

**Ein erhöhter „Subschwellen“-Natrium-Strom als neuer
Mechanismus einer familiären Epilepsie mit einer
SCN2A Mutation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Lauxmann, Stephan Immanuel**

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Lerche
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Antkowiak
3. Berichterstatter: Professor Dr. H. Potschka

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Spannungsabhängige Natriumkanäle.....	1
1.1.1	Diversität der α -Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen	3
1.1.2	Funktionen spannungsabhängiger Natriumkanäle im Gehirn.....	5
1.1.3	Die auxiliären β -Untereinheiten	7
1.2	„Patch-clamp-Technik“.....	10
1.2.1	Varianten der „Patch-clamp-Technik“	11
1.3	Epilepsie	13
1.3.1	Idiopathische Epilepsien als Kanalopathien	14
1.3.2	Benigne familiäre Epilepsie-Syndrome des Neugeborenen- und Säuglinglinalters	16
1.4	Wissenschaftliche Fragestellung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Klinisches und genetisches Screening	18
2.1.1	Klinische Einschätzung.....	18
2.1.2	Mutationsscreening	18
2.2	Molekulare und zellbiologische Methoden	19
2.2.1	Mutagenese.....	19
2.2.2	Zellkultur.....	20
2.2.2.1	Subkultivierung und Erhaltung einer tsA-201 Zelllinie	20
2.2.2.2	Kryokonservierung	21
2.2.3	Transfektion.....	22
2.2.3.1	Transiente Zelltransfektion in tsA-201 Zellen	23
2.3	Elektrophysiologie.....	24

2.3.1	Setup	24
2.3.2	Experimentelles Vorgehen.....	26
2.3.3	Glaselektroden	31
2.3.4	Ag/AgCl-Elektroden	31
2.3.5	„Whole cell-Messungen“ von tsA-201 Zellen	31
2.3.6	Reagenzien und Lösungen.....	32
2.3.7	„Voltage-clamp-Protokolle“ und Datenanalyse	32
2.3.7.1	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	32
2.3.7.2	„Steady state“ der schnellen Inaktivierung	33
2.3.7.3	Inaktivierungs-Zeitkonstanten und "persistierender Strom"	34
2.3.7.4	Erholung von schneller Inaktivierung	34
2.3.7.5	„Use-dependence“	35
2.3.7.6	Aktionspotential-Stimulus und Aktionspotential-Train	35
2.3.7.7	Subtraktion von „Leak-“ und kapazitiven Strömen.....	36
2.3.8	Statistik.....	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Klinische Daten.....	37
3.2	Mutationsscreening.....	42
3.3	Funktionelle Charakterisierung der Y1589C Mutation	43
3.3.1	Stromdichte (<i>Current Density</i>)	43
3.3.2	<i>Steady-state</i> Aktivierung und Inaktivierung.....	44
3.3.3	Inaktivierungskonstante der schnellen Inaktivierung und persistierender Natriumstrom	45
3.3.4	Erholung von schneller Inaktivierung.....	46
3.3.5	„Use dependence“ und Aktionspotential-„Train“	47
3.3.6	Aktionspotential Stimulus	50

3.4	Einfluss der h β 1- und h β 2-Untereinheiten auf den Na $_v$ 1.2-Kanal.....	52
3.4.1	Stromdichte	52
3.4.2	<i>Steady-state</i> Aktivierung und Inaktivierung.....	54
3.4.3	Persistierender Natriumstrom und Inaktivierungs-Zeitkonstante	55
3.4.4	Erholung von schneller Inaktivierung.....	55
4	DISKUSSION	57
4.1	Funktionelle Folgen der neu identifizierten BFNIS Mutation im SCN2A-Gen.....	57
4.1.1	Klinische Aspekte	57
4.1.2	Molekulargenetische Aspekte der Y1589C Mutation	58
4.1.3	Elektrophysiologische Aspekte der Y1589C Mutation	59
4.1.3.1	Funktionelle Auswirkungen der Y1589C Mutation.....	59
4.1.3.2	Modulierende Effekte der β -Untereinheiten auf die Funktion der SCN2A Wildtyp- und Y1589C-Kanäle	63
4.2	Die bisher bekannten SCN2A Mutationen	66
4.2.1	Die zwölf bekannten BFNIS Mutationen	66
4.2.2	Andere SCN2A Mutationen	68
4.2.2.1	Dravet-Syndrom (SMEI).....	68
4.2.2.2	Infantile Spasmen	69
4.2.2.3	Epileptische Enzephalopathien und andere mit schweren Epilepsieformen assoziierte Syndrome	69
4.2.2.4	SCN2A-Mutationen, die nicht mit Epilepsien assoziiert sind	71
4.3	Funktionelle Auswirkungen bei anderen Natriumkanal-Mutationen	71
4.3.1	SCN1A, SCN3A und SCN8A.....	72
4.3.2	SCN4A	73
4.3.3	SCN5A	73
4.3.4	SCN9A, SCN10A und SCN11A.....	74

4.4	Einordnung der Y1589C Mutation und Schlussfolgerung	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	76
6	LITERATUR	78
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....	89
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	89
	DANKSAGUNG	90

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur spannungsabhängiger Natriumkanäle	2
Abb. 2: Phylogenetischer Baum der spannungsgesteuerten Na ⁺ -Kanäle	3
Abb. 3: Chromosomale Lokalisationen von humanen Natriumkanal-Genen	4
Abb. 4: Konformationsstadien	6
Abb. 5: Funktionelle Domänen der β 1-Untereinheit.....	8
Abb. 6: <i>Patch-Clamp</i> -Konfigurationen	12
Abb. 7: Beispiele betroffener Gene bei monogenetischen Epilepsien	15
Abb. 8: Transfektionsmethoden.....	23
Abb. 9: Setup-Aufbau	25
Abb. 10: Technisches Zubehör: Puller und Glaspipetten	27
Abb. 11: Stromkreislauf und Widerstände	30
Abb. 12: Aktivierungs-Protokoll	32
Abb. 13: Inaktivierungs-Protokoll.....	33
Abb. 14: „Recovery“-Protokoll mit Repolarisierungsphase bei -80/-100/-120 mV	34
Abb. 15: Stammbaum.....	37
Abb. 16: Patienten-EEG	39
Abb. 17: Sequenzanalyse.....	42
Abb. 18: Stromdichte	43
Abb. 19: <i>Steady-state</i> Aktivierung und Inaktivierung	44
Abb. 20: Inaktivierungskonstanten der schnellen Inaktivierung	45
Abb. 21: Persistierender Natriumstrom.....	46
Abb. 22: Erholung von schneller Inaktivierung	47
Abb. 23: <i>Use Dependence</i>	48
Abb. 24: AP Train	49
Abb. 25: Aktionspotential als Spannungs-Stimulus	50
Abb. 26: Aktionspotential-Stimulus - Normalisierte Ströme und Differenz- Darstellung	51
Abb. 27: Aktionspotential-Stimulus – Zeit bis zum Erreichen der Spitzenströme und negative Spitzenströme im Subschwellen-Bereich.....	52
Abb. 28: Stromdichte	53
Abb. 29: <i>Steady-state</i> Aktivierung und Inaktivierung	54

Abkürzungsverzeichnis

ADNFLE	autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (dt. Autosomal dominante nächtliche Frontallappen-Epilepsie)
AIS	Axoninitialsegment
AMP	Adenosine Monophosphat
AP	Aktionspotential
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BFNC	benign familial neonatal convulsions (dt. Benigne familiäre neonatale Anfälle)
BFNIS	Benign familial neonatal-infantile seizures (dt. Benigne familiäre neonatal-infantile Anfälle)
CAE	childhood absence epilepsy (dt. Kindliche Absence-Epilepsie)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (dt. Komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
EEG	Elektroenzephalogramm
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGMA	Epilepsy with Grand-Mal seizures on awakening (dt. Aufwach-Grand-Mal Epilepsie)
EGTA	Ethylene glycol tetra-acetic acid
GABA	γ -aminobutyric acid (dt. γ -aminobutyryl-Säure)
GEFS+	Generalized epilepsy with febrile seizures plus (dt. Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus)
HBSS	Hank's buffered salt solution
HEBS	HEPES buffered saline
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Säure
I	Stromamplitude
IGE	Idiopathisch Generalisierte Epilepsie
JAE	Juvenile Absence-Epilepsie
JME	Juvenile Myoklonus-Epilepsie
k	Steigungskonstante der Boltzmann Funktion
kDa	Kilodalton
LGI1-Gen	Leucine-rich glioma-inactivated-1-Gen

MEM	Modified Eagle's Medium
Na _v 1.1-Na _v 1.9	Na _x Voltage-gated sodium channel α -Untereinheit Isoformen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)
SMEB	Severe myoclonic epilepsy borderline (dt. Grenzwertige schwere myoklonische Epilepsie)
SMEI	Severe myoclonic epilepsy of infancy (dt. Schwere myoklonische Epilepsie des Kindesalters)
SNV	<i>Single nucleotide variant</i> (dt. Einzelnukleotid-Variante)
TTX	Tetrodotoxin
u.v.m.	und viele(s) mehr
V	Spannung
V _{rev}	Reversal potential (dt. Umkehr-Potential)
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten der Familienmitglieder mit neonatal-infantiler Epilepsie.....	41
Tabelle 2: Elektrophysiologische Daten im Überblick.....	56

1 EINLEITUNG

Ionenkanäle sind von zentraler Bedeutung für die Funktionsfähigkeit jeglicher lebender Zellen. Diese Transmembranproteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von schnellen Membranpotential-Änderungen und der synaptischen Signalübertragung. Darüber hinaus beeinflussen sie zahlreiche metabolische Prozesse im Zellinneren und andere wichtige physiologische Prozesse. Ihre Ionenselektivität erlaubt nur bestimmten Ionen, die Zellmembran entlang ihres Konzentrationsgradienten zu passieren. Das Öffnen und Schließen der Kanäle, „*Gating*“ genannt, wird durch Spannungsänderung, dem Binden von Liganden oder anderen Prozessen reguliert.

Mit Hilfe der Genklonierung und –sequenzierung konnten inzwischen nahezu alle Ionenkanal-Gene identifiziert werden. Die „patch-clamp-Technik“ ermöglicht das Aufzeichnen von Ionenflüssen durch singuläre offene Kanäle und die Determinierung von Ionenkanalfunktionen. Zudem hat die Röntgen-Kristallographie eine detaillierte Ansicht der dreidimensionalen Struktur einiger Ionenkanäle ermöglicht. Eine Reihe biochemischer und genetischer Störungen schränkt die Funktionsfähigkeit von bestimmten Ionenkanälen ein und führt somit zu spezifischen Erkrankungsbildern (Lehmann-Horn & Jurkat-Rott 1999, Lerche et al 2005).

Molekulare und elektrophysiologische Untersuchungen dieser genetisch bedingten Störungen von Ionenkanälen, den sogenannten „Kanalopathien“, machen die Pathophysiologie dieser Erkrankungen verständlicher und können dabei helfen neue Therapiekonzepte zu entwickeln. Außerdem haben natürlich vorkommende Mutationen wichtige Hinweise zum Verständnis der biophysikalischen Mechanismen der „Ionenkanal-Familie“ geliefert.

1.1 Spannungsabhängige Natriumkanäle

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind heteromere Protein-Komplexe. Sie bestehen aus einer großen glykosylierten α -Untereinheit (ca. 260 kDa), die mit

mindestens einer auxiliären β -Untereinheit assoziiert ist (Kearney et al 2001, Lerche et al 2005).

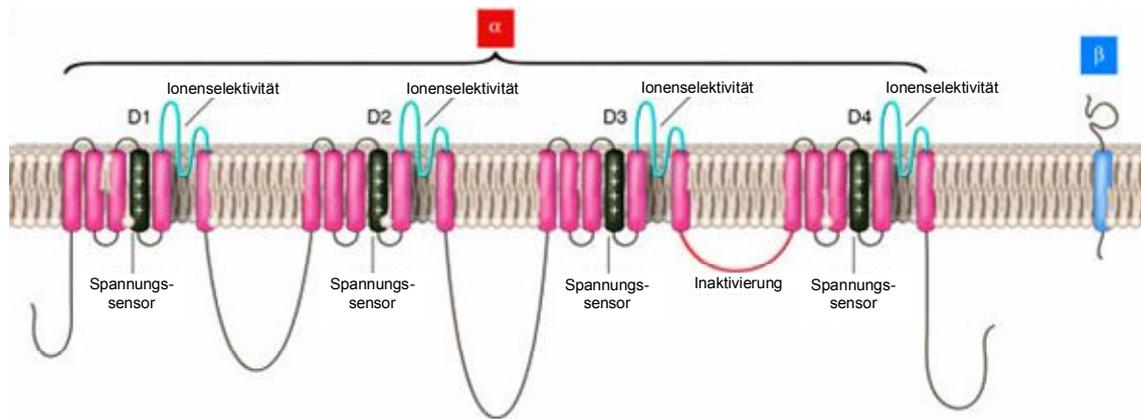


Abb. 1: Struktur spannungsabhängiger Natriumkanäle

Einfaches Modell, das die Transmembran-Topologie der α - und β -Untereinheiten repräsentativ darstellt. Die strukturellen Domänen, die Schlüsseleigenschaften tragen, sind hier mit D1 bis D4 gekennzeichnet.

(George 2005)

Die porenbildende α -Untereinheit enthält vier homologe Domänen (I-IV), von denen jede sechs Transmembransegmente hat, die mit S1-S6 bezeichnet werden (Abb. 1). Der „Spannungssensor“ ist im S4 Segment lokalisiert, das vier bis acht positiv geladene Aminosäurereste enthält (Yu & Catterall 2003). Der p-loop zwischen S5 und S6 ist in die Transmembranregion des Kanals eingebettet, die den ionenselektiven Filter am extrazellulären Ende der Pore bildet. Vom cytoplasmatischen Verbindungsstück zwischen Domäne III und IV wird angenommen, dass es ein Inaktivierungs-Partikel enthält, das die intrinsische schnelle Inaktivierung vermittelt (Patton et al 1992).

Spannungsabhängige Natriumkanäle werden in vielen erregbaren Zellen des Nervensystems von Säugern wie auch in Herz- und Skelettmuskeln exprimiert. Sie spielen eine essentielle Rolle sowohl bei der Initiierung, als auch bei der Weiterleitung von Aktionspotentialen in Neuronen und anderen elektrisch erregbaren Zellen, wie z.B. Myozyten und endokrinen Zellen (George 2005).

1.1.1 Diversität der α -Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen

Neun α -Untereinheiten ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$) spannungsabhängiger Natriumkanäle wurden bislang funktionell charakterisiert und eine zehnte eng verwandte Isoform (Na_x) könnte möglicherweise ebenfalls als Natriumkanal fungieren (Goldin et al 2000). Mindestens 20 Exons kodieren für jedes der neun Natriumkanal-Proteine. Die neun Säuger-Natriumkanäle können in drei Gruppen aufgeteilt werden, entsprechend der chromosomalen Lokalisation ihrer kodierenden Gene (George 2005, Plummer & Meisler 1999) wie in Abb. 2 dargestellt.

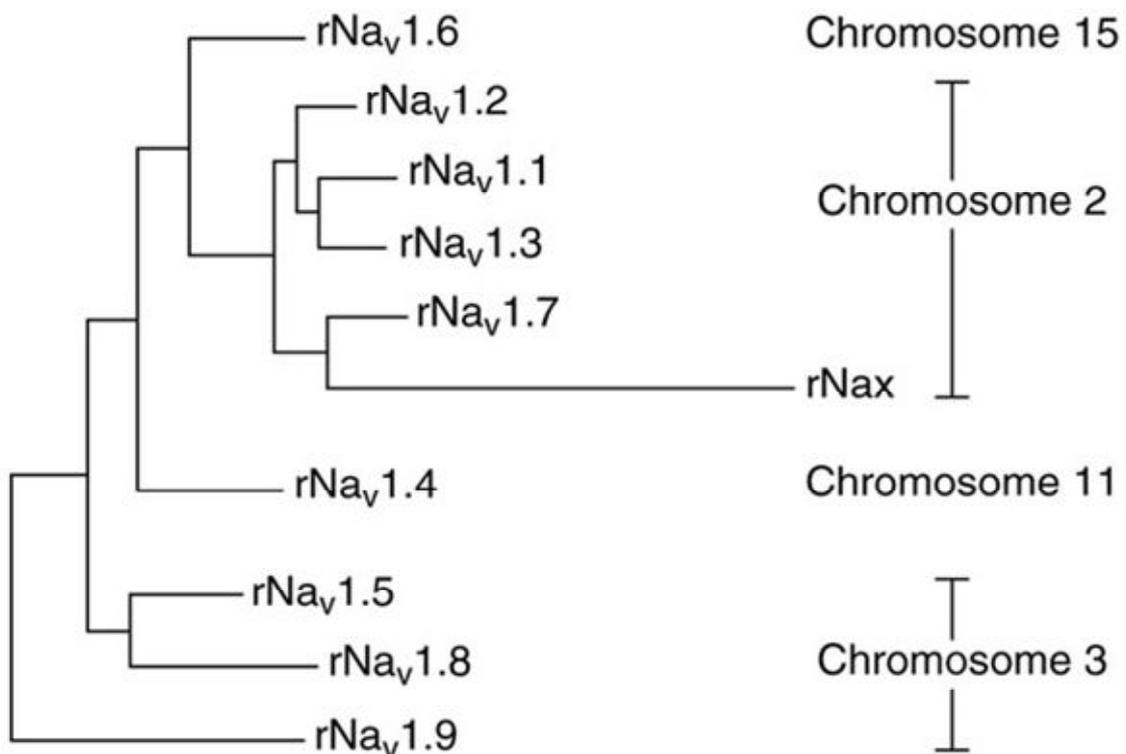


Abb. 2: Phylogenetischer Baum der spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle

Phylogenetischer Baum der spannungsabhängigen Natriumkanal- α -Untereinheiten von Ratten. Die menschlichen Chromosomen, auf denen die humanen Orthologen der entsprechenden Ratten-Gene gefunden werden, sind rechts gezeigt.

(Yu & Catterall 2003)

Die erste Gruppe besteht aus $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$ und $\text{Na}_v1.3$, sowie etwas ferner assoziiert $\text{Na}_v1.7$, deren kodierende Gene (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* und *SCN9A*) bei Menschen und Mäusen alle auf Chromosom 2 eng beieinander liegen (Abb. 3). Diese Kanäle teilen auch einige gemeinsame Charakteristika, so z.B. auch die Expression im Nervensystem und die Sensitivität für Nanomolar-Konzentrationen von Tetrodotoxin (TTX).

Die Gene, die für $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$ und $\text{Na}_v1.9$ kodieren, finden sich beim Menschen auf Chromosom 3 und tragen die Gennamen *SCN5A*, *SCN10A* und *SCN11A*. Diese Kanäle werden als TTX-resistent angesehen (Mikromolar-Konzentrationen von TTX werden zur Blockade dieser Kanäle benötigt). Die letzten beiden Isoformen $\text{Na}_v1.4$ und $\text{Na}_v1.6$ gehören zur dritten Gruppe, obwohl ihre kodierenden Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Sie teilen ähnliche Eigenschaften mit den Kanälen, die auf Chromosom 2 kodiert werden, wie z.B. die TTX-Sensitivität. $\text{Na}_v1.6$ wird von einem auf dem menschlichen Chromosom 15 lokalisierten Gen codiert und ist einer der wichtigsten Kanäle im Nervensystem, wohingegen $\text{Na}_v1.4$ primär in adulten Skelettmuskelzellen exprimiert wird und sich das kodierende Gen auf Chromosom 11 finden lässt.

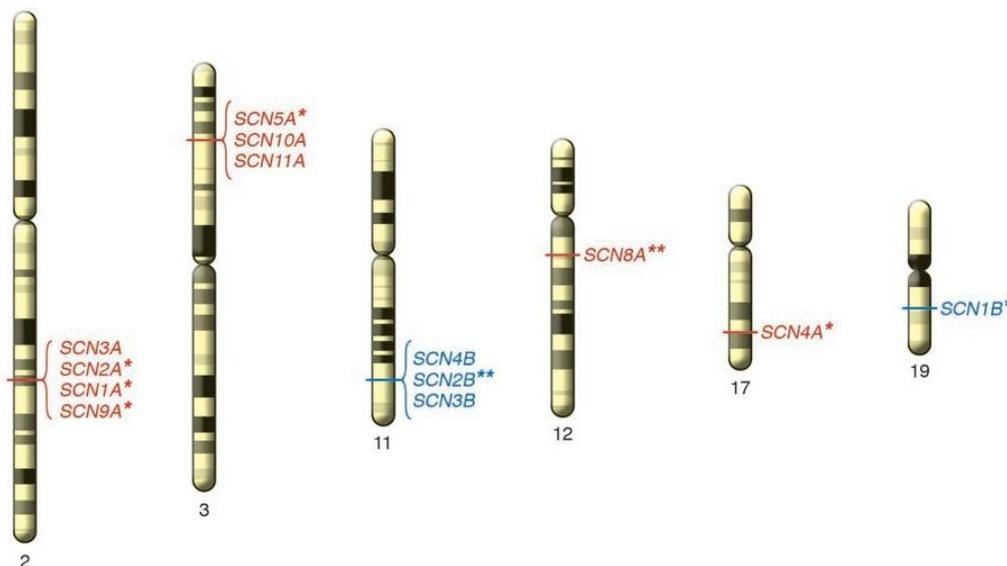


Abb. 3: Chromosomale Lokalisationen von humanen Natriumkanal-Genen

Chromosomale Lokalisationen der humanen Gene, die für α - (rot) und β -

Untereinheiten (blau) von humanen spannungsabhängigen Natriumkanälen kodieren. Ein Sternchen neben dem Gen-Namen zeigt eine Assoziation mit einer vererbaren menschlichen Erkrankung an, ein Doppelsternchen mit Mäuse-Phänotypen.

(George 2005)

Zusätzlich generieren posttranskriptionale Verarbeitung, alternatives „*Splicing*“ und „*RNA editing*“ eine noch breitere Diversität von Natriumkanälen. Dabei wird alternatives *Splicing* für sechs der im Nervensystem von Säugern vorkommenden Isoformen beschrieben: Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 (Gustafson et al 1993, Kasai et al 2001, Lu & Brown 1998, Schaller et al 1992), Na_v1.5 (Raymond et al 2004, Zimmer et al 2002), Na_v1.6 (Plummer et al 1997) und Na_v1.7 (Belcher et al 1995, Raymond et al 2004).

Es sind ganz unterschiedliche Faktoren wie z.B. das Alter, der Ursprung des Gewebes oder auch das Vorhandensein einer modulierenden Substanz (z.B. Dibutyryl-zyklisches AMP), die den Anteil differentieller *Splice*-Transkripte ausmachen (Dietrich et al 1998, Gustafson et al 1993, Oh & Waxman 1998, Plummer et al 1997). Die alternativen *Splice*-Isoformen von Exon 6, als Exon 6N und Exon 6A bezeichnet, werden lediglich durch den Austausch einer einzigen Aminosäure (Asn zu Asp) an Position 209 verursacht, das im extrazellulären Loop zwischen S3 und S4 auf Domäne I lokalisiert ist und resultieren in zwei hochkonservierte, vom Entwicklungsstadium abhängig regulierte alternative *Splice*-Isoformen des humanen Na_v1.2 (Kasai et al 2001). Eine der *Splice*-Varianten wird hauptsächlich neonatal exprimiert (N), während die andere *Splice*-Variante ausschließlich im Erwachsenenalter exprimiert wird (A). Jedoch ist die funktionelle Konsequenz aus diesem Sachverhalt weiterhin noch sehr schlecht verstanden.

1.1.2 Funktionen spannungsabhängiger Natriumkanäle im Gehirn

Spannungsabhängige Natriumkanäle haben drei Haupt-Konformationsstadien, ein geschlossenes (*closed*, „c“), ein offenes (*open*, „o“) und ein inaktives Stadium (*inactive* „I“) wie in Abb. 4 dargestellt.

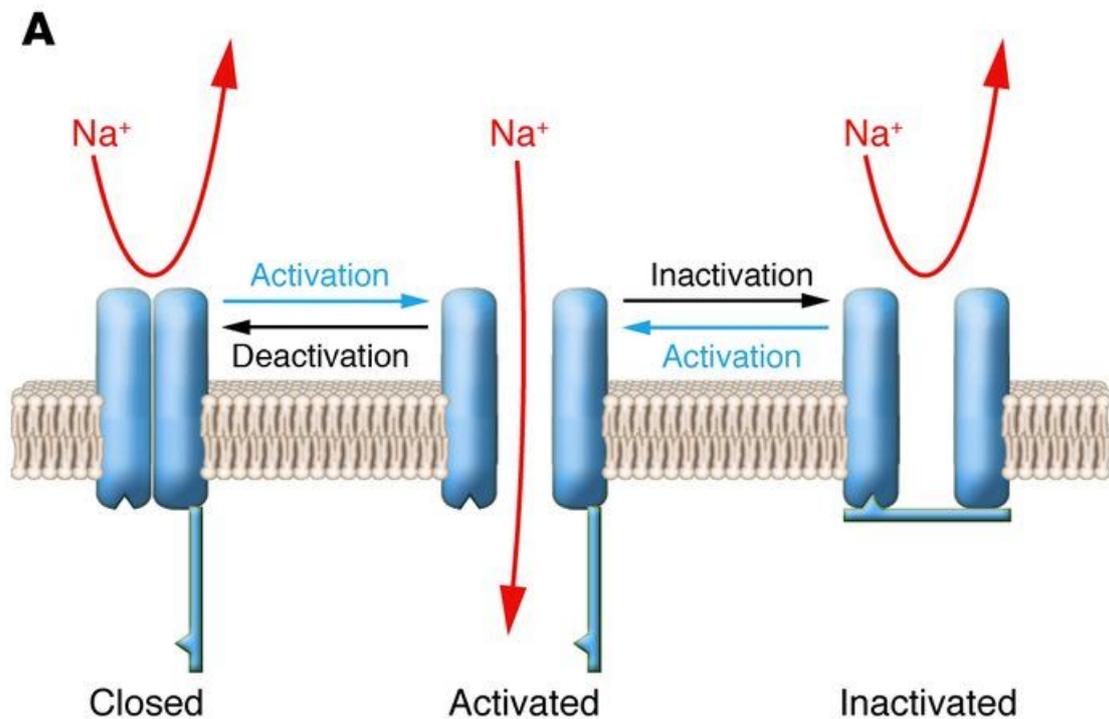


Abb. 4: Konformationsstadien

Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Natriumkanals, der die unterschiedlichen „Gating“-Zustände durchläuft. Dabei steht „closed“ für geschlossen, „activated“ für aktiviert bzw. offen und „inactivated“ für inaktiviert.

(George 2005)

Die Kanäle bleiben im geschlossenen Zustand beim Ruhemembranpotential und können auf Grund ihrer Spannungsabhängigkeit rasch aktiviert oder inaktiviert werden. Als Reaktion auf eine Membrandepolarisation bewegen sich die im S4 Segment lokalisierten Spannungssensoren nach außen und öffnen damit das „Aktivierungstor“ des Kanals innerhalb von Millisekunden durch einen bislang noch unbekanntem Mechanismus. Bei anhaltender Depolarisation werden die Kanäle inaktiviert durch das IFM Motiv, das Inaktivierungspartikel, das sich nach innen in den Kanal faltet und dadurch die innere Öffnung der Pore blockiert (Eaholtz et al 1994, Hodgkin & Huxley 1952, Vassilev et al 1989, Vassilev et al 1988). Die Auswärtsbewegung des S4 Segments in Domäne IV löst durch das Schließen des intrazellulären „Inaktivierungstors“ eine schnelle Inaktivierung des Natriumkanals aus, was sich „Coupling“ (dt. „Koppelung“) von

Aktivierung und Inaktivierung nennt (Chen & Lucero 1999). Auf eine erneute Depolarisation bleiben die inaktivierten Kanäle für eine gewisse Zeit refraktär für weitere Öffnungen. Dieses Zeitfenster wird von der Zeit bestimmt, die für eine substanzielle (~80%) Erholung von der Inaktivierung benötigt wird; normalerweise ein paar Millisekunden.

Inaktivierung schließt den Kanal und verhindert eine erneute Öffnung bis zur Erholung, was ein Parameter ist, der die maximale Frequenz von Aktionspotentialabfolgen mitbedingt. Prolongierte Depolarisationen (Sekunden bis Minuten) resultieren in langsamer Inaktivierung, was ein anderer, vom Inaktivierungspartikel unabhängiger Prozess ist.

Die Erholung von langsamer Inaktivierung benötigt einige Sekunden, was Natriumkanäle daran hindern könnte nach einer einzelnen oder mehreren Aktionspotentialfolgen wieder zu schnell verfügbar zu sein (Ellerkmann et al 2001, Mickus et al 1999).

Die molekularen Mechanismen der langsamen Inaktivierung sind noch nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese sagt, dass es sich aus einem strukturellen Rearrangement der Pore ergibt, ähnlich dem Mechanismus der *c-Type* Inaktivierung von Kalium-Kanälen (Liu et al 1996). Es wird angenommen, dass sich die innere Öffnung der Pore während der langsamen Inaktivierung nicht schließt (Ong et al 2000, Struyk & Cannon 2002). Es wird von einigen Regionen wie z.B. der Pore (Balsler et al 1996), dem Spannungssensor (Mitrovic et al 2000), S4-S5 Loops (Cummins & Sigworth 1996, Hayward et al 1997), oder auch S5 (Bendahhou et al 1999) und S6 (Hayward et al 1997) Segmenten berichtet, dass sie in den Prozess der langsamen Inaktivierung involviert seien.

