

**Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung: Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie**

**SCN1A-MUTATIONEN UND SUDEP
Elektrophysiologische Untersuchungen an
Natriumkanalmutationen zweier spanischer
Familien mit Epilepsie und gehäuftem
plötzlichen, unerwarteten Tod**

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

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

vorgelegt von

Hatice Bunea, geb. Kerti

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Lerche

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Antkowiak

Tag der Disputation: 01.10.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
1.1 Spannungsabhängige Natriumkanäle	7
1.1.1 Struktur und Funktion spannungsabhängiger Natriumkanäle	7
1.1.2 Nomenklatur spannungsabhängiger Natriumkanäle	9
1.1.3 Die Rolle der spannungsgesteuerten Natriumkanäle für das Aktionspotential	12
1.1.4 Mutationen in spannungsabhängigen Natriumkanälen	14
1.2 Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS ⁺)	16
1.2.1 Definition von GEFS ⁺	16
1.2.2 Klinischer Verlauf und Genetik von GEFS ⁺	18
1.2.3 Das Dravet-Syndrom (SMEI, Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy)	21
1.3 SUDEP	22
1.3.1 Definition von SUDEP	22
1.3.2 Inzidenz von SUDEP	22
1.3.3 Risikofaktoren für SUDEP	23
1.4 Klinische und genetische Daten der 2 untersuchten Familien	25
1.4.1 Familie 1	25
1.4.1.1 Epileptologische Daten	25
1.4.1.2 SUDEP-Fälle und -Rate	30
1.4.1.3 Herzuntersuchungen	30
1.1.1.1 Genetische Daten	30
1.4.2 Familie 2	32
1.4.2.1 Epileptologische Daten	32
1.4.2.2 SUDEP-Fälle und -Rate	34
1.4.2.3 Genetische Daten	34
1.5 Wissenschaftliche Fragestellung und Ziele der Arbeit	36
2 Material und Methodik	37
2.1 Zellkultur der tsA-Zelllinie	37
2.2 Transiente Transfektion	38
2.3 Elektrophysiologie	41
2.3.1 Das elektrophysiologische Setup und die Durchführung der Experimente	41

2.3.2	Die Ganzzelleableitung	43
2.3.3	Herstellung von Glas-Patchpipetten und Ag/AgCl-Elektroden	44
2.3.4	Herstellung von Pipetten- und Badlösung	45
2.4	Analyse der Patch-Clamp-Daten	46
2.4.1	Strom-Spannungs-Kurve	46
2.4.2	Die spannungsabhängige Aktivierung	47
2.4.3	Die spannungsabhängige Inaktivierung	47
2.4.4	Refraktärität	49
2.5	Auswertung und statistische Verfahren	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Elektrophysiologische Analyse der Mutation in der 1. Familie	52
4.1.1	Natriumstromdichte der Zellen	53
4.1.2	Aktivierung und Inaktivierung der Natriumkanäle	54
4.1.3	Zeitkonstante Tau der schnellen Inaktivierung	55
4.1.4	Erholung der Natriumkanäle ausgehend von einem Membranpotential von -100 mV	56
4.2	Elektrophysiologische Analyse der Mutation in der 2. Familie	58
5	Diskussion	59
5.1	Beschreibung der klinischen Daten der zwei Familien und der gefundenen Mutationen	59
5.2	Elektrophysiologische Konsequenzen der Mutationen und Diskussion der Methodik	62
5.3	Einordnung der Mutationen in den physiologischen Kontext	64
5.4	Ausblick	69
6	Zusammenfassung	71
7	Literaturverzeichnis	73
8	Erklärung zum Eigenanteil	80
9	Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Ag/AgCl-Elektrode	Silber-Silberchlorid-Elektrode
ATPase	Adenosintriphosphatase
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CsF	Chemische Summenformel für Caesiumfluorid
CsOH	Chemische Summenformel für Caesiumhydroxid
CT	Computertomografie
d	Durchmesser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
F	Farad
FeCl ₃	Chemische Summenformel für Eisentrichlorid
FK ⁺	Fieberkrämpfe Plus
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GEFS ⁺	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus
GΩ	Gigaohm
GTKA	Generalisierte tonisch-klonische Anfälle
HCl	Chemische Summenformel für Chlorwasserstoff
HEK	Human Embryonic Kidney; Humane Embryonale Niere

