileptogenese der häufigen IGE-Syndrome zu spielen. Zusammengefaßt fanden wir keine statistisch hinreichenden Anhaltspunkte dafür, daß ein Hauptgeneffekt in der chromosomalen Region 20q13 zur genetischen Disposition der häufigen IGE-Syndrome beiträgt.

2.2.2 Kandidatengenregion 8q24

In der Kandidatengenregion 8q24 akkumulieren Kopplungshinweise für drei IGE-Subtypen. Bei ca. 20% der Familien mit autosomal-dominant vererbten, benignen familiären Neugeborenenkrämpfen findet sich eine Kopplung in dieser Region (Ryan et al., 1991; Lewis et al., 1993; Steinlein et al., 1995b). In der Zwischenzeit konnten Mutationen im Gen eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (*KCNQ3*) als Erkrankungsursache identifiziert werden

(Singh et al., 1998). Zara & Mitarb. (1995) berichteten über eine signifikante Kopplung von häufigen IGE-Syndromen und Fieberkrämpfen mit der Region 8q24 bei 10 italienischen Familien. Fong & Mitarb. (1998) publizierten eine Kopplung zwischen der persistierenden CAE und Markern der Region 8q24 in 10 mittelamerikanischen Familien. Zusammengenommen stützen diese Befunde die Annahme, daß ein Epilepsie-Gen in der chromosomalen Region 8q24 zu der genetischen Disposition eines breiten IGE-Spektrums beiträgt. Unsere Kopplungsstudie bei 38 Familien mit mehreren IGE-Erkrankten überprüfte den von Zara & Mitarb. (1995) publizierten Kopplungshinweis (Sander et al., 1998a). Kritisch ist anzumerken, daß das von Zara & Mitarb. (1995) angewandte statistische Verfahren für die Kopplungsanalyse eine relativ hohe Typ-I Fehlerrate aufweist (Davis & Weeks, 1997). Unsere parametrischen Mehrpunktanalysen mit dem Programm *GENEHUNTER* ergaben durchgehend signifikant negative Kopplungsevidenzen ($Z < -2$) im chromosomalen Bereich 8q24. Ebenfalls negative Kopplungsevidenzen fanden sich in zwei klinisch homogeneren Teilgruppen der Familien, die in 18 Familien mit JME-Angehörigen und 20 Familien ohne JME-Mitglied aufgeteilt wurden. Wir konnten somit einen Kopplungshinweis für die häufigen IGE-Syndrome in der Kandidatenregion 8q24 nicht bestätigen.

2.2.3 Kandidatengenregion 15q14

Der Nachweis von Mutationen im *CHRNA4* Gen als Erkrankungsursache für autosomal-dominant vererbte Frontallappen-Anfälle (Steinlein et al., 1995a, 1997a) begründete die Kandidatengenhypothese, daß Gene von Untereinheiten des neuronalen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptors an der Epileptogenese beteilgt sind. Die Kandidatengenregion 15q14 fand besondere Beachtung, da hier das Gen der α_7-Untereinheit des neuronalen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptors (*CHRNA7*) lokalisiert ist. Die α_7-Untereinheit des neuronalen nikotinergen Acetycholin-Rezeptors ist durch eine hohe Kalzium-Permeabilität gekennzeichnet, über die zahlreiche Mechanismen der neuronalen Plastizität reguliert werden (Broide & Leslie, 1999). Zwei Studien bei häufigen idiopathischen Epilepsien fanden Kopplungshinweise im chromosomalen Bereich des *CHRNA7* Gens. Elmslie & Mitarb. (1997)

lokalisierten einen Hauptgeneffekt für die JME in der *CHRNA7* Region bei 34 Familien mit mehreren JME-Erkrankten. Neubauer & Mitarb. (1998) berichteten ebenfalls über einen signifikanten Kopplungshinweis mit dieser Region bei Familien mit Rolando-Epilepsie. In dieser Studie war das typische EEG-Merkmal der Rolando-Epilepsie, die centrotemporalen Spitzen, mit der *CHRNA7* Region gekoppelt. Beide Kopplungsbefunde erhärten die Hypothese, daß Genstörungen in der chromosomalen Region 15q14 an der genetischen Disposition von idiopathischen Epilepsien beteiligt sind.

Unsere Kopplungsstudie bei 27 Familien von JME-Patienten konnte den Kopplungsbefund von Elmslie & Mitarb. (1997) nicht bestätigen (Sander et al., 1999). In 11 Familien mit mehreren JME-Erkrankten fanden wir weder in der parametrischen, noch in der parameter-freien Analyse positive Kopplungshinweise. Unter Verwendung der gleichen Vererbungsparameter war die parametrische Kopplungsevidenz im Bereich des *CHRNA7* Gens eindeutig negativ, ohne jedoch das Niveau für einen statistischen Kopplungsausschluß ($Z < -2$) zu erreichen. Eine Evidenz gegen eine Kopplung fand sich bei einem erweiterten Kollektiv von 27 JME-Familien und 30 Familien von Patienten mit idiopathischen Absence-Epilepsien, wenn Familienangehörige mit unprovozierten generalisierten Anfällen oder dem subklinischen GSW-EEG als Merkmalsträger klassifiziert wurden. Eine Assoziationsanalyse mit einem Mikrosatelliten-Polymorphismus in unmittelbarer Nähe des *CHRNA7* Gens ergab ebenfalls keinen Anhalt für eine allelische Assoziation mit der JME oder den idiopathischen Absence-Epilepsien. Eine zweite davon unabhängige Kopplungsstudie von Durner & Mitarb. (2000) fand ebenfalls keinen Kopplungshinweis in der chromosomal Region 15q24 in Familien von JME-Patienten. Die direkte Mutationsanalyse des *CHRNA7* Gens ist bisher nicht gelungen, da ein unmittelbar danebenliegendes, nahezu sequenzidentisches, Pseudogen die selektive Sequenzanalyse erschwert (Bate et al., 2000).

2.2.4 Kandidatengene *CACNA1A* und *CACNB4*

Tiermodelle mit genetisch determinierten Epilepsien bieten ideale Voraussetzungen für die positionelle Klonierung von Epilepsie-Genen und für die anschließende Aufklärung der pathogenetischen Mechanismen (Puranam & McNamara, 1999). Durch den kurzen Generationszyklus und gezielte Kreuzungen können die zugrunde liegenden Gendefekte bei Mausmodellen mit Absence-Epilepsien rasch und präzise lokalisiert werden. Bei drei Mausmutanten mit autosomal-rezessiv vererbten Absence-Epilepsien wurden Gendefekte in drei Untereinheiten neuronaler Kalziumkanäle (*tottering* Mutante*: Cch1a, lethargic* Mutante: *Cchb4* und *stargazer* Mutante: *Cacng2*) als Erkrankungsursache identifiziert (Übersicht in: Burgess & Noebels, 1999). Diese Befunde und die Rolle von T-Typ Kalziumströmen bei der Generierung von elektrophysiologischen GSW-Entladungen (Tsakiridou et al., 1995) begründen die besondere Bedeutung von Kalziumkanal-Genen als Kandidatengene der IGE beim Menschen. In zwei molekulargenetischen Kandidatengenstudien überprüften wir eine ätiologische Beteiligung der humanen Gene der α_{1A}- (*CACNA1A)* und β_4-Kalziumkanal-Untereinheit (*CACNB4*) an der Pathogenese der häufigen IGE-Syndrome (Sander et al., 1998b; Escayg et al., 2000).