1.1.3 Die auxiliären β -Untereinheiten

Biochemische Studien zeigten, dass die spannungsabhängigen Natriumkanäle des Gehirns aus einer porenbildenden α -Untereinheit und auxiliären β -Untereinheiten (Catterall 2000) zusammengesetzt sind. Die Familie der spannungsabhängigen Natriumkanal β -Untereinheiten beinhalten vier Mitglieder, β 1, β 2, β 3, β 4 und eine *Splice*-Variante von β 1, die als β 1B

bezeichnet wird. $\beta 1$ und $\beta 3$ sind aus chemischer Sicht enger miteinander verwandt (~45% Sequenzidentität), wie sich auch $\beta 2$ und $\beta 4$ stark ähneln (35 % Sequenzidentität; (Yu & Catterall 2003). $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten wurden ursprünglich als assoziierte Proteine von zerebralen α -Untereinheiten mit einer Stöchiometrie der Untereinheiten von 1:1:1 (Catterall 2000) identifiziert. Diese zwei β -Untereinheiten teilen Ähnlichkeiten in der Struktur, haben beide eine große extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domäne, eine einzige Transmembrandomäne und kurze zytoplasmatische „tails“ (Isom et al 1992, Isom et al 1995a, Isom et al 1995b).

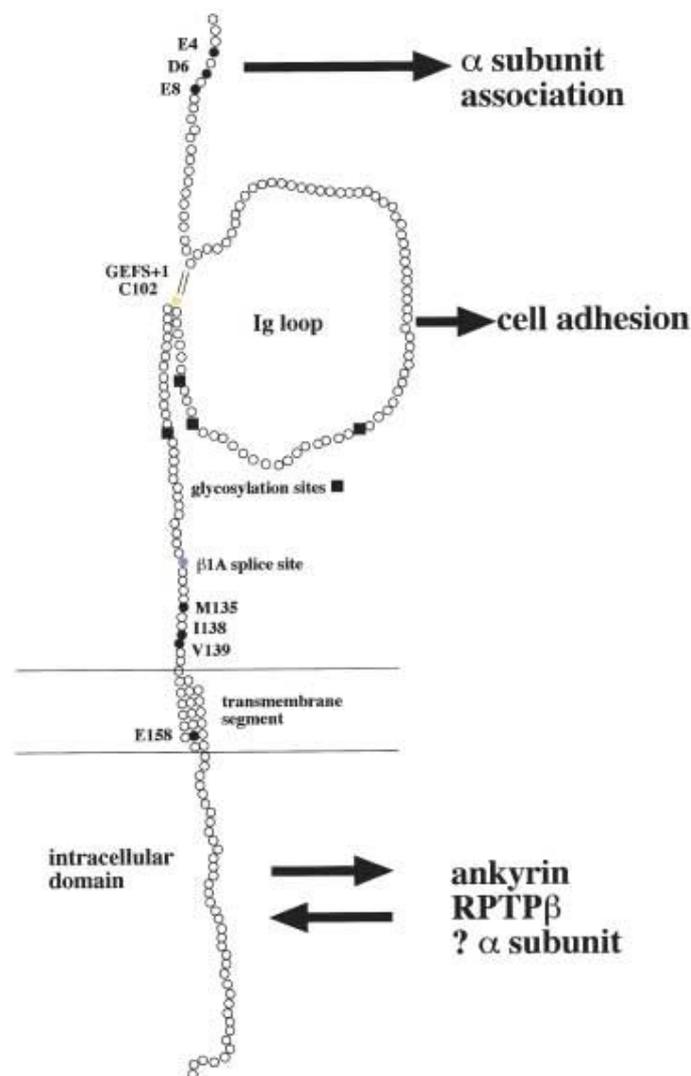


Abb. 5: Funktionelle Domänen der $\beta 1$ -Untereinheit

Die einzelnen Aminosäuren der β 1-Untereinheit von Ratten sind durch Kreise dargestellt. Disulfid-verbundene Cystein-Reste, von denen gedacht wird, dass sie die Immunglobulin-Schleifen-Region determinieren, sind dargestellt (Isom 1996). Aminosäure-Reste, die mit Hilfe von Site-directed-Mutagenese untersucht wurden, sind als gefüllte Kreise dargestellt (McCormick, 1998; McCormick, 1999). Mögliche N-verlinkte Glykosylierungs-Stellen sind als Quadrate abgebildet. Die extrazelluläre Domäne hat sich dabei als entscheidend für die α - β 1-Untereinheit Interaktionen, wie auch die Zelladhäsion gezeigt. Dagegen ist die intrazelluläre Domäne bei der Rekrutierung von Ankyrin und bei Interaktionen mit RPTP β beteiligt.

(Isom 2001)

Die β 1-Untereinheit ist ein 23 Kilodalton (kDa) großes Protein, das nonkovalent mit der α -Untereinheit assoziiert ist. Sie hat vier Cysteine in ihrer extrazellulären Domäne, die zur Immunglobulin-ähnlichen Faltung beitragen. Die β 2-Untereinheit ist 21 kDa groß, enthält fünf extrazelluläre Cysteine und bildet eine Disulfid-Brücke mit der zugehörigen α -Untereinheit (Abb. 5)

Die β -Untereinheiten scheinen multifunktional zu sein: Erstens modulieren sie das Öffnungsverhalten spannungsabhängiger Natriumkanäle. Koexpression von β 1- und β 2-Untereinheiten rücken Natriumkanäle in einen „*Fast-gating-Modus*“ durch ein beschleunigtes Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten (Isom et al 1992, Isom et al 1995a, Isom et al 1995b, Qu et al 2001). Funktionelle Untersuchungen haben bewiesen, dass die extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Faltung von β 1 entscheidend ist für die Modulation (Chen & Cannon 1995, Makita et al 1996, McCormick et al 1998, McCormick et al 1999). Die Loops auf der extrazellulären Seite der Transmembransegmente IS5-S6 und IVS5-S6 wurden als wichtige Regionen für die Interaktion zwischen α - und β 1-Untereinheit ausgemacht (Makita et al 1996, Qu et al 1999). Interaktionen des extrazellulären *Loops* mit Transmembransegment IVS6 dienen der Modulation der Kanalaktivierung und dem „*Coupling*“ mit der schnellen Inaktivierung mittels eines noch ungeklärten Mechanismus. Andere Arbeiten haben ebenfalls eine intrazelluläre Interaktionsdomäne der α - und der

β_1 -Untereinheit gezeigt (An et al 1998, Malhotra et al 2002, Meadows et al 2001).

Zweitens dienen sie als Zelladhäsionsmoleküle, die Zell-Zell-Interaktionen im Nervensystem und auch in anderen Geweben vermitteln. Die Interaktionen von β_1 und β_2 mit Ankyrin, Tenascin-R und Neurofascin könnten für das „*Targeting*“ von Natriumkanal-Komplexen zu speziellen Regionen, wie z.B. den Ranvier-Schnürringen oder dem Axonitalsegment (AIS) verantwortlich sein. Sie könnten zudem die hohe Dichte von Natriumkanälen in diesen Regionen stabilisieren (Malhotra et al 2000, Ratcliffe et al 2001, Srinivasan et al 1998, Yu & Catterall 2003). Nicht zuletzt können Mutationen im *SCN1B*-Gen, das für die β_1 -Untereinheit kodiert, mit dem GEFS+-Syndrom assoziiert sein und febrile Anfälle auslösen (Wallace et al 1998).

1.2 „Patch-clamp-Technik“

Die Funktion von Ionenkanälen ist das Leiten von Ionen über bzw. durch die Zellmembran, daher impliziert jegliche Art von Erforschung ihrer Funktionen auch Messungen von Strömen. Die Aufzeichnung inhärenter elektrischer Aktivität in Fröschen im 19. Jahrhundert war der Beginn eines erstaunlichen historischen Marschs bis hin zur „Patch-clamp-Technik“ wie sie heutzutage angewendet wird. Auf die Entwicklung des „*voltage clamp*“ durch (Cole 1949) für das Riesenaxon des Tintenfischs folgte die Anwendung der „Voltage-clamp-Technik“ auf Zellen, die Mitte der 1970-er von Erwin Neher und Bert Sakmann (Neher & Sakmann 1976) beschrieben wurde, so wie eine weitere Verfeinerung und Verbesserung durch Hamill (Hamill et al 1981).

Die Voltage-clamp-Technik, bei der die Spannung über der Zellmembran durch einen Rückkopplungs-Kreislauf kontrolliert wird, der den „Netto-Strom“ zunächst erfasst und dann ausgleicht, war über mindestens ein halbes Jahrhundert das beste biophysikalische Instrument, um spannungsempfindliche Kanäle zu erforschen. Informationen über die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Proteine wurde über die Anwendung von ein paar einfach strukturierten *Voltage-clamp*-Protokollen gewonnen. Diese basierten auf dem Auslenken der

Spannung - von einem Haltepotential ausgehend - zu ganz bestimmten Testpotentialen und auf dem Aufzeichnen des dabei auftretenden transienten Stroms. Die Analyse dieses Stroms hinsichtlich des Zeitverlaufs und der Spannungsabhängigkeit lässt Rückschlüsse auf die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der Kanalöffnung und -schließung zu.

1.2.1 Varianten der „Patch-clamp-Technik“

Wie in Abb. 6 dargestellt gibt es unterschiedliche Konfigurationen der „Patch-clamp-Technik“. Dabei ist allen gemeinsam, dass zunächst durch leichtes Ansaugen eine „*Cell-attached*“-Konfiguration erzeugt wird (eine detaillierte Beschreibung hierzu folgt im Kapitel 2.3.2). Dann unterscheiden sich die einzelnen Konfigurationen jedoch in der weiteren Ausführung für Strommessungen des „*Patches*“ (engl. Fleck, Flicker, Füllstück) wie z.B. bei der „*Inside-out*“- und „*Outside-out*“-Konfiguration (s. Beschreibung Abb. 6).

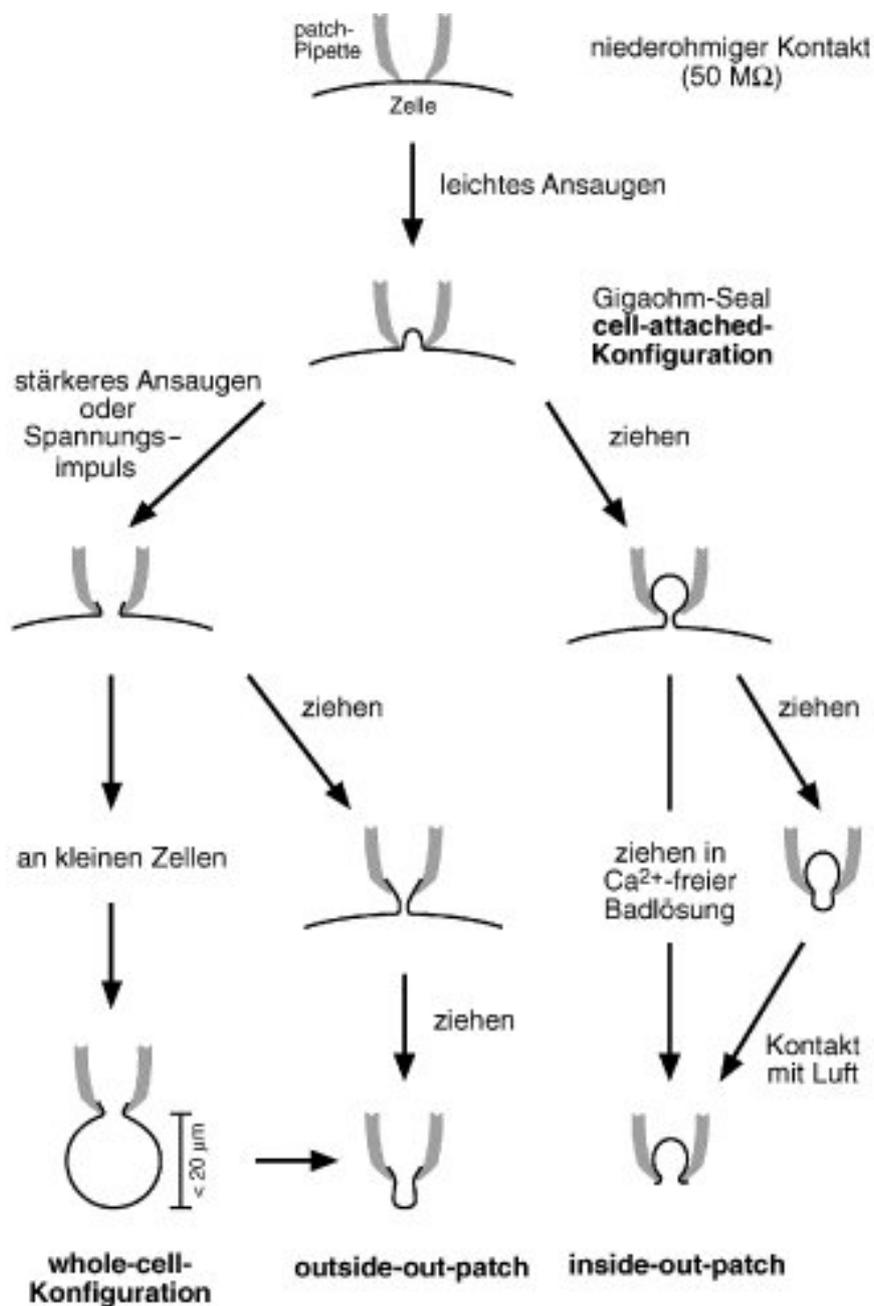


Abb. 6: Patch-Clamp-Konfigurationen

Einfaches Aufsetzen der *Patch*-Pipette auf die Zelle führt zur Ausbildung eines niederohmigen Widerstands am Pipettenrand, der nach leichtem Ansaugen in einen Gigaohm-Seal übergeht (*cell-attached*-Modus). Diese Ableitkonfiguration ist zur Registrierung von Einzelkanalaktivität geeignet. Durch weiteres stärkeres Ansaugen oder durch einen Spannungsimpuls kann das unter der Pipette liegende Membranareal aufgerissen werden. An kleinen (Durchmesser etwa 10 μm) Zellen können nun

Ionenströme über die gesamte Membran gemessen werden (*whole-cell-Ableitung*). Wenn die Pipette danach von der Zelle abgehoben wird, reißt ein Membranteilchen ab und schließt sich zu einem *outside-out-patch* (Außenseite nach außen). Alternativ kann die Pipette bereits im *cell-attached*-Modus von der Zelle abgehoben werden. Dies führt zur Bildung einer isolierten Membranvesikel, die sich öffnet, wenn die Pipettenspitze kurzzeitig aus der Badlösung gehoben und mit der Luft in Kontakt gebracht wird; nun ist die Innenseite der Membran gegen die Badlösung gekehrt (*inside-out-patch*). In einer Ca^{2+} -freien Badlösung kommt es zu keiner Vesikelbildung; der isolierte *patch* geht unmittelbar in die *inside-out*-Konfiguration über.

(modifiziert nach *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*)

1.3 Epilepsie

Epilepsie betrifft auf die gesamte Lebenszeit bezogen ungefähr 3% der Allgemeinbevölkerung und tritt deutlich häufiger während der Kindheit auf (Hauser et al 1996, Hildebrand et al 2013). Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch wiederholte, unprovokierte epileptische Anfälle auf Grund von synchronisierten elektrischen Entladungen von Neuronen des Zentralen Nervensystems (ZNS). Die Anfälle selbst stellen die klinische Manifestation der zugrunde liegenden transienten abnormalen Funktion der kortikalen neuronalen Aktivität dar. Die Symptome können dabei abhängig von der beteiligten Hirnregion breit variieren und reichen von Bewusstseinsveränderungen oder – einschränkungen, über dystone oder rhythmische Muskelaktivitäten, stereotypen Handlungen und visuellen Halluzinationen bis zu somatosensorischen Symptomen.

Die zwei wichtigsten Kriterien, die verwendet werden, um epileptische Anfälle und epileptische Syndrome zu klassifizieren, sind der Ursprung des Anfalls bzw. der Epilepsie und die zugrunde liegende Ursache. Der Ursprung kann entweder fokal sein, d.h. der Anfall beginnt in einer umschriebenen Hirnregion, oder generalisiert, d.h. es scheint das gesamte Gehirn beim Beginn involviert zu sein. Die Ursachen für sporadische oder wiederkehrende Anfälle sind zahlreich und beinhalten Hirntumoren oder Schlaganfälle, eine veränderte Stoffwechsellage und angeborene Malformationen des Gehirns. Jedoch finden

sich bei ca. 40% der Epilepsien keine anderen neurologischen Abnormalitäten. Auf Grund der unklaren Genese werden diese Anfallsformen „Idiopathische Epilepsien“ genannt und als Ursache werden hauptsächlich genetische Faktoren angenommen.

1.3.1 Idiopathische Epilepsien als Kanalopathien

Obwohl die idiopathischen Epilepsien genetisch bedingt sind, sind nur ein paar wenige spezifische Syndrome Einzel-Gen-Störungen. Die ersten Gene, die idiopathische Epilepsiesyndrome verursachen können, wurden in den letzten 20 Jahren identifiziert (Lerche et al 2005, Mulley et al 2003, Steinlein 2004, Thomas et al 2009). Die Zahl dieser Berichte wird wohl mit dem weiteren Fortschritt der mutationsanalysierenden Methoden und Technologien in nächster Zukunft ebenfalls stark steigen. Überraschenderweise kodieren die meisten der bislang identifizierten Epilepsie-Gene für Ionenkanäle (Abb. 7). Diese wichtige Rolle von Ionenkanälen in der Epileptologie wird unterstrichen von dem Fakt, dass die meisten Antikonvulsiva, die in klinischem Gebrauch sind, unterschiedliche Typen von Ionenkanälen modifizieren.

Gen	Syndrom	Jahr der Veröffentlichung
CHRNA4	ADNFLE	1995
KCNQ2	BFNS	1998
KCNQ3	BFNS	1998
SCN1B	GEFS+	1998
SCN1A	GEFS+ / Dravet-Syndrom	2000 / 2001-2008
CHRNA2	ADNFLE	2000
GABRG2	GEFS+ / CAE+ / FS	2000-2006
SCN2A	BFNIS	2001 / 2007
GABRA1	JME / Absence	2002-2006
CHRNA2	ADNFLE	2006

Gene, welche die Ionenkanal-Aktivität beeinflussen:

LGI1	ADPEAF	2002
------	--------	------

Abb. 7: Beispiele betroffener Gene bei monogenetischen Epilepsien

ADNFLE, autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (dt. Autosomal dominante nächtliche Frontallappen-Epilepsie); **ADPEAF**, autosomal dominant partial epilepsy with auditory features (dt. Autosomal dominante fokale Epilepsie mit auditorischen Merkmalen); **BFNS**, benign familial neonatal seizures (dt. Benigne familiäre neonatale Anfälle); **GEFSp**, genetic epilepsy with febrile seizures plus (dt. Genetische Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus); **JME**, juvenile myoclonic epilepsy (dt. Juvenile myoklonische Epilepsie).

(Nabbout & Scheffer 2013)

Da die axonale Reizweiterleitung durch spannungsabhängige Kanäle vermittelt wird, die Aktionspotentiale generieren und die Signal-Transduktion von Zelle zu Zelle durch Liganden-gesteuerte Kanäle, welche die synaptische Übertragung vermitteln, ist es von pathophysiologischer Seite aus klar, dass jede mutationsbedingte Malfunktion eines Kanals die Exzitabilität des Gehirns verändern und somit auch epileptische Anfälle induzieren kann.

Gene, die nicht für Ionenkanäle kodieren, aber trotzdem in der Epileptogenese relevant sind, sind z.B. das *Leucine-rich glioma-inactivated-1-Gen (LGI1)*, bei dem Mutationen die autosomal dominante laterale Temporallappen-Epilepsie verursachen können, oder das *STX1B-Gen*, das für ein präsynaptisches Protein

kodiert und fieber-assoziierte Epilepsiesyndrome hervorrufen kann (Schubert et al 2014), wie auch das *proline-rich transmembrane protein (PRRT2) Gen*, das in den letzten 3 Jahren mit Epilepsie, wie auch der paroxysmalen kinesigenen Dyskinesie, hemiplegischer Migräne und anderen neurologischen Bewegungsstörungen in Verbindung gebracht wurde.

Darüber hinaus gibt es auch Erkenntnisse, die darauf hinweisen, dass metabolische Veränderungen für eine idiopathische Epilepsie prädisponieren können, wie es für Mutationen im Glucose-Transporter GLUT1 - dem Transporter für den wichtigsten Energieträger des Gehirns über die Blut-Hirn-Schranke - gefunden wurde. Neben dem klassischen GLUT1-Defizienz-Syndrom, einer schweren epileptischen Enzephalopathie (De Vivo et al 1991), wurden GLUT1-Mutationen auch mit milden Phänotypen assoziiert gefunden; so auch bei idiopathisch generalisierten Epilepsien – v.a. Absence-Epilepsien (Roulet-Perez et al 2008, Suls et al 2008, Suls et al 2009, Weber et al 2008).

1.3.2 Benigne familiäre Epilepsie-Syndrome des Neugeborenen- und Säuglingsalters

Afebrile Anfälle, die im frühen Kindesalter auftreten, sind normalerweise ein starker Hinweis auf eine ernsthafte strukturelle Grunderkrankung des Gehirns oder auf eine metabolische Störung, häufig mit einer schlechten Prognose (Chevrie & Aicardi 1978, Matsumoto et al 1983).

Es treten jedoch auch drei benigne familiäre Epilepsie-Syndrome bei Neugeborenen und Kleinkindern auf: Benigne familiäre neonatale Anfälle (engl. *benign familial neonatal seizures*, BFNS; MIM #121200 und MIM #121201), benigne familiäre neonatal-infantile Anfälle (engl. *benign familial neonatal-infantile seizures*, BFNIS; MIM #607745), und benigne familiäre infantile Anfälle (engl. *benign familial infantile seizures*, BFIS; MIM #605751). Diese Syndrome können entsprechend dem Alter ihrer Erstmanifestation voneinander abgegrenzt werden, obwohl es deutliche Überschneidungen bei einzelnen Individuen geben kann (Berkovic et al 2004, Specchio & Vigeveno 2006).

Sie sind alle durch das Auftreten von Clustern afebriler fokaler oder sekundär generalisierter Anfälle mit Erstmanifestation in den ersten Lebenstagen (BFNS),

zwischen drei und zwölf Monaten (BFIS) und etwas variabler zwischen den ersten Lebenstagen und Monaten nach der Geburt (BFNIS) charakterisiert. Alle Syndrome zeigen vor dem dritten Lebensjahr eine spontane Remission mit einzelnen Anfällen im weiteren Verlauf und einer prinzipiell guten Prognose. BFNIS ist dabei eine milde, sich selbst limitierende autosomal dominante Epilepsieform, ohne Abnormalitäten des Gehirns oder andere ätiologische Faktoren.

Zwei dieser Syndrome sind an Gene geknüpft, die für Ionenkanal-Untereinheiten kodieren. BFNS wird durch Mutationen im *KCNQ2*- (MIM *602235) und *KCNQ3*-Gen (MIM *602232) verursacht (Biervert & Steinlein 1999, Charlier et al 1998, Singh et al 1998), die für die spannungsabhängigen Kaliumkanal-Untereinheiten $K_{V7.2}$ bzw. $K_{V7.3}$ kodieren und BFNIS wird durch Mutationen im *SCN2A* Gen (MIM *182390) verursacht, das für den spannungsabhängigen Natriumkanal $Na_{V1.2}$ codiert (Heron et al 2002). Hierfür sind bereits mehrere Missense-Mutationen im *SCN2A*-Gen identifiziert worden (Berkovic et al 2004, Heron et al 2002, Kamiya et al 2004, Lauxmann et al 2013, Liao et al 2010a, Liao et al 2010b, Sugawara et al 2001).

Erst kürzlich wurde das *PRRT2*-Gen (MIM *614386), das für ein präsynaptisches Protein codiert, als Hauptgen für BFIS ausgemacht, was oft zusammen mit paroxysmaler kinesiogener Dyskinesie in Erscheinung tritt (Chen et al 2011, Heron et al 2012, Lee et al 2012a, Lee et al 2012b, Schubert et al 2012, Wang et al 2011).

1.4 Wissenschaftliche Fragestellung

Die vorliegende Arbeit soll Antwort auf folgende Hauptfragen geben:

1. Welche a) klinischen und b) elektrophysiologischen Veränderungen werden durch die von unseren französischen Kollaborationspartnern neu in einer BFNIS Familie identifizierte Y1589C Mutation im *SCN2A*-Gen bewirkt?
2. Welche funktionellen Konsequenzen können daraus bestimmt werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Klinisches und genetisches Screening

Die klinische Einschätzung wie auch das Screening auf eine vermutete Natriumkanalmutation erfolgte durch unsere französischen Kooperationspartner, insbesondere Herrn Dr. Gaetan Lesca vom „Lyon Neuroscience Research Center“ und „Department of Medical Genetics“. Daher soll in dieser Arbeit nur eine kurze zusammenfassende Beschreibung dieser Punkte erfolgen.

2.1.1 Klinische Einschätzung

Der Proband (III-12) und seine Eltern (II-6 und II-7) wurden in die Pädiatrie in Villefranche-sur-Saone überwiesen. Jeder in der Studie Beteiligte wurde befragt und untersucht. Familienmitglieder der zweiten Generation (II-1, II-5 und II-6) wurden auch auf das Auftreten von infantilen Anfällen bei anderen Familienmitgliedern befragt.

Ein Patient, der infantile Anfälle erlitt (II-3), verstarb in der Folge einer Lungenembolie. Die vier jüngsten Patienten wurden während der Neugeborenen-Phase stationär aufgenommen. Medizinische Aufzeichnungen waren von drei Familienmitgliedern (III-2, IV-3 und III-12) vorhanden und zusätzliche EEGs für zwei davon (III-12 und IV-3). Ein schriftliches Einverständnis liegt von allen Beteiligten oder deren Eltern entsprechend dem französischen Bio-Ethik-Gesetz vor.

2.1.2 Mutationsscreening

Genomische DNA wurde aus venösen Blutentnahmen mit Hilfe von Qlamp *blood purification kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France) extrahiert. Es wurden die kodierenden Exons sowie angrenzende Introns des *SCN2A* Gens (GenBank accession number (Hg18): NM_021007.2) mit einem *BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v1.1* und einem *3130xl Gen-Analyzer* mit der *SeqScape v2.5 software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) resequenziert.

Um die Folgen der Missense Mutation auf der Proteinbasis abzuschätzen wurde die Alamut-1.42 *mutation prediction software* (Interactive biosoftware, Mont Saint-Aignan, France) verwendet, die drei unterschiedliche Scores berücksichtigt: die *Grantham*-Skala, *SIFT* (Sorting Intolerant From Tolerant, http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html) und *Polyphen*-Algorithmen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Die *Grantham*-Skala wurde benutzt, um die chemischen Abweichungen zwischen dem Wildtyp und dem Mutanten-Rest zu zeigen. Dieser Score berücksichtigt und beschreibt unter anderem den Unterschied des Seitenketten-Atomaufbaus, der Polarität und dem Volumen zwischen zwei Aminosäuren (Grantham 1974). *SIFT* und *Polyphen* Voraussagen basieren beide auf Alignment von orthologen oder paralogen Proteinsequenzen. Dabei bezieht *Polyphen* auch, wenn vorhanden, 3D-Daten mit ein. dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) und die „1000 genomes“-Datenbank (<http://browser.1000genomes.org/index.html>) wurden zur Überprüfung der Mutationen in Kontrollen verwendet.

2.2 Molekulare und zellbiologische Methoden

2.2.1 Mutagenese

Die Mutagenese und das Klonen der *SCN2A* Mutation wurde von anderen Mitarbeitern unseres Labors durchgeführt, weshalb an dieser Stelle nur eine kurz gehaltene Beschreibung stehen soll.

Die cDNA des humanen spannungsabhängigen Natriumkanals Na_v1.2 (adulte *Splice*-Isoform) wurde in einen pcDNA3.1 Plasmid-Vektor eingefügt und uns freundlicherweise von Dr. Steven Petrou (Melbourne) zur Verfügung gestellt.

Es wurde eine „*Site-directed mutagenesis*“ (dt. Ort-/Stellen-spezifische Mutagenese) mit Hilfe von *Quickchange*[™] (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; Primer sind auf Nachfrage verfügbar) in unserem Labor durchgeführt, um die Mutation in die adulte *Splice*-Variante des humanen spannungsabhängigen Natriumkanals Na_v1.2 zielgerichtet einzubringen. Die mutierte komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde vollständig resequenziert, bevor sie in Experimenten verwendet wurde, um die eingefügte

Mutation zu bestätigen und um etwaige andere Sequenz-Alterationen auszuschließen.

Die humanen auxiliären Natriumkanal-Untereinheiten $h\beta_1$ und $h\beta_2$ wurden uns freundlicherweise von der Firma GlaxoSmithKline in einem pCLH Vektor zur Verfügung gestellt. Wir tauschten die Hygromycin-codierende Region des Vektors mit der Sequenz aus, die für „*enhanced green fluorescent protein*“ (EGFP) oder CD 8 Marker-Gene kodieren, um pCLH- $h\beta_1$ -EGFP bzw. pCLH- $h\beta_2$ -CD8 zu erhalten (Liao et al 2010b).

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Subkultivierung und Erhaltung einer tsA-201 Zelllinie

Die tsA-201 Zelllinie ist eine Variante der humanen „*embryonic kidney cell line*“ (dt. embryonale Nieren-Zelllinie) HEK-293, die jedoch das „Simian-Virus 40 T-Antigen“ exprimiert. Dieses wiederum erlaubt die episomale Replikation transfizierter Plasmide, die den SV 40 Replikationsursprung enthalten, was zu einer Amplifikation dieser transfizierten Plasmide und zu einer erweiterten temporären Expression des gewünschten Genprodukts führt.