H ₂ O	Chemische Summenformel für Wasser
ILAE	International League Against Epilepsy
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
KI	Konfidenzintervall
l	Länge
MgCl ₂	Chemische Summenformel für Magnesiumchlorid
Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MΩ	Megaohm
MRT	Magnetresonanztomografie
mV	Millivolt
ms	Millisekunde
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
nA	Nanoampere
NaCl	Chemische Summenformel für Natriumchlorid
Na ⁺	Natrium
pA	Pikoampère
pF	Pikofarad
PNS	Peripheres Nervensystem

S	Siemens
SMEI	Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy; Schwere myoklonische Epilepsie des Säuglingsalters, Dravet-Syndrom
SUDEP	Sudden Unexpected / Unexplained Death of Epilepsy Patients; Plötzlicher unerwarteter / ungeklärter Tod eines an Epilepsie erkrankten Patienten
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Spannungsabhängige Natriumkanäle

1.1.1 Struktur und Funktion spannungsabhängiger Natriumkanäle

Spannungsabhängige Natriumkanäle dienen in Neuronen und Muskelzellen der Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen und sind verantwortlich für die Informationsverarbeitung in Neuronen und die Erregungsausbreitung in Muskelzellen. Sie bilden eine Pore in der Zellmembran und ermöglichen Natriumionen das Passieren der Zellmembran von extra- nach intrazellulär in Abhängigkeit von einer an der Membran anliegenden Spannung.

Natriumkanäle bestehen aus mindestens zwei Untereinheiten. Die porenbildende α -Untereinheit mit einer Größe von ca. 260 kDa (1800-4000 Aminosäuren) ist assoziiert mit bis zu zwei zusätzlichen, nicht porenbildenden 33 bis 36 kDa großen β -Untereinheiten (Catterall, 2000). Bisher konnten zehn Gene entschlüsselt werden, die die α -Untereinheit kodieren und vier Gene für verschiedene β -Untereinheiten ($\beta_1 - \beta_4$) sind bekannt (Goldin, 2001, Maier et al., 2004). Die Gene *SCN1A - SCN11A* für die Isoformen der α -Untereinheit befinden sich beim Menschen auf dem Chromosom 2 im Bereich 2q21 – 24 (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* und *SCN9A*) und im Bereich 2q21-23 (*SCN6A* und *SCN7A*), auf dem Chromosom 3 im Bereich 3p21 – 24 (*SCN5A*, *SCN10A* und *SCN11A*), auf dem Chromosom 12 im Bereich 12q13 (*SCN8A*) und auf dem Chromosom 17 im Bereich 17q23 – 25 (*SCN4A*).

Die Sequenz ist hochkonserviert und kodiert den typischen Aufbau (Abbildung 1, Seite 9) der α -Untereinheit aus vier homologen Domänen DI – DIV mit jeweils sechs α -helikalen Segmenten S1 – S6 (Goldin, 2001, Catterall et al., 2005). Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Segmente sind durch Zwischensequenzen miteinander verbunden. Den Selektivitätsfilter bilden die vier loop-förmigen P-Segmente, die zwischen den Segmenten S 5 und S 6 „haarnadelförmig“ in die Membran hineinragen (Goldin, 2003). Daraus resultiert die Natriumselektivität der α -Untereinheit (Catterall, 2000). Die

Spannungssensitivität der α -Untereinheit resultiert aus positiv geladenen Aminosäuren im Segment 4 (S4), das als Sensor für Änderungen des elektrischen Feldes über der Membran dient. Er sorgt für das Öffnen und Schließen der Natriumkanäle (Cestele et al., 2006). Die homologen S4-Segmente reagieren auf Depolarisation mit einer Konformationsänderung des gesamten Proteinmoleküls. Hierdurch öffnet sich die Kanalpore. Die Inaktivierung des Kanals wird durch eine kurze Aminosäuresequenz in der intrazellulären Schleife zwischen den Domänen III und IV verursacht (Goldin, 2003).