Das menschliche Kalziumkanal-Gen *CACNA1A* (Chromosom 19p13) ist homolog mit dem *Cch1a* Gen der Maus, welches bei der autosomal-rezessiv vererbten Absence-Epilepsie der *tottering* Mausmutante defekt ist (Fletcher et al., 1996). Mutationen in unterschiedlichen Lokalisationen des humanen *CACNA1A* Gens fanden sich bei Familien mit familiärer hemiplegischer Migräne, mit episodischer Ataxie (Typ 2) und mit chronischer spinocerebellärer Ataxie (Typ 6) (Übersicht in: Terwindt et al., 1998). Mutationen des humanen *CACNA1A* Gens sind demnach an der Pathogenese von paroxysmalen Störungen beteiligt. Diese Befunde stützen unsere Kandidatengen-Hypothese, daß das *CACNA1A* Gen zur Disposition von IGE-Syndromen beiträgt. Diese Hypothese überprüften wir durch Kopplungs- und Assoziationsanalysen mit einem exonischen Trinukleotid-Polymorphismus des *CACNA1A* Gens bei insgesamt 70 Familien von CAE-, JAE- und JME-Patienten. Moderate Expansionen (> 20 CAG-Wiederholungen) dieses exprimierten Trinukleotid-Polymorphismus in der 3'-Region des *CACNA1A* Gens wurden als Erkrankungsursache der chronischen

spinocerebellären Ataxie vom Typ-6 identifiziert (Zhuchenko et al., 1997). Unsere Assoziationsanalyse in Familien-Trios ergab keinen Hinweis auf eine allelische Assoziation des Trinukleotid-Polymorphismus mit der CAE, JAE oder JME. Wir fanden ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl von CAG-Wiederholungen und der Disposition zu IGE-Subtypen. Im Besonderen lag bei keinem der genotypisierten IGE-Patienten eine Expansion des CAG-Polymorphismus vor. Als höchste Anzahl von CAG-Wiederholungen fanden wir bei zwei IGE-Patienten ein Allel mit 14 CAG-Einheiten. Diese lagen somit deutlich unter der kritischen Schwelle (< 20 CAG-Wiederholungen). Unsere parameter-freie Kopplungsanalyse mit dem *GENEHUNTER* Programm ergab keinen signifikanten Kopplungshinweis bei 55 IGE-Familien sowie bei zwei klinisch homogeneren Teilkollektiven von 26 JME-Familien und 42 Absence-Epilepsie Familien. Zusammengefaßt fanden wir keinen Hinweis für einen bedeutsamen Hauptgeneffekt des *CACNA1A* Gens bei der Pathogenese der häufigen IGE-Syndrome.

In Zusammenarbeit mit der molekulargenetischen Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. M. Meisler an der Universität von Michigan und dem Neurophysiologen, Dr. M. Waard, an der Universität von Marseille beteiligten wir uns an einer Mutationsanalyse des *CACNB4* Gens bei Patienten mit IGE und episodischen Ataxien (Escayg et al., 2000). Ein Gendefekt im homologen *Cchb4* Gen bei der Mausmutante *"lethargic"* führt zu einem Erkrankungsbild, das durch eine Absence-Epilepsie und eine chronisch progrediente Ataxie charakterisiert ist (Burgess et al., 1997). Unsere Kandidatengenanalyse überprüfte, ob Varianten des *CACNB4* Gens durch eine Störung der Kanalfunktion zur Pathogenese von IGE beitragen. Die Mutationsstudie des *CACNB4* Gens analysierte die kodierenden Sequenzabschnitte und die Intron-Exon Übergänge. Insgesamt wurden 10 Sequenzvarianten identifiziert. Acht davon führten nicht zu einem Aminosäureaustausch oder einer offensichtlichen Alteration des RNS-Spleißens. Bei zwei IGE-Patienten fanden sich Sequenzvarianten, aus denen eine Veränderung des *CACNB4* Proteins resultierte. Bei einer JME-Patientin lag in Exon 13 ein Nukleotidaustausch (C→T) vor, der zu einem vorzeitigen Stopcodon (R482X) führte. Dadurch wird die Aminosäurekette um 38 Aminosäuren in der C-terminalen Region verkürzt. Zur neurophysiologischen Funktionsprüfung wurde die cDNA der R482X-Mutation zusammen

mit der cDNA der α_{1A}-Untereinheit in *Xenopus laevis* Eizellen exprimiert. Im Vergleich zu dem *CACNB4* Wildtyp zeigte die elektrophysiologische Ableitung eine veränderte Inaktivierung der co-transfizierten cDNA der α_{1A}-Untereinheit. Die R482X Variante könnte somit eine funktionelle Bedeutung haben und zur Epileptogenese beitragen. Bei 255 Kontrollpersonen fand sich die R482X Variante nicht. Interessanterweise ist die Tochter der JME-Patientin ebenfalls an einer Epilepsie erkrankt. Da die Mutter einer molekulargenetischen Untersuchung der Tochter nicht zustimmte, waren wir nicht in der Lage, die pathogenetische Relevanz dieser Sequenzvariante genauer abzuklären.

Eine weitere G→T Nukleotidsubstitution wurde in Exon 3 bei jeweils einem Patienten mit Absence-Epilepsie und einem Patienten mit episodischer Ataxie detektiert. Diese Sequenzvariante führt zu einem Aminosäureaustausch (C104F). Die elektrophysiologische Überprüfung der C104F Variante ergab keinen Hinweis für eine funktionelle Alteration des varianten Kalziumkanals. Der Epilepsie-Proband mit der C104F Variante ist Vater von zwei Kindern, von denen ein Kind ebenfalls eine Epilepsie mit generalisiert tonisch-klonischen Anfällen aufweist. Bei diesem Kind fand sich ebenfalls die C104F Variante, während die klinisch unauffällige Mutter und das nicht erkrankte Kind die C104F Variante nicht aufwiesen. Gleichfalls war die C104F Variante bei allen fünf erkrankten Familienangehörigen sowie zwei nicht erkrankten Familienmitgliedern einer unverwandten Familie mit episodischen Ataxie nachweisbar. Die C104F Variante fand sich nicht bei den 255 Kontrollpersonen. Die Segregation der C104F Variante in beiden Familien spricht für einen Hauptgeneffekt dieser Variante, obwohl sich ein Zufallsbefund aufgrund der nur geringen Familiengröße nicht ausschließen läßt. Zusammengefaßt ergeben sich Anhaltspunkte, daß Varianten des *CACNB4* Gens bei der Pathogenese von paroxysmalen Störungen beteiligt sind. Diese Annahme bedarf jedoch weiterer Bestätigung. Dazu ist vorgesehen, beide identifizierte Varianten des *CACNB4* Gens in transgenen Tieren auf funktionelle Störungen zu überprüfen.

2.2.5 Fazit

Die Vielzahl unbestätigter Kopplungshinweise bei den genetisch komplexen Erkrankungen hat dazu beigetragen, daß die zum Teil widersprüchlichen Kopplungsbefunde mit sehr viel Skepsis betrachtet werden. Diese Einstellung ist nur zum Teil berechtigt. Einerseits verleitet die phänotypische und genetische Varianz der genetisch komplexen Erkrankungen zu einer Maximierung von positiven Kopplungsevidenzen durch eine post-hoc Anpassung der Vererbungsparameter und der Erkrankungsmodelle. Darüber hinaus werden explorativ multiple Testungen vorgenommen, ohne daß eine adäquate Anpassung des Signifikanzniveaus vorgenommen wird. Dieses Vorgehen erhöht die Rate von falsch-positiven Kopplungsberichten. Andererseits entspricht es der Erwartung, daß in unabhängigen Studien, infolge der heterogenen und komplexen genetischen Disposition, nicht stets derselbe genetische Faktor herausgefiltert wird. Dies ist im Besonderen der Fall, wenn die Familienkollektive klein sind und sich das Studiendesign bei der Familienauswahl und dem Erkrankungsmodell unterscheidet. Simulationsstudien, die die Komplexität der beteiligten genetischen Faktoren berücksichtigen, belegen, daß wesentlich größere Familienkollektive, als bisher untersucht, für eine statistisch hinreichende Erfassung von heterogenen Hauptgeneffekten bei genetisch komplexen Erkrankungen erforderlich sind (Goldin et al., 1991; Badner et al., 1998). Solche Forschungsprojekte sind nur im Rahmen multizentrischer Kollaborationen realisierbar. Darüber hinaus ermöglicht erst eine systematische Genomanalyse, heterogene Hauptgene zu differenzieren und interaktive Geneffekte zu erfassen.