TsA-201 Zellen enthalten nur sehr wenige endogene Natriumkanäle. Deshalb werden sie häufig zur heterologen Expression und zur funktionellen Charakterisierung von Natriumkanälen mittels Patch-clamp-Technik verwendet. Standard-Zellkulturprotokolle und Abläufe für adhärente Zelllinien wurden angewendet: Die Zellen wurden in sterilen 25 ml Flaschen erhalten (Integra Bioscience or Greiner, Frickenhausen) in 50% *Dulbecco's modified essential medium* (DMEM) + 50% *Ham's Nährstoff-Mixtur* (GIBCO Brl, Paisley, Scotland oder PAA Laboratories, Linz, Austria), ergänzt durch 10% (v/v) fetales Rinderserum (Lonza, Switzerland) in kontrollierter 5% CO₂ Atmosphäre bei 37°C (Zellinkubator IG 150, Jouan, Unterhachingen, Germany). Dabei wurde regelmäßig Zellmedium ausgetauscht, um Überwachsen der Zellkultur und beschleunigten Zelltod durch verbrauchtes Medium zu verhindern. Zudem wurde mindestens zweimal wöchentlich eine Subkultur angelegt. Zur pH-Stabilisierung des Mediums, und um die dann darauffolgende Resuspension

abzumildern durch Schwächung der Zell-Zell- und Zell-Schalen-Verbindungen wurden die Zellen vor dem „*Splitting*“ behutsam mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier PBS-Lösung (PAA Laboratories, Linz, Austria) gewaschen. Anschließend wurde neues Medium in die Flasche gegeben, um eine neue Zell-Suspension zu schaffen. Dann war mehrfaches Pipettieren notwendig, um Zellklumpen aufzubrechen, und (mit einer 5ml Plastikpipette von Greiner, Frickenhausen, Germany) um letzte haftende Zellen abzulösen. Die Zellen konnten dann zusammen mit frischem Medium in einem Verhältnis von 1:3 in saubere, sterile Flaschen gegeben werden. Abschließend wurde die Kultur mikroskopisch untersucht auf erneutes Anhaften der Zellen am Flaschenboden und aktives Wachstum. Für die Transfektion wurden lediglich Zellen bis zur 30. Passage verwendet.

2.2.2.2 Kryokonservierung

Kryokonservierung ist eine Technik zum Einfrieren von Zellen und Geweben bei sehr niedrigen Temperaturen, typischerweise bei -197°C . So bleiben biologische Materialien genetisch stabil und metabolisch inert. Das intrazelluläre Wasser muss dabei durch andere Stoffgemische ersetzt werden, die beim Einfrieren nicht auskristallisieren. Zu diesem Zweck wurde die Kultur auf eine adäquate Zelldichte verdünnt, um das gewünschte Volumen einzufrieren. Das optimale Zeitfenster, um die Kryokonservierung durchzuführen liegt ungefähr bei zwei bis vier Tagen nach dem Anlegen einer Subkultur, einer Phase der aktiven Zellproliferation, in der sich die Zellzahl exponentiell vermehrt.

Die Zellen werden vom Substrat abgelöst und in einem Wachstums-Medium resuspendiert. Um die Zahl der vitalen Zellen zu bestimmen wurden die Zellen anschließend gezählt. Es folgte eine zehnmütige Zentrifugation mit 300g.

Die Menge an Einfrier-Medium - 10% DMSO (Dimethyl Sulfoxid: ein Kryoprotektor, der den Zelltod von gefrorenen Zellen verhindern kann) in frischem Medium – wurde entsprechend dem Verhältnis der Gesamt-Zellkonzentration und der gewünschten Zelldichte berechnet.

Das „Zell-Pellet“ wurde resuspendiert mit Hilfe des Kryokonservierungs-Mediums, auf- und abpipettiert, um eine Suspension mit Einzelzellen zu

erhalten. Nach erfolgter Dispension in die gewünschte Anzahl an Kryoröhrchen zur Kryokonservierung, wurden die Röhrchen für eine Stunde bei -20°C gehalten, dann für 24 Stunden (in einer Styropor-Box) in den -80°C -Gefrierschrank transferiert, um sie schließlich in Flüssig-Stickstoff bei -197°C zu lagern.

Bei Bedarf wurde das Auftauen so schnell wie möglich durchgeführt (im Wasserbad bei 37°C oder in der Hand bei Körpertemperatur), das Kryokonservierungs-Medium wurde sofort durch Transferieren der Zellen in eine 25 cm^2 Kulturflasche mit passend frischem und kaltem (4°C) Kulturmedium verdünnt. Die Zellen kamen anschließend in einen Inkubator bei 37°C und das Medium wurde nach 24 Stunden ausgetauscht. Lediglich eine Woche wurde so normalerweise benötigt, um die aufgetauten Zellen wieder in optimale Kulturbedingungen bringen zu können, wie sie vor dem Einfrieren waren.

2.2.3 Transfektion

Transfektion bedeutet die Einführung jeglicher Art von Nukleinsäuren auf nicht-virale Art in eine eukaryote Empfänger-Zelle. Wird eine transiente Transfektion durchgeführt, so wird die eingeschleuste DNA nicht ins nukleäre Genom eingebaut. Deshalb geht die Fremd-Nukleinsäure in späteren Stadien wieder verloren, wenn die Zelle eine Mitose durchläuft. Es stellt eine gebräuchliche und weit verbreitete Technologie zur Untersuchung von Gen-Funktionen dar. Prinzipiell können drei Transfektionsmethoden unterschieden werden: erstens physikalische oder „Direkt-Transfer-Methoden“ wie z.B. die Elektroporation, Mikroinjektion, Sonoporation, Magnetofektion oder Partikel-Guns (dt. Genkanonen). Zweitens gibt es biologische Verfahren wie die Transferinfektion oder Antikörper-vermittelte Infektion und eine dritte Gruppe chemisch-vermittelter Methoden, wie z.B. die Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion oder auch Verfahren, die auf Komplexierung mittels kationischer Polymere oder Nanopartikeln basieren.

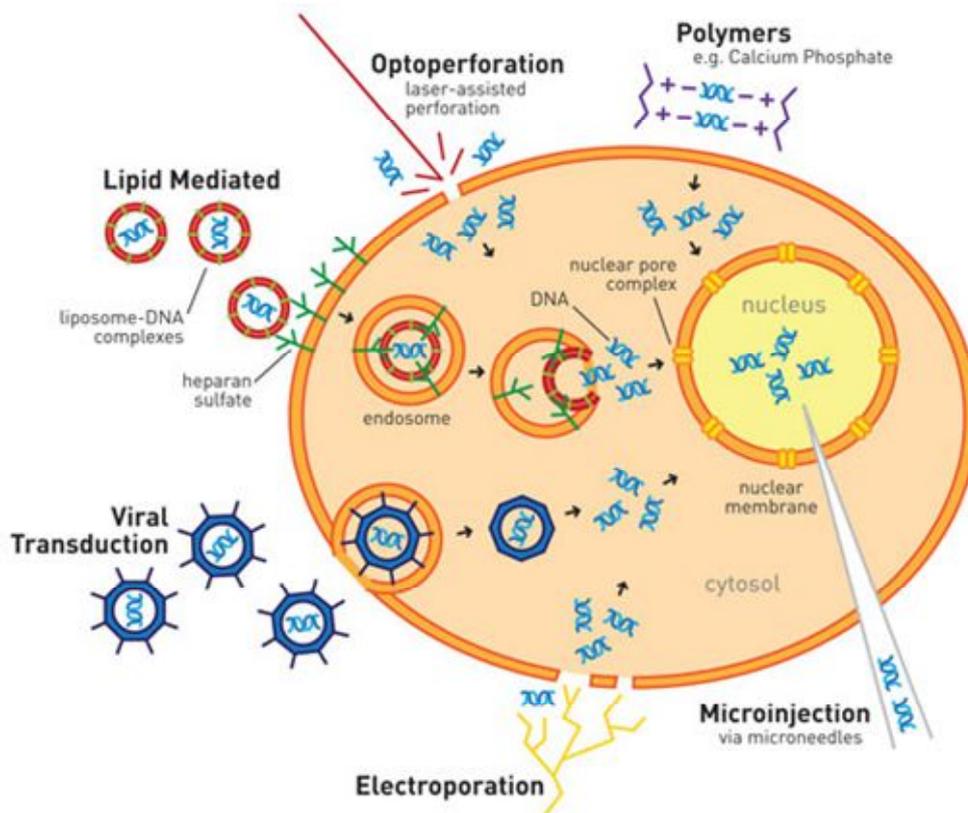


Abb. 8: Transfektionsmethoden

Schematische Darstellung der gängigen Transfektionsmethoden. Hierbei lassen sich physikalische (oder „Direkt-Transfer-Methoden“) wie Mikroinjektion (engl. „*microinjection*“), Elektroporation (engl. „*electroporation*“) und Laser-gestützte Optpoerforation (engl. „*optpoerforation*“) von biologischen und chemisch-vermittelten Verfahren wie z.B. Komplexierung mittels kationischer Polymere oder Lipofektion und Nanopartikeln unterscheiden. Ziel ist dabei immer das Einführen von Nukleinsäuren in eukaryote Empfänger-Zellen. Wird dies mit Hilfe von Viren erreicht, spricht man von Transduktion.

(Darstellung adaptiert von Life Technologies)

2.2.3.1 Transiente Zelltransfektion in tsA-201 Zellen

Wir verwendeten mit Mirus „TransIT®-LT1“ ein Breitspektrum-Verfahren der dritten (chemischen) Gruppe, das durch die Vermittlung von Polyaminen und kationischen Lipiden zur Endozytose führt. Dabei wurde eine hocheffiziente transiente Expression von Wildtyp- und Mutanten-Natriumkanal- α -

Untereinheiten alleine oder zusammen mit β_1 - und β_2 -Untereinheiten in tsA201 Zellen erreicht bei gleichzeitig niedriger zellulärer Toxizität.

Wenn lediglich α -Untereinheiten transfiziert wurden, fügten wir ein CD8 exprimierendes Plasmid hinzu (2 μg α -Untereinheit und 0,5 μg CD8), um die transfizierten Zellen mit „*Microbeads*“ erkennbar zu machen. Für eine Ko-Expression von α - und beiden β -Untereinheiten wurde eine Gesamt-DNA-Menge von 2,4 μg in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 transfiziert; anti-CD8 Antikörper-umhüllte „*Microbeads*“ (Dynabeads M450, Dynal, Norway), in Phosphat-gepufferter Salzlösung suspendiert, wurden zu den Zellen gegeben und behutsam geschüttelt. Nur diejenigen Zellen, die sowohl positiv für CD8 Antigen als auch für *EGFP*-Fluoreszenz waren, wurden für meine elektrophysiologischen Messungen verwendet.

2.3 Elektrophysiologie

2.3.1 Setup

Für die Messungen wurde ein Axopatch 200B Verstärker (Molecular Devices, Union City, CA, USA) verwendet (Abb. 9 ①), um kontinuierliche Einzelelektroden-Aufzeichnungen in der „*Whole-cell*-Konfiguration“ zu machen. Dabei wurde der Vorverstärker (Abb. 9 ②) auf einen motorisierten Mini-Manipulator (LN Unit Junior, Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, Germany) montiert und an einem invertierten Stereomikroskop Axiovert 10 (Zeiss, Germany) befestigt (Abb. 9 ③). Die Messkammer, das Mikroskop, so wie der Mikromanipulator wurden auf einem luftgefederten Tisch (Abb. 9 ④) aus schwerem Granit mit aktiver (pneumatischer) Unterstützung platziert, so dass die für die Messungen wesentlichen Bestandteile auf einem Luftpolster gefedert waren. Um das Experimentier-Setup wurde ein Faraday-Käfig (Abb. 9 ⑤) angebracht und alle Metallteile in der Nähe des Vorverstärkers mit Hilfe des virtuellen Erdungs-Eingangs des Verstärkers geerdet.

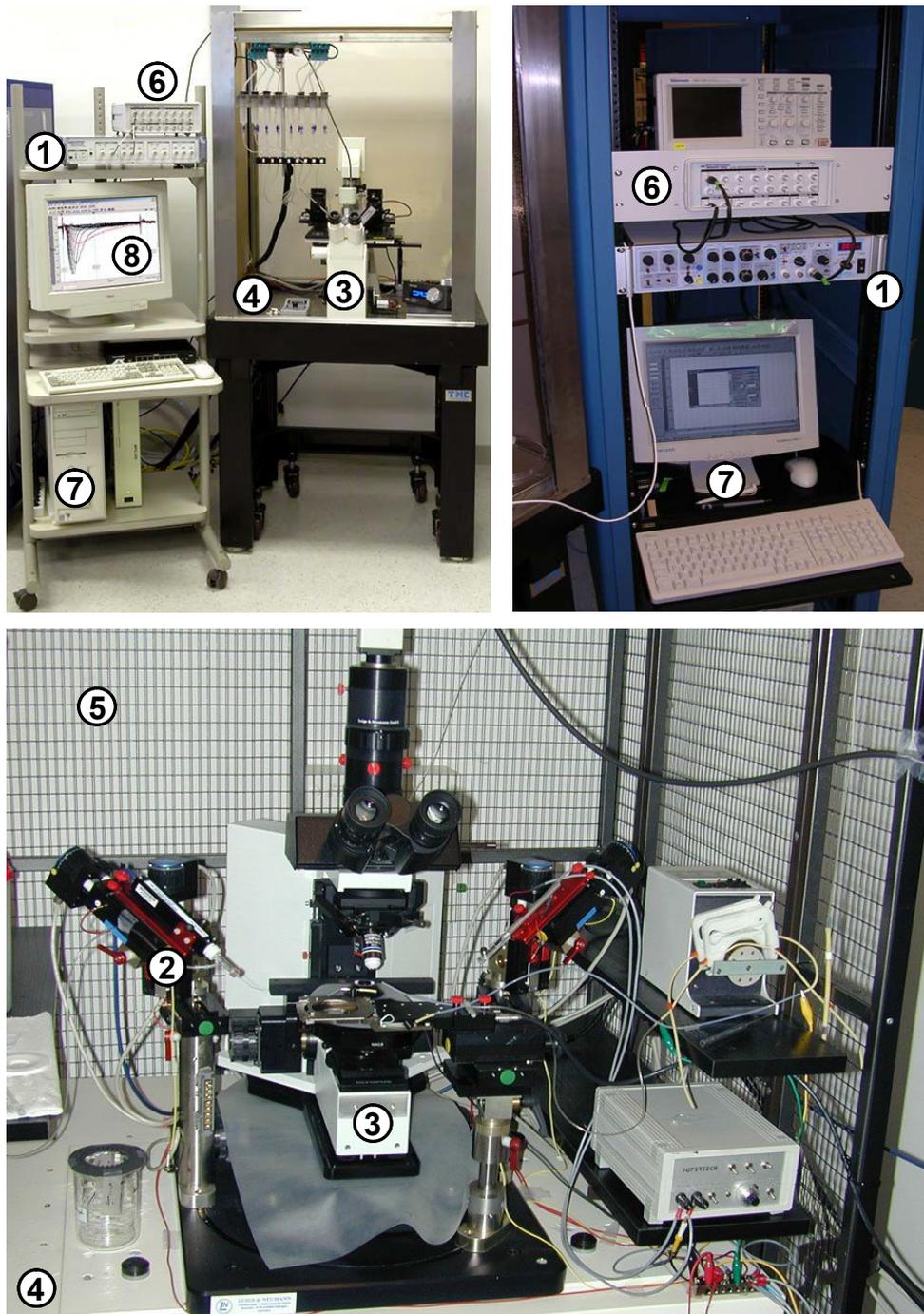


Abb. 9: Setup-Aufbau

Schematische Darstellung eines typischen Setup-Aufbaus: ① Digitaler Verstärker ② Vorverstärker ③ Invertiertes Stereo-Mikroskop ④ Antivibrations-Platte ⑤ Faraday-Käfig ⑥ Digitalisierer ⑦ PC ⑧ Daten-Erhebungs-Software

(Darstellung adaptiert von Molecular Devices®)

Bei allen Versuchs-Konfigurationen wurde der *Voltage-clamp*-Verstärker digitalisiert durch einen Digidata 1320A Digitalisierer (Abb. 9 ⑥; Axon Instruments, Union City, USA), der wiederum mit einem PC (Abb. 9 ⑦) verbunden war. So konnten die Experimente über die Daten-Erhebungs-Software *Clampex 8.0* (Abb. 9 ⑧; Axon Instruments, Union City, USA), was auf Windows-Basis (Microsoft Corp. Redmond, USA) betrieben werden kann, gesteuert. Die „Strom-Antwort“ auf einen Spannungs-Stimulus wurde auf Festplatte aufgenommen und zusätzlich eine weitere Kopie für jedes Protokoll extern gespeichert. Die Datenanalyse wurde schließlich auf einem PC mit *Clampfit* (Molecular Devices, U.S.A.), *GraFit* (Erithacus Software Ltd., West Sussex, UK), *Origin* (Microcal, Northampton, U.S.A.) und *Excel* (Microsoft) durchgeführt.

2.3.2 Experimentelles Vorgehen

Mit Hilfe der *Patch-clamp*-Technik im *Voltage-clamp* Modus ist es möglich die ganze Membran der Zelle auf eine gewünschte *Spannung* (engl. *voltage*) „zu klemmen“ (engl. *clamp*) und die Ströme, die durch die zelluläre Oberflächenmembran fließen, zu messen. Genau diese Ströme muss der *Patch-clamp*-Verstärker wiederum applizieren, um die Spannung auf dem gleichen Niveau („festgeklemmt“) zu halten.

Die elektrischen Ereignisse auf der zellulären Ebene werden via Elektrode gemessen, die mit dem *Patch-clamp*-Verstärker verbunden ist (Abb. 9 und Abb. 11). Der erste Verstärker fungiert als Strom-Spannungs-Konverter, der (zweite) Rückkopplungs-Verstärker vergleicht die beiden Spannungseingänge, die er empfängt, d.h. zum einen die Spannung des ersten Verstärkers (von der Pipettenelektrode) und die gewollte Spannung auf der „geklemmten“ Membran („Kommandospannung“/„Kommandopotential“). Dementsprechend generiert er den ausgehenden Strom durch Subtraktion der beiden Eingänge.

Die Elektrode (Abb. 10 oben rechts) ist von einer Borosilikat Glaspipette (Abb. 10 unten links) umgeben, deren feine Spitze mit einer Ionen-Pufferlösung gefüllt ist. Die Glaspipette wird nun unter mikroskopischer Kontrolle mit der

Zellmembran in Kontakt gebracht. Zwischen der Glaselektrode und der Zellmembran wird eine enge Verbindung hergestellt, indem die Pipette senkrecht zur Zelloberfläche aufgesetzt wird und dann vorsichtig Unterdruck erzeugt wird (Abb. 10 unten rechts). Dies resultiert in einem hohen Widerstand der Pipette, die in engstem Kontakt mit der Zellmembran steht, von mehr als einem Giga-Ohm ($1 \text{ G}\Omega$), einem sog. „Gigaseal“. Die „Cell-attached“-Konfiguration ist erreicht.

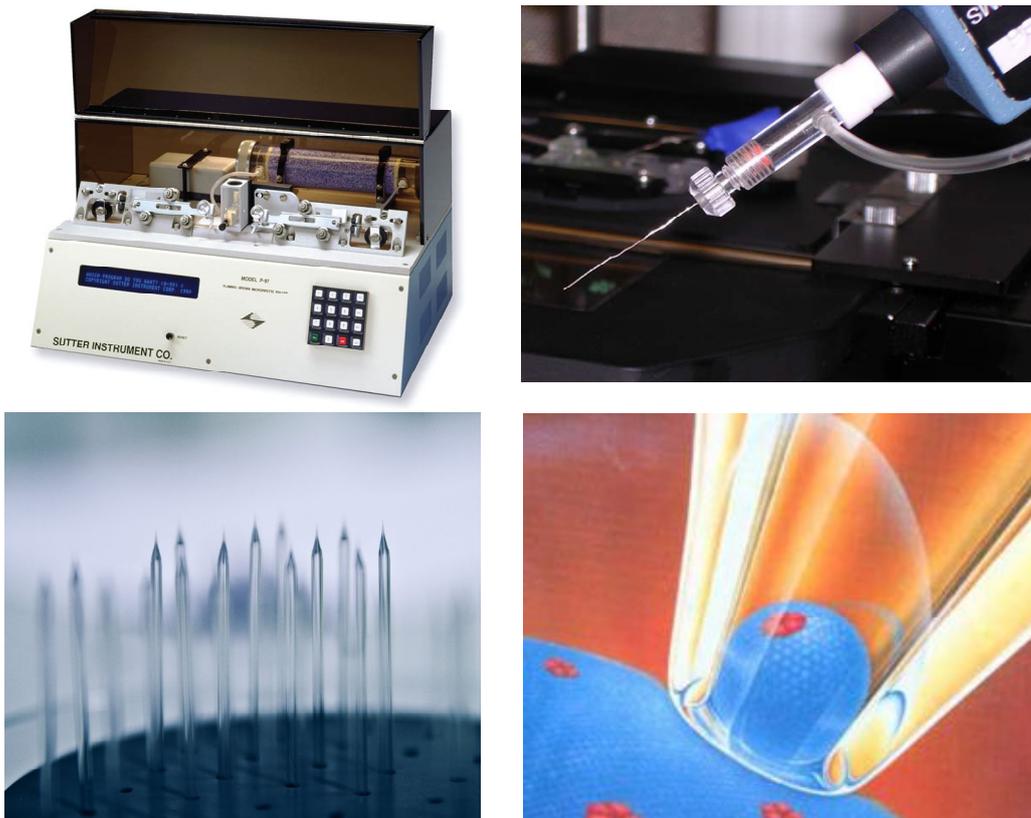


Abb. 10: Technisches Zubehör: Puller und Glaspipetten

Oben links: *Puller* wie wir ihn verwendeten. Oben rechts: Pipetten-Halter mit chlorierter Elektrode. Unten links: Vorbereitete Borosilikat Mikropipetten in einem Pipettenhalter aus unserem Labor. Unten rechts: Mikropipetten in *Whole-cell*-Konfiguration beim „*Sealing*“.

(Darstellung adaptiert von Molecular Devices®)

Ausgehend von dieser Situation können Messungen in unterschiedlichen Konfigurationen durchgeführt werden: 1. „*Whole-cell*-Messungen“, die

Aufzeichnungen über der gesamten Membran erlauben, wie in unserem Fall. Dabei wird in einem weiteren Schritt der angesaugte „*patch*“ durch eine plötzliche Erhöhung des bereits vorbestehenden Unterdrucks eingesaugt. Dies kann entweder durch eine geschickte schnelle Saugbewegung mit dem Mund oder - mit einer geeigneten Spritze - durch eine kräftige, aber nicht zu starke Rückzieh-Bewegung des Kolbens erfolgen. Auf diese Weise hat man eine typische „*Whole-cell*“-Konfiguration erzeugt (weitere Konfigurationen sind im Kapitel 1.2.1 beschrieben).

Um tatsächlich akkurate und genaue Messungen des Stromflusses der in der Zellmembran exprimierten Ionenkanäle zu erhalten, müssen zwei wichtige Punkte berücksichtigt werden: erstens ist eine sehr gute Kontrolle des Membranpotentials (d.h. ein sehr guter „*Clamp*“) unabdingbar und zweitens ist auf eine exakte Extraktion des gemessenen Stroms aus allen Strömen, die den Rückkopplungs-Resistor durchfließen zu achten. D.h. eine klare Trennung der kapazitiv bedingten transienten Ströme und *Leak*-Ströme von dem eigentlichen Ionenstrom.

1. Die Zellmembran auf einem bestimmten Wert „festzuklemmen“ erfordert:

- Kompensation des Diffusionspotentials (engl. *liquid junction potential*).
Immer wenn zwei unterschiedliche ionische Lösungen miteinander in Kontakt kommen, tritt ein Diffusionspotential zwischen den beiden Lösungen auf Grund von unterschiedlichen Ionenverteilungen in der Grenzzone auf. Das Diffusionspotential der Lösungen, die für unsere Messungen von Natriumkanälen benutzt wurden, lag bei ca. sieben mV und wurde bereits bevor die *Patch*-Formation erreicht wurde ausgeglichen.
- Kompensation des Fehlers auf Grund des sog. Serienwiderstands.
Die Hauptfehlerquellen beim „Festklemmen“ der Membran auf einer bestimmten Spannung sind auf zusätzliche Widerstände zwischen Pipettenelektrode und der Membran (R_s) zurückzuführen (Abb. 11).
Diese kommen zum einen von der Pipette selber und zum anderen von den Resten des Membranstücks (des „*Patches*“), das eingerissen wurde,

um die „*Whole-cell*-Konfiguration“ zu erreichen. Diese Widerstände – in Serie mit dem Membranwiderstand (Striano et al) – verursachen einen Spannungsabfall $V_s = I \cdot R_s$, dabei steht I für den Pipettenstrom, V für die Spannung. Die Kompensation des Serienwiderstand-Fehlers wird erreicht, indem zum Kommandosignal ein Spannungssignal proportional zum Membranstrom hinzugefügt wird, der dementsprechend skaliert ist. In *Whole-cell*-Experimenten wurde eine Kompensation von mindestens 95% des Serienwiderstands eingesetzt, was mit einem maximalen Spannungsfehler (engl. „*voltage error*“; V_s) von 5 mV für Stromgrößen zwischen 1 und 12 nA korrespondiert.

2. Messungen ausschließlich des Stroms, der durch die Ionenkanalporen fließt impliziert:

- Subtraktion von *Leak*-Strömen

Der Strom, der während eines *Voltage-clamp*-Experimentes gemessen wird, ist eine Summe von Kanalströmen und *Leak*-Strömen. Der *Leak*-Strom kann die Ionenpermeabilität durch die doppelte Lipidschicht der Membran oder durch schlecht definierbare Pfade unter Beteiligung unspezifischer Membranproteine widerspiegeln. Je höher der Nebenwiderstand (R_{pipette}) – hier der „*Seal*-Widerstand“ in *Gigaseal*-Größenordnung – desto kleiner wird der *Leak*-Strom (R_{leak}).

- Subtraktion anderer kapazitiver Ströme

Kapazitive Ströme treten dann auf, wenn die Spannung zwischen zwei Werten wechselt auf Grund der Ladung der Lipiddoppelschicht biologischer Membranen (langsame transiente Ströme, „*slow transients*“) und der Glaspipettenränder (schnelle transiente Ströme, „*fast transients*“), die elektrisch gesehen zwei Kondensatoren entsprechen.

Abb. 11 zeigt einen vereinfachten Stromkreislauf einer Zelle mit einer Kapazität C_m und einem Membranwiderstand R_m . Nun wird über einen Verstärker mit der Verstärkung μ die Spannung „festgeklemmt“ durch eine Elektrode mit dem Widerstand R_{pipette} . Die Applikation eines einfachen Spannungssprunges resultiert in einem kapazitiven Strom, der durch die einfache Gleichung

$$I_{IN} = \frac{R_{pipette} \cdot C_M}{\mu}$$

beschrieben werden kann. Dieser Strom kann mit den Strömen, die durch die Ionenkanäle fließen, interferieren und zusätzlich zu einer Sättigung der Verstärker der aufzeichnenden Stromkreisläufe führen. Die Erdung dieses kapazitiven Stroms wird durch einen zusätzlichen Strom erreicht, um das Kommandopotential zu erhalten. Dieser soll die Zelle direkt auf den gewünschten Wert bringen („aufladen“). Die entwickelten *Patch-clamp*-Protokolle enthalten deshalb auch ein *P/4 Leak*-Strom-Protokoll, wie auch ein Protokoll, das kapazitive Ströme subtrahiert.

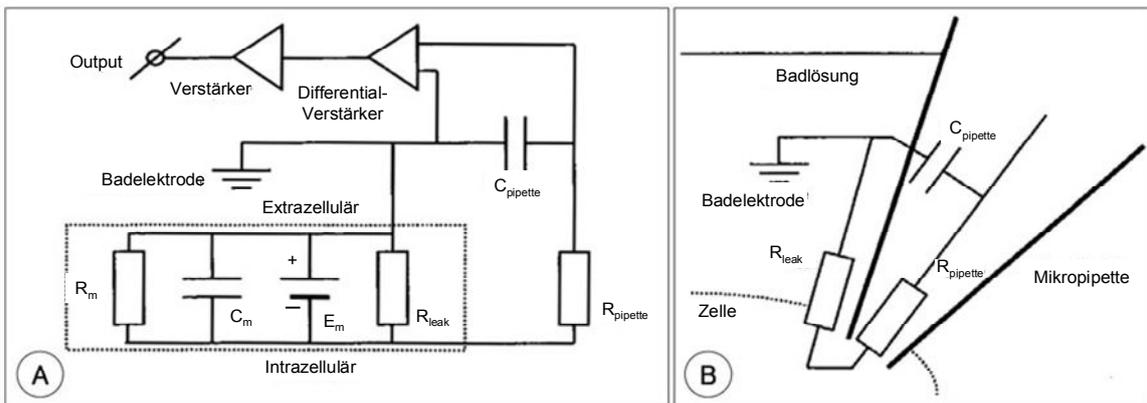


Abb. 11: Stromkreislauf und Widerstände

Bild **A** zeigt vereinfacht den Gesamt-Stromkreislauf der intrazellulären Aufzeichnungs-Konfiguration mit den auftretenden Widerständen von Pipette ($R_{pipette}$), Membran selbst (R_m) und einem möglichst gering zu haltenden Widerstand durch den *Leak*-Strom (R_{leak}). Desweiteren berücksichtigt sind neben den kapazitiven Strömen von Membran (Schubert et al) und Pipette ($C_{pipette}$) auch die Stromquelle E_m sowie die beiden Verstärker und die Badeelektrode. Bild **B** zeigt - ebenfalls vereinfacht dargestellt - den Stromkreislauf des „Zelle-Pipetten-Systems“.

(Mod. nach Mollemann A., Patch Clamping, an Introductory guide to patch clamp electrophysiology. John Wiley & Son;2002. p.23-6).

2.3.3 Glaselektroden

Glas-Mikroelektroden wurden mit Hilfe eines horizontalen „*Two stage DMZ Universal Pullers*“ (Zeitz Instruments, Augsburg, Germany) mit Filamenten aus dünnwandigen Borosilikat Glaspipetten gezogen (1,5 mm OD, 1,17 mm ID; Science Products, Hofheim, Germany). Die Mikroelektroden für *Patch-clamp*-Aufzeichnungen wurden Feuer-polieret. Die Widerstände der „*Whole-cell-patch-clamp*-Elektroden“ betragen zwischen 1 und 2 M Ω .

2.3.4 Ag/AgCl-Elektroden

Die Ag/AgCl-Elektroden wurden durch chemisch chlorierte Silberdrahtstücke vorbereitet (l=5cm, d=300 μ m, Science Products, Hofheim, Germany).