Die Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung des Kanals wird durch die β -Untereinheiten moduliert. Die β -Untereinheit besteht aus einem einzelnen transmembranären Segment, einer extrazellulären immunoglobulin-ähnlichen Schleife („Loop“) und einem intrazellulären C-Terminus. Die Untereinheiten β_2 und β_4 sind kovalent mit der α -Untereinheit über eine Disulfidbrücke verbunden, die Untereinheiten β_1 und β_3 sind nichtkovalent angelagert (Yu et al., 2003). Des Weiteren werden den β -Untereinheiten Funktionen wie Modulation der Spannungsabhängigkeit der Pore, Regulation der Kanalexpression in der Zellmembran und Wirkung als Zelladhäsionsmoleküle zugewiesen (Isom, 2001). Die Gene *SCN1B* – *SCN4B* der vier Isoformen der β -Untereinheiten liegen auf dem Chromosom 19 im Bereich 19q13 (*SCN1B*) und auf dem Chromosom 11 im Bereich 11q22 – 23 (*SCN2B*, *SCN3B*, *SCN4B*) (Yu et al., 2003, Catterall et al., 2005).

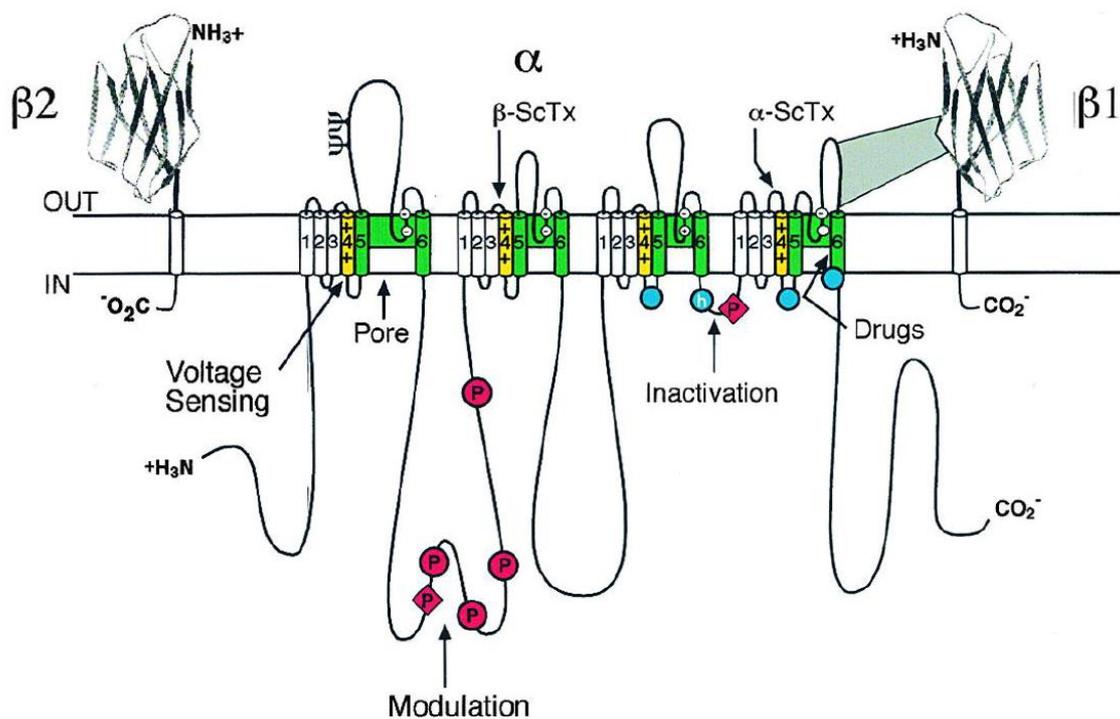


Abbildung 1: Struktur eines spannungsabhängigen Natriumkanals (Catterall, 2000)

Domänen I-IV und jeweilige Segmente S1-6, gelb markiert: positiv geladene S4-Segmente; OUT: extrazellulär; IN: intrazellulär; *Inactivation*: Inaktivierung durch intrazelluläre Schleife