2.3 Systematische Genomanalyse bei idiopathisch generalisierten Epilepsien

2.3.1 Studiendesign

Ziel unserer systematischen Genomanalyse bei Familien mit mehreren IGE-Erkrankten ist die positionelle Klonierung von Genstörungen, die an der Disposition eines breiten IGE-Spektrums beteiligt sind. Dabei gehen wir von den Hypothesen aus, daß dem neurogenetischen Spektrum von CAE, JAE und JME eine gemeinsame genetische Disposition zugrunde liegt und daß Hauptgeneffekte bei Familien mit erkrankten Geschwistern zur komplexen genetischen Ätiologie beitragen. Aufgrund der komplexen und heterogenen genetischen Disposition der häufigen IGE sind große Familienkollektive für die Kopplungsstudien erforderlich. Durch die Gründung des ″European Consortium on the Genetics of Idiopathic Generalised Epilepsy″ ist es uns gelungen, eine Zusammenarbeit der fünf bedeutendsten europäischen Arbeitsgruppen zu realisieren. In einer konzertierten Aktion konnten 130 Familien von Probanden mit CAE, JAE oder JME in die Kopplungsstudien eingeschlossen werden. Um die Wahrscheinlichkeit für die Beteiligung eines Hauptgeneffekts zu erhöhen, mußten zwei oder mehr Geschwister entweder unprovozierte generalisierte Anfälle oder generalisierte spike-wave Entladungen im EEG aufweisen. Die Rekrutierung von Kernfamilien mit erkrankten Geschwisterpaaren bietet die effizientesten Voraussetzungen für die Kartierung häufiger Hauptgene bei genetisch komplexen Erkrankungen (Goldin et al., 1991; Badner et al., 1998). Die klinischen Daten wurden anhand standardisierter Dokumentationsbögen systematisch erfaßt und erlauben eine detaillierte Differenzierung von IGE-Merkmalen. Die Klassifikation von epileptischen Anfällen und Epilepsie-Syndromen erfolgte gemäß den Richtlinien der Internationalen Liga gegen Epilepsie (1989). Die Stammbäume mit detaillierten klinischen Daten sind im Internet abrufbar (http://www.charite.de/epileptologie/Forschungsgruppen/genetik/downlinks.html). Von 694 Familienangehörigen wiesen 360 einen IGE-Phänotyp auf. Bei 617 Familienangehörigen wurden für die systematische Genomanalyse insgesamt 383 Mikrosatelliten-Polymorphismen mit einem durchschnittlichen Abstand von 10 cM genotypisiert. Die Zusammenstellung der Mikrosatelliten-Polymorphismen findet sich unter: http://wwwmsz.mdc-berlin.de/marker.html

(Dib et al., 1996). Weitere 33 Mikrosatelliten wurden in Chromosomenabschnitten mit Kopplungshinweis zur Feinkartierung und Informativitätssteigerung ergänzt. Insgesamt wurden 250.000 Genotypisierungen am Mikrosatelliten Zentrum des Max-Delbrück-Centrums in Berlin durchgeführt und nach sorgfältiger Qualitäts- und Plausibilitätsprüfung für die statistischen Analysen bereitgestellt. Die Kopplungsanalysen erfolgten unter zwei Erkrankungsmodellen. Unter dem ″engen Erkrankungsmodell″ wurden 276 Familienangehörigen mit CAE, JAE oder JME als IGE-Merkmalsträger klassifiziert. Unter dem ″weiten Erkrankungsmodell″ wurden 360 Familienangehörige als IGE-Merkmalsträger gekennzeichnet, wenn sie entweder mindestens einen unprovozierten generalisierten Anfall erlitten hatten, oder subklinisch ein GSW-EEG aufwiesen. Da infolge der komplexen genetischen Disposition von einer interfamiliären Varianz der Vererbungsparameter auszugehen ist, wurden für die statistischen Kopplungsstudien das parameter-freie Analyseverfahren *GENEHUNTER* angewandt (Kruglyak et al., 1996). Dieses parameter-freie Analyseverfahren ermittelt die Übereinstimmung von elterlichen Chromosomenabschnitten bei den erkrankten Angehörigen einer Familie und vergleicht diese mit den Erwartungswerten bei einer erkrankungsunabhängigen Mendelschen Verteilung. Die spekulative Festlegung eines Erbgangs ist dazu nicht erforderlich und die Analyse berücksichtigt nur die genetische Information von erkrankten Familienangehörigen (″affecteds-only″ Analyse). Ein Schwellenwert für die Typ-I Fehlerrate von $P < 2.2 \times 10^{-5}$ wird entsprechend anerkannter Richtwerte als signifikante Kopplungsevidenz akzeptiert, und eine Typ-I Fehlerrate von $P < 7.4 \times 10^{-4}$ als Kopplungshinweis betrachtet (Lander & Kruglyak, 1995).

2.3.2 Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Die genomweiten Kopplungsevidenzen der parameter-freien Mehrpunktanalysen sind für beide Erkrankungsmodelle in Abbildung 4 dargestellt. Zur explorativen Analyse wurden zusätzlich parametrische Mehrpunktberechnungen durchgeführt, um den Vererbungsmodus der ermittelten IGE-Loci und den Grad der genetischen Heterogenität zu charakterisieren. Unsere genomweiten parameter-freien Kopplungsanalysen ergaben einen signifikanten

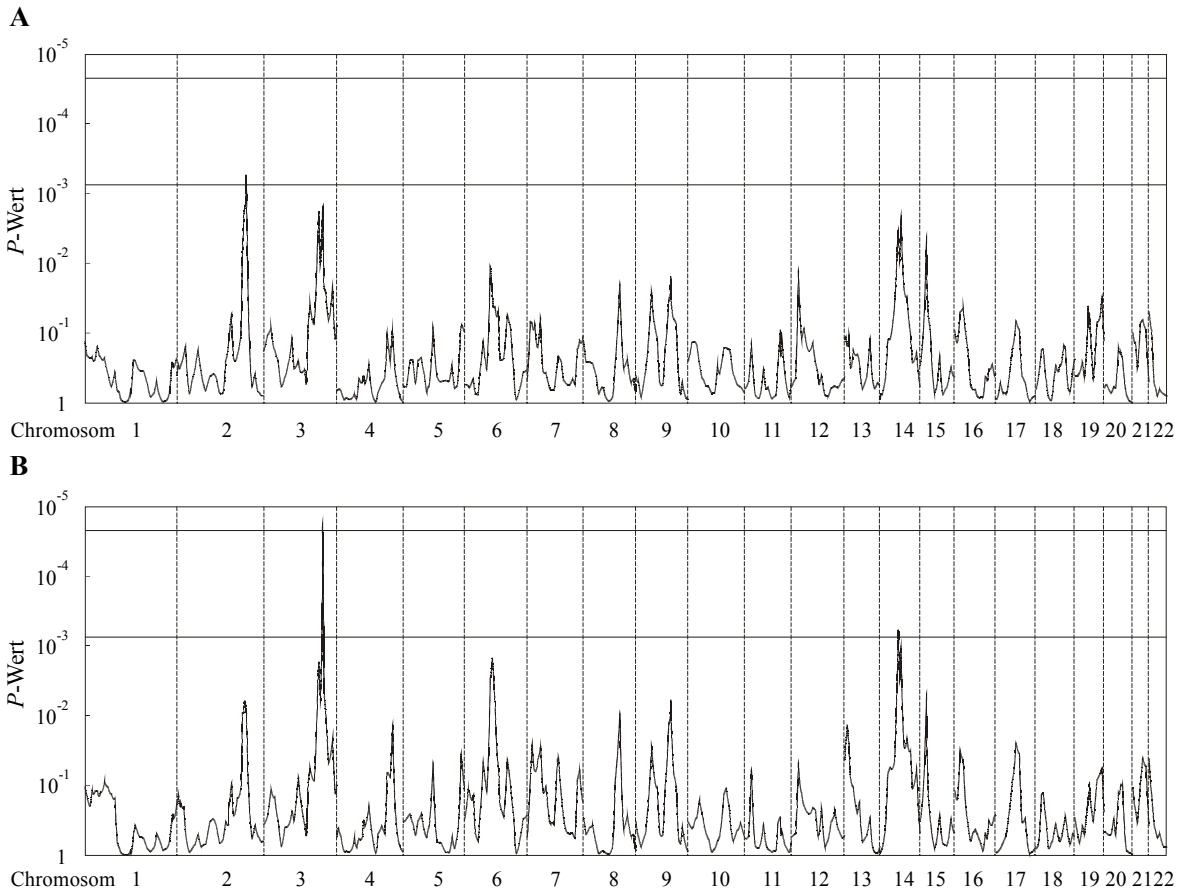
Kopplungsbefund in der chromosomalen Region 3q26 (P = 1,7 x 10^{-5} bei *D3S3725;* ″weites Erkrankungsmodell″), sowie zwei Kopplungshinweise in den chromosomalen Regionen 2q36.1 (P = 5,4 x 10^{-4} bei *D2S1371*; ″enges Erkrankungsmodell″) und 14q23 (P = 5,6 x 10^{-4} bei *D14S63;* ″weites Erkrankungsmodell″) (Abb. 5). Die explorativen parametrischen Mehrpunktanalysen bestätigten die parameter-freien Kopplungsbefunde und weisen auf das Vorliegen von autosomal dominanten Hauptgeneffekten bei jeweils einem Drittel der untersuchten Familien hin. Die parameter-freien Kopplungsanalysen in zwei klinisch homogeneren Untergruppen der Familien (54 Familien mit und 76 Familien ohne JME-Angehörige) ergaben bei beiden Teilkollektiven positive Kopplungsevidenzen in den chromosomalen Regionen 3q26, 2q36.1 und 14q23 (Abb. 5). Dieser Befund belegt, daß die drei identifizierten IGE-Loci zur genetischen Disposition eines breiten IGE-Spektrums beitragen.