Dabei gaben wir die Elektroden für ca. 10 Minuten in Chlorid-Lösung bis ein dunkler Überzug entstand. Die Chlorid-Lösung setzte sich aus Eisenchlorid und verdünnter Hydrochlorid-Säure zusammen (600 ml destilliertes H₂O, 300 mg FeCl₃, 300 ml HCl). Vor jedem Experimentiertag wurde die Elektrode erneut rechloriert und gelegentlich zwischen den Experimenten, um eine Verschiebung des Pipettenpotentials auf Grund eines unzureichenden Chlorid-Überzugs zu verhindern.

2.3.5 „*Whole cell*-Messungen“ von tsA-201 Zellen

Für die „*Whole-cell*-Aufnahmen“ wurde zunächst etwa zehn Minuten gewartet bis sich zwischen der Pipette und der Intrazellular-Lösung (nach Membranruptur) ein Gleichgewicht einstellen konnte, und um die Kinetik der Kanäle, die sich im Laufe der Zeit ändert, immer nach etwa der gleichen Zeitspanne zu erfassen. Nicht transfizierte tsA-201-Zellen können zwar auch Natriumströme aufweisen, jedoch gewöhnlich weniger als 200 pA. Deshalb wurden nur transfizierte Zellen mit einem Strom von mindestens 1 nA zur weiteren Auswertung herangezogen. Zudem verwendeten wir eine Kompensation des Serienwiderstands und schlossen lediglich Zellen mit einem Spannungsfehler („*voltage error*“) von weniger als 5 mV in die Auswertung mit

ein. Die bei Raumtemperatur (21-23°C) gemessenen Ströme wurden mit einem 5 kHz Filter und einer Sampling Rate von 20 kHz aufgezeichnet.

2.3.6 Reagenzien und Lösungen

Die meisten Reagenzien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany) bezogen. Die eingesetzten Lösungen sind untenstehend in mM aufgelistet. Für „Whole-cell“-Aufnahmen in tsA-201-Zellen enthielt die (intrazelluläre) Pipettenlösung (in mM): 105 CsF, 35 NaCl, 10 EGTA, 10 (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid (HEPES); pH = 7,4.

Die Badlösung (extrazellulär) enthielt (in mM): 150 NaCl, 2 KCl, 1,5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH = 7,4.

Der pH-Wert wurde mit Hilfe von CsOH auf 7,4 ausgeglichen. Die Osmolarität der Lösungen betrug ca. 300 mOsm/kg.

2.3.7 „Voltage-clamp-Protokolle“ und Datenanalyse

2.3.7.1 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

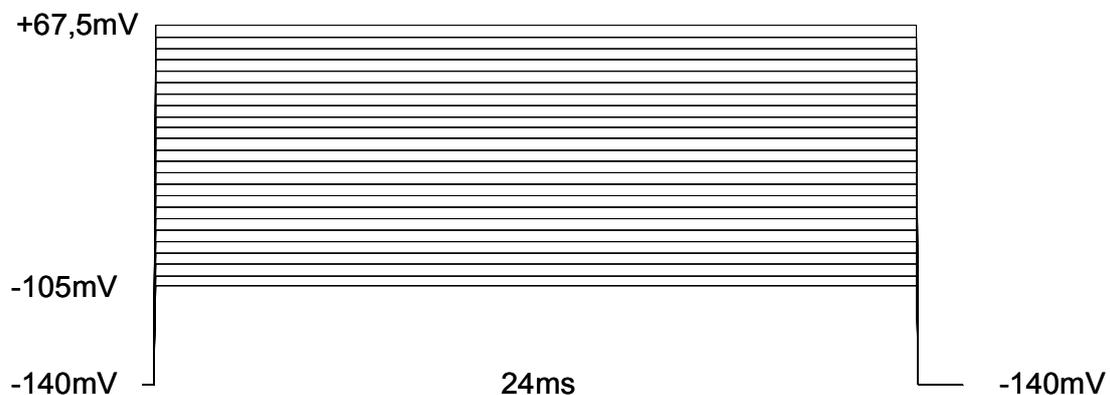


Abb. 12: Aktivierungs-Protokoll

Die Aktivierungskurve (Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung) wurde von der Strom-Spannungs-Beziehung abgeleitet, die sich durch Messung des maximalen Stroms und des Stroms auf unterschiedlichen Depolarisationsstufen (von -105 mV bis 67,5 mV) in 7,5 mV Schritten ergibt. Dabei gingen die

einzelnen Depolarisationen jeweils von einem Haltepotential von -140 mV aus. Die folgende Boltzmann-Funktion wurde dabei zum „*Fitting*“ (engl. das Anpassen, Angleichen, in Form bringen) der erhaltenen Datenpunkte verwendet:

$$g(V) = \frac{g_{\max}(V)}{\{1 + \exp[(V - V_{1/2}) / k_V]\}}$$

Dabei ist $g(V) = I/(V - V_{\text{rev}})$ die Leitfähigkeit, I die gemessene Stromamplitude beim gegebenen Testpotential V , V_{rev} das Umkehrpotential (engl. reversal potential) von Natrium, g_{\max} die maximale Leitfähigkeit, $V_{1/2}$ die Spannung bei halb-maximaler Aktivierung und k_V die Steigungskonstante.

2.3.7.2 „*Steady state*“ der schnellen Inaktivierung

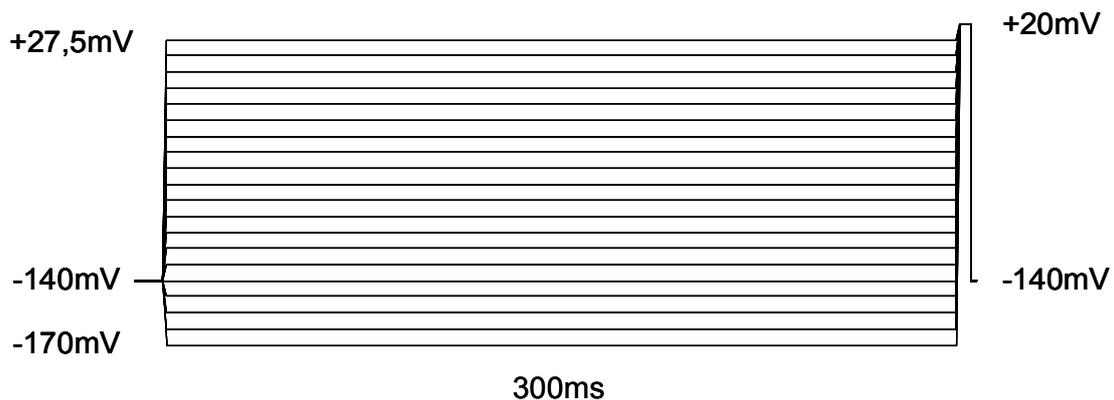


Abb. 13: Inaktivierungs-Protokoll

Die „*Steady-state*“ Inaktivierung wurde bestimmt, indem initial ein vorbereitender 300 ms langer Puls zu unterschiedlichen Potentialen (von -170 mV bis zu -27,5 mV) erging, gefolgt von einem Testpuls zu -20 mV, wobei der maximal geflossene Strom (engl. *peak current*) den Prozentsatz an nicht inaktivierten Kanälen widerspiegelt. Eine Standard-Boltzmann-Funktion wurde zur mathematischen Beschreibung der Inaktivierungs-Kurven verwendet:

$$I = \frac{I_{max}}{\{1 + \exp[(V - V_{1/2}) / k_V]\}}$$

Dabei ist I die gemessene Stromamplitude auf dem vorgegebenen Potential V, I_{max} ist die maximale Stromamplitude, $V_{1/2}$ das Potential bei halb-maximaler Inaktivierung und k_V eine Steigungskonstante.

2.3.7.3 Inaktivierungs-Zeitkonstanten und "persistierender Strom"

Die Membran wurde von einem Haltepotential von -140 mV auf unterschiedliche Testpotentiale depolarisiert, um Natriumströme aufzuzeichnen. Eine zweitgradige Exponentialfunktion entsprach beim Zeitverlauf der schnellen Inaktivierung während der ersten 70 ms nach dem Beginn der Depolarisation dem besten „Fit“ und ergab somit zwei Zeitkonstanten. Die Aussagekraft der zweiten, langsameren Zeitkonstanten ist dabei relativ gering. Deshalb wurde für die Darstellung unserer Daten im Ergebnisteil nur die schnelle Zeitkonstante, als τ_h bezeichnet, verwendet.

Der persistierende Natriumstrom (I_{SS} bezeichnet für den „steady-state“ Strom) wurde am Ende des Depolarisationspulses mit 70 ms für unterschiedliche Potentiale bestimmt und wird im Verhältnis zu dem initialen maximalen Strom (I_{PEAK}) angegeben.

2.3.7.4 Erholung von schneller Inaktivierung

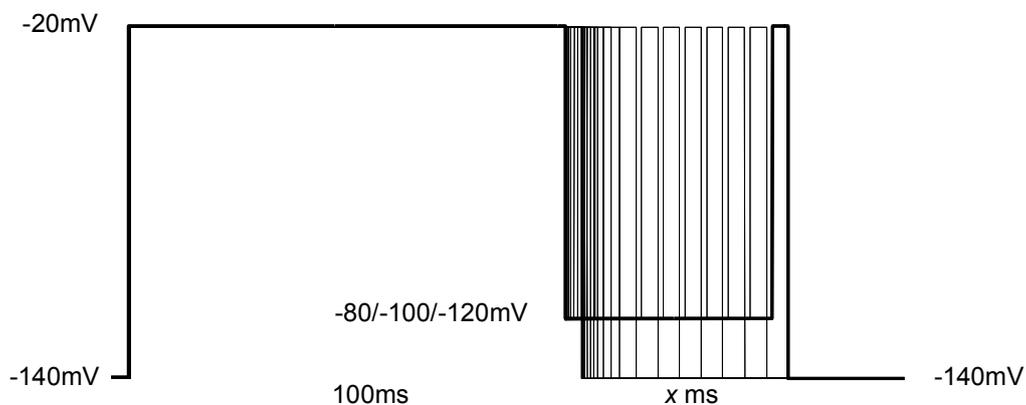


Abb. 14: „Recovery“-Protokoll mit Repolarisierungsphase bei -80/-100/-120 mV

Die Erholung von der schnellen Inaktivierung wurde ebenfalls von einem Haltepotential von -140 mV ausgehend aufgezeichnet. Die Zellen wurden für 100 ms auf -20 mV depolarisiert, um alle Natriumkanäle zu inaktivieren und dann für Zeitabschnitte mit zunehmender Dauer („x ms“ in Abb. 14) zu unterschiedlichen Potentialen repolarisiert (-80, -100 oder -120 mV), um sich zu erholen. Der Durchlauf mit der längsten Erholungsphase wurde in Abb. 14 fett eingezeichnet. Eine zweitgradige Exponentialfunktion mit einer initialen Verzögerung stellte die beste mathematische Beschreibung für den zeitlichen Verlauf der Erholung von der schnellen Inaktivierung dar. Die schnelle Zeitkonstante mit der deutlichen größeren Amplitude, τ_{rec} wird für die Veranschaulichung der Daten gezeigt.

2.3.7.5 „Use-dependence“

Um die „Use dependence“ (engl. use für Gebrauch, Nutzung, Einsatz; dependence hier a.e. Abhängigkeit;) zu bestimmen, wurden die Zellen mit Depolarisations-Abfolgen (50 depolarisierende Potential-Stufen auf -20 mV für 10 ms) bei bestimmten Frequenzen stimuliert. Die Ströme wurden dann normalisiert auf den maximal aufgezeichneten Strom als Antwort auf den ersten Strompuls jeder Abfolge und anschließend der Abfall der maximalen Stromamplituden mit Hilfe einer zweitgradigen Exponentialfunktion eingepasst.

2.3.7.6 Aktionspotential-Stimulus und Aktionspotential-Train

Von regulär feuernden pyramidalen Neuronen eines neokortikalen Schnitts (Layer V) von Mäusen wurden Aktionspotentiale (AP) bei 34 °C aufgezeichnet und als komplexe Potential-Stimuli in Voltage-clamp-Experimenten verwendet, um die allgemeine und gesamte Natriumstrom-Antwort während eines Aktionspotentials zu erfassen. Beginnend mit einem Haltepotential und einem „Intersweep“-Potential (zwischen den einzelnen Durchläufen) von -70 mV, zeichneten wir zehn „Sweeps“ (dt. Durchläufe) mit jeweils 100 ms für den einzelnen AP Stimulus und elf „Sweeps“ mit jeweils 800 ms für die „Aktionspotential-Trains“ (engl. *train* für Abfolge, Serie) mit einer „Sampling“-

Rate (dt. Abtastrate) von 100 kHz und einem 5 kHz Tiefpass-Filter. Die Ströme wurden im Anschluss auf den maximalen positiven Strom normalisiert.

2.3.7.7 Subtraktion von „Leak-“ und kapazitiven Strömen

Die zur Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Natriumkanälen verwendeten Protokolle enthielten generell ein Protokoll, um den *Leak*-Strom wie auch kapazitive Ströme zu subtrahieren. Dazu wurden vor jedem Testpuls vier hyperpolarisierende „Vorpulse“ von einem Haltepotential von -120 mV ausgehend appliziert, wobei die Amplitude ein Viertel (P/4) des eigentlichen Testpulses betrug. Bei diesen Potentialen öffnet noch kein Natriumkanal. Die Summe der hierbei gemessenen Ströme während der P/4 „Vorpulse“ wird von dem während des Testpulses aufgezeichneten Strom abgezogen. Der *Leak*-Strom hängt linear von der Spannung ab, sodass die Summe der während der vier „Vorpulse“ auftretenden Ströme dem *Leak*-Strom, der während des Testpulses auftritt, entspricht.

2.3.8 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“, SEM) gezeigt, wenn nicht anders beschrieben. Um statistisch signifikante Unterschiede nachzuweisen, wurde ein unabhängiger Student's *t*-test durchgeführt. Statistische Signifikanz erforderte einen p-Wert von weniger als 0,05.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klinische Daten

Der Familienstammbaum ist in Abb. 15 dargestellt. Die gemeinsame Vorfahrin aller Betroffenen der Familie stammte von Madagaskar.

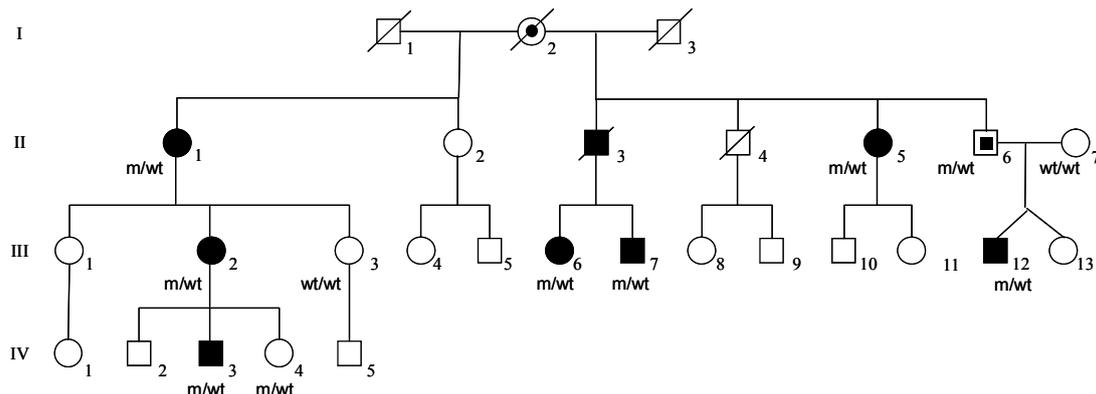


Abb. 15: Stammbaum

Die schwarz gefüllten Symbole stellen Patienten mit infantilen Anfällen dar; die im Zentrum schwarz gefüllten Symbole obligate Carrier ohne berichtete Anfälle in der Anamnese; wt steht für Wildtyp-Allel; m für mutiertes Allel. Durchgestrichene Kreise und Quadrate sind verstorbene Familienmitglieder.

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

Die klinischen Daten der betroffenen Familienmitglieder sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Acht Patienten erlitten nicht-fieberhafte (afebrile) Anfälle mit einem erstmaligen Auftreten zwischen dem dritten und neunten Monat und spontaner Remission vor dem 18. Monat, mit oder ohne antiepileptische Therapie. Keiner von ihnen erlitt im weiteren Verlauf einen erneuten Anfall. Alle Patienten hatten eine altersentsprechende psychomotorische und kognitive Entwicklung. Auch bei der ausführlichen Anamnese ergaben sich für den obligaten Überträger II-6 in der Vorgeschichte keine Anfälle. Für I-2 waren keine Daten verfügbar. Im

Folgenden möchte ich - exemplarisch für die typischen Fälle – einen Patienten etwas detaillierter beschreiben.

Patient III-12

Dieser 9-jährige Junge wurde nach 33-wöchiger Zwillingschwangerschaft ohne irgendwelche Komplikationen durch die Frühgeburt entbunden. Er erlitt erstmalig im Alter von 4,5 Monaten Anfälle während des Schlafs, beginnend mit einer Versionsbewegung des Kopfes nach rechts, wie auch Augenverdrehen nach rechts, von einer tonischen Extension des Körpers und Zyanose gefolgt.

Die Anfälle dauerten zwischen zwei und drei Minuten und traten in Clustern von zwei bis zehn Anfällen auf, alle mit ähnlicher klinischer Ausprägung. Zunächst wurde er mit VPA behandelt, dann in Ergänzung mit intravenösem Clonazepam (CZP). Die Anfälle sistierten, nachdem er letztendlich einen Phenytoin-Bolus (PHT) bekam.

Das iktale EEG zeigte – vor Behandlungsbeginn – eine Aufwach-Reaktion mit einer Beschleunigung des aufgezeichneten Rhythmus', gefolgt von einem hochfrequenten, temporo-zentralen Rhythmus und schließlich linkshemisphärischen „Spikes“ (dt. Spitzen) (Abb. 16 A-D). Nach ca. 20 bis 30 Sekunden (s) trat eine Generalisierung auf. 40 s später konnte eine Verlangsamung des EEG-Rhythmus' beobachtet werden, so wie *Spikes* und „*Slow waves*“ (dt. langsame Wellen) mit linkshemisphärischer Dominanz, dann folgte – ebenfalls mit linkshemisphärischer Dominanz - eine Abflachung.

Der klinische Anfallsbeginn wurde ca. 30 s nach der Aufwachreaktion beobachtet, parallel zur im EEG sichtbaren Generalisierung. Dabei zeigte sich eine Extensionsbewegung beider Arme, gefolgt von Kloni aller vier Extremitäten und einer Blickdeviation nach links.

Das interiktale EEG vor Behandlungsbeginn zeigte eine unauffällige Hintergrund-Aktivität mit unilateralen wie auch bilateralen temporo-zentralen epilepsietypischen Potentialen (Abb. 16 E). Dieses Muster persistierte über zwei Monate hinweg.

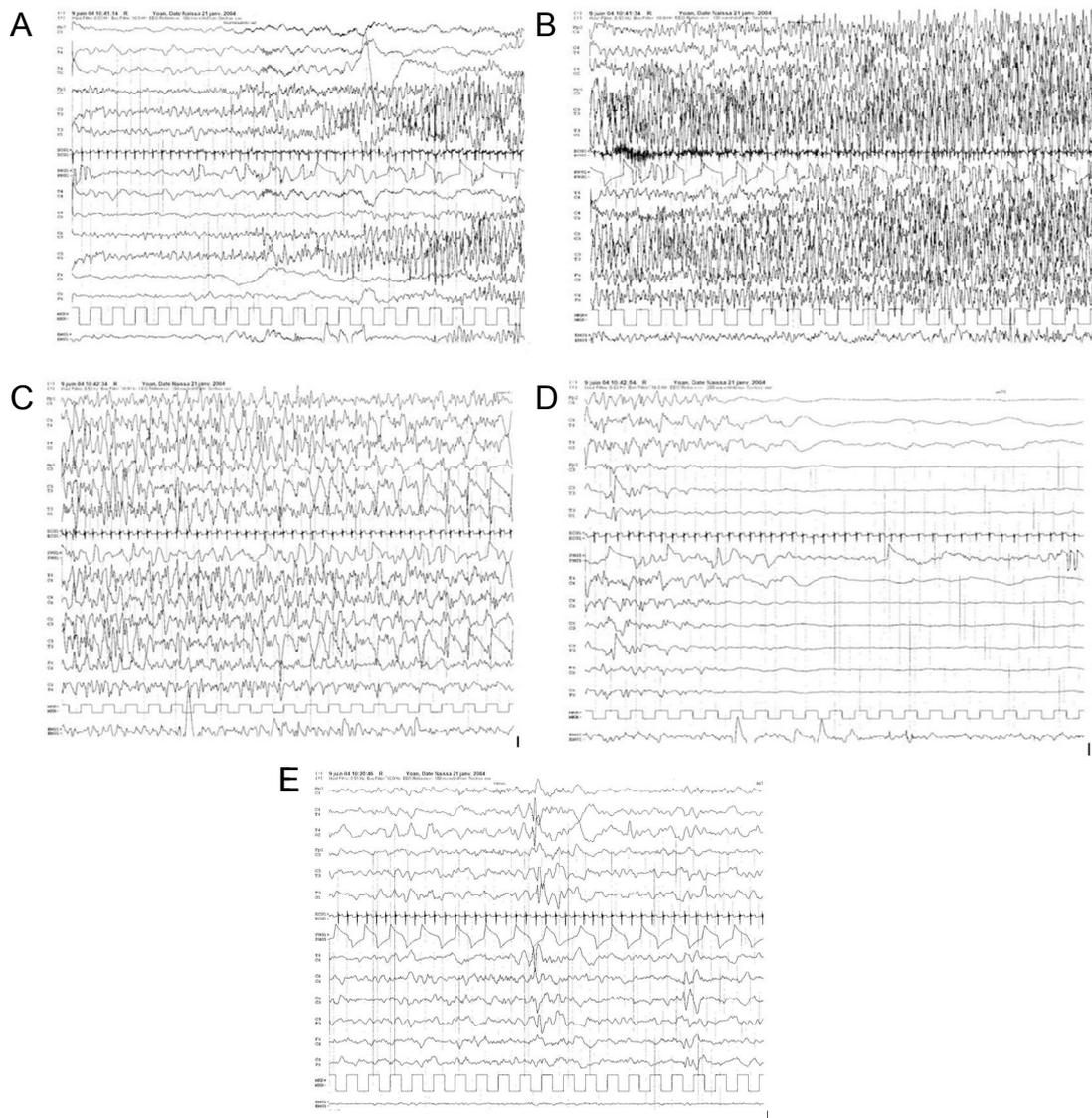


Abb. 16: Patienten-EEG

Iktales (Nakamura et al) und Interiktales (E) EEG von Patient III-12 im Alter von 4 ½ Jahren. Die Aufzeichnung wurde bei 40 Sekunden zwischen B und C geschnitten. **A** und **B**: links parietaler Beginn mit temporo-zentral hochfrequenten Rhythmen, die von einem linkshemisphärischen Anfallsmuster und einer sekundären Generalisierung gefolgt werden. **C** und **D**: linksbetonte Verlangsamung mit anschließend asymmetrischer Abflachung. **E**: Interiktales EEG mit unauffälliger Hintergrund-Aktivität und unilateralen wie auch bilateralen temporo-zentralen epilepsietypischen Potentialen.

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

Am nächsten Tag und drei Tage später ereigneten sich zwei weitere Cluster mit sechs bzw. zwölf Anfällen. Das zweite Cluster trat unter der bereits begonnen antiepileptischen Therapie mit VPA und intravenösem CZP auf. Es wurde zusätzlich intravenös PHT verabreicht und zwei Tage nach dem letzten Anfall wieder abgesetzt.

Im Alter von 5,5 Monaten erlitt der Patient ein kurzes Cluster von drei Anfällen innerhalb von 24 Stunden. Daraufhin wurde VPA gegen Carbamazepin (CBZ) ausgetauscht und CZP abgesetzt. So wurde bis zum Alter von zwei Jahren mit einer Carbamazepin-Monotherapie ohne weitere Anfallsereignisse behandelt.

Während der Cluster zeigten sich bei der klinisch-neurologischen Untersuchung eine mild ausgeprägte globale Hypotonie und Müdigkeit, wahrscheinlich therapie-bedingt, jedoch ohne fokal-neurologisches Defizit.

Im Alter von 6,5 Monaten war die dann durchgeführte neurologische Untersuchung unauffällig. Kontroll-EEGs stellten sich insgesamt unauffällig dar. Zwei kraniale MRTs wurden im Alter von fünf Monaten und zwei Jahren durchgeführt, zeigten jedoch keine morphologischen Auffälligkeiten. Mit sechs Jahren ergab eine kognitive Testung mit der „*Wechsler rating scale*“, die auf Grund der Frühgeburtlichkeit durchgeführt wurde, ein altersentsprechendes Ergebnis.

Tabelle 1: Klinische Daten der Familienmitglieder mit neonatal-infantiler Epilepsie

Patient	II-1	II-3	II-5	III-2	III-6	III-7	III-12	IV-3
Alter bei Beginn (Mo)	3	< 9	< 6	4	3.5	5	4.5	4
Anfallstyp	G	G	G	G	G	G	F	G
Anfallsdauer	Kurz	U	< 2 min	2 - 4 min	< 2 min	1 min	< 2 min	15 min (1. Anfall)
Cluster (Dauer)	U	U	Ja	Ja (12 h)	Ja (24 h)	Nein	Ja (2-4 d)	Ja (1 d)
Anzahl an Cluster	U	+++	+++	+++	3	0	5	2
Alter bei Sistieren (Mo)	U	15	6	18	7.5	U	5.5	4.5
Interiktales EEG	ND	ND	ND	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Bilaterale CTS	Rechts CTS teilweise mit kontralateraler Ausbreitung
Schädel MRT	ND	ND	ND	ND	Unauffällig	ND	Unauffällig	Rechts temporale Läsion
Initiale Behandlung	Keine	Keine	Keine	VPA	PHB	Keine	VPA, dann + CLZ, dann + PHT	CLZ, dann + PHT, dann + VPA
Längerfristige Behandlung (Dauer)	Keine	Keine	Keine	VPA (7 Mo)	VPA (1 J)	Keine	CBZ mit 5 Mo aufgrund rezidivierender Anfälle (2 J)	VPA (1 J)

G = generalisiert, F = fokal, U = unbekannt, ND = nicht durchgeführt, CTS = Centro-temporale Spikes, CBZ= Carbamazepin, CLZ = Clonazepam, PHT = Phenytoin, VPA = Valproinsäure, PHB = Phenobarbital, min = Minuten, h = Stunden, d = Tage, Mo = Monate, J = Jahre

3.2 Mutationsscreening

Es wurde auf Exon 26 im SCN2A-Gen eine heterozygote c.4766A>G Mutation gefunden, die den Aminosäuren-Austausch eines hochkonservierten Tyrosins gegen ein Cystein p.Tyr1589Cys bewirkt (Abb. 17).

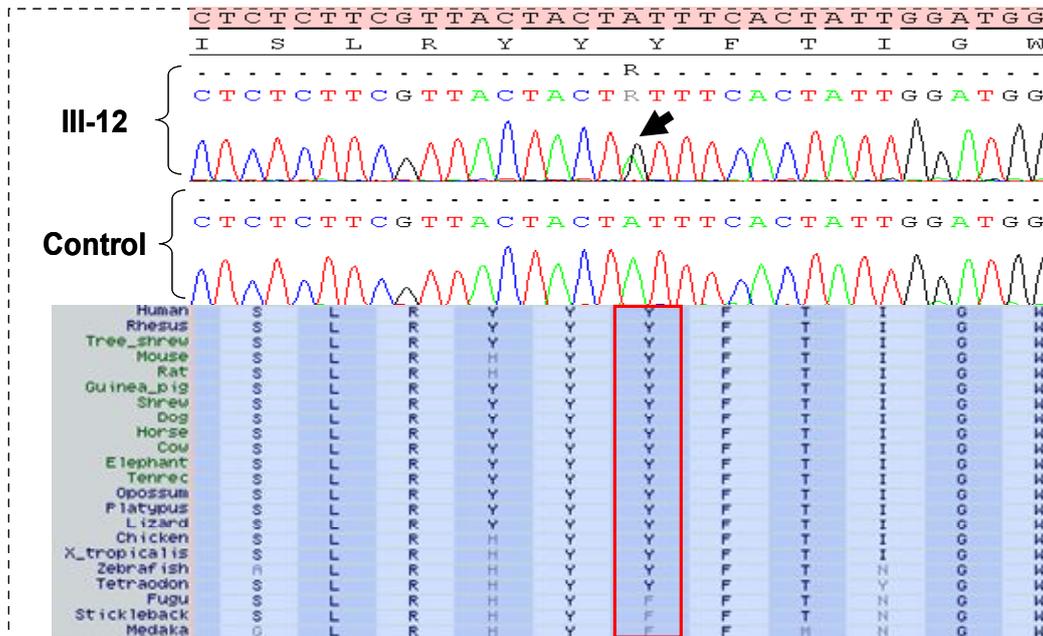


Abb. 17: Sequenzanalyse

Sequenzanalyse von Patient III-12 und einem Kontroll-Individuum, das die Basen-Substitution c.4766A>G (Pfeil) wie auch die entwicklungs- und evolutionär hochkonservierten umliegenden Sequenzen von Tyr 1589 zeigt (Daten von UCSC website, <http://genome.ucsc.edu/>).

Diese Mutation wurde bei allen acht betroffenen Individuen und dem obligaten Überträger II-6 gefunden (Abb. 15). Bei 200 Chromosomen französischer Kontrollen, wie auch bei dbSNP und in der 1000-Genom-Datenbank war diese Mutation nicht zu finden. In silico Analysen zeigten eine hochgradige Nukleotid-Konservierung für Tyr1589 und einen wichtigen physikalischen und auch chemischen „Gap“ (engl. Lücke, Graben) zwischen dem Tyrosin- und dem Cystein-Rest mit einem *Grantham* Skala von 194 [0-215]. Sowohl die SIFT als auch die PolyPhen Algorithmen sagten einen destrukturierenden funktionellen Effekt voraus.