1.1.2 Nomenklatur spannungsabhängiger Natriumkanäle

In der Nomenklatur der Natriumkanäle Nav1.1 – Nav1.9 werden die einzelnen Isoformen mit „x“ benannt, „Na“ steht für das bevorzugte Ion Natrium und „v“ („voltage“) für den Steuerungsmechanismus (Goldin, 2001). Die spannungsabhängigen Natriumkanäle werden hinsichtlich ihres Vorkommens in Geweben in drei Gruppen eingeteilt (Tabelle 1, Seite 11). Die Isoformen Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6 und Nav1.9 dominieren im ZNS und werden in Neuronen und Gliazellen exprimiert. Nav1.9 stellt eine atypische Isoform dar, die wahrscheinlich durch Änderung der extrazellulären Natriumkonzentration gesteuert ist und Bedeutung für die Regulation des Wasserhaushalts und Natriumkonzentration hat (Hiyama et al., 2002). Nav1.4 wird in adulten Muskelzellen und Nav1.5 in embryonalen und denervierten Muskelzellen sowie

in Herzmuskelzellen exprimiert. In den Spinalganglien des peripheren Nervensystems sind die Isoformen Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 zu finden (Catterall et al., 2005). Eine Einteilung der spannungssensitiven Natriumkanäle erfolgt auch häufig nach der unterschiedlichen Affinität zu Tetrodotoxin (TTX), dem Gift des japanischen Kugelfisches. Die im ZNS vorherrschenden Isoformen Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 und Nav1.7 sind TTX-sensibel (Goldin, 2001).

Tabelle 1: Isoformen, TTX-Sensitivität und Vorkommen des spannungsabhängigen Natriumkanals

Natriumkanal	TTX-Sensitivität	Gewebe	Gensymbol	Chromosom
Nav1.1	sensibel	ZNS	SCN1A	2q24
Nav1.2	sensibel	ZNS	SCN2A	2q23-24
Nav1.3	sensibel	ZNS	SCN3A	2q24
Nav1.4	sensibel	Skelettmuskel	SCN4A	17q23-25
Nav1.5	resistent	Denervierter Skelettmuskel, Herzmuskel	SCN5A	3p21
Nav1.6	sensibel	ZNS	SCN8A	12q13
Nav1.7	sensibel	PNS	SCN9A	2q24
Nav1.8	resistent	PNS	SCN10A	3p22-24
Nav1.9	resistent	PNS	SCN11A	3p21-24
Navx		Herzmuskel, Uterus, Astrozyten, PNS, glatte Muskulatur	SCN6A, SCN7A	2q21-23

1.1.3 Die Rolle der spannungsgesteuerten Natriumkanäle für das Aktionspotential

In Neuronen und Muskelzellen sind spannungsabhängige Natriumkanäle für die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen verantwortlich. Voraussetzung für die Entstehung eines Aktionspotentials in Neuronen oder Muskelzellen ist das Vorhandensein eines Spannungsgradienten entlang der Zellmembran, der durch die Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhalten wird. Die Natrium-Kalium-ATPase schafft intrazellulär eine hohe Kaliumkonzentration und pumpt gleichzeitig Natriumionen nach außen, sodass sich über der Zellmembran ein Ruhemembranpotential von -50 bis -100 mV einstellt. Ein Aktionspotential besteht aus drei Phasen. Ein ankommender Reiz (z. B. durch Öffnen von postsynaptischen Kationenkanälen durch Neurotransmitter) bewirkt eine initiale Depolarisierung des Ruhemembranpotentials. Nach Überschreiten des Schwellenpotentials werden die spannungsabhängigen Natriumkanäle aktiviert und es erfolgt ein schneller Einstrom von Natriumionen aus dem Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum, die die 1. Phase des Aktionspotentials der Depolarisation der Zellmembran bis in den positiven Bereich darstellt. Innerhalb weniger Millisekunden gehen die Natriumkanäle in einen inaktiven Zustand über und es wird die 2. Phase des Aktionspotentials, die Repolarisation mit Potentialumkehr, eingeleitet. In dieser Phase nimmt der Kaliumstrom über spannungsabhängige Kaliumkanäle zu und es kommt zum Erreichen des Ruhemembranpotentials und darüber hinaus kann es zur Nachhyperpolarisation kommen (3. Phase), da die Kaliumleitfähigkeit noch erhöht ist (Kandel et al., 2000).

Das Natriumkanalprotein ändert seine Hauptformation während eines Aktionspotentials und durchläuft drei zyklische Zustände: ruhend, aktiviert und inaktiviert (Abbildung 2, Seite 13). Der inaktivierte Zustand („*Inactivated*“) unterscheidet sich vom ruhenden Zustand durch die Nichtaktivierbarkeit. Beim Ruhemembranpotential sind die Kanäle im ruhenden Zustand. Bei Membrandepolarisation bewegen sich auf molekularer Ebene die Spannungssensoren (Aminosäuresequenz an Segment 4 der Domäne IV) nach

außen und die Kanalpore befindet sich im aktivierten Zustand („Open“) und ist geöffnet für den Natriumionenfluss. Bei weiterer Depolarisation limitiert die schnelle Inaktivierung die Dauer des Aktionspotentials und initiiert die Repolarisation. In dieser Zeit sind einige Natriumionenkanäle refraktär („Closed“), eine Öffnung des Ionenkanals ist nicht möglich, und eine Erholung vom inaktivierten Zustand erfolgt erst wieder nach der Repolarisation (Denac et al., 2001, Marban et al., 1998, Goldin, 2001).