Da Mutationen in Genen von Ionenkanälen zur Pathogenese von monogenen, idiopathischen Epilepsien und anderen monogenen Erkrankungen mit paroxysmalen Symptomen beitragen, überprüften wir die ermittelten Chromosomenabschnitte auf Gene, die an der Regulation von neuronalen Ionenströmen beteiligt sind. Folgende Kandidatengene halten wir für aussichtsreich:

1) Region 3q26: Gen der β-Untereinheit des Kalium-Kanals ″*KCNA1B*″,
Gen des Chlorid-Kanals ″*CLCN2*″;
2) Region 2q36: Gen des Chlorid-Bikarbonat Ionenaustauschers ″*SLC4A3*″;
3) Region 14q23: Gen des Natrium-Kalzium Ionenaustauschers ″*SLC8A3*″.

Derzeit führen wir Mutationsanalysen bei den genannten Kandidatengenen durch, um disponierende Genmutationen bei IGE-Patienten aus Familien mit positivem Kopplungshinweis zu identifizieren.

Abb. 4: Genomweite Typ-I Fehlerraten (*P*-Werte) der parameter-freien *GENEHUNTER* Berechnungen.



A: ″enges Erkrankungsmodell″: CAE, JAE, JME;
B: ″weites Erkrankungsmodell″: unprovozierte generalisierte Anfälle oder GSW-EEG.

Abb. 5: Typ-I Fehlerraten (*P*) in den chromosomalen Regionen 3q26, 14q23 und 2q26.1 bei IGE-, IAE-, und JME-Familien.

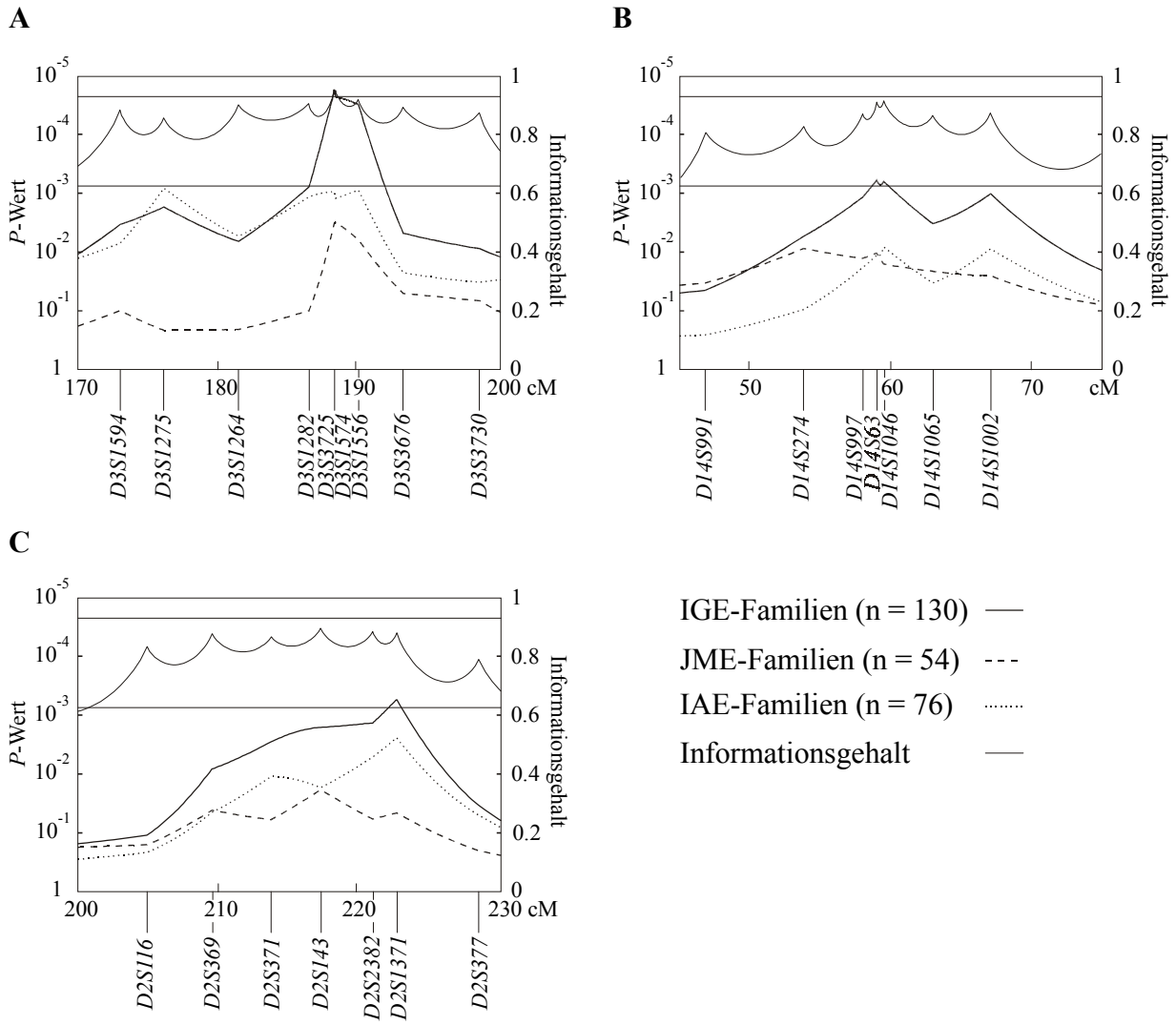


Abb. 5a: Typ-I Fehlerraten (*P*) für das ″weite Erkrankungsmodell″ in der Region 3q26.
Abb. 5b: Typ-I Fehlerraten (*P*) für das ″weite Erkrankungsmodell″ in der Region 14q23.
Abb. 5c: Typ-I Fehlerraten (*P*) für das ″enge Erkrankungsmodell″ in der Region 2q36.

″enges Erkrankungsmodell″: CAE, JAE oder JME;
″weites Erkrankungsmodell″: unprovozierte generalisierte Anfälle oder GSW-EEG.