3.3 Funktionelle Charakterisierung der Y1589C Mutation

3.3.1 Stromdichte (*Current Density*)

Bezüglich der Stromdichte (engl. *current density*) bei mit Na_v1.2 transfizierten Zellen liegen teilweise widersprüchliche Ergebnisse vor, was in der Diskussion noch etwas näher beleuchtet werden soll. Bei meinen Messungen für die Y1589C-Mutation zeigte sich jedoch - mit den β -Untereinheiten gemessen - eine klare statistisch signifikant reduzierte Stromdichte und ohne die β -Untereinheiten ebenfalls eine deutliche Tendenz, die jedoch statistisch nicht signifikant war (Tabelle 2). Das Umkehrpotential blieb durch die Mutation unverändert (Abb. 18:).

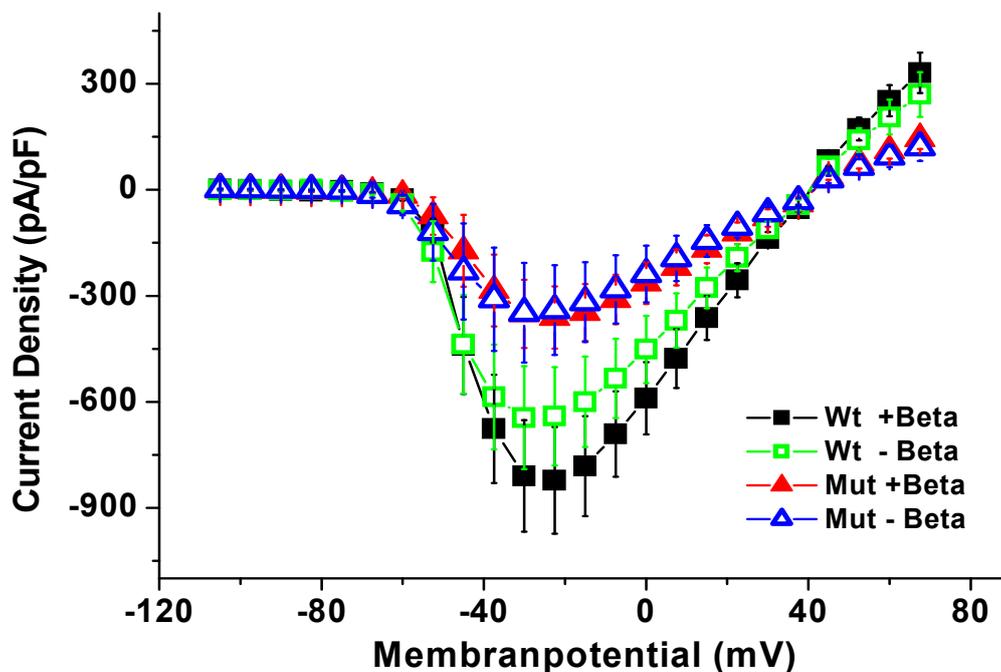


Abb. 18: Stromdichte

Gezeigt ist die Stromdichte über dem jeweiligen Membranpotential. Die schwarz gefüllten Quadrate stehen für die Wildtyp-Na_v1.2 mit β -Untereinheiten (n=15), die unausgefüllten grünen Quadrate für die Wildtyp-Na_v1.2 ohne β -Untereinheiten ((n=9); die ausgefüllten, roten Dreiecke symbolisieren die Y1589C-Na_v1.2 Kanäle mit β -Untereinheiten (n=14), die ausgefüllten die Y1589C-Na_v1.2 Kanäle ohne β -Untereinheiten (n=7).

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

3.3.2 *Steady-state* Aktivierung und Inaktivierung

Bei meinen Ergebnissen zeigte sich eine nicht signifikant veränderte Aktivierungskurve, jedoch eine signifikant zu depolarisierteren Potentialen hin verschobene Inaktivierungs-Kurve für die schnelle Inaktivierung. Die Steigungskonstante k für die Messungen mit β -Untereinheiten blieb dabei unverändert (Abb. 19).

Die Y1589C-Mutation verursachte in den tsA-201-Zellen einen klar erhöhten „*window current*“ (engl. für „Fenster-Strom“), der in Bezug auf die gemeinsame Schnittfläche unter der Aktivierungs- und Inaktivierungs-Kurve – das sog. „*window*“ - so genannt wird. Dies kann sowohl aufgrund einer nach „links“ zu hyperpolarisierteren Potentialen hin verschobenen Aktivierungskurve als auch aufgrund einer nach „rechts“ verschobenen Inaktivierungs-Kurve, in manchen Fällen auch auf Grund der Kombination von beidem, der Fall sein.

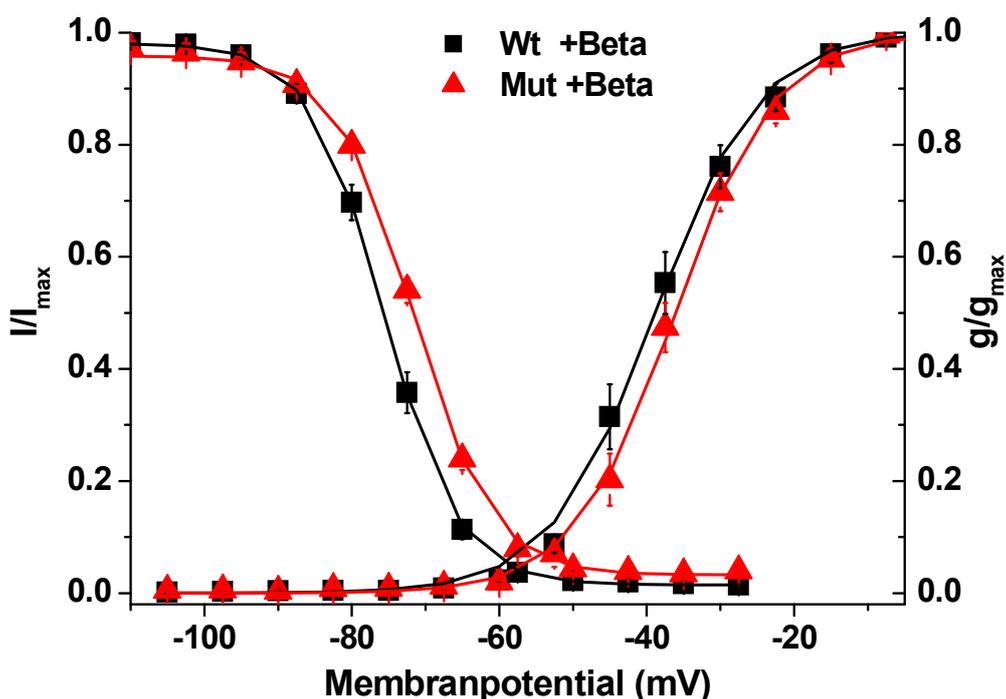


Abb. 19: *Steady-state* Aktivierung und Inaktivierung

Die schwarz gefüllten Quadrate stehen für die Wildtyp- $\text{Na}_v1.2$ mit β -Untereinheiten ($n=15$ bzw. $n=13$), die ausgefüllten Dreiecke symbolisieren die Y1589C- $\text{Na}_v1.2$ mit β -Untereinheiten ($n=14$ bzw. $n=15$). (Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

3.3.3 Inaktivierungskonstante der schnellen Inaktivierung und persistierender Natriumstrom

Passend zu einer Destabilisation des schnell inaktivierten Status' war auch die Inaktivierungskonstante der Mutanten-Kanäle bei unseren Messungen im Vergleich zu Wildtyp-Kanälen signifikant verlängert (Abb. 20).

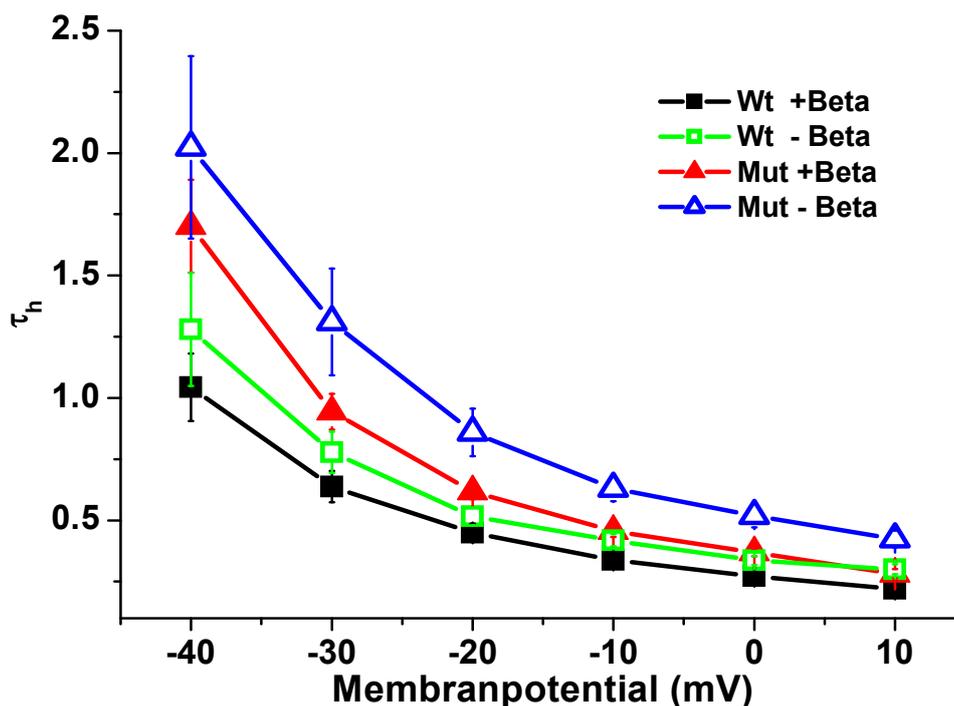


Abb. 20: Inaktivierungskonstanten der schnellen Inaktivierung

Die schwarz gefüllten Quadrate stehen für die Wildtyp- $\text{Na}_v1.2$ mit β -Untereinheiten ($n=13$), die unausgefüllten Quadrate für die Wildtyp- $\text{Na}_v1.2$ ohne β -Untereinheiten ($n=7$); die ausgefüllten Dreiecke symbolisieren die Y1589C- $\text{Na}_v1.2$ mit β -Untereinheiten ($n=14$), die ausgefüllten die Y1589C- $\text{Na}_v1.2$ ohne β -Untereinheiten ($n=6$).

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

Außerdem ließ sich ein signifikant erhöhter persistierender Natriumstrom für die mutierten Kanäle beobachten (Abb. 21), der mit β -Untereinheiten bei 0 mV bei den Wildtyp-Kanälen ca. 1,6-fach höher als bei den mutierten Kanälen war. Dieser nicht-inaktivierende Strom wurde am Ende eines längeren Testpotentials

(70ms) in Relation zum maximalen Strom (I_{ss}/I_{peak}) quantifiziert und konnte mit 10 μ M Tetrodotoxin, einem spezifischen Blocker von spannungsabhängigen Natriumkanälen, blockiert werden.

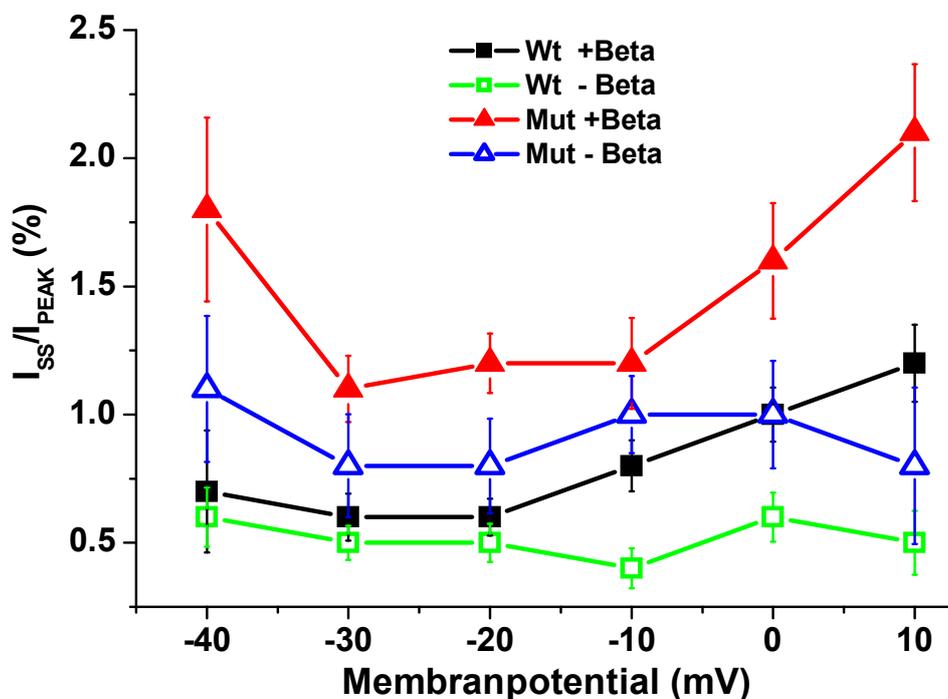


Abb. 21: Persistierender Natriumstrom

Die schwarz gefüllten Quadrate stehen für die Wildtyp- $Na_v1.2$ mit β -Untereinheiten (n=11), die unausgefüllten Quadrate für die Wildtyp- $Na_v1.2$ ohne β -Untereinheiten (n=5); die ausgefüllten Dreiecke symbolisieren die Y1589C- $Na_v1.2$ mit β -Untereinheiten (n=7), die ausgefüllten die Y1589C- $Na_v1.2$ ohne β -Untereinheiten (n=5).

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

3.3.4 Erholung von schneller Inaktivierung

Des Weiteren zeigte sich für die Mutanten-Kanäle mit und ohne β -Untereinheiten eine zwei- bis dreimal so schnelle Erholungszeit von der schnellen Inaktivierung wie für die Wildtyp-Kanäle (Abb. 22) Dieser Effekt war bei dem durchgeführten Protokoll von unterschiedlichen Haltepotentialen aus (-

80 mV, -100 mV und -120 mV) signifikant und konsistent zu beobachten (Abb. 22 Inset)

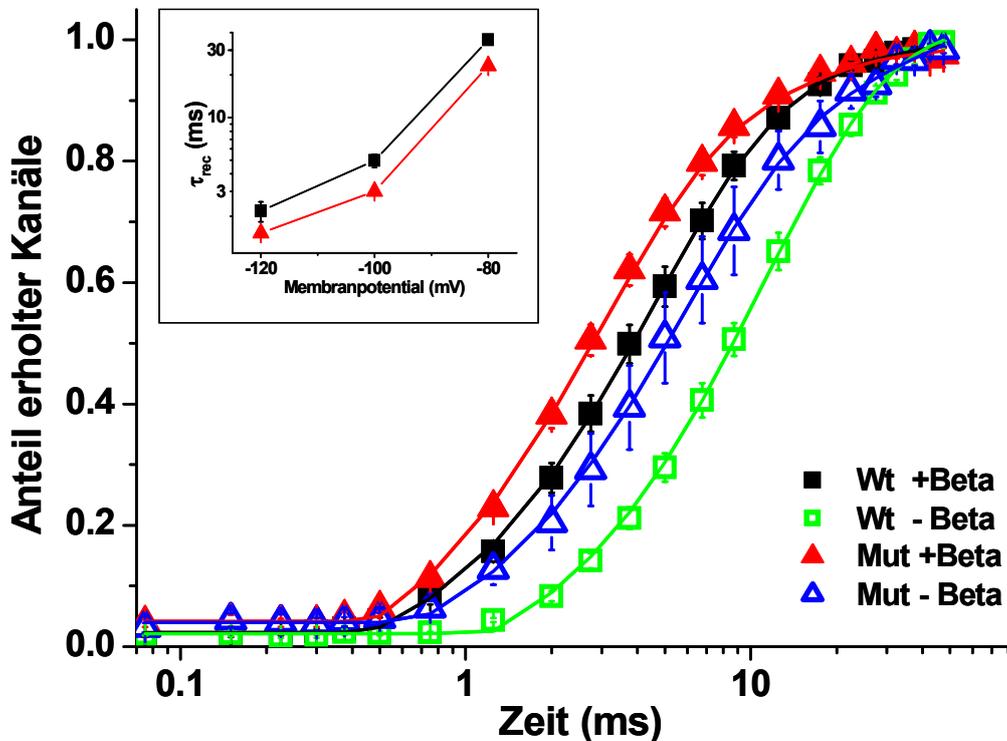


Abb. 22: Erholung von schneller Inaktivierung

Die schwarz gefüllten Quadrate stehen für die Wildtyp- $\text{Na}_v1.2$ mit β -Untereinheiten ($n=13$), die unausgefüllten Quadrate für die Wildtyp- $\text{Na}_v1.2$ ohne β -Untereinheiten ($n=9$); die ausgefüllten Dreiecke symbolisieren die Y1589C- $\text{Na}_v1.2$ mit β -Untereinheiten ($n=13$), die ausgefüllten die Y1589C- $\text{Na}_v1.2$ ohne β -Untereinheiten ($n=7$).

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

3.3.5 „Use dependence“ und Aktionspotential-„Train“

Bei der Reaktion der Kanäle auf schnell aufeinanderfolgende Depolarisationen konnten weder bei dem gängigen *Use dependence*-Protokoll (Abb. 23) noch bei dem neu kreierte Aktionspotential-„Train“ (Abb. 24) signifikante Effekte nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich passend zur beschleunigten Erholungszeit von der schnellen Inaktivierung wie auch den reduzierten

Inaktivierungskonstanten der schnellen Inaktivierung bei 80 Hz für die *Use Dependence* und bei den Aktionspotential-„*Trains*“ ein Trend zu einer schnelleren Verfügbarkeit der Mutanten-Kanäle nach den erfolgten Depolarisationsabfolgen.

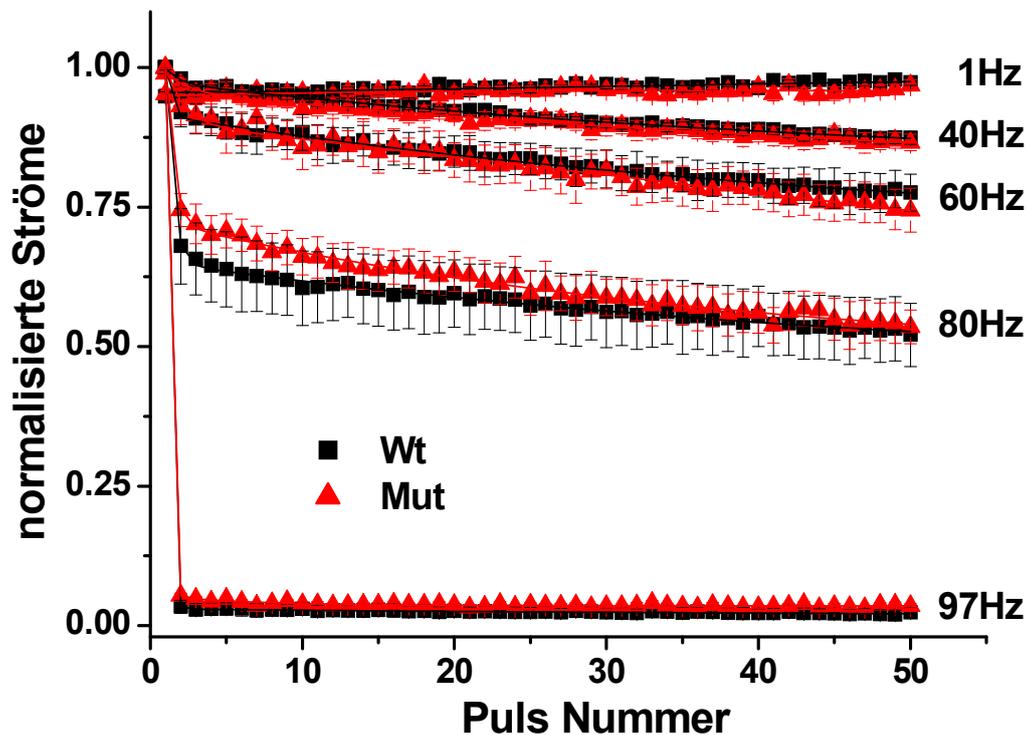


Abb. 23: Use Dependence

Use Dependence mit Spitzenströmen, die jeweils zum ersten und größten Spitzenstrom als Antwort auf einen Spannungs-Sprung aufgezeichnet wurden bei Frequenzen von 1, 40, 60, 80 und 97 Hz. Das „*Use-dependence*“-Verhalten der mutierten Kanäle zeigt dabei nur kleine, nicht signifikante Abweichungen bei 80 Hz Pulsen.

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

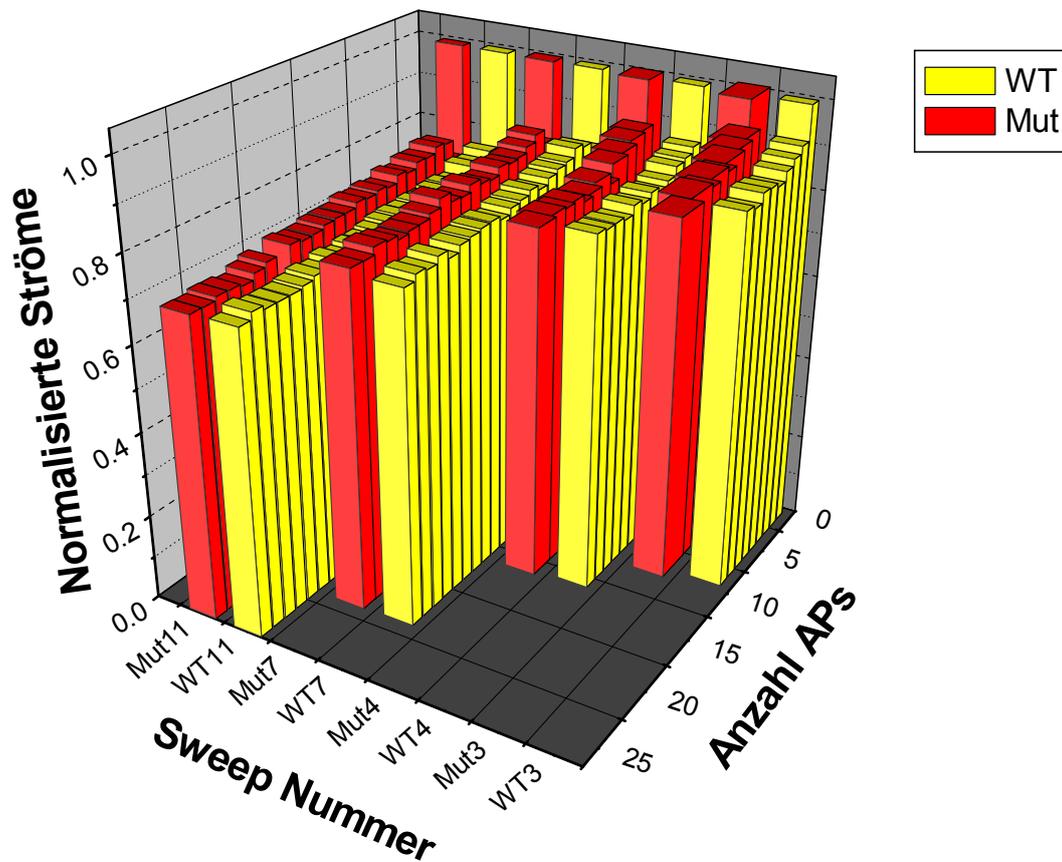


Abb. 24: AP Train

Dieser 3D-Graph zeigt die Antwort auf eine Abfolge an Aktionspotentialen (Aktionspotential-„Train“), was als Spannungs-Stimulus verwendet wurde. Die gelb gefüllten Säulen (n=13) stehen dabei für die Wildtyp- $\text{Na}_v1.2$ mit β -Untereinheiten, die rot gefüllten (n=14) für die Y1589C- $\text{Na}_v1.2$ mit β -Untereinheiten. Von einem Haltepotential und auch „Intersweep“-Haltepotential von -70 mV ausgehend zeichneten wir 11 Sweeps über 800 ms auf mit einer steigenden Anzahl an Aktionspotentialen (zwischen 0 und 26 Aktionspotentialen). Hier zeigen wir den jeweiligen Durchschnitt der Spitzenströme von Sweep 3,4,7 und 11 (entsprechend mit 9, 13, 21, 26 Aktionspotentialen), wobei die Ströme auf die jeweiligen positiven Spitzenströme normalisiert wurden, um den statistisch nicht signifikanten, aber angedeuteten Trend zu einer erhöhten Verfügbarkeit der mutierten Kanäle herauszustellen. Ohne *Leak*-Subtraktion dargestellt.

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

3.3.6 Aktionspotential Stimulus

Um Natriumströme als Antwort auf physiologischerer Stimuli als die zuvor verwendeten Stimuli zu untersuchen, verwendeten wir Aktionspotentiale (Scalmani et al 2006), die in Pyramidenzellen von frischen, murinen *Slice*-Präparationen gemessen wurden und setzten diese als Stimuli in Voltage clamp Experimenten ein. Dabei beobachteten wir einen signifikant erhöhten Natriumstrom der mutierten Kanäle in der langsam depolarisierenden „Subschwelle“-Phase (engl. *subthreshold*) vor dem schnellen Aufstrich (Abb. 25). Der Natrium-Spitzenstrom während des eigentlichen Aktionspotentials war nur geringfügig kleiner und in der Form unverändert, was mit der reduzierten Stromdichte pro Membranfläche übereinstimmt.

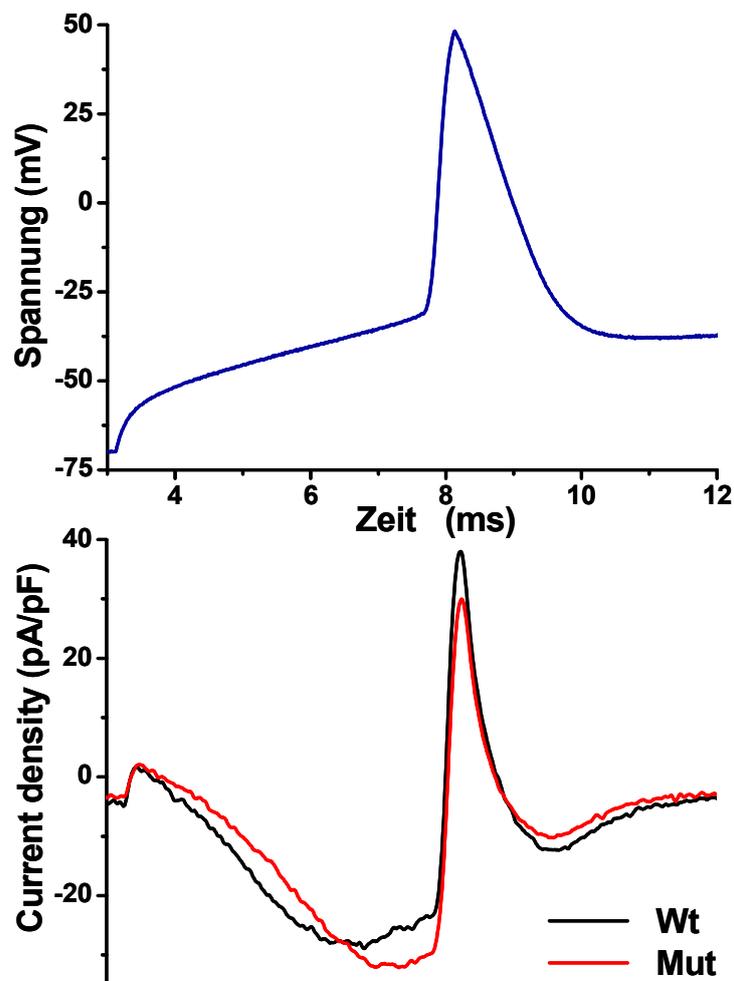


Abb. 25: Aktionspotential als Spannungs-Stimulus

Oben: Das Aktionspotential, das zuvor in Pyramidenzellen gemessen wurde, wurde als komplexer Spannungs-Stimulus verwendet. Unten: Die als Antwort aufgezeichnete *Current Density* (Maximal-Strom dividiert durch die Zell-Kapazität). Hier zeigen wir den ersten repräsentativen *Sweeps* als Durchschnitt aller aufgezeichneten Zellen; ohne *Leak* Subtraktion. Rote Linie: Y1589C (n=14), schwarze Linie: WT Na_v1.2 (n=13). Mit den verwendeten Lösungen lag das Umkehrpotential bei 41.8 mV (35.5 + 6.3 mV *junction potential*), was den großen positiven Strom im unteren Bild erklärt.

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

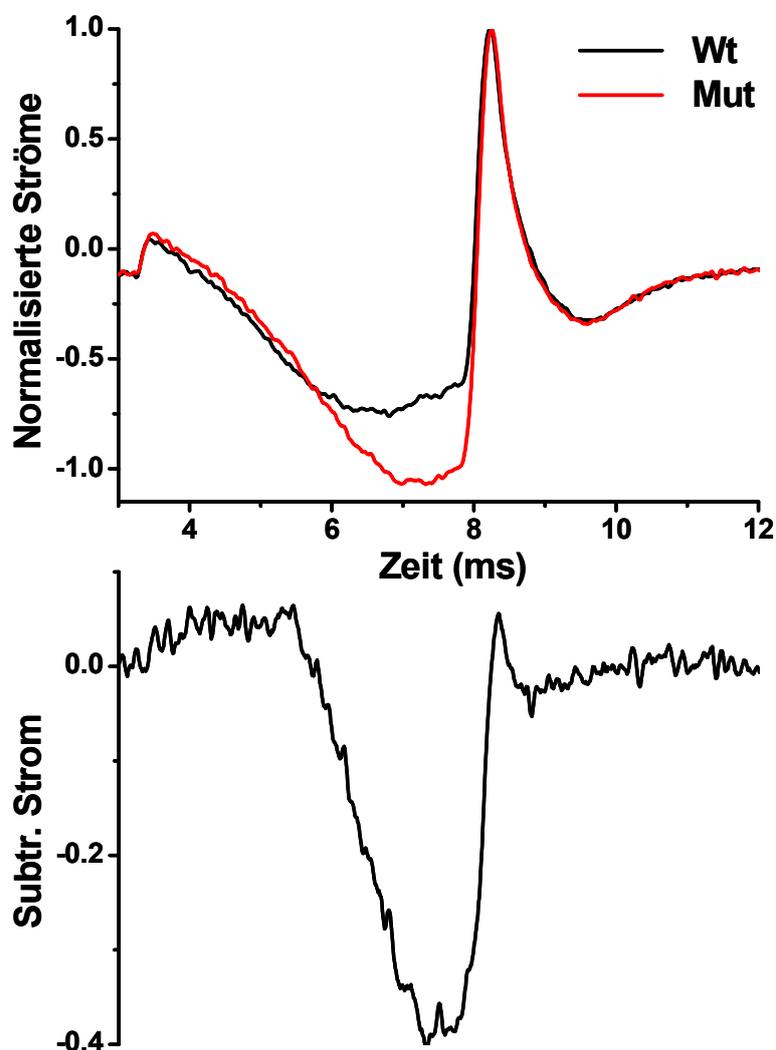


Abb. 26: Aktionspotential-Stimulus - Normalisierte Ströme und Differenz-Darstellung

Die obere Graphik zeigt die Ströme aus Abb. 25, die hier auf ihre positiven Maxima

normalisiert dargestellt wurden. Die untere Graphik zeigt die Differenz der WT Ströme von den mutierten Strömen (WT – Mut). Rote Linie: Y1589C (n=14), schwarze Linie: WT Na_v1.2 (n=13).