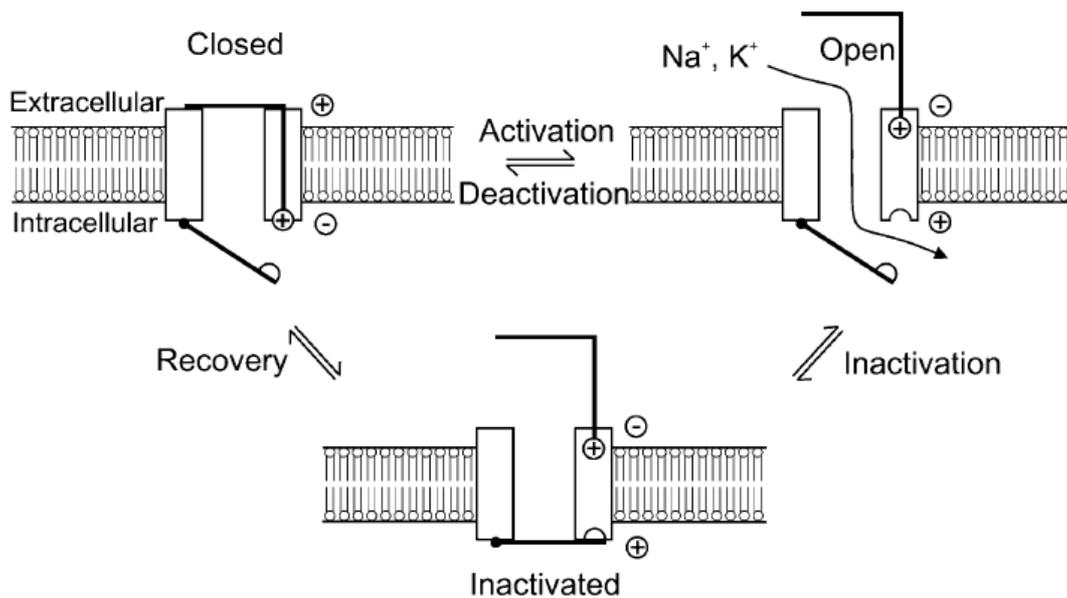


Abbildung 2: Konformationen spannungsabhängiger Kationenkanäle (Lerche et al., 2001)

Im inaktivierten Zustand bilden auf molekularer Ebene mehrere Aminosäuren zwischen der Domäne III und IV der porenformenden α -Untereinheit eine intrazelluläre Schleife, die die Kanalpore von innen verschließt (Abbildung 3, Seite 14).