2.3.3 Fazit

Bei der vorliegenden Kopplungsstudie handelt es sich um die erste systematische Genomanalyse zur Aufklärung der komplexen genetischen Disposition der häufigen IGE-Syndrome. Für die Kopplungsanalysen stand das bisher umfangreichste Kollektiv von IGE-Multiplex Familien zur Verfügung. Die komplexe genetische Disposition und die genetische Heterogenität der häufigen IGE-Syndrome stellen die größten analytischen Probleme für die Kopplungsstudien dar. Aufgrund der kleinen Familiengröße ist es vorab nicht erkennbar, ob ein Hauptgeneffekt an der Erkrankungsentstehung beteiligt ist oder ob eine polygene Disposition vorliegt. Durch die systematische Genomanalyse mit Mikrosatelliten-Markern in einem durchschnittlichen Abstand von ca. 10 cM besteht das Potential dieser genomweiten Kopplungsanalyse darin, daß wir definierte Phänotyp-Genotyp Hypothesen an jedem beliebigen Ort des menschlichen Genoms mit hinreichender Informativität überprüfen können. In der vorliegenden Studie konnten wir drei chromosomale Regionen (3q26, 2q36.1, 14q23) ermitteln, in denen mit hinreichender statistischer Wahrscheinlichkeit IGE-Gene mit einem breiten Dispositionsspektrum lokalisiert sind. Kandidatengene aus diesen chromosomalen Regionen werden derzeit Mutationsanalysen unterzogen. Durch die sukzessive Erweiterung des Familienkollektivs und durch die kombinierte Analyse mit Daten von anderen Forschergruppen verfolgen wir das Ziel, eine für alle Forschergruppen zugängliche Datenbank aufzubauen, die das Potential besitzt, die häufigen Hauptgeneffekte der IGE-Syndrome zu ermitteln und ihr komplexes und heterogenes Zusammenspiel zu erfassen. Rasche Fortschritte bei der Aufklärung von genetisch komplexen Erkrankungen sind von der bald abgeschlossenen Sequenzierung des menschlichen Genoms zu erwarten. Noch in diesem Jahr soll ein erster Entwurf der nahezu kompletten Sequenz des menschlichen Genoms vorgelegt werden. Die umfassende Kenntnis der menschlichen Gene, ihrer Lokalisation und genomischen Organisation wird es ermöglichen, Gene in der von uns ermittelten Kandidatengenregionen auszuwählen und direkt in Mutationsanalysen zu überprüfen. Bis zu diesem Zeitpunkt werden wir die wichtigsten Kandidatengenregionen für IGE-Gene ermittelt haben.

2.3.4 Ausblick

Aktuell stehen wir am Anfang des Vorhabens, die molekularen Mechanismen der Epileptogenese durch die molekulargenetische Identifizierung von IGE-Genen aufzuklären. Der Nachweis von Mutationen in Genen von Ionenkanälen bei einigen monogenen idiopathischen Epilepsien und einigen monogenen paroxysmalen Störungen eröffnet erste konkrete Einblicke in die molekulare Pathogenese von paroxysmalen Störungen (Übersicht in: Cooper & Jan, 1999). Diese wegweisenden Schlüsselbefunde erlauben es, kritische Störungen der Erregungsbildung oder -ausbreitung im Gehirn zu erforschen und rational begründete Therapieansätze gezielt zu entwickeln (Cooper & Jan, 1999; Davies & Hanna, 1999). Vorerst bleibt unklar, inwieweit die Erkenntnisse bei diesen seltenen monogenen Funktionsstörungen auch Rückschlüsse auf die pathogenetischen Mechanismen bei den weit häufigeren genetisch komplexen IGE zulassen. Obwohl voraussichtlich einzelne Hauptgeneffekte nur bei einem geringen Anteil von IGE-Patienten (spekulativ < 5%) eine relevante Rolle spielen, ist es wahrscheinlich, daß komplexe Störungen in den gleichen Funktionssystemen auch bei der Epileptogenese von IGE-Patienten mit polygener Disposition vorliegen. Es besteht damit die Aussicht, daß die aus molekulargenetischen Erkenntnissen resultierenden Therapieansätze vielen Epilepsie-Patienten zu Gute kommen werden.

Nach dem Abschluß des ″Human Genome Project″ ist mit einem raschen Fortschritt bei der Aufklärung von Erkrankungen mit genetisch komplexer Disposition zu rechnen. In den Kandidatengenregionen können dann positionell und funktionell plausible Gene systematisch in Mutationsanalysen überprüft werden. Sobald IGE-Gene ermittelt werden, lassen sich weitere Gene dieses Funktionsspektrums gezielt testen. Aktuell zeichnen sich bereits erste Erfolge dieser Strategie ab. So konnten Genmutationen in anderen Untereinheiten der bisher identifizierten Ionenkanäle als heterogene Erkrankungsursache bei weiteren monogenen IGE-Syndromen ermittelt werden (Charlier et al., 1998; Biervert et al., 1998; Singh et al., 1998; Wallace et al., 1998; Escayg et al., 2000a). Darüber hinaus bestehen Hinweise dafür, daß verschiedene Mutationen eines Gens zu phänotypisch sehr unterschiedlichen paroxysmalen Störungen führen können. Dominante Mutationen in dem Kalziumkanalgen *CACNA1A* sind

aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation und der dadurch variierenden Funktionsstörung an der Pathogenese der familiären hemiplegischen Migräne, der episodischen Ataxie (Typ 2) und der chronischen spinocerebellären Ataxie (Typ 6) beim Menschen verantwortlich (Übersicht in: Terwindt et al., 1998). Eine autosomal-rezessiv vererbte Mutation im homologen *Cch1a* Gen bei der *"tottering"* Mausmutante führt zu einem Erkrankungsbild mit Absence-Anfällen und einer chronisch progredienten Ataxie (Fletcher et al., 1996). Die Identifizierung von IGE-Genen könnte demnach zur Aufklärung eines weiten Spektrums von genetisch determinierten paroxysmalen Störungen einen Beitrag leisten.

Molekulargenetische Kenntnisse werden dazu beitragen, die molekularen Mechanismen der Epileptogenese aufzuklären und rational begründete Therapieansätze zu entwickeln. Auch wenn die Ermittlung eines Gendefekts nicht ausreichend ist, die Erregungsregulation in komplexen neuronalen Netzwerken zu erfassen, so können die epileptogenen Auswirkungen dieser Einzelfaktoren im interaktiven Zusammenhang mit komplexen Regulationssystemem in tierexperimentellen Forschungsansätzen untersucht werden (Puranam & McNamara, 1999). Die Klonierung von zahlreichen neuronalen Ionenkanälen und Rezeptorgenen schafft die Voraussetzungen, Antiepileptika mit spezifischen Wirkungsmechanismen zu entwickeln (Propping & Nöthen, 1995). Zusätzlich lassen sich durch molekulargenetische Testsysteme die funktionellen Genvarianten von zahlreichen Stoffwechselenzymen (z.B. Cytochrome P450) bestimmen, wodurch sich individuell pharmakogenetische Besonderheiten bei der Antiepileptika-Therapie voraussagen lassen (Mamiya et al., 1998; Coutts & Urichuk, 1999). Dadurch kann die Pharmakotherapie bei einem Epilepsie-Patienten gezielter geplant und nebenwirkungsärmer durchgeführt werden. Sobald einzelne Hauptgene für die häufigen IGE identifiziert sind, können diagnostische Tests ein genetisches Risikoprofil bei jedem Patienten ermitteln (Propping & Nöthen, 1995; Davies & Hanna, 1999). Bei Vorliegen von spezifischen Hauptgeneffekten können diese Patienten dann mit individuell differenzierten Therapieansätzen behandelt werden. Es ist voraussehbar, daß die molekulargenetische Forschung in den nächsten zehn Jahren einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis der Epileptogenese und der epileptologischen Therapie leisten wird.

3 Zusammenfassung

Die idiopathisch generalisierten Epilepsien (IGE) repräsentieren 40% aller Epilepsien. Zwillings- und Familienstudien belegen die genetische Ätiologie der IGE. Mehrere genetische Faktoren sind in einem komplexen Zusammenspiel an der Pathogenese der IGE beteiligt. Ziel der vorliegenden Kopplungsstudien ist es, IGE-Gene im Genom des Menschen zu lokalisieren und die verantwortlichen Genstörungen durch die Mutationsanalyse von positionell und funktionell plausiblen Kandidatengenen zu identifizieren. Für die Kopplungsstudien wurden die drei häufigsten IGE-Syndrome ausgewählt: die Absence-Epilepsie des Kindesalters (CAE), die juvenile Absence-Epilepsie (JAE) und die juvenile myoklonische Epilepsie (JME). Diese drei IGE-Syndrome bilden ein neurogenetisches Spektrum, dem eine gemeinsame genetische Disposition zugrunde liegt.