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

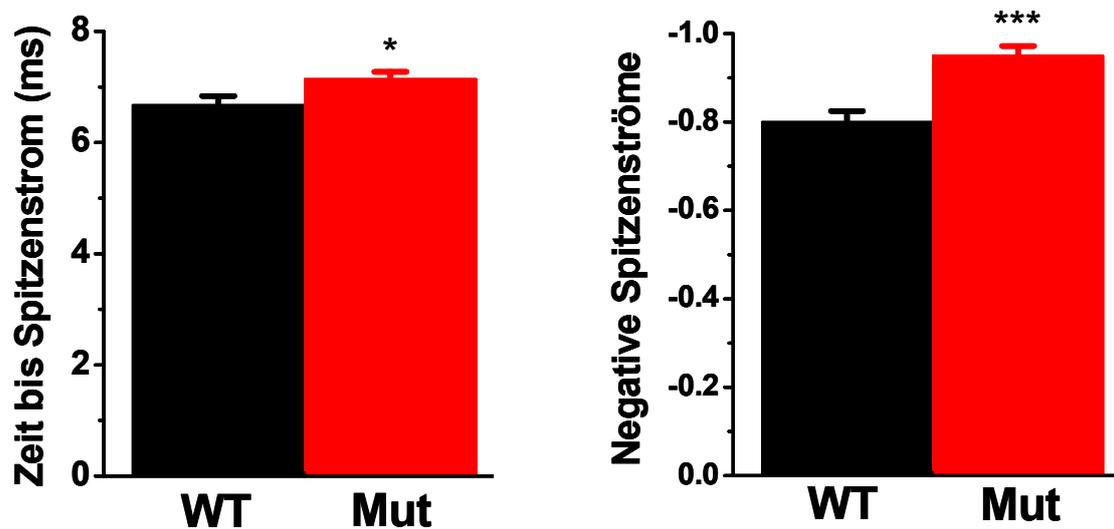


Abb. 27: Aktionspotential-Stimulus – Zeit bis zum Erreichen der Spitzenströme und negative Spitzenströme im Subschwellen-Bereich

Links: Die Zeit bis zum Erreichen der negativen Spitzenströme im Subschwellen-Bereich war bei den mutierten Na_v1.2 Kanälen signifikant verzögert.

Das rechte Balken-Diagramm zeigt die im Vergleich zu den WT-Na_v 1.2 Kanälen hochsignifikant erhöhten negativen Spitzenströme der mutierten Kanäle.

Roter Balken: Y1589C (n=14), schwarzer Balken: WT Na_v1.2 (n=13).

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

3.4 Einfluss der h β 1- und h β 2-Untereinheiten auf den Na_v1.2-Kanal

3.4.1 Stromdichte

Wie in der Einleitung beschrieben spielen β -Untereinheiten durchaus eine entscheidende Rolle beim sog. „*Targetting*“ der Kanäle und beeinflussen somit

auch die lokale Dichte der Kanäle in einer biologischen Membran. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir speziell auch die Stromdichte mit und ohne die beiden β -Untereinheiten ($h\beta 1$ und $h\beta 2$), welche durch die Strom-Spannungs-Kurve dargestellt wird. Dabei zeigten sich für die im Wildtyp exprimierten α -Untereinheiten bezüglich der Strom-Amplituden keine signifikanten Unterschiede, was sich auch für die α -Untereinheit mit der Y1598C-Mutation (mit und ohne β -Untereinheiten) bestätigen ließ. Ebenso konnten keine signifikanten Verschiebungen des Umkehrpotentials oder der Steigung der Strom-Spannungs-Kurve durch die β -Untereinheiten beobachtet werden (Abb. 18).

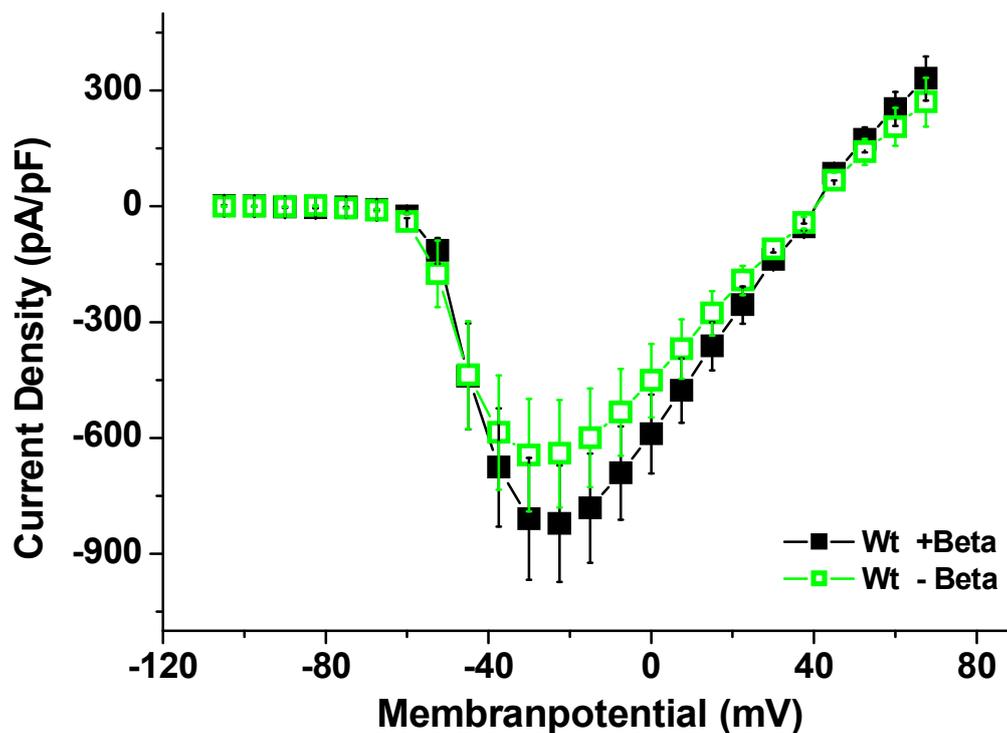


Abb. 28: Stromdichte

Gezeigt ist die Stromdichte über dem jeweiligen Membranpotential. Die schwarz gefüllten Quadrate stehen für die Wildtyp- $Na_v1.2$ mit β -Untereinheiten ($n=15$), die unausgefüllten grünen Quadrate für die Wildtyp- $Na_v1.2$ ohne β -Untereinheiten ($n=9$).

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

3.4.2 *Steady-state* Aktivierung und Inaktivierung

Für die *Steady-state* Inaktivierung beobachteten wir eine statistisch signifikante Verschiebung hin zu positiveren Potentialen, was auch in ähnlicher Weise für die *Steady-state* Aktivierung nachgewiesen werden konnte, jedoch lediglich als Trend und nicht im statistisch signifikanten Bereich. Unsere Messungen zeigten zudem einen signifikanten Unterschied der Steigungskonstanten k , die für die Aufzeichnungen ohne β -Untereinheiten höher bestimmt wurde als ohne β -Untereinheiten, sodass bei zunehmend positiveren Potentialen mit β -Untereinheiten die Inaktivierung der Kanäle schneller erfolgte (Abb. 19).

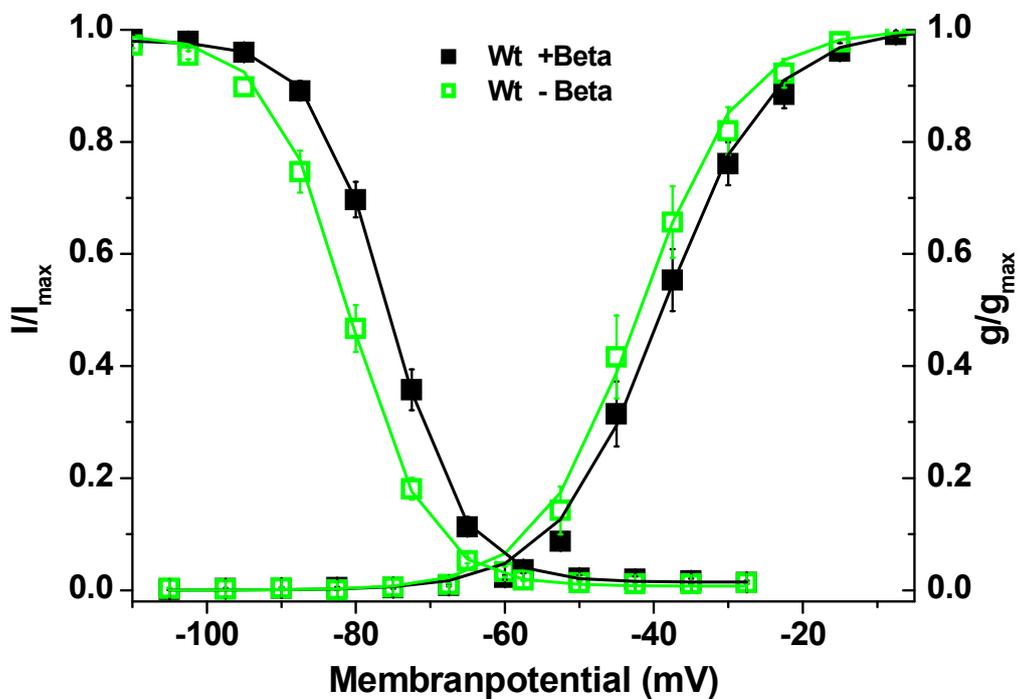


Abb. 29: *Steady-state* Aktivierung und Inaktivierung

Die schwarz gefüllten Quadrate stehen für die Wildtyp- $\text{Na}_v1.2$ mit β -Untereinheiten ($n=15$), die unausgefüllten grünen Quadrate für die Wildtyp- $\text{Na}_v1.2$ ohne β -Untereinheiten ($n=9$).

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

3.4.3 Persistierender Natriumstrom und Inaktivierungs-Zeitkonstante

In unseren Messungen zeigte sich der persistierende Natrium-Strom mit β -Untereinheiten im Vergleich zu ohne β -Untereinheiten, in tsA-201-Zellen exprimiert, statistisch signifikant um ca. Zweidrittel erhöht (Abb. 21). Dies konnte sowohl für die Wildtyp-Form als auch für die Mutation nachgewiesen werden.

Die Inaktivierungs-Zeitkonstanten zeigten bei unseren Aufzeichnungen eine hochsignifikante Verlangsamung der raschen Inaktivierung für die Natrium-Kanäle ohne β -Untereinheiten. Das passt physiologisch sehr gut zur Beobachtung einer Verschiebung hin zu positiveren Potentialen bei der *Steady-state* Inaktivierung (Abb. 20).

3.4.4 Erholung von schneller Inaktivierung

Wir beobachteten bei unseren Messungen für die Natriumkanäle mit β -Untereinheiten eine signifikante Linksverschiebung der Inaktivierungskurve im Sinne einer schnelleren Erholung der Natriumkanäle, die auf der Eigenschaften der koexprimierten β -Untereinheiten zurückzuführen ist. So kommt es zu einer deutlich höheren Verfügbarkeit der Kanäle zum gleichen Zeitpunkt bzw. - bei gleich angenommener Verfügbarkeit - zu einer sehr viel schnelleren Erholung der Natriumkanäle mit koexprimierten β -Untereinheiten (Abb. 22).

Dabei zeigten sich Zeitkonstanten der Erholung von schneller Inaktivierung, die ohne β -Untereinheiten mehr als doppelt so hoch waren (2,16-fach schneller) wie mit β -Untereinheiten und somit hochsignifikant (Tabelle 2). Dies bestätigte sich auch im Vergleich der mutierten α -Untereinheit mit und ohne β -Untereinheiten sehr deutlich in ganz ähnlichem Verhältnis (1,9-fach schneller). Zudem war dieser Effekt unabhängig vom Ruhepotential und zeigte sich konsistent bei allen getesteten Membranpotentialen, bei -80 mV, -100 mV und -120 mV (Abb. 22 Inset).

Tabelle 2: Elektrophysiologische Daten im Überblick

	Steady-state activation			Steady-state inactivation			τ_h bei 0 mV (ms)	I_{ss}/I_{PEAK} bei 0 mV (%)	n	τ_{rec} bei -100 mV (ms)	n	Current density (A/F)	n
	$V_{1/2}$ (mV)	k	n	$V_{1/2}$ (mV)	k	n							
WT +$\beta_{1/2}$	-38.6±1.5	-5.9±0.4	15	-75.6±0.8	4.8±0.2	13	0.27±0.01	1.0±0.1	11	5.0±0.5	13	-823±151	15
Y1589C +$\beta_{1/2}$	-36.1±1.3	-6.1±0.3	14	-71.6±0.5 ***	5.2±0.2	15	0.37±0.02 ***	1.6±0.2 *	7	3.0±0.2 **	13	-361±88 *	14
WT -$\beta_{1/2}$	-41.6±1.9	-5.8±0.4	9	-81.0±1.0 ^^^	5.4±0.1 ^	9	0.34±0.02 ^^^	0.6±0.1 ^	5	10.8±0.9 ^^^	9	-645±146	9
Y1589C -$\beta_{1/2}$	-40.7±3.9	-6.1±0.5	7	-74.6±3.1 *	5.7±0.2 *	7	0.52±0.05 ** ^^	1.0±0.2	5	5.7±0.9 ** ^^	7	-348±141	7

Elektrophysiologische Parameter in Whole-cell patch-clamp Aufzeichnungen von transfizierten tsA201 Zellen mit Wildtyp (WT) und Y1589C mutierten Nav1.2-Kanälen.

$V_{1/2}$: Spannung bei halbmaximaler Aktivierung oder Inaktivierung; k: Steigungskonstante; n: Anzahl an aufgezeichneten Zellen; τ_h : Zeitkonstante bei schneller Inaktivierung; ISS/IPEAK: persistierender Natriumstrom (steady-state) geteilt durch den maximalen Spitzenstrom; τ_{rec} : Zeitkonstante der Erholung von der schnellen Inaktivierung. Gezeigt sind die Durchschnittswerte \pm SEM. Signifikante Unterschiede zwischen mutierten und Wildtyp-Kanälen sind fett dargestellt.

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kanälen mit und ohne β -Untereinheiten sind kursiv dargestellt. ^p<0.05; ^^p<0.01; ^^^p<0.001.

(Modifiziert nach Lauxmann et al., 2013)

4 DISKUSSION

4.1 Funktionelle Folgen der neu identifizierten BFNIS Mutation im SCN2A-Gen

4.1.1 Klinische Aspekte

Der klinische Phänotyp wie auch das EEG Muster in der oben beschriebenen Familie entspricht dem klinischen Syndrom von BFNIS. Alle bislang in der Literatur beschriebenen BFNIS Familien haben einen europäischen Ursprung (Berkovic et al 2004, Herlenius et al 2007, Heron et al 2002, Liao et al 2010b, Striano et al 2006a). Die hier vorgestellte Familie ist die erste mit gut dokumentiertem BFNIS und nicht-europäischen Wurzeln. Genauer gesagt stammt diese Familie von Madagaskar, dessen gemischte Bevölkerung sowohl ostafrikanische als auch südostasiatische Vorfahren aufweist. Das Alter der Erstmanifestation war homogen bei ungefähr vier Monaten und die fokalen Anfälle zeigten sich bei allen Individuen monomorph, variierten jedoch zwischen den unterschiedlichen Familienmitgliedern. Der fokale Beginn der Anfälle ist für den Patient III-12 an Hand eines ictalen EEGs nachgewiesen, das temporozentrale Spikes zeigt. Die meisten Anfälle dauerten nur kurz an und traten in Clustern auf. Nur Patient IV-3 erlitt einen außerordentlich langen Anfall mit einer so bislang noch nicht beschriebenen Gesamtdauer von 15 Minuten. Da eben dieser Patient auch eine temporale Läsion aufweist, könnten sowohl die SCN2A Mutation als auch die rechts temporale Läsion zur Epileptogenese und der ungewöhnlich langen Dauer der Anfälle beigetragen haben. Jedoch traten unter der antiepileptischen Behandlung keine weiteren Anfälle mehr auf und blieben auch nach Beendigung der Therapie mit einem Lebensjahr aus. Alle Patienten zeigten einen sehr günstigen Verlauf, auch nach Beendigung der antikonvulsiven Therapie. Lediglich Patient III-2 erlitt mit 18 Monaten einen letzten Anfall. Im Vergleich zu anderen klinischen Erscheinungsbildern von SCN2A Mutationen ist jedoch von einem ausgesprochen gutartigen Charakter der BFNIS Mutationen auszugehen. Es gibt Hinweise darauf, dass andere SCN2A Mutationen - wie z.B. die drei von japanischen Kollegen beschriebenen

SCN2A Mutationen E1211K, I1473M und R102X – durchaus schwere klinische Verläufe haben können von infantilen Spasmen (Sundaram et al 2013) über Ataxie-Formen, Schmerzsyndrome und Myoklonien (Liao et al 2010a) bis hin zum Dravet-Syndrom und Dravet-ähnlichen-Syndromen (Baasch et al 2014, Kamiya et al 2004, Lossin et al 2012, Ogiwara et al 2009, Shi et al 2009). Dabei sind jedoch im Gegensatz zu den BFNIS auslösenden Mutationen häufig *de novo* Mutationen beschrieben, lediglich wenige Missense-Mutationen (Shi et al 2009, Baasch et al., 2014). Eine detailliertere Betrachtung zum klinischen Spektrum der SCN2A Mutationen in Korrelation mit den entsprechenden Genotypen erfolgt in Kapitel 4.2.1.

Die spontane Remission der Anfälle bei BFNIS-Patienten, die auch in der hier beschriebenen Familie beobachtet wurde, könnte auf eine entwicklungsbedingte Veränderung der Natriumkanal-Expression am Axoninitialsegment (AIS) der exzitatorischen Prinzipalneurone zurückzuführen sein. Wie bereits von Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde, sind Na_v1.2-Kanäle in den ersten Lebensmonaten am AIS hoch exprimiert. Na_v1.6-Kanäle, die nicht mutiert sind, werden relativ spät hochreguliert und repräsentieren dann den für das Erwachsenenalter prädominanten Kanal (Liao et al 2010b).

4.1.2 Molekulargenetische Aspekte der Y1589C Mutation

Die neue p.Tyr1589Cys Missense-Mutation betrifft eine hochkonservierte Aminosäure der Domäne IV im S2-S3-Loop des Na_v1.2-Kanals. Diese wurde bei allen betroffenen Familienmitgliedern und obligaten Trägern gefunden und war bei französischen Kontrollen nicht vorhanden. Leider stand von madagassischen Individuen keine Kontroll-DNA zur Verfügung. Jedoch wurde diese Mutation in der dbSNP und 1000 Genom-Datenbank, die ebenfalls Kontrollen von afrikanischer und asiatischer Herkunft beinhalten, bisher noch nicht beschrieben. Auch bei dem Exome Variant Server (EVS), mit sowohl europäisch-amerikanischem Datensatz als auch afrikanisch-amerikanischem Datensatz und beim „Exome Aggregation Consortium“ (ExAC) mit über 60.000 sequenzierten Individuen fand sich diese Mutation nicht. Da diese Tyrosin-

Stelle nicht als mögliches Phosphorylierungs-Motiv (laut Phospho-Site-Plus, <http://www.phosphosite.org>) vorausgesagt wurde, ist das veränderte Ionenkanal-Verhalten eher auf die substituierte Aminosäure selber zurückzuführen und nicht die Folge einer veränderten Phosphorylierung.

4.1.3 Elektrophysiologische Aspekte der Y1589C Mutation

4.1.3.1 Funktionelle Auswirkungen der Y1589C Mutation

Eingeschränkte schnelle Inaktivierung und verkürzte Refraktärzeit

Unsere Ergebnisse zeigen insgesamt eine eingeschränkte schnelle Inaktivierung, was sowohl durch die Verschiebung der Inaktivierungskurve zu positiveren Potentialen zum Ausdruck kommt, wie auch durch den Zeitverlauf der schnellen Inaktivierung. Das bedeutet, dass nach einer erfolgten Depolarisation auf einer bestimmten Membranpotentialstufe – bei unseren Messungen insbesondere bei Potentialen zwischen -50 mV und -90 mV – im Vergleich zu den Wildtyp-Kanälen signifikant größere Ströme in diesem Potentialbereich für die mutierten Kanäle gemessen wurden.

Die Unterschiede im zeitlichen Verlauf machen zudem deutlich, dass mutierte Kanäle darüber hinaus auch noch bei der schnellen Inaktivierung deutlich träger reagieren und somit länger im „offenen“ Konformationsstadium sind, bevor das „Inaktivierungstor“ (s. Einleitung) schließt. Im Anschluss folgt eine Refraktärzeit, in der sich die Kanäle substanziell von der erfolgten Depolarisation erholen sollen bis sie wieder erneut für weitere Depolarisationen bereit stehen. Diese Zeit ist für die mutanten Kanäle signifikant verkürzt. Dies ermöglicht schnellere Depolarisationsabfolgen und ein rasches „Feuerverhalten“ von Nervenzellen. Dies spiegelt sich auch durch den Trend zu einer höheren „Verfügbarkeit“ nach hochfrequenten Stimuli (s. *Use dependence* Protokolle und Aktionspotential-„Train“) wieder. Es ist zudem ein weiterer Hinweis auf die Instabilität des inaktivierten Zustands.

Erhöhter persistierender Natriumstrom

Der erhöhte persistierende Natriumstrom nach einem langen depolarisierenden Puls könnte über eine Verschiebung des Membranpotentials in Richtung der Schwelle für die Aktionspotential-Generierung zu einer gesteigerten neuronalen Erregbarkeit führen. Es erhöht den Natrium-Einstrom und kann gut eine Membrandepolarisation so wie vermehrtes „Feuern“ der Neurone erklären (Golomb et al 2006, Vervaeke et al 2006).

Kearney et al. berichten, dass ein auf das Doppelte erhöhter persistierender Natriumstrom in Q54 transgenen Mäusen, welche die GAL 879-881 QQQ Mutation im *SCN2A*-Gen trugen, für Anfälle mit hippokampalem Ursprung verantwortlich gemacht werden können (Kearney et al 2001). In unserem Fall wurde ein ca. 1,6-fach erhöhter persistierender Natriumstrom für die mutierten Kanäle mit β -Untereinheiten gemessen (s. Abb. 21). Im Zusammenwirken mit weiteren „*gain-of-function*“-Veränderungen könnte dies funktionell relevant sein. Unser Labor beobachtete bereits bei einer weiteren BFNIS auslösenden *SCN2A*-Mutante (M252V-neo) einen signifikant erhöhten persistierenden Natriumstrom (Liao et al 2010b) wie auch bei einer *SCN2A* Mutation (A263V), die mit (neonataler) Epilepsie, episodischer Ataxie, Myoklonien und Schmerzen assoziiert ist (Liao et al 2010a). Dabei war der persistierende Natriumstrom auf bis zu dreifache Werte erhöht.

Solch ein erhöhter persistierender Natriumstrom ist in verschiedenen Geweben beschrieben, die aufgrund einer Übererregbarkeit mit einer Myotonie, kardialen Arrhythmie und auch Epilepsie einhergehen können (Cannon 2006, George 2005, Lerche et al 2005) und wird im Kapitel 4.3 detaillierter behandelt.

Reduzierte Stromdichte

Wie im Ergebnis-Teil dargestellt, zeigte sich bei unseren Messungen eine auf weniger als die Hälfte reduzierte Stromdichte für die mutierten Kanäle. Dies ist bereits für drei weitere Mutationen, die in tsA201-Zellen exprimiert wurden, in ähnlichem Ausmaß beschrieben und kann auf eine reduzierte Zelloberflächen-Expression des Kanal-Proteins zurückgeführt werden, die zwischen 47% und 79% angegeben wird (Misra et al 2008). Die relative Größe der Kanal-Protein-

Reduktion ist dabei konkordant zu den reduzierten Spitzenströmen. Dabei wird ein aberrantes „*Trafficking*“ der mutierten Proteine zur Plasmamembran vermutet, möglicherweise durch Fehlfaltung oder veränderte Interaktionen mit Chaperon-Proteinen (Hirose 2006). Solche reduzierten Stromamplituden weisen prinzipiell auf einen „*loss-of-function*“-Mechanismus der mutierten Kanäle hin und reduzieren den maximalen Spitzenstrom unter experimentellen Bedingungen. Was aber unter physiologischen Natrium-Konzentrationen (wir benutzten hier 35 mM Natrium für die intrazelluläre Lösung) den Netto-Einwärtsstrom vermutlich nur minimal verändern dürfte und das Feuerverhalten, wenn einmal die Schwelle für ein Aktionspotential erreicht ist, wahrscheinlich nicht beeinflusst. Daher ist der Einfluss dieser Beobachtung im Verhältnis zu den anderen „*gain-of-function*“-Veränderungen wohl eher als geringfügig zu bewerten.

Funktionelle Folgen des erhöhten “Subschwellen”-Natriumstroms

Um die dynamischen Bedingungen eines feuernenden Neurons möglichst physiologisch zu reproduzieren, verwendeten wir ein zuvor in murinen kortikalen Pyramidenzellen gemessenes Aktionspotential als komplexen Spannungs-Stimulus. Die Natriumströme, die als Reaktion auf diesen Stimulus zu messen sind, sind deshalb auch eben jene, die als Reaktion auf physiologische Membran-Depolarisationen zu erwarten sind. Daher eignet sich diese Methode besonders gut, um die Gesamt-Effekte einer Mutation zu erfassen, die nicht durch einfache „Quader“-Stimuli - wie sie z.B. zur Untersuchung der Aktivierung, Inaktivierung oder der Refraktärzeit zum Einsatz kommen – zu detektieren sind.

Zudem können Aussagen darüber gemacht werden, in welcher Phase sich die bereits bekannten oder auch durch andere Protokolle nicht erfassten elektrophysiologischen Effekte auswirken.

Hierbei war es uns möglich, während des komplexen Aktionspotential-Stimulus' einen signifikant erhöhten Natrium-Einwärtsstrom in der kritischen unterschwelligen Depolarisations-Phase nachzuweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass die mutierten Kanäle bereits früher die Schwelle zur

Auslösung eines Aktionspotentials erreichen bzw. kleinere Membrandepolarisationen in mutierten Kanälen zu einem Aktionspotential führen, wohingegen die gleichen Membrandepolarisationen in Wildtyp-Kanälen kleinere Ströme bei gleicher Depolarisation zeigten und möglicherweise noch unerschwellig blieben. Dies ist sehr gut vereinbar mit einer Hyperexzitabilität. Interessanterweise tritt der gemessene Maximalstrom nicht bei maximaler Depolarisation auf - also der maximalen Stromamplitude des reproduzierten Aktionspotentials – sondern bereits im unerschwelligen Bereich, sodass sich dieser Effekt nicht allein mit den bereits diskutierten elektrophysiologischen Veränderungen erklären lässt, sondern wohl als eigene Entität gesehen werden muss. Deshalb betrachten wir diesen „Subschwellen“-Natriumstrom als pathophysiologisches Markenzeichen dieser Mutation, der zusammen mit den anderen bereits diskutierten elektrophysiologischen Veränderungen mit Funktionsgewinn die Pathophysiologie bzw. das Entstehen von epileptischen Anfällen plausibel erklärt.

In ähnlicher Weise ist dieser Effekt eines erhöhten Natrium-Einwärtsstroms im unerschwelligen Bereich auch von Scalmani et al. (Scalmani et al 2006) für zwei weitere Mutationen (R233Q und R1319Q) beschrieben worden, die sonst lediglich mild ausgeprägte elektrophysiologische Veränderungen aufwiesen. Die zum Teil für einen Funktionsgewinn (Positiv-Verschiebung der Inaktivierungskurve, langsamere Inaktivierungskinetik) sprechen und zum Teil für einen Funktionsverlust (Positiv-Verschiebung der Aktivierungskurve, langsamere Aktivierungskinetik). Allerdings zeigten sich hierbei auch erhöhte Natrium-Ströme im Bereich der maximalen Depolarisation des Aktionspotential-Stimulus', was bei der hier vorliegenden Mutation nicht der Fall war. Jedoch konnte in unserem Fall auch keine Zunahme der Stromdichte (*current density*), sondern vielmehr eine Abnahme auf weniger als die Hälfte, gezeigt werden, was diese Beobachtung plausibel erklären würde. Zur Klärung der Frage, ob ausschließlich dieser Effekt ausreicht, die klinischen Symptome von BFNIS zu erklären, wären Aktionspotential-Messungen in Nervenzellen zu Mutationen aufschlussreich, die außer dem „Subschwellen“-Natriumstrom keinerlei elektrophysiologische Veränderungen aufweisen.