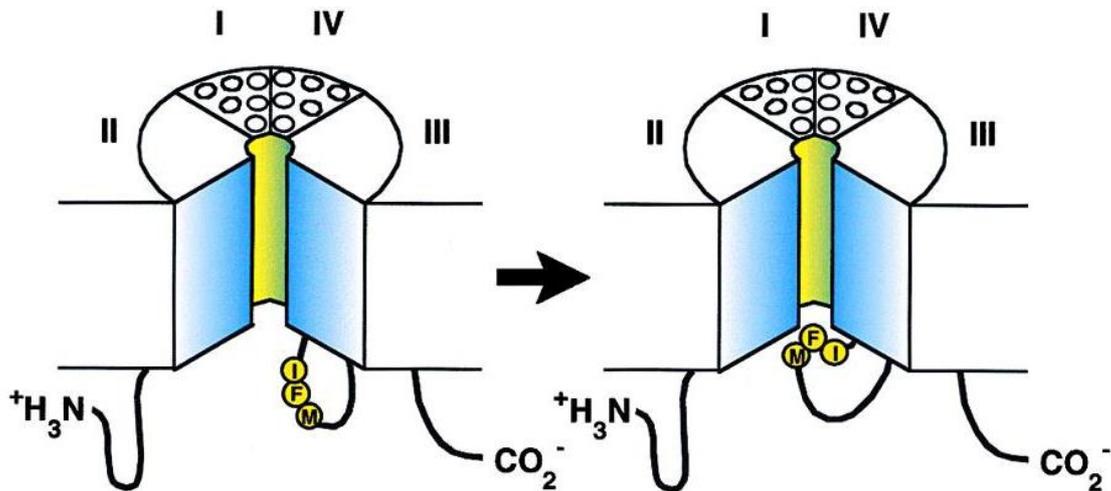


Abbildung 3: Molekularer Mechanismus der Kanalpore (Catterall, 2000)

Porenformende α -Untereinheit mit intrazellulärem „Loop“ zwischen den Domänen III und IV; links: aktivierter Zustand \rightarrow rechts: inaktivierter Zustand

1.1.4 Mutationen in spannungsabhängigen Natriumkanälen

Spannungsabhängige Natriumkanäle können durch Mutationen in ihrem Genom schwer in ihrer Funktion beeinträchtigt sein. Daraus resultiert eine gestörte Erregungsbildung und Ausbreitung des Aktionspotentials. Die Mutationen können zu erblich bedingten Krankheiten führen, wie zum Beispiel Epilepsien, Myoklonien oder Herzrhythmusstörungen.

Mutationen in Natriumkanälen können sowohl *gain of function* als auch *loss of function* Mechanismen hervorrufen. Als *gain of function* werden solche Veränderungen bezeichnet, die nach einem Aktionspotential die Erholungsphase von der schnellen Inaktivierung beschleunigen und die Refraktärzeit verkürzen (Alekov et al., 2000). Eine Störung der schnellen Inaktivierung der Natriumkanäle führt dazu, dass die Repolarisation der Zellmembran verlangsamt oder inkomplett stattfindet. Das resultiert in einer Übererregbarkeit mit spontanen Serien von Aktionspotentialen. Ein weiterer *gain of function* Mechanismus sind persistierende Einwärtsströme von Natriumionen, die die Zellmembran depolarisieren (Lossin et al., 2003).

Genmutationen in *SCN1A* (Tabelle 2, unten) und *SCN1B* führen zur generalisierten Epilepsie mit oder ohne Fieberkrämpfe (Wallace et al., 2001, Wallace et al., 2002). Die der GEFS⁺ zugrunde liegende Genetik ist sehr heterogen. Der Erbgang ist häufig autosomal-dominant. Am häufigsten finden sich Mutationen im Gen *SCN1A* (2q24.3, Natriumkanal-Protein Typ 1, Untereinheit Alpha, 10%). Mutationen in den Genen *SCN2A*, *SCN1B*, und *GABRG2* werden seltener berichtet. *SCN1A* Mutationen finden sich, neben epileptischen Syndromen wie GEFS⁺ und Dravet-Syndrom, auch bei familiärer hemiplegischer Migräne (Dichgans et al., 2005).

Tabelle 2: Vorkommen von *SCN1A*-Mutationen bei Epilepsien

Anfallstyp	Vorkommen
Einfache Fieberkrämpfe	seltener
Fieberkrämpfe Plus	seltener
Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus	5 – 10%
Schwere frühkindliche myoklonische Epilepsie = Dravet-Syndrom	33 – 90%
Schwere frühkindliche Grand mal-Epilepsie	70%

1.2 Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS+)

1.2.1 Definition von GEFS+

Anfallstypen und Epilepsiesyndrome werden nach dem Klassifikationssystem der Internationalen Liga gegen Epilepsie (ILAE, englisches Akronym für The International League Against Epilepsy) eingeteilt. Der letzte Vorschlag für eine Revision des Klassifikationssystems wurde im Jahre 2010 gemacht. Die ILAE unterscheidet über 20 verschiedene elektroklinische Syndrome, die jeweils durch klinische Merkmale, Zeichen und Symptome sowie Muster im Elektroenzephalogramm charakterisiert sind. Zahlreiche Epilepsiesyndrome beginnen typischerweise im 1. Lebensjahr. Ca. 13% der Epilepsiepatienten haben anamnestisch Fieberkrämpfe (Berg et al., 2010).