Unsere Kopplungsanalysen befaßten sich am Anfang mit der chromosomalen Kartierung und Kandidatengenanalyse eines IGE-Locus (Locus-Symbol: *EJM1*) in der chromosomalen Region 6p21.3. Wir konnten diesen Kopplungsbefund unabhängig bestätigen, die Phänotyp-Genotyp Beziehung präzisieren und die Kandidatengenregion auf ein chromosomales Segment von 10 centiMorgan eingrenzen. Ein positionell und funktionell plausibles Kandidatengen ist das Gen einer Untereinheit des heterodimeren $GABA_B$ Rezeptors (Gen-Symbol: *GABA-BR1*). Die systematische Mutationsanalyse des *GABA-BR1* Gens und eine Assoziationsstudie mit drei Sequenzpolymorphismen in den Exonen 1a1, 7 und 11 ergaben keinen Anhalt für eine Beteiligung des *GABA-BR1* Gens bei der Epileptogenese der IGE.

Kopplungshinweise in den chromosomalen Regionen 20q13, 8q24 und 15q14 konnten wir in unserem Familienkollektiv nicht bestätigen. Die Mutationsanalyse der Kandidatengene *CHRNA4* und *KCNQ2* in der Kandidatengenregion 20q13 ergab keinen Hinweis auf eine genetische Disposition der untersuchten IGE-Patienten durch die identifizierten Sequenzvarianten. Bei der Kandidatengenanalyse von zwei Kalziumkanal-Genen (*CACNA1A*, *CACNB4*), deren Gendefekte bei Mausmutanten (*tottering*, *lethargic*) Absence-Epilepsien verursachen, fanden wir keine Anhaltspunkte für einen häufigen Hauptgeneffekt dieser Gene

bei den menschlichen IGE-Syndromen. Zwei seltene exonische Sequenzvarianten (C104F, R482X) des *CACNB4* Gens könnten jedoch aufgrund der familiären Assoziation mit mehreren erkrankten Familienangehörigen (C104F) und der elektrophysiologischen Funktionsalteration (R482X) zur Disposition von paroxysmalen Störungen beitragen. Durch die Expression dieser *CACNB4* Sequenzvarianten in transgenen Tieren wird diesen Anhaltspunkten weiter nachgegangen.

Unsere systematische Genomanalyse bei 130 Familien mit mehreren IGE-Angehörigen zielte auf die positionelle Eingrenzung von Genstörungen, die an der Disposition eines breiten IGE-Spektrums beteiligt sind. Bei 360 der 694 Familienangehörigen lag ein IGE-Phänotyp vor. Bei 617 Familienangehörigen wurden für die systematische Genomanalyse insgesamt 416 Mikrosatelliten-Polymorphismen mit einem durchschnittlichen Abstand von 10 cM genotypisiert. Die parameter-freien genomweiten Kopplungsanalysen ergaben einen signifikanten Kopplungsbefund in der chromosomalen Region 3q26 (P = 1,7 x 10^{-5} bei *D3S3725*) sowie zwei Kopplungshinweise in den chromosomalen Regionen 2q36.1 (P = 5,4 x 10^{-4} bei *D2S1371*) und 14q23 (P = 5,6 x 10^{-4} bei *D14S63*). Die parametrischen Kopplungsanalysen bestätigen die parameter-freien Koplungsbefunde und weisen auf das Vorliegen von autosomal-dominanten Hauptgeneffekten bei jeweils einem Drittel der Familien hin. Positionell und funktionell plausible Kandidatengene sind die Gene der β-Untereinheit eines spannungsabhängigen Kalium-Kanals *″KCNA1B″* und des spannungsabhängigen Chlorid-Kanals *″CLCN2″* in der Region 3q26, das Gen des Chlorid-Bikarbonat Austauschers *″SLC4A3″* in der Region 2q36, und das Gen des Natrium-Kalzium Austauschers *″SLC8A3″* in der Region 14q23. Derzeit führen wir Mutationsanalysen bei den genannten Kandidatengenen durch, um disponierende Genmutationen bei IGE-Patienten von Familien mit positivem Kopplungshinweis zu identifizieren. Der molekulargenetische Nachweis von Genmutationen für die IGE wird konkrete Einblicke in die molekularen Mechanismen der Epileptogenese eröffnen und die Voraussetzungen dafür schaffen, rational begründete Therapieansätze zu entwickeln und diese differentiell bei Epilepsie-Patienten einzusetzen.

4 Literaturverzeichnis

Avanzini G, de Curtis M, Pape HC, Spreafico R (1999) Intrinsic properties of reticular thalamic neurons relevant to genetically determined spike-wave generation. Adv. Neurol. 79: 297-309

Badner JA, Gershon ES, Goldin LR (1998) Optimal ascertainment strategies to detect linkage to common disease alleles. Am. J. Hum. Genet. 63: 880-888

Bate L, Williamson M, Gardiner M (2000) The major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. In: Juvenile myoclonic epilepsy: The Janz Syndrome. Schmitz B, Sander T (eds) Wrightson Biomedical Publishing LTD, Petersfield, UK, Philadelphia, USA, pp. 181-196

Beck-Mannagetta G, Janz D (1991) Syndrome-related genetics in generalized epilepsy. Epilepsy Res. Suppl. 4: 105-111

Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Gloor P (1987) Concepts of absence epilepsies: discrete syndromes or biological continuum? Neurology 37: 993-1000

Berkovic SF, Kennerson ML, Howell RA, Scheffer IE, Hwang PA, Nicholson GA (1994) Phenotypic expression of benign familial neonatal convulsions linked to chromosome 20. Arch. Neurol. 51: 1125-1128

Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL (1998) Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. Ann. Neurol. 43: 435-445

Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. Science 279: 403-406

Bowery NG, Parry K, Boehrer A, Mathivet P, Marescaux C, Bernasconi R (1999) Pertussis toxin decreases absence seizures and GABA(B) receptor binding in thalamus of a genetically prone rat (GAERS). Neuropharmacology 38: 1691-1697

Broide RS, Leslie FM (1999) The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. Mol. Neurobiol. 20: 1-16

Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL (1997) Mutation of the Ca2+ channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. Cell 88: 385-392

Burgess DL, Noebels JL (1999) Single gene defects in mice: the role of voltage-dependent calcium channels in absence models. Epilepsy Res. 36: 111-122

Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M (1998) A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. Nat. Genet. 18: 53-55

Charpier S, Leresche N, Deniau JM, Mahon S, Hughes SW, Crunelli V (1999) On the putative contribution of GABA(B) receptors to the electrical events occurring during spontaneous spike and wave discharges. Neuropharmacology 38: 1699-1706

Commission on Classification and Terminology (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Epilepsia 30: 389-399

Cooper EC, Jan LY (1999) Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenges. Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A. 96: 4759-4766

Coutts RT, Urichuk LJ (1999) Polymorphic cytochromes P450 and drugs used in psychiatry. Cell Mol. Neurobiol. 19: 325-354

Davies NP, Hanna MG (1999) Neurological channelopathies: diagnosis and therapy in the new millennium. Ann. Med. 31: 406-420

Davis S, Weeks DE (1997) Comparison of nonparametric statistics for detection of linkage in nuclear families: single-marker evaluation. Am. J. Hum. Genet. 61: 1431-1444

Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. Nature 380: 152-154

Durner M, Sander T, Greenberg DA, Johnson K, Beck-Mannagetta G, Janz D (1991) Localization of idiopathic generalized epilepsy on chromosome 6p in families of juvenile myoclonic epilepsy patients. Neurology 41: 1651-1655

Durner M, Janz D, Zingsem J, Greenberg DA (1992) Possible association of juvenile myoclonic epilepsy with HLA-DRw6. Epilepsia 33: 814-816