4.1.3.2 Modulierende Effekte der β -Untereinheiten auf die Funktion der SCN2A Wildtyp- und Y1589C-Kanäle

Positive Verschiebung der Steady-state Aktivierung und Inaktivierung, kürzere Inaktivierungs-Zeitkonstanten durch β_1 - und β_2 -Untereinheiten

Sowohl für die Inaktivierung (hochsignifikant), als auch in sehr viel geringerem Ausmaß für die Aktivierung (als Trend), wurde eine Verschiebung zu positiveren Potentialen mit beiden β -Untereinheiten ($h\beta_1$ und $h\beta_2$) beobachtet. Dieser „depolarisierende Effekt“ der β -Untereinheiten (β_1 und β_2) unterstützt somit auch die Ergebnisse von Qu et al. (Qu et al 2001) (Qu et al 2001) (Qu et al 2001), die ebenfalls in tsA201-Zellen eine klare Verschiebung der Strom-Spannungskurven (für die Inaktivierungskurve deutlich mehr als für die Aktivierungskurve) zu positiveren Potentialen beschreiben. In deren Ergebnissen zeigte sich dies sowohl für die β_1 -Untereinheit, als auch für die β_2 -Untereinheit. Wurden beide β -Untereinheiten koexprimiert, war dieser Effekt sogar bei der *Steady-state* Aktivierung verstärkt. Zuvor war in *Xenopus* Oozyten und „Chinese hamster lung cells 1610“ eine Negativ-Verschiebung, also in entgegengesetzter Richtung, beschrieben worden, was sich allerdings wiederholt in Säuger-Expressions-Systemen (wie z.B. tsA201 Zellen) wie auch hippokampalen Mäuse-Neuronen nicht bestätigen ließ (Chen et al 2002, Isom et al 1992, Isom et al 1995a). Darüber hinaus zeigt sich bei unseren Messungen ein signifikant steilerer Abfall der Inaktivierungskurve für die Wildtyp-Kanäle ohne β -Untereinheiten, wohingegen die Aktivierungskurve nicht einmal einen Trend in eine Richtung aufweist, so wie eine deutlich kleinere Inaktivierungskonstante für die schnelle Inaktivierung.

Diese Konstellation einer relativ stärkeren depolarisierenden Verschiebung wie auch eines steileren Abfalls der Inaktivierungskurve bei nicht signifikant veränderter Aktivierungskurve, weist prinzipiell auf einen „steigernden“ und „beschleunigenden“ Effekt hin, sodass insgesamt bei gleichzeitiger Präsenz beider β -Untereinheiten (β_1 und β_2) von einer erhöhten neuronalen Sensitivität für exzitatorische „Inputs“ bzw. dem Übergang von einem langsamen „Gating“-

Modus in einen schnellen „*Gating*“-Modus auszugehen ist (Isom et al 1992, Isom et al 1995a, Morgan et al 2000).

Beschleunigte Erholung von schneller Inaktivierung mit β -Untereinheiten

Im Gegensatz zu bereits erfolgten Messungen bei einem Haltepotential von -120 mV mit und ohne β_1 - und β_2 -Untereinheiten, die keinerlei Effekt nachweisen konnten (Qu et al 2001), zeigte sich bei unseren Messungen eine hochsignifikant beschleunigte Erholungszeit mit ungefähr doppelt so großen Zeitkonstanten bei -100 mV. Dies lässt auf eine deutlich verkürzte Refraktärzeit der Kanäle mit β -Untereinheiten schließen, was sehr gut zur Annahme eines beschleunigten „*Gating*“-Verhaltens und einer insgesamt „beschleunigenden“ Wirkung der β -Untereinheiten (s. 4.3.1) passt.

Erhöhter persistierender Natriumstrom mit β -Untereinheiten

Unsere Ergebnisse zeigen eine nur moderate, aber signifikante Erhöhung des persistierenden Natriumstroms bei gleichzeitiger Expression von β_1 - und β_2 -Untereinheiten, sowohl für die Wildtyp- $\text{Na}_v1.2$ -Kanäle als auch für die mutierten Natrium-Kanäle. Da davon ausgegangen wird, dass bereits kleinere Veränderungen im persistierenden Natriumstrom eine wichtige Rolle bei der Integration synaptischer Signale in den Dendriten und für die Generierung von epileptischen Entladungen in kortikalen Neuronen spielt (Crill 1996), hätte eine moderate Erhöhung, wie in unserem Fall beobachtet, einen wichtigen physiologischen und auch pathophysiologischen Einfluss. Ein persistierender Natriumstrom kann durch den Eintritt eines Bruchteils der Natrium-Kanäle, die bei der Aktionspotential-Generierung beteiligt sind, in einen langsamen „*Gating*“-Modus übergehen (Alzheimer et al 1993), obwohl es darüber hinaus auch Evidenz dafür gibt, dass die Generierung dieser Ströme durch eine ganz umschriebene Population an Natriumkanälen geschieht (Alzheimer et al 1993, Magistretti et al 1999).

In tsA-201-Zellen exprimierte $\text{Na}_v1.2$ -Kanäle zeigen gewöhnlich relativ kleine persistierende Natrium-Ströme. Einige Faktoren, die zu einer Erhöhung des

persistierenden Natriumstroms führen, wurden bereits identifiziert. Dazu gehört eine Überexpression der $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G Proteins zusammen mit Nav1.2-Kanälen in tsA201-Zellen (Ma et al 1997), wie auch Hypoxie und Stickstoffoxid (Hammarstrom & Gage 1999). Zudem ist eine Erhöhung des persistierenden Natriumstroms auf ca. das 3,5-fache bei Koexpression von β_3 -Untereinheiten wie auch – in noch größerem Ausmaß - von β_2 - und β_3 -Untereinheiten beschrieben, was für die gleichzeitige Koexpression von β_1 - und β_2 -Untereinheiten nicht beobachtet werden konnte (Qu et al., 2001). Jedoch zeigte sich für die Koexpression von β_1 -Untereinheiten zusammen mit β_4 -Untereinheiten, die mit der β_2 -Untereinheit strukturell am engsten verwandt sind, und Nav1.1-Kanälen in HEK-Zellen eine signifikante Erhöhung, die bei alleiniger Expression von β_2 – bzw. β_4 -Untereinheiten sogar noch größer war (Aman et al 2009).

Durch eine Erhöhung der „Offen“-Wahrscheinlichkeit und Verfügbarkeit der Natrium-Kanäle im unterschweligen Bereich, führt sowohl ein persistierender wie auch ein „resurgent“ (engl. für „wieder erstehender“, „wieder auflebender“) Natriumstrom zu einer generell erhöhten Feuerrate von Neuronen (Khaliq et al 2003, Stafstrom et al 1984). Somit würde der oben beschriebene signifikant erhöhte persistierende Natriumstrom bei gleichzeitiger Expression beider β -Untereinheiten zu einer Verstärkung von transienten Strömen führen und in einer gesteigerten Erregbarkeit peripherer und zentralnervöser Neurone resultieren, welche β_1 - und β_2 -Untereinheiten exprimieren.

Bewertung der modulierenden Effekte

Prinzipiell zeigen unsere Ergebnisse die gleichen elektrophysiologischen Veränderungen der mutanten Kanäle bei Koexpression der β -Untereinheiten β_1 und β_2 . Obwohl die funktionellen Effekte der auxiliären β -Untereinheiten in unseren heterologen Säugerzell-Expressionssystemen relativ klein erscheinen, können eben diese jedoch sehr entscheidend in der Regulierung der funktionellen Eigenschaften von Natrium-Kanälen sein, um eine regelrechte Erregbarkeit in Neuronen zu gewährleisten. Da exzitatorische postsynaptische

Potentiale (EPSP) Neurone lediglich um wenige Millivolt depolarisieren, haben auch relativ geringfügige Verschiebungen in der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung oder Inaktivierung einen großen Effekt auf die Antwort von Neuronen auf ihren synaptischen Eingang („*input*“), die dann nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip darüber entscheiden, ob diese Neurone als Antwort auf EPSPs Aktionspotentiale feuern oder nicht (Yu et al 2003).

4.2 Die bisher bekannten SCN2A Mutationen

4.2.1 Die zwölf bekannten BFNIS Mutationen

Bislang sind über 33 *SCN2A* Mutationen in der Literatur beschrieben, von denen die Mehrheit mit milden Epilepsie Phänotypen assoziiert ist. Zwölf davon finden sich in Familien mit BFNIS – die hier vorliegende eingeschlossen (Berkovic et al 2004, Herlenius et al 2007, Heron et al 2002, Liao et al 2010b, Striano et al 2006a). Dabei sind alle Mutationen, die mit BFNIS assoziiert sind, Missense-Mutationen entwicklungsgeschichtlich hochkonservierter Aminosäuren. Zudem wurde das klinische Bild - durch den Anfallsbeginn in den ersten Lebensmonaten von benignen neonatalen und etwas schwieriger von infantilen Anfällen (BFNS bzw. BFIS) abgegrenzt - ausschließlich bei Patienten mit *SCN2A* Mutationen beobachtet. Andere beteiligte Gene sind bislang nicht beschrieben.

Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Generell wird angenommen, dass hochkonservierte Aminosäuren entwicklungsgeschichtlich bedeutsam und relevant sein müssen, sodass bei Substitutionen dieser Aminosäuren, wie auch bei Mutationen in funktionell relevanten Regionen, wie dem Spannungssensor oder dem Inaktivierungspartikel, von ebenfalls bedeutsamen elektrophysiologischen Veränderungen auszugehen ist. Diese Annahmen und Überlegungen fließen selbstverständlich auch in Programme (Polyphen, Sift) oder Scores (z.B. Grantham-Score) mit ein, sodass bei Missense-Mutationen diejenigen

Mutationen, die einen höheren Grantham-Score aufweisen mit schwerwiegenderen Phänotypen assoziiert sind (Grantham 1974).

Arbeiten, welche die physiko-chemischen Unterschiede zwischen den Aminosäuren-Veränderungen für elf BFNIS Missense-Mutationen untersuchten, ergaben einen niedrigen (GS von 29) Grantham Score (Brunklaus et al 2014) im Vergleich zu anderen *SCN2A*-Mutationen mit schwerwiegenderen Erkrankungsbildern (GS von 62; siehe auch 4.2.2). Dies bestätigt, dass die Aminosäuren-Substitutionen, die in BFNIS Mutationen beobachtet wurden, zwischen physiko-chemisch ähnlichen Aminosäuren stattfanden und somit auch weniger wahrscheinlich schwerwiegende Erkrankungen verursachen. Zudem sind *SCN2A*-Mutationen in mild ausgeprägten Phänotypen wie z.B. BFNIS oder GEFS+ alle vererbt, wohingegen schwer ausgeprägte Phänotypen *de novo* entstehen (Kamiya et al 2004, Nakamura et al 2013a, Shi et al 2012).

„Gain“- und „Loss-of-function“-Veränderungen bei den bisher bekannten BFNIS-Mutationen

Von den bislang sechs funktionell untersuchten BFNIS Mutationen werden teilweise kontrovers diskutierte Ergebnisse berichtet. Scalmani et al. 2006 beschreiben für die vier zuerst in dissoziierten neokortikalen Ratten-Neuronen gemessenen Mutationen (L1330F, L1563V, R223Q und R1319Q) einen erhöhten Natriumstrom und legt „*gain-of-function*“-Mechanismen mit neuronaler Hyperexzitabilität zugrunde (Scalmani et al 2006). Dabei zeigten die Autoren für zwei Mutationen eine zu depolarisierteren Potentialen hin verschobene Inaktivierungskurve (L1330F) bzw. eine zu hyperpolarisierteren Potentialen hin verschobene Aktivierungskurve (L1563V). Zwei weitere Mutationen (R223Q und R1319Q) blieben in allen mit herkömmlich gemessenen Methoden unauffällig und zeigten keinerlei spezifische Modifikationen der Exzitabilität. Jedoch zeigten diese beiden Mutationen in weiteren Experimenten, die mit physiologischen Spannungs-Stimuli durchgeführt wurden, größere Ströme im unter-schweligen Bereich vor dem schnellen Aufstrich des Aktionspotentials, weshalb daraus ebenfalls eine neuronale Hyperexzitabilität resultieren könnte.

Misra et al. (2008) hingegen berichten von in tsA201-Zellen durchgeführten Messungen, die zwar für die L1563V-Mutation ebenfalls einen „*gain-of-function*“-Mechanismus vermuten lassen, jedoch für die L1330F-Mutation und die R1319Q eher „*loss-of-function*“-Mechanismen durch eine verminderte Stromdichte nahelegen.

Alle von uns dargestellten elektrophysiologischen Veränderungen – die „*current density*“ ausgenommen (Abb. 18) - weisen insgesamt durch einen erhöhten Natrium-Einwärtsstrom im Subschwellen-Bereich auf einen Funktionsgewinn hin. Somit ist von einer durch die Mutation bedingten gesteigerten neuronalen Exzitabilität der Neurone auszugehen. Na_v1.2-Kanäle werden im zerebralen Kortex wie auch im Hippokampus hauptsächlich in Axonen, Nervenendigungen und möglicherweise ganz besonders hoch in exzitatorischen pyramidalen Neuronen exprimiert, wie Färbungen von exzitatorischen Fasern nahelegen (Gong et al 1999, Westenbroek et al 1989, Whitaker et al 2001). Zudem kommt es zu ganz selektiven „Clustern“ an den Ranvier’schen Schnürringen in sich entwickelnden myelinisierten Fasern (Kaplan et al 2001). Wegen dieser Verteilung könnten die veränderten Eigenschaften der Na_v1.2-Kanäle besonders die Funktionsweise von exzitatorischen Neuronen beeinträchtigen, indem sie eine Übererregbarkeit von neuronalen Netzwerken verursachen, was die erhöhte Suszeptibilität der Patienten für Anfälle erklären kann.

4.2.2 Andere SCN2A Mutationen

4.2.2.1 Dravet-Syndrom (SMEI)

Ca. 75% aller Dravet-Syndrome (syn. Severe myoclonic epilepsy in infancy – SMEI), einer myoklonischen infantilen Epilepsie mit schlechter Prognose werden durch Mutationen des *SCN1A*-Gens verursacht und treten nach neueren Daten in der dänischen Bevölkerung mit einer Inzidenz von 1:22.000 auf (Bayat et al 2015). Ein kleiner Teil dieser Patienten könnte dabei von einer Therapie mit Lamotrigin profitieren (Dalic et al 2015). Vor ca. 6 Jahren wurden auch drei Missense-SCN2A-Mutationen in Patienten mit Dravet-ähnlichen Syndromen identifiziert (Ogiwara et al 2009, Shi et al 2009). Die -Mutationen

E211K und I1473M resultieren in hyperpolarisierende Verschiebungen der Spannungsabhängigkeit bei der Aktivierung, was sehr gut zum verfrühten Öffnen der Kanäle und der Hyperaktivität passt (Ogiwara et al 2009). Eine weitere Missense-Mutation (R1312T) zeigte in ausführlichen elektrophysiologischen Messungen eine reduzierte Verfügbarkeit der Kanäle nach schneller und langsamer Inaktivierung, eine verlangsamte Erholung der Kanäle von schneller Inaktivierung, sowie eine verstärkte Use dependence nach repetitiver Stimulation. Trotz der ebenfalls beobachteten Negativ-Verschiebung der Spannungsabhängigkeit bei der Aktivierung hin zu negativeren Potentialen, nehmen die Autoren insgesamt einen „Loss-of-function“-Mechanismus an (Lossin et al 2012).

4.2.2.2 Infantile Spasmen

Im Jahr 2013 wurde bekannt, dass *SCN2A*-Mutationen mit infantilen Spasmen assoziiert sein können. Infantile Spasmen sind durch epileptische Spasmen charakterisiert, die in Clustern mit einem Beginn im ersten Lebensjahr auftreten (sog. „BNS-Anfälle“, „West-Syndrom“). Dabei wurde ein hippokampaler Anfallsursprung vermutet (Sundaram et al 2013). Unsere französischen Kooperationspartner bestätigten nun Anfang 2015 in einer größeren Kohorte von 75 Patienten mit infantilen Spasmen den Zusammenhang durch eine neu entdeckte Mikroduplikation, die das *SCN2A*-Gen mit einschloss (Boutry-Kryza et al 2015).

4.2.2.3 Epileptische Enzephalopathien und andere mit schweren Epilepsieformen assoziierte Syndrome

Es sind seither drei unterschiedliche *SCN2A* Mutationen in sporadischen Fällen beschrieben mit therapierefraktärer Epilepsie und schwerwiegenden kognitiven Einschränkungen (Kamiya et al 2004, Ogiwara et al 2009). Die funktionellen Untersuchungen zeigen unterschiedliche elektrophysiologische Veränderungen, die alle auf einen kompletten oder zumindest schweren „*loss-of-function*“-Mechanismus schließen lassen. Die p.Arg102X Mutation ist dabei seither die einzige trunkierende *SCN2A* Mutation, bei der sogar ein dominant-negativer

Effekt auf Wildtyp Kanäle vermutet wird (Kamiya et al 2004, Ogiwara et al 2009). Solche schweren *“loss-of-function”*-Mechanismen könnten komplexe Netzwerk-Veränderungen induzieren, ganz im Gegensatz zu den kleineren *„gain-of-function“*-Veränderungen, die wir und andere für die BFNIS Mutationen beobachtet haben. Dies könnte auch die großen Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild der *SCN2A*-assoziierten Epilepsien erklären.

Eine weitere *SCN2A* Missense-Mutation wurde in einem sporadischen Fall mit schwerer und schlecht behandelbarer neonataler infantiler Epilepsie beschrieben, die sich erst im Alter von 13 Monaten verlor. Zudem ging dieses Syndrom im weiteren Verlauf mit ataktischen Episoden, Myoklonien und Schmerzen einher (Liao et al 2010a). Interessanterweise fand sich eben diese Mutation *de novo* auch in einem monozygoten Zwillingsspaar mit Ohtahara-Syndrom. Dabei war die *SCN2A*-Mutation in einem Zwilling, der bereits 2 Wochen nach der Geburt aus iatrogenen Gründen verstarb mit einer dentato-olivären Dysplasie assoziiert. Dies ist bislang der erste neuropathologische Bericht einer subtilen Anomalie in der zerebellären Architektur.

Darüber hinaus gibt es zunehmend mehr Berichte über epileptische Enzephalopathien, die klar auf *SCN2A*-Mutationen zurückzuführen sind. So wurde erst vor wenigen Monaten eine Fallserie von drei weiteren Patienten mit *de novo* Mutationen berichtet (Matalon et al 2014). Bei einem Patient fand sich ein Ohtahara-ähnliches Syndrom, bei den anderen beiden Patienten schwer behandelbare Epilepsien und weiteren Symptome wie eine schwere globale Entwicklungsverzögerung, eine diffuse muskuläre Hypotonie, choreatiforme Bewegungen aller Extremitäten, eine Plagiozephalie wie auch eine Feinmotorikstörung.

Carvill et al. untersuchten 500 Patienten auf 19 bekannte Gene und 46 Kandidatengene. Dabei konnte gezeigt werden, dass *de novo* *CHD2* und *SYNGAP1* Mutationen für 1,2% bzw. 1,0% der Fälle die Ursache von epileptischen Enzephalopathien sind (Carvill et al 2013).

Ebenfalls im letzten Jahr wurde erneut eine neue *de novo* Missense-Mutation (R1882L) bei einem fünfjährigen Mädchen identifiziert, die für schwer behandelbare Anfälle, eine Optikus-Atrophie, eine schwere

Intelligenzminderung und muskuläre Hypotonie verantwortlich gemacht werden kann (Baasch et al 2014).

Eine Schweizer Gruppe um Barbara Plecko berichtete kürzlich von einem weiteren Mädchen mit einer schweren epileptischen Enzephalopathie mit Beginn im Kleinkindalter (Hackenberg et al 2014). Diese trat in Kombination mit einer vorübergehenden choreatischen Bewegungsstörung, Hypersomnie, wie auch einer progressiven Hirnatrophie auf. Somit erweitert sich das klinische Spektrum der *SCN2A*-Mutationen ständig.

Auch aus eigener Erfahrung können wir von einigen schwer ausgeprägten Phänotypen epileptischer Enzephalopathien berichten, die gut auf Phenytoin ansprechen (Daten noch nicht veröffentlicht). Daher gehen wir hierbei von „Gain-of-function“-Mutationen aus.

4.2.2.4 *SCN2A*-Mutationen, die nicht mit Epilepsien assoziiert sind

Mit dem Siegeszug des Whole-Exome Sequencing in den letzten Jahren, zeigte sich auch eine zunehmende Zahl an Erkrankungen, die mit *SCN2A*-Mutationen assoziiert sein können, wobei nicht zwangsläufig epileptische Anfälle mit auftreten müssen. So konnte eine Gruppe um Stephan Sanders von der Yale University in einer Kohorte von 928 Individuen einen Zusammenhang von *de novo* Einzelneukleotid-Varianten (*single nucleotide variants; SNVs*) im *SCN2A*-Gen mit Autismus nachweisen (Sanders et al 2012). Beide Index-Personen hatten dabei noch niemals epileptische Anfälle.

Zudem finden sich aber auch Hinweise darauf, dass schwere Intelligenzminderungen bei nicht-syndromalen Patienten mit Genen wie *STXBP1*, *SYNGAP1*, aber auch *SCN2A* assoziiert sind (Rauch et al 2012). Elektrophysiologische Studien hierfür sind jedoch noch durchzuführen.

4.3 Funktionelle Auswirkungen bei anderen Natriumkanal-Mutationen

Mutationen in Genen, die für spannungsabhängige Natriumkanäle kodieren, haben sich als die klinisch relevantesten Gene in Bezug auf die Assoziation zu

Epilepsien, kardiale Leitungsstörungen, periphere Muskelerkrankungen und auch periphere Schmerzsyndrome herausgestellt. In Vergleichen von über 1300 Natriumkanal Mutationen des zentralen und peripheren Nervensystems wie auch im Herzen und Skelettmuskel wurden zahlreiche Ähnlichkeiten der genetischen und klinischen Charakteristika der „Natriumkanal-Familie“ festgestellt (Brunklaus et al 2014).

4.3.1 SCN1A, SCN3A und SCN8A

Wie bereits mehrfach erwähnt sind, ist das *SCN1A-Gen* eng verwandt mit dem *SCN2A-Gen*, sowohl hinsichtlich seiner Aminosäuresequenz, als auch in Bezug auf das klinische Spektrum der durch Mutationen verursachten Erkrankungsbilder. Aktuell sind mehr als 750 Sequenzvarianten des *SCN1A-Gens* identifiziert (Zuberi et al 2011). Dabei reicht die Spannbreite von relativ milde Phänotypen wie GEFS+ bis hin zum Dravet-Syndrom (s. auch 4.2.2.1). Mehr als die Hälfte der mit dem Dravet-Syndrom assoziierten Mutationen sind dabei Aminosäure-Substitutionen, die zum Abbruch des Leserasters führen und einen Funktionsverlust mit sich bringen. Im Gegensatz dazu sind GEFS+ Mutationen fast immer mit Missense-Mutationen assoziiert (Claes et al 2009). Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse wiesen im *SCN1A*-Maus-Modell mit mutierten $\text{Na}_v1.1$ -Kanälen (R1648H) eine Dysfunktion von GABAergen Interneuronen nach, wobei insbesondere eine eingeschränkte Aktionspotential-Initiation am AIS eine Rolle zu spielen scheint. Dieses Defizit nahm mit zunehmender Dauer der „Feuer-Perioden“ zu, was einen Mechanismus mit einer erhöhten langsamen Inaktivierung nahelegt.

Es ist bekannt, dass eine abnorme Expression von $\text{Na}_v1.3$ -Kanälen eine bedeutende Rolle in der Weiterleitung von Schmerzen nach Rückenmarksschädigungen spielt. Dabei scheinen die Hinterhorn-Neurone wie auch thalamische Neurone eine Rolle zu spielen (Hains et al 2005). Darüber hinaus finden sich bislang 5 Beschreibungen von Mutationen, die mit Epilepsie assoziiert sind (Holland et al 2008, Vanoye et al 2014). Vier davon sind Missense-Mutationen. Alle fünf zeigen jedoch als gemeinsamen Mechanismus

eine gesteigerte Strom-Aktivierung als Antwort auf depolarisierende Spannungs-Rampen.

Der Na_v1.6-Kanal wird vom *SCN8A-Gen* kodiert und findet sich im peripheren wie auch zentralen Nervensystemen. Er ist insbesondere an Dendriten, Synapsen, am AIS und den Ranvier'schen Schnürringen lokalisiert (Caldwell et al 2000). In den letzten Monaten häufen sich die Hinweise einer Assoziation des *SCN8A-Gens* mit epileptischen Enzephalopathien mit leichter bis schwerer Intelligenzminderung, epileptischen Anfällen, wie auch motorischen Manifestationen in Form von Hypo- und Dystonie, Hyperreflexie und Ataxie (Larsen et al 2015, O'Brien & Meisler 2013, Ohba et al 2014). Funktionelle Arbeiten weisen auf einen „*Gain-of-function*“-Mechanismus hin mit einem persistierenden Natriumstrom und inkompletter Inaktivierung (Veeramah et al 2012).

4.3.2 SCN4A

Mutationen in spannungsabhängigen Na_v1.4-Kanälen sind mit einer Reihe von skelettalen Muskelerkrankungen assoziiert wie z.B. die kaliumsensitive Myotonie (*engl. potassium-aggravated myotonia [PAM]*), die Paramyotonia congenita (PMC), oder die hyper- und hypokaliämische periodische Paralyse (HyperPP bzw. HypoPP) und kongenitale myasthene Syndrome (Jurkat-Rott et al 2010). Bislang sind mehr als 40 unterschiedliche Missense-Mutationen beschrieben, davon folgen fast alle einem autosomal-dominanten Erbgang. Es gibt keine Berichte von Abbruch-Mutationen. Hauptsymptome sind Myotonien, die durch unkontrollierte repetitive Muskelfaser-Entladungen und Muskelschwäche auf Grund von einer Unerregbarkeit von Muskelfasern (Jurkat-Rott et al 2010).

4.3.3 SCN5A

Die Na_v1.5-Kanäle werden auf dem *SCN5A-Gen* kodiert und sind die wichtigsten kardialen Natriumkanäle. Sie sind im Sarkolemm der atrialen und ventrikulären Myozyten lokalisiert, wie auch im kardialen autonomen

Nervensystem, wo sie an der Schrittmacher-Funktion des sinoatrialen und atrioventrikulären Knotens beteiligt sind. Daher spielen Na_v1.5-Kanäle eine entscheidende Rolle bei der kardialen Erregbarkeit und bei der Weiterleitung elektrischer Impulse im Herzen. Mutationen im *SCN5A-Gen* sind mit schweren Arrhythmien assoziiert, die sogar lebensbedrohlich sein und zu einem plötzlichen Herztod führen können (Vatta et al 2002).

Funktionelle Arbeiten in heterologen Systemen (HEK-293) und an Mausmodellen haben gezeigt, dass es prinzipiell zwei krankheitsverursachenden Mechanismen gibt im *SCN5A-Gen*: 1. „*Gain-of-function*“-Mutationen verursachen einen erhöhten Natriumeinstrom, der zu einer verzögerten kardialen Repolarisation, einer längeren Aktionspotential Dauer und letztendlich zu einem Long-QT-Syndrom Typ 3 führt. (LQT3). 2. „*Loss-of-function*“-Mutationen verringern den Natriumeinstrom und führen zu einer reduzierten kardialen Erregbarkeit, einer langsameren elektrischen Weiterleitungs-Geschwindigkeit und schließlich zu einem Brugada Syndrom (BS), Sick-Sinus-Syndrom (SSS) oder einer Progressiven kardialen Leitungsverzögerung (*engl. progressive cardiac conduction disease [PCCD]*) und Überlappungs-Syndromen (Bennett et al 1995, Tan et al 2001). Gründe für einen Funktionsverlust sind bspw. eine erniedrigte Expression auf Grund von „*trafficking*“ Defekten, Expression von nicht funktionellen Kanälen oder auch Veränderungen der *gating* Eigenschaften, die auf eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und/oder Inaktivierung zurückzuführen sind (Amin et al 2010).

4.3.4 SCN9A, SCN10A und SCN11A

Die *SCN9A-Gen* kodiert für den Na_v1.7-Kanal, der Na_v1.8-Kanal wird vom *SCN10A-Gen* kodiert und der Na_v1.9-Kanal vom *SCN11A-Gen*. Sie werden alle hauptsächlich in Neuronen der Hinterwurzelganglien exprimiert und spielen eine große Rolle in der Schmerzverarbeitung. Es sind vier unterschiedliche Erkrankungen beschrieben, die durch Mutationen im *SCN9A-Gen* verursacht werden können. Ein Funktionsverlust der Na_v1.7-Kanäle ist mit einer kongenitalen Schmerzunempfindlichkeit (*engl. congenital insensitivity to pain*

[CIP]) assoziiert, wohingegen ein Funktionsgewinn („*gain-of-function*“) dieses Kanals mit einer Erythromelalgie (*engl. individuals with erythromelalgia [IEM]*), einer paroxysmalen extremen Schmerzstörung (*paroxysmal extreme pain disorder [PEPD]*) und einer schmerzhaften peripheren Neuropathie (*engl. painful peripheral neuropathy [PPN]*) einhergehen können. Elektrophysiologisch ist bei der IEM eine Verschiebung der Aktivierungskurve in die hyperpolarisierende Richtung verantwortlich im Sinne einer Übererregbarkeit des affizierten Neurons (Waxman & Dib-Hajj 2005). Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zeigten, dass Mutationen, die kleinere Effekte auf die Aktivierung der Natriumkanäle hatten, mit einer weniger stark erhöhten Erregbarkeit der Neurone und einem späteren klinischen Auftreten assoziiert waren (Han et al 2009).

Na_v1.8-Kanäle sind ebenfalls mit IEM und PPN assoziiert. Mutationen zeigten eine beschleunigte Erholung von schneller Inaktivierung, was zu einer Hyperexzitabilität der Neurone führt (Faber et al 2012).

Mutationen in Na_v1.9-Kanäle führen zu einer stark reduzierten bis gar nicht mehr vorhandenen thermischen und mechanischen Entzündungs-induzierten Hyperalgesie in Mäusen (Priest et al 2005).

4.4 Einordnung der Y1589C Mutation und Schlussfolgerung

Bislang wurden sechs BFNIS Mutationen funktionell getestet (Liao et al 2010b, Misra et al 2008, Scalmani et al 2006, Xu et al 2007). Alle davon sind mit einer ganzen Reihe an biophysikalischen Defekten assoziiert, die hauptsächlich auf einen Funktionsgewinn hinweisen. Einige von ihnen zeigten dabei jedoch auch eine reduzierte Stromdichte, so dass manche Autoren einen Funktionsverlust diskutierten. Die Mutation, die mit dem schwersten Phänotyp einhergeht, zeigte auch die prominentesten „*gain-of-function*“-Veränderungen (Liao et al 2010a).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Benigne neonatal-infantile Anfälle (BFNIS) werden durch Mutationen im *SCN2A*-Gen verursacht, welches den spannungsabhängigen Natrium-Kanal Nav1.2 kodiert. Bei Patienten mit der meist selbstlimitierenden autosomal-dominanten Erkrankung BFNIS sind Missense-Mutationen im *SCN2A*-Gen beschrieben. Im Gegensatz dazu wurden aber auch einige *SCN2A de novo* Mutationen bei Patienten mit schwerwiegender epileptischer Enzephalopathie gefunden.

Wir berichten hier von einer BFNIS Familie von Madagaskar mit neun betroffenen Individuen in vier Generationen, bei denen eine neue *SCN2A*-Mutation identifiziert wurde, und charakterisierten deren funktionelle Auswirkungen. Der Zeitpunkt des Anfallbeginns reichte vom dritten bis zum neunten Lebensmonat, wobei die Anfälle häufig in „Clustern“ und bei einem Individuum auch in Form eines Status epilepticus auftraten. Bei zwei Patienten konnten ictale EEGs mit fokalem Anfallsmuster mit und auch ohne sekundäre Generalisierung aufgezeichnet werden. Die Anfälle sistierten zwischen dem fünften und 18. Lebensmonat, teilweise auch ohne antiepileptische Medikation. Die psychomotorische und intellektuelle Entwicklung war bei allen Patienten unauffällig. Die direkte Sequenzierung von *SCN2A* ergab eine neue heterozygote Missense-Mutation, c.4766A>G, die einen Aminosäure-Austausch p.Tyr1589Cys in einer hochkonservierten Region des Nav1.2-Kanals (D4/S2-S3) voraussagte. Diese Mutation kosegregierte mit dem klinischen Phänotyp und wurde nicht in normalen Kontrollen gefunden. Funktionelle Untersuchungen in einem heterologen Säugerzell-Expressionssystem mit tsA201-Zellen und der „*whole-cell Patch-Clamp*“ Technik ergab eine Verschiebung der *steady-state* Inaktivierung hin zu depolarisierteren Potentialen, einen erhöhten persistierenden Natriumstrom, eine Verlangsamung der schnellen Inaktivierung, sowie eine beschleunigte Erholung von der schnellen Inaktivierung. Darüber hinaus beobachteten wir bei der Anwendung eines Aktionspotentials als komplexem physiologischen Stimulus in „*voltage-*

clamp“-Experimenten einen erhöhten Natrium-Einwärtsstrom bei unter-schwel-ligen Spannungen.

In der Gesamtschau weisen alle von uns dargestellten elektrophysiologischen Veränderungen – die „*current density*“ ausgenommen - auf einen Funktionsgewinn hin. Somit ist von einem durch die Mutation bedingten erhöhten Natrium-Einwärtsstrom und einer dadurch gesteigerten neuronalen Exzitabilität der Neurone auszugehen. Aufgrund der spezifischen Verteilung im zerebralen Kortex, der besonders hohen Expression in exzitatorischen pyramidalen Neuronen, wie auch dem Auftreten von ganz selektiven „Clustern“ an den Ranvier’schen Schnürringen, könnten die veränderten Eigenschaften der Na_v1.2-Kanäle besonders die Funktionsweise von exzitatorischen Neuronen beeinträchtigen und dadurch eine Übererregbarkeit von neuronalen Netzwerken verursachen, was die erhöhte Suszeptibilität der Patienten für Anfälle erklären kann.

6 LITERATUR

- Alzheimer C, Schwindt PC, Crill WE. 1993. Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13: 660-73
- Aman TK, Grieco-Calub TM, Chen C, Rusconi R, Slat EA, et al. 2009. Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 2027-42
- Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL. 2010. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460: 223-37
- An RH, Wang XL, Kerem B, Benhorin J, Medina A, et al. 1998. Novel LQT-3 mutation affects Na⁺ channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits. *Circulation research* 83: 141-6
- Baasch AL, Huning I, Gilissen C, Klepper J, Veltman JA, et al. 2014. Exome sequencing identifies a de novo SCN2A mutation in a patient with intractable seizures, severe intellectual disability, optic atrophy, muscular hypotonia, and brain abnormalities. *Epilepsia* 55: e25-9
- Balser JR, Nuss HB, Chiamvimonvat N, Perez-Garcia MT, Marban E, Tomaselli GF. 1996. External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *The Journal of physiology* 494 (Pt 2): 431-42
- Bayat A, Hjalgrim H, Moller RS. 2015. The incidence of SCN1A-related Dravet syndrome in Denmark is 1:22,000: A population-based study from 2004 to 2009. *Epilepsia*
- Belcher SM, Zerillo CA, Levenson R, Ritchie JM, Howe JR. 1995. Cloning of a sodium channel alpha subunit from rabbit Schwann cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 11034-8
- Bendahhou S, Cummins TR, Tawil R, Waxman SG, Ptacek LJ. 1999. Activation and inactivation of the voltage-gated sodium channel: role of segment S5 revealed by a novel hyperkalaemic periodic paralysis mutation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 4762-71
- Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL, Jr. 1995. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376: 683-5
- Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, et al. 2004. Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Annals of neurology* 55: 550-7
- Biervert C, Steinlein OK. 1999. Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Human genetics* 104: 234-40
- Boutry-Kryza N, Labalme A, Ville D, de Bellescize J, Touraine R, et al. 2015. Molecular characterization of a cohort of 73 patients with infantile spasms syndrome. *European journal of medical genetics* 58: 51-8

- Brunklaus A, Ellis R, Reavey E, Semsarian C, Zuberi SM. 2014. Genotype phenotype associations across the voltage-gated sodium channel family. *Journal of medical genetics* 51: 650-8
- Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. 2000. Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5616-20
- Cannon SC. 2006. Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. *Annual review of neuroscience* 29: 387-415
- Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, McMahon JM, O'Roak BJ, et al. 2013. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nature genetics* 45: 825-30
- Catterall WA. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25
- Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, et al. 1998. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nature genetics* 18: 53-5
- Chen C, Bharucha V, Chen Y, Westenbroek RE, Brown A, et al. 2002. Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 17072-7
- Chen C, Cannon SC. 1995. Modulation of Na⁺ channel inactivation by the beta 1 subunit: a deletion analysis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 431: 186-95
- Chen N, Lucero MT. 1999. Transient and persistent tetrodotoxin-sensitive sodium currents in squid olfactory receptor neurons. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology* 184: 63-72
- Chen WJ, Lin Y, Xiong ZQ, Wei W, Ni W, et al. 2011. Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nature genetics* 43: 1252-5
- Chevrie JJ, Aicardi J. 1978. Convulsive disorders in the first year of life: neurological and mental outcome and mortality. *Epilepsia* 19: 67-74
- Claes LR, Deprez L, Suls A, Baets J, Smets K, et al. 2009. The SCN1A variant database: a novel research and diagnostic tool. *Human mutation* 30: E904-20
- Cole KS. 1949. Some physical aspects of bioelectric phenomena. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 35: 558-66
- Crill WE. 1996. Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annual review of physiology* 58: 349-62
- Cummins TR, Sigworth FJ. 1996. Impaired slow inactivation in mutant sodium channels. *Biophysical journal* 71: 227-36
- Dalic L, Mullen SA, Roulet Perez E, Scheffer I. 2015. Lamotrigine can be beneficial in patients with Dravet syndrome. *Developmental medicine and child neurology* 57: 200-2

- De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI. 1991. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *The New England journal of medicine* 325: 703-9
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, et al. 2005. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366: 371-7
- Dietrich PS, McGivern JG, Delgado SG, Koch BD, Eglén RM, et al. 1998. Functional analysis of a voltage-gated sodium channel and its splice variant from rat dorsal root ganglia. *Journal of neurochemistry* 70: 2262-72
- Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA. 1994. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 12: 1041-8
- Ellerkmann RK, Riazanski V, Elger CE, Urban BW, Beck H. 2001. Slow recovery from inactivation regulates the availability of voltage-dependent Na(+) channels in hippocampal granule cells, hilar neurons and basket cells. *The Journal of physiology* 532: 385-97
- Faber CG, Lauria G, Merkies IS, Cheng X, Han C, et al. 2012. Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 19444-9
- George AL, Jr. 2005. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *The Journal of clinical investigation* 115: 1990-9
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, et al. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28: 365-8
- Golomb D, Yue C, Yaari Y. 2006. Contribution of persistent Na⁺ current and M-type K⁺ current to somatic bursting in CA1 pyramidal cells: combined experimental and modeling study. *Journal of neurophysiology* 96: 1912-26
- Gong B, Rhodes KJ, Bekele-Arcuri Z, Trimmer JS. 1999. Type I and type II Na(+) channel alpha-subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain. *The Journal of comparative neurology* 412: 342-52
- Grantham R. 1974. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185: 862-4
- Gustafson TA, Clevinger EC, O'Neill TJ, Yarowsky PJ, Krueger BK. 1993. Mutually exclusive exon splicing of type III brain sodium channel alpha subunit RNA generates developmentally regulated isoforms in rat brain. *The Journal of biological chemistry* 268: 18648-53
- Hackenberg A, Baumer A, Sticht H, Schmitt B, Kroell-Seger J, et al. 2014. Infantile epileptic encephalopathy, transient choreoathetotic movements, and hypersomnia due to a De Novo missense mutation in the SCN2A gene. *Neuropediatrics* 45: 261-4
- Hains BC, Saab CY, Waxman SG. 2005. Changes in electrophysiological properties and sodium channel Nav1.3 expression in thalamic neurons after spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology* 128: 2359-71
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and

- cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 391: 85-100
- Hammarstrom AK, Gage PW. 1999. Nitric oxide increases persistent sodium current in rat hippocampal neurons. *The Journal of physiology* 520 Pt 2: 451-61
- Han C, Dib-Hajj SD, Lin Z, Li Y, Eastman EM, et al. 2009. Early- and late-onset inherited erythromelalgia: genotype-phenotype correlation. *Brain : a journal of neurology* 132: 1711-22
- Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA. 1996. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clinic proceedings* 71: 576-86
- Hayward LJ, Brown RH, Jr., Cannon SC. 1997. Slow inactivation differs among mutant Na channels associated with myotonia and periodic paralysis. *Biophysical journal* 72: 1204-19
- Herlenius E, Heron SE, Grinton BE, Keay D, Scheffer IE, et al. 2007. SCN2A mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: the phenotypic spectrum. *Epilepsia* 48: 1138-42
- Heron SE, Crossland KM, Andermann E, Phillips HA, Hall AJ, et al. 2002. Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* 360: 851-2
- Heron SE, Grinton BE, Kivity S, Afawi Z, Zuberi SM, et al. 2012. PRRT2 mutations cause benign familial infantile epilepsy and infantile convulsions with choreoathetosis syndrome. *American journal of human genetics* 90: 152-60
- Hildebrand MS, Dahl HH, Damiano JA, Smith RJ, Scheffer IE, Berkovic SF. 2013. Recent advances in the molecular genetics of epilepsy. *Journal of medical genetics* 50: 271-9
- Hirose S. 2006. A new paradigm of channelopathy in epilepsy syndromes: intracellular trafficking abnormality of channel molecules. *Epilepsy research* 70 Suppl 1: S206-17
- Hodgkin AL, Huxley AF. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* 117: 500-44
- Holland KD, Kearney JA, Glauser TA, Buck G, Keddache M, et al. 2008. Mutation of sodium channel SCN3A in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy. *Neuroscience letters* 433: 65-70
- Isom LL. 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 7: 42-54
- Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, et al. 1992. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256: 839-42
- Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, et al. 1995a. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83: 433-42
- Isom LL, Scheuer T, Brownstein AB, Ragsdale DS, Murphy BJ, Catterall WA. 1995b. Functional co-expression of the beta 1 and type IIA alpha

- subunits of sodium channels in a mammalian cell line. *The Journal of biological chemistry* 270: 3306-12
- Jurkat-Rott K, Holzherr B, Fauler M, Lehmann-Horn F. 2010. Sodium channelopathies of skeletal muscle result from gain or loss of function. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460: 239-48
- Kamiya K, Kaneda M, Sugawara T, Mazaki E, Okamura N, et al. 2004. A nonsense mutation of the sodium channel gene SCN2A in a patient with intractable epilepsy and mental decline. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 2690-8
- Kaplan MR, Cho MH, Ullian EM, Isom LL, Levinson SR, Barres BA. 2001. Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron* 30: 105-19
- Kasai N, Fukushima K, Ueki Y, Prasad S, Nosakowski J, et al. 2001. Genomic structures of SCN2A and SCN3A - candidate genes for deafness at the DFNA16 locus. *Gene* 264: 113-22
- Kearney JA, Plummer NW, Smith MR, Kapur J, Cummins TR, et al. 2001. A gain-of-function mutation in the sodium channel gene Scn2a results in seizures and behavioral abnormalities. *Neuroscience* 102: 307-17
- Khaliq ZM, Gouwens NW, Raman IM. 2003. The contribution of resurgent sodium current to high-frequency firing in Purkinje neurons: an experimental and modeling study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 4899-912
- Larsen J, Carvill GL, Gardella E, Kluger G, Schmiedel G, et al. 2015. The phenotypic spectrum of SCN8A encephalopathy. *Neurology* 84: 480-9
- Lauxmann S, Boutry-Kryza N, Rivier C, Mueller S, Hedrich UB, et al. 2013. An SCN2A mutation in a family with infantile seizures from Madagascar reveals an increased subthreshold Na(+) current. *Epilepsia* 54: e117-21
- Le Gal F, Korff CM, Monso-Hinard C, Mund MT, Morris M, et al. 2010. A case of SUDEP in a patient with Dravet syndrome with SCN1A mutation. *Epilepsia* 51: 1915-8
- Lee HY, Huang Y, Bruneau N, Roll P, Roberson ED, et al. 2012a. Mutations in the gene PRRT2 cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions. *Cell reports* 1: 2-12
- Lee YC, Lee MJ, Yu HY, Chen C, Hsu CH, et al. 2012b. PRRT2 mutations in paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions in a Taiwanese cohort. *PloS one* 7: e38543
- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. 1999. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiological reviews* 79: 1317-72
- Lerche H, Weber YG, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. 2005. Ion channel defects in idiopathic epilepsies. *Current pharmaceutical design* 11: 2737-52
- Liao Y, Anttonen AK, Liukkonen E, Gaily E, Maljevic S, et al. 2010a. SCN2A mutation associated with neonatal epilepsy, late-onset episodic ataxia, myoclonus, and pain. *Neurology* 75: 1454-8
- Liao Y, Deprez L, Maljevic S, Pitsch J, Claes L, et al. 2010b. Molecular correlates of age-dependent seizures in an inherited neonatal-infantile epilepsy. *Brain : a journal of neurology* 133: 1403-14

- Liu Y, Jurman ME, Yellen G. 1996. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* 16: 859-67
- Lossin C, Shi X, Rogawski MA, Hirose S. 2012. Compromised function in the Na(v)1.2 Dravet syndrome mutation R1312T. *Neurobiology of disease* 47: 378-84
- Lu CM, Brown GB. 1998. Isolation of a human-brain sodium-channel gene encoding two isoforms of the subtype III alpha-subunit. *Journal of molecular neuroscience : MN* 10: 67-70
- Ma JY, Catterall WA, Scheuer T. 1997. Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein betagamma subunits. *Neuron* 19: 443-52
- Magistretti J, Ragsdale DS, Alonso A. 1999. Direct demonstration of persistent Na⁺ channel activity in dendritic processes of mammalian cortical neurones. *The Journal of physiology* 521 Pt 3: 629-36
- Makita N, Bennett PB, George AL, Jr. 1996. Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na⁺ channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 7117-27
- Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom LL. 2000. Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *The Journal of biological chemistry* 275: 11383-8
- Malhotra JD, Koopmann MC, Kazen-Gillespie KA, Fettman N, Hortsch M, Isom LL. 2002. Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *The Journal of biological chemistry* 277: 26681-8
- Matalon D, Goldberg E, Medne L, Marsh ED. 2014. Confirming an expanded spectrum of SCN2A mutations: a case series. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape* 16: 13-8
- Matsumoto A, Watanabe K, Sugiura M, Negoro T, Takaesu E, Iwase K. 1983. Long-term prognosis of convulsive disorders in the first year of life: mental and physical development and seizure persistence. *Epilepsia* 24: 321-9
- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T, Catterall WA. 1998. Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *The Journal of biological chemistry* 273: 3954-62
- McCormick KA, Srinivasan J, White K, Scheuer T, Catterall WA. 1999. The extracellular domain of the beta1 subunit is both necessary and sufficient for beta1-like modulation of sodium channel gating. *The Journal of biological chemistry* 274: 32638-46
- Meadows L, Malhotra JD, Stetzer A, Isom LL, Ragsdale DS. 2001. The intracellular segment of the sodium channel beta 1 subunit is required for its efficient association with the channel alpha subunit. *Journal of neurochemistry* 76: 1871-8
- Mickus T, Jung HY, Spruston N. 1999. Slow sodium channel inactivation in CA1 pyramidal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868: 97-101

- Misra SN, Kahlig KM, George AL, Jr. 2008. Impaired Nav1.2 function and reduced cell surface expression in benign familial neonatal-infantile seizures. *Epilepsia* 49: 1535-45
- Mitrovic N, George AL, Jr., Horn R. 2000. Role of domain 4 in sodium channel slow inactivation. *The Journal of general physiology* 115: 707-18
- Mitrovic N, George AL, Jr., Lerche H, Wagner S, Fahlke C, Lehmann-Horn F. 1995. Different effects on gating of three myotonia-causing mutations in the inactivation gate of the human muscle sodium channel. *The Journal of physiology* 487 (Pt 1): 107-14
- Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, et al. 2000. beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 2308-13
- Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, Berkovic SF. 2003. Channelopathies as a genetic cause of epilepsy. *Current opinion in neurology* 16: 171-6
- Nabbout R, Scheffer IE. 2013. Genetics of idiopathic epilepsies. *Handbook of clinical neurology* 111: 567-78
- Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, et al. 2013a. Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 81: 992-8
- Nakamura K, Sakagami H, Asanuma-Date K, Nagasawa N, Nakahara Y, et al. 2013b. Immobilized glycosylated Fmoc-amino acid for SPR: comparative studies of lectin-binding to linear or biantennary diLacNAc structures. *Carbohydrate research* 382: 77-85
- Nassar MA, Baker MD, Levato A, Ingram R, Mallucci G, et al. 2006. Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice. *Molecular pain* 2: 33
- Neher E, Sakmann B. 1976. Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *The Journal of physiology* 258: 705-29
- O'Brien JE, Meisler MH. 2013. Sodium channel SCN8A (Nav1.6): properties and de novo mutations in epileptic encephalopathy and intellectual disability. *Frontiers in genetics* 4: 213
- Ogiwara I, Ito K, Sawaishi Y, Osaka H, Mazaki E, et al. 2009. De novo mutations of voltage-gated sodium channel alpha gene SCN2A in intractable epilepsies. *Neurology* 73: 1046-53
- Oh Y, Waxman SG. 1998. Novel splice variants of the voltage-sensitive sodium channel alpha subunit. *Neuroreport* 9: 1267-72
- Ohba C, Kato M, Takahashi S, Lerman-Sagie T, Lev D, et al. 2014. Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. *Epilepsia* 55: 994-1000
- Ong BH, Tomaselli GF, Balser JR. 2000. A structural rearrangement in the sodium channel pore linked to slow inactivation and use dependence. *The Journal of general physiology* 116: 653-62
- Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL. 1992. Amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation: charge neutralizations and

- deletions in the III-IV linker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 10905-9
- Plummer NW, McBurney MW, Meisler MH. 1997. Alternative splicing of the sodium channel SCN8A predicts a truncated two-domain protein in fetal brain and non-neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 272: 24008-15
- Plummer NW, Meisler MH. 1999. Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* 57: 323-31
- Priest BT, Murphy BA, Lindia JA, Diaz C, Abbadie C, et al. 2005. Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9382-7
- Qu Y, Curtis R, Lawson D, Gilbride K, Ge P, et al. 2001. Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. *Molecular and cellular neurosciences* 18: 570-80
- Qu Y, Rogers JC, Chen SF, McCormick KA, Scheuer T, Catterall WA. 1999. Functional roles of the extracellular segments of the sodium channel alpha subunit in voltage-dependent gating and modulation by beta1 subunits. *The Journal of biological chemistry* 274: 32647-54
- Ratcliffe CF, Westenbroek RE, Curtis R, Catterall WA. 2001. Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *The Journal of cell biology* 154: 427-34
- Rauch A, Wiczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, et al. 2012. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* 380: 1674-82
- Raymond CK, Castle J, Garrett-Engele P, Armour CD, Kan Z, et al. 2004. Expression of alternatively spliced sodium channel alpha-subunit genes. Unique splicing patterns are observed in dorsal root ganglia. *The Journal of biological chemistry* 279: 46234-41
- Roulet-Perez E, Ballhausen D, Bonafe L, Cronel-Ohayon S, Maeder-Ingvar M. 2008. Glut-1 deficiency syndrome masquerading as idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 49: 1955-8
- Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, et al. 2012. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 485: 237-41
- Scalmani P, Rusconi R, Armatura E, Zara F, Avanzini G, et al. 2006. Effects in neocortical neurons of mutations of the Na(v)1.2 Na⁺ channel causing benign familial neonatal-infantile seizures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 10100-9
- Schaller KL, Krzemien DM, McKenna NM, Caldwell JH. 1992. Alternatively spliced sodium channel transcripts in brain and muscle. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12: 1370-81

- Schubert J, Paravidino R, Becker F, Berger A, Bebek N, et al. 2012. PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures. *Human mutation* 33: 1439-43
- Schubert J, Siekierska A, Langlois M, May P, Huneau C, et al. 2014. Mutations in STX1B, encoding a presynaptic protein, cause fever-associated epilepsy syndromes. *Nature genetics* 46: 1327-32
- Shi X, Yasumoto S, Kurahashi H, Nakagawa E, Fukasawa T, et al. 2012. Clinical spectrum of SCN2A mutations. *Brain & development* 34: 541-5
- Shi X, Yasumoto S, Nakagawa E, Fukasawa T, Uchiya S, Hirose S. 2009. Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome. *Brain & development* 31: 758-62
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, et al. 1998. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature genetics* 18: 25-9
- Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. 2010. Ion permeation and block of the gating pore in the voltage sensor of NaV1.4 channels with hypokalemic periodic paralysis mutations. *The Journal of general physiology* 136: 225-36
- Specchio N, Vigeveno F. 2006. The spectrum of benign infantile seizures. *Epilepsy research* 70 Suppl 1: S156-67
- Srinivasan J, Schachner M, Catterall WA. 1998. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15753-7
- Stafstrom CE, Schwindt PC, Flatman JA, Crill WE. 1984. Properties of subthreshold response and action potential recorded in layer V neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *Journal of neurophysiology* 52: 244-63
- Steinlein OK. 2004. Genes and mutations in human idiopathic epilepsy. *Brain & development* 26: 213-8
- Striano P, Bordo L, Lispi ML, Specchio N, Minetti C, et al. 2006a. A novel SCN2A mutation in family with benign familial infantile seizures. *Epilepsia* 47: 218-20
- Striano P, Lispi ML, Gennaro E, Madia F, Traverso M, et al. 2006b. Linkage analysis and disease models in benign familial infantile seizures: a study of 16 families. *Epilepsia* 47: 1029-34
- Struyk AF, Cannon SC. 2002. Slow inactivation does not block the aqueous accessibility to the outer pore of voltage-gated Na channels. *The Journal of general physiology* 120: 509-16
- Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, Ito M, Fukuma G, et al. 2001. A missense mutation of the Na⁺ channel alpha II subunit gene Na(v)1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 6384-9
- Suls A, Dedeken P, Goffin K, Van Esch H, Dupont P, et al. 2008. Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain : a journal of neurology* 131: 1831-44

- Suls A, Mullen SA, Weber YG, Verhaert K, Ceulemans B, et al. 2009. Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Annals of neurology* 66: 415-9
- Sundaram SK, Chugani HT, Tiwari VN, Huq AH. 2013. SCN2A mutation is associated with infantile spasms and bitemporal glucose hypometabolism. *Pediatric neurology* 49: 46-9
- Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, et al. 2001. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 409: 1043-7
- Thomas EA, Reid CA, Berkovic SF, Petrou S. 2009. Prediction by modeling that epilepsy may be caused by very small functional changes in ion channels. *Archives of neurology* 66: 1225-32
- Vanoye CG, Gurnett CA, Holland KD, George AL, Jr., Kearney JA. 2014. Novel SCN3A variants associated with focal epilepsy in children. *Neurobiology of disease* 62: 313-22
- Vassilev P, Scheuer T, Catterall WA. 1989. Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 8147-51
- Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. 1988. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241: 1658-61
- Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, et al. 2002. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Human molecular genetics* 11: 337-45
- Veeramah KR, O'Brien JE, Meisler MH, Cheng X, Dib-Hajj SD, et al. 2012. De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. *American journal of human genetics* 90: 502-10
- Vervaeke K, Hu H, Graham LJ, Storm JF. 2006. Contrasting effects of the persistent Na⁺ current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron* 49: 257-70
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL, Jr., et al. 1998. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nature genetics* 19: 366-70
- Wang JL, Cao L, Li XH, Hu ZM, Li JD, et al. 2011. Identification of PRRT2 as the causative gene of paroxysmal kinesigenic dyskinesias. *Brain : a journal of neurology* 134: 3493-501
- Waxman SG, Dib-Hajj SD. 2005. Erythromelalgia: a hereditary pain syndrome enters the molecular era. *Annals of neurology* 57: 785-8
- Weber YG, Storch A, Wuttke TV, Brockmann K, Kempfle J, et al. 2008. GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *The Journal of clinical investigation* 118: 2157-68
- Westenbroek RE, Merrick DK, Catterall WA. 1989. Differential subcellular localization of the RI and RII Na⁺ channel subtypes in central neurons. *Neuron* 3: 695-704

- Whitaker WR, Faull RL, Waldvogel HJ, Plumpton CJ, Emson PC, Clare JJ. 2001. Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain. *Brain research. Molecular brain research* 88: 37-53
- Xu R, Thomas EA, Jenkins M, Gazina EV, Chiu C, et al. 2007. A childhood epilepsy mutation reveals a role for developmentally regulated splicing of a sodium channel. *Molecular and cellular neurosciences* 35: 292-301
- Yu FH, Catterall WA. 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome biology* 4: 207
- Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, et al. 2003. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 7577-85
- Zimmer T, Bollensdorff C, Haufe V, Birch-Hirschfeld E, Benndorf K. 2002. Mouse heart Na⁺ channels: primary structure and function of two isoforms and alternatively spliced variants. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 282: H1007-17
- Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH. 2011. Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology* 76: 594-600

7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Holger Lerche konzipierte die elektrophysiologischen Studien und trug entscheidend zur Interpretation der Daten und deren Veröffentlichung bei. Zudem betreute er die hier vorliegende Arbeit und korrigierte das Manuskript.

Gaetan Lesca konzipierte die klinischen und genetischen Studien und trug entscheidend zur Interpretation der Daten und deren Veröffentlichung bei.

Pierre Szepetowski und Clotilde Rivier trugen konzeptionell zur Gestaltung der Studien, wie auch zur Analyse und Interpretation der Daten bei.

Snezana Maljevic trug zur Analyse und Interpretation der molekularen Daten bei.

Ulrike Hedrich trug zur Analyse und Interpretation der funktionellen Daten bei.

Stephan Müller führte die „Site-directed“-Mutagenese durch.

Nadia Boutry-Kryza erhob die genetischen Daten, war maßgeblich an der konzeptionellen Gestaltung beteiligt und trug entscheidend zur Interpretation der genetischen Daten so wie deren Veröffentlichung bei.

Ich führte die Erhebung aller funktionellen Daten durch, war maßgeblich an der konzeptionellen Gestaltung beteiligt und trug entscheidend zur Analyse und Interpretation der funktionellen Daten wie auch deren Veröffentlichung bei.

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Stephan Lauxmann, Nadia Boutry-Kryza, Clotilde Rivier, Stephan Mueller, Ulrike B. S. Hedrich, Snezana Maljevic, Pierre Szepetowski, Holger Lerche und Gaetan Lesca - An SCN2A mutation in a family with infantile seizures from Madagascar reveals an increased subthreshold Na(+) current - *Epilepsia* 2013 – 54 - e117-121.

DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Professor Lerche, für die Überlassung des interessanten Themas sowie das Vertrauen und die Unterstützung, die er mir bei meinen ersten Schritten in der Welt der Forschung entgegenbrachte, danken.

Mein Dank gilt auch Dr. Ulrike Hedrich und Dr. Yunxiang Liao, die während der Entstehung dieser Arbeit immer ein offenes Ohr für alltägliche Fragen hatten, mich in freundschaftlicher und äußerst hilfreicher Weise begleiteten, und mit denen ich gerne über meine Ergebnisse – und auch vieles andere - diskutierte.

In gleicher Weise bin ich dankbar für die viele Geduld und die unschätzbaren Tipps, die ich von meiner Laborkollegin Dr. Snezana Maljevic und meinen „Mitreiterinnen“ an der Bench – Nicole Jezutkovic und Heidi Löffler – empfang.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Lerche für alle ihre wertvolle Unterstützung danken in dieser herausfordernden Zeit. Kaum in Worte zu fassen ist dabei für mich der Dank, der meinen Labor- und Kicker-Freunden Julian Schubert, Stephan Müller, Yvonne Füll und – jetzt in belgischem Exil – Dorien Schepers gilt, die mich die ganze Zeit über geduldig ertrugen und mich in dieser besonderen Lebensphase freundschaftlich in allen Bereichen unterstützten, förderten und prägten.

Nicht zuletzt soll der Dank denen in besonderer und herzlicher Weise gelten, die vor allem durch Verzicht auf gemeinsam verbrachte Zeit und durch unermüdliches Motivieren maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit teilhaben. Hierzu zählen sicherlich in erster Linie meine liebe Frau Eva, zusammen mit meiner Familie so wie mein treuer Freundeskreis.