Durner M, Zhou G, Fu D, Abreu P, Shinnar S, Resor SR, Moshe SL, Rosenbaum D, Cohen J, Harden C, Kang H, Wallace S, Luciano D, Ballaban-Gil K, Klotz I, Dicker E, Greenberg DA (1999) Evidence for linkage of adolescent-onset idiopathic generalized epilepsies to chromosome 8-and genetic heterogeneity. Am. J. Hum. Genet. 64: 1411-1419

Durner M, Shinnar S, Resor SR, Moshe SL, Rosenbaum D, Cohen J, Harden C, Kang H, Hertz S, Wallace S, Luciano D, Ballaban-Gil K, Greenberg DA (2000) No evidence for a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. Am. J. Med. Genet. 96: 49-52

Elmslie FV, Williamson MP, Rees M, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, Sundqvist A, Friis ML, Richens A, Chadwick D, Whitehouse WP, Gardiner RM (1996) Linkage analysis of juvenile myoclonic epilepsy and microsatellite loci spanning 61 cM of human chromosome 6p in 19 nuclear pedigrees provides no evidence for a susceptibility locus in this region. Am. J. Hum. Genet. 59: 653-663

Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, Sundqvist A, Friis ML, Chadwick D, Richens A, Covanis A, Santos M, Arzimanoglou A, Panayiotopoulos CP, Curtis D, Whitehouse WP, Gardiner RM (1997) Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. Hum. Mol. Genet. 6: 1329-1334

Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A (2000a) Mutations of *SCN1A*, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. Nat. Genet. 24: 343-345

Escayg A, De Waard M, Lee DD, Wolf P, Mayer T, Baloh R, Sander T, Meisler MH (2000b) Mutations of the human $ß_4$ subunit gene *CACNB4* in idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. Am. J. Hum. Genet. 66: 1531-1539

Fletcher CF, Lutz CM, O'Sullivan TN, Shaughnessy JDJ, Hawkes R, Frankel WN, Copeland NG, Jenkins NA (1996) Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. Cell 87: 607-617

Fong GC, Shah PU, Gee MN, Serratosa JM, Castroviejo IP, Khan S, Ravat SH, Mani J, Huang Y, Zhao HZ, Medina MT, Treiman LJ, Pineda G, Delgado-Escueta AV (1998) Childhood absence epilepsy with tonic-clonic seizures and electroencephalogram 3-4-Hz spike and multispike-slow wave complexes: linkage to chromosome 8q24. Am. J. Hum. Genet. 63: 1117-1129

Gardiner RM (1999) Genetic basis of the human epilepsies. Epilepsy Res. 36: 91-95

Goldin LR, Martinez MN, Gershon E (1991) Samplimg strategies for linkage studies. Eur. Arch. Psychatry Clin. Neurosci. 240: 182-187

Greenberg DA, Delgado-Escueta AV, Widelitz H, Sparkes RS, Treiman L, Maldonado HM, Park MS, Terasaki PI (1988) Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. Am. J. Med. Genet. 31: 185-192

Greenberg DA, Durner M, Delgado-Escueta AV (1992) Evidence for multiple gene loci in the expression of the common generalized epilepsies. Neurology 42: 56-62

Greenberg DA, Durner M, Resor S, Rosenbaum D, Shinnar S (1995) The genetics of idiopathic generalized epilepsies of adolescent onset: differences between juvenile myoclonic epilepsy and epilepsy with random grand mal and with awakening grand mal. Neurology 45: 942-946

Greenberg DA, Durner M, Shinnar S, Resor S, Rosenbaum D, Klotz I, Dicker E, Keddache M, Zhou G, Yang X, Altstiel L (1996) Association of HLA class II alleles in patients with juvenile myoclonic epilepsy compared with patients with other forms of adolescent-onset generalized epilepsy. Neurology 47: 750-755

Greenberg DA, Durner M, Keddache M, Shinnar S, Resor SR, Moshe SL, Rosenbaum D, Cohen J, Harden C, Kang H, Wallace S, Luciano D, Ballaban-Gil K, Tomasini L, Zhou G, Klotz I, Dicker E (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: 508-516

Hosford DA (1995) Models of primary generalized epilepsy. Curr. Opin. Neurol. 8: 121-125

Janz D, Beck-Mannagetta G, Sander T (1992) Do idiopathic generalized epilepsies share a common susceptibility gene? Neurology 42: 48-55

Janz D (1997) The idiopathic generalized epilepsies of adolescence with childhood and juvenile age of onset. Epilepsia 38: 4-11

Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. Nature 386: 239-246

Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. Am. J. Hum. Genet. 58: 1347-1363

Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. Science 265: 2037-2048

Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nat. Genet. 11: 241-247

Lathrop GM, Lalouel JM (1984) Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. Am. J. Hum. Genet. 36: 460-465

Leppert M, Anderson VE, Quattlebaum T, Stauffer D, O'Connell P, Nakamura Y, Lalouel JM, White R (1989) Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. Nature 337: 647-648

Lewis TB, Leach RJ, Ward K, O'Connell P, Ryan SG (1993) Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q. Am. J. Hum. Genet. 53: 670-675

Liu AW, Delgado-Escueta AV, Gee MN, Serratosa JM, Zhang QW, Alonso ME, Medina MT, Cordova S, Zhao HZ, Spellman JM, Donnadieu FR, Peek JR, Treiman LJ, Sparkes RS (1996) Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-p11: locus heterogeneity and recombinations. Am. J. Med. Genet. 63: 438-446

Mamiya K, Ieiri I, Shimamoto J, Yukawa E, Imai J, Ninomiya H, Yamada H, Otsubo K, Higuchi S, Tashiro N (1998) The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. Epilepsia 39: 1317-1323

McNamara JO (1999) Emerging insights into the genesis of epilepsy. Nature 399: A15-A22

Neubauer BA, Fiedler B, Himmelein B, Kampfer F, Lassker U, Schwabe G, Spanier I, Tams D, Bretscher C, Moldenhauer K, Kurlemann G, Weise S, Tedroff K, Eeg-Olofsson O, Wadelius C, Stephani U (1998) Centrotemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14. Neurology 51: 1608-1612

Noebels JL (1996) Targeting epilepsy genes. Neuron 16: 241-244

Nöthen MM, Propping P, Fimmers R (1993) Association versus linkage studies in psychosis genetics. J. Med. Genet. 30: 634-637

Obeid T, el Rab MO, Daif AK, Panayiotopoulos CP, Halim K, Bahakim H, Bamgboye E (1994) Is HLA-DRW13 (W6) associated with juvenile myoclonic epilepsy in Arab patients? Epilepsia 35: 319-321

Pedley TA (1991) The use and role of EEG in the genetic analysis of epilepsy. Epilepsy Res. Suppl. 4: 31-44

Peters HC, mmer G, Volz A, Kaupmann K, Ziegler A, Bettler B, Epplen JT, Sander T, Riess O (1998) Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABABR1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy. Neurogenetics 2: 47-54

Propping P, Nöthen MM (1995) Genetic variation of CNS receptors--a new perspective for pharmacogenetics. Pharmacogenetics 5: 318-325

Puranam RS, McNamara JO (1999) Seizure disorders in mutant mice: relevance to human epilepsies. Curr. Opin. Neurobiol. 9: 281-287

Roberts SB, MacLean CJ, Neale MC, Eaves LJ, Kendler KS (1999) Replication of linkage studies of complex traits: an examination of variation in location estimates. Am. J. Hum. Genet. 65: 876-884

Ronen GM, Rosales TO, Connolly M, Anderson VE, Leppert M (1993) Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. Neurology 43: 1355-1360

Ryan SG, Wiznitzer M, Hollman C, Torres MC, Szekeresova M, Schneider S (1991) Benign familial neonatal convulsions: evidence for clinical and genetic heterogeneity. Ann. Neurol. 29: 469-473

Ryan SG (1999) Ion channels and the genetic contribution to epilepsy. J. Child Neurol. 14: 58-66

Sander T, Hildmann T, Janz D, Wienker TF, Neitzel H, Bianchi A, Bauer G, Sailer U, Berek K, Schmitz B (1995) The phenotypic spectrum related to the human epilepsy susceptibility gene "EJM1". Ann. Neurol. 38: 210-217

Sander T (1996) The genetics of idiopathic generalized epilepsy: implications for the understanding of its aetiology. Mol. Med. Today 2: 173-180

Sander T, Hildmann T, Wienker TF, Ramel C, Beck-Mannagetta G, Bianchi A, Sailer U, Berek K, Bauer G, Neitzel H, Schmitz B, Durner M, Johnson KJ, Janz D (1996) Common subtypes of idiopathic generalized epilepsies: lack of linkage to D20S19 close to candidate loci (EBN1, EEGV1) on chromosome 20. Am. J. Med. Genet. 67: 31-39

Sander T, Bockenkamp B, Hildmann T, Blasczyk R, Kretz R, Wienker TF, Volz A, Schmitz B, Beck-Mannagetta G, Riess O, Epplen JT, Janz D, Ziegler A (1997) Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. Neurology 49: 842-847

Sander T, Kretz R, Schulz H, Sailer U, Bauer G, Scaramelli A, Epplen JT, Riess O, Janz D (1998a) Replication analysis of a putative susceptibility locus (EGI) for idiopathic generalized epilepsy on chromosome 8q24. Epilepsia 39: 715-720

Sander T, Peters C, Janz D, Bianchi A, Bauer G, Wienker TF, Hildmann T, Epplen JT, Riess O (1998b) The gene encoding the alpha1A-voltage-dependent calcium channel (CACN1A4) is not a candidate for causing common subtypes of idiopathic generalized epilepsy. Epilepsy Res. 29: 115-122

Sander T, Schulz H, Vieira-Saeker AM, Bianchi A, Sailer U, Bauer G, Scaramelli A, Wienker TF, Saar K, Reis A, Janz D, Epplen JT, Riess O (1999) Evaluation of a putative major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q14. Am. J. Med. Genet. 88: 182-187

Sander T, Bockenkamp B, Ziegler A, Janz D (2000) Progress in mapping the gene for juvenile myoclonic epilepsy. In: Juvenile myoclonic epilepsy: The Janz Syndrome. Schmitz B, Sander T (eds) Wrightson Biomedical Publishing LTD, Petersfield, UK, Philadelphia, USA, pp. 173-180

Schmitz B, Sailer U, Sander T, Bauer G, Janz D (2000) Clinical genetics in subtypes of idiopathic generalized epilepsies. In: Juvenile myoclonic epilepsy: The Janz Syndrome. Schmitz B, Sander T (eds) Wrightson Biomedical Publishing LTD, Petersfield, UK, Philadelphia, USA, pp. 129-144

Serratosa JM, Delgado-Escueta AV, Medina MT, Zhang Q, Iranmanesh R, Sparkes RS (1996) Clinical and genetic analysis of a large pedigree with juvenile myoclonic epilepsy. Ann. Neurol. 39: 187-195

Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M (1998) A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. Nat. Genet. 18: 25-29

Steinlein O, Anokhin A, Yping M, Schalt E, Vogel F (1992) Localization of a gene for the human low-voltage EEG on 20q and genetic heterogeneity. Genomics 12: 69-73

Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF (1995a) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Nat. Genet. 11: 201-203

Steinlein O, Schuster V, Fischer C, Haussler M (1995b) Benign familial neonatal convulsions: confirmation of genetic heterogeneity and further evidence for a second locus on chromosome 8q. Hum. Genet. 95: 411-415

Steinlein OK, Magnusson A, Stoodt J, Bertrand S, Weiland S, Berkovic SF, Nakken KO, Propping P, Bertrand D (1997a) An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Hum. Mol. Genet. 6: 943-947

Steinlein O, Sander T, Stoodt J, Kretz R, Janz D, Propping P (1997b) Possible association of a silent polymorphism in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha4 with common idiopathic generalized epilepsies. Am. J. Med. Genet. 74: 445-449

Steinlein OK (1998) New insights into the molecular and genetic mechanisms underlying idiopathic epilepsies. Clin. Genet. 54: 169-175

Steinlein OK, Stoodt J, Biervert C, Janz D, Sander T (1999) The voltage gated potassium channel KCNQ2 and idiopathic generalized epilepsy. Neuroreport 10: 1163-1166

Terwindt GM, Ophoff RA, Haan J, Sandkuijl LA, Frants RR, Ferrari MD (1998) Migraine, ataxia and epilepsy: a challenging spectrum of genetically determined calcium channelopathies. Dutch Migraine Genetics Research Group. Eur. J. Hum. Genet. 6: 297-307

Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, Avanzini G, Pape HC (1995) Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. J. Neurosci. 15: 3110-3117

Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George ALJ, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC (1998) Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na+-channel beta1 subunit gene SCN1B. Nat. Genet. 19: 366-370

Whitehouse WP, Rees M, Curtis D, Sundqvist A, Parker K, Chung E, Baralle D, Gardiner RM (1993) Linkage analysis of idiopathic generalized epilepsy (IGE) and marker loci on chromosome 6p in families of patients with juvenile myoclonic epilepsy: no evidence for an epilepsy locus in the HLA region. Am. J. Hum. Genet. 53: 652-662

Zara F, Bianchi A, Avanzini G, Di Donato S, Castellotti B, Patel PI, Pandolfo M (1995) Mapping of genes predisposing to idiopathic generalized epilepsy. Hum. Mol. Genet. 4: 1201-1207

Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. Nat. Genet. 15: 62-69

5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D. Janz, der durch seine epileptologische Kompetenz und seinen Enthusiasmus mein Interesse an der Epilepsie-Genetik weckte. Ohne seine unermüdliche Schaffenskraft wären die vorliegenden Forschungsarbeiten nicht realisierbar gewesen.

Frau Professor Dr. K. Mölling hat mich für die molekulare Genetik begeistert. Ich verdanke ihr meine molekulargenetische Grundausbildung, die es mir erlaubte, meine molekulargenetischen Interessen eigenständig zu verfolgen.

Herrn Prof. Dr. K. Einhäupl danke ich für seine Unterstützung und Betreuung meines Habilitationsvorhabens. Bei Herrn Prof. Dr. U. Heinemann möchte ich mich für seine Präsenz und seine wegweisenden Beratungen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. K. Sperling und Frau PD Dr. H. Neitzel für ihre Unterstützung und die Mitbetreuung meiner Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. A. Reis und Frau Dr. K. Saar gilt mein Dank für ihre Zusammenarbeit bei der systematischen Genomsuche. Ihre Kompetenz und ihr Einsatz waren essentiell für das Gelingen des Projekts. Herrn Prof. Dr. T.F. Wienker danke ich für seine freundschaftliche Betreuung und seine wertvollen Anregungen.

Herrn Herbert Schulz danke ich für seine Mitarbeit und Verläßlichkeit. Ohne ihn wäre die systematische Genomanalyse nicht in meinem Sinne realisierbar gewesen. Ebenfalls möchte ich den von mir betreuten Doktoranden, Frau W. Berlin, Frau B. Bockenkamp, Herrn Dr. T. Hildmann und Frau R. Kretz, meinen Dank aussprechen.

Die Zusammenarbeit mit den zahlreichen, multidisziplinären Kooperationspartnern hat mich stets inspiriert. Bedanken möchte ich mich namentlich bei: Herrn Prof. Dr. O. Dulac, Herrn Dr. A. Escayg, Herrn Prof. Dr. M. Gardiner, Herrn Dr. A. Heils, Frau Dr. M. Hoehe, Herrn Prof. Dr. K. Johnson, Hern Dr. K. Kaupmann, Herrn Prof. Dr. D. Lindhout, Frau Prof. Dr. M. Meisler, Herrn PD Dr. B. Neubauer, Herrn Prof. Dr. O. Riess, Frau PD Dr. O. Steinlein, Herrn Dr. A. Volz, Herrn Dr. F. Zara und Herrn Prof. Dr. A. Ziegler.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die Stiftung Michael haben meine Forschungsarbeiten durch Sachbeihilfen und Stipendien unterstützt.

Mein herzlicher Dank gilt den Familien und ihren betreuenden Ärzten für ihre Studienteilnahme und ihr Interesse an unseren Studien.