Fieberkrämpfe treten bei 3-5% aller Kinder unter sechs Jahren auf und sind typischerweise nicht mit einem erhöhten Risiko verbunden, eine Epilepsie als Jugendlicher oder Erwachsener zu entwickeln (Berg et al., 2010, ILAE, 1989). Ein Fieberkrampf ist ein epileptischer Anfall, der während eines Fieberschubs (Körpertemperatur $>38,5$ °C) auftritt. Die Unterteilung der Fieberkrämpfe erfolgt in einfache und komplizierte Fieberkrämpfe (Tabelle 3, Seite 17).

Einfache Fieberkrämpfe treten als generalisierte tonisch-klonische Anfälle bei Kindern im Alter zwischen sechs Monaten und fünf Jahren auf. Die Dauer der Anfälle liegt unter 15 Minuten und die Häufigkeit ist maximal einmal täglich. Einfache Fieberkrämpfe treten maximal drei Mal im Leben auf und das Elektroenzephalogramm (EEG) ist zwei Wochen nach einem Anfall unauffällig.

Komplizierte Fieberkrämpfe beginnen fokal und dauern länger als 15 Minuten oder wiederholen sich innerhalb von 24 Stunden. Postiktal sind neurologische Ausfälle und EEG-Veränderungen bis zu zwei Wochen nach dem Fieberkrampf möglich. Das Alter für komplizierte Fieberkrämpfe liegt zwischen einem Monat und sechs Jahren. (Waruiru and Appleton, 2004, Kugler and Johnson, 1998, Nelson et al., 1991).

Als Fieberkrämpfe Plus werden Anfälle bezeichnet, die über das 6. Lebensjahr hinaus auftreten und von afebrilen generalisierten tonisch-klonisch Anfällen begleitet sein können oder auch nicht (Scheffer and Berkovic, 1997).

Generalisierte genetische Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS⁺) ist eine Erkrankung mit familiärer Assoziation von Fieberkrämpfen und epileptischen Anfällen. Dieses Syndrom wurde von Scheffer und Berkovic im Jahre 1997 eingeführt. Es charakterisiert Familien, in denen sowohl einfache Fieberkrämpfe, als auch Fieberkrämpfe nach dem 5. Lebensjahr sowie verschiedene Formen afebriler Anfälle bei unterschiedlichen oder auch den gleichen Familienmitgliedern vorkommen und dominant mit reduzierter Penetranz vererbt werden.

Tabelle 3: Einfache und komplexe Fieberkrämpfe nach Fetveit (2008)

Einfacher Fieberkrampf	Komplexer Fieberkrampf
Dauer <15 Minuten (selbstlimitierend)	Dauer >15 Minuten
Keine Wiederholung innerhalb von 24 Stunden	Wiederholung innerhalb von 24 Stunden bzw. Anfallsserien
Postiktal unauffälliger neuropädiatrischer Status	Postiktale Parese bzw. neurologische Defizite
Generalisierte, tonisch-klonische Anfälle	Fokale. atone Anfälle, mit / ohne Generalisierung

1.2.2 Klinischer Verlauf und Genetik von GEFS⁺

Patienten mit GEFS⁺ zeigen Fieberkrämpfe, die über das sechste Lebensjahr hinaus fortbestehen und häufig zusätzlich von afebrilen generalisierten tonisch-klonischen Anfällen wie Absencen, myoklonische, atonische und myoklonisch-astatische Anfälle begleitet sind (Scheffer and Berkovic, 1997).

Es treten im EEG meist Spike-Wave-Muster auf und Photosensitivität. Afebrile Anfälle (am häufigsten generalisiert tonisch-klonische Krämpfe) können in der Kindheit mit Fieberkrämpfen assoziiert sein; das gemeinsame Auftreten von afebrilen und Fieberkrämpfen ist typisch für GEFS⁺. Afebrile Krämpfe können auch nach einer anfallsfreien Periode wieder auftreten; sie können auch in Patienten auftreten, die vormals keine Fieberkrämpfe hatten.

Von GEFS⁺ betroffene Mitglieder einer Familie zeigen heterogene Manifestationen der o.g. Anfälle mit unterschiedlicher Ausprägung und Altersabhängigkeit. Die Anfälle können im Alter von 12 Jahren sistieren oder auch persistieren, welche dann schwer behandelbar sind. Bei einzelnen Patienten kommt es erst im Erwachsenenalter zu einer klassischen Temporallappen-Epilepsie (Baulac et al., 2004)..

Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS⁺) ist eine Erkrankung, die durch Mutationen in Genen von spannungsabhängigen und ligandengesteuerten Ionenkanäle verursacht werden kann (Tabelle 4, Seite 20).

Veränderungen wurde in Untereinheiten neuronaler spannungsabhängiger Natriumkanäle und von GABA_A-Rezeptoren beschrieben (Nakayama, 2009). GEFS⁺ wird autosomal dominant vererbt mit einer unterschiedlichen Penetranz von 60 – 90% (Singh et al., 1999).

In Zellkultur wurden GEFS⁺-Mutationen exprimiert, die in Patch-Clamp-Untersuchungen sowohl *gain of function* als auch *loss of function* zeigten. Im Mausmodell dagegen wurde festgestellt, dass der primäre Effekt von GEFS⁺-Mutationen darin besteht, die Aktivität von GABAergen inhibitorischen Neuronen zu senken. Der Funktionsverlust der GABAergen inhibitorischen

Neurone scheint die Hauptursache für epileptisches Geschehen bei GEFS⁺-Patienten zu sein und könnte in direktem Zusammenhang mit *SCN1A*-Mutationen stehen (Escayg and Goldin, 2010, Catterall et al., 2010).

Etwa 10% der GEFS⁺-Familien tragen Mutationen im *SCN1A*-Gen (Chromosom 2q24, 26 Exone). Das Gen kodiert für die porenbildende Untereinheit des Natriumkanals Nav_v1.1. Mutationen, die *de novo* entstehen, gehen mit der schwersten Verlaufsform einher, dem sog. Dravet-Syndrom. Es gibt klare Hinweise dafür, dass die Art der Mutation mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Mutationen im *SCN1A*-Gen scheinen beim Dravet-Syndrom häufig eingreifendere Folgen in die Funktion des Proteins zu haben als Mutationen im selben Gen bei GEFS⁺. So sind viele Mutationen beim Dravet-Syndrom als „trunkierend“ zu bezeichnen (Mulley et al., 2005). Es treten Basenaustausche, aber auch größere Deletionen auf. Die Mutationen verursachen einen Funktionsverlust von Nav_v1.1, der in inhibitorischen Neuronen lokalisiert ist. Diese *loss of function* Mutationen beeinträchtigen das Feuern inhibitorischer Neurone, was zu einer verminderten Hemmung führt (Hedrich et al., 2014, Gambardella and Marini, 2009) .

Für das *SCN1B*-Gen (19q13.1, 6 Exone) sind bisher nur fünf Mutationen beschrieben (Wallace et al., 1998, Scheffer et al., 2007, Audenaert et al., 2003). Mutationen im *SCN1B*-Gen führen zu einer beeinträchtigten Modulation der Kinetik von Natriumkanälen (Wimmer et al., 2010).

Patienten mit GEFS⁺ Typ 3 tragen Mutationen im *GABRG2*-Gen, welches die γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors kodiert. Der GABA_A-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Chloridkanal, welcher das wichtigste inhibitorische Molekül im Gehirn darstellt. Der Kanal hat spezifische Bindungsstellen für GABA (Gamma-Aminobuttersäure), Benzodiazepine, Barbiturate und Steroide. Er ist als Heteropentamer aufgebaut, wobei *GABRG2* eine der drei wichtigsten Untereinheiten des Kanals kodiert. Der am häufigsten vorkommende Rezeptor besteht aus zwei α_1 -Untereinheiten, zwei β_1 -Untereinheiten und einer γ_2 -Untereinheit (Hedrich and Maljevic, 2016).

GABA_A-Rezeptoren vermitteln inhibitorische Effekte im Gehirn. Die verminderte Aktivität des GABA-Chloridkanals bewirkt eine Reduktion der Inhibition. Eine trunkierende Mutation führt zum Verlust der γ_2 -Untereinheit in der Membran und GABAerger Ströme. Bei GEFS⁺ sind die Veränderungen vor allem in der Gamma-2-Untereinheit (*GABRG2*-Gen, 5q31.1 – q33.1, 10 Exone) zu finden. Es sind vor allem Missensemutationen, Nonsense- und Spleißmutationen im *GABRG2*-Gen bekannt (Harkin et al., 2001), aber auch seltene Mutationen wurden im *GABRD*-Gen beschrieben (Dibbens et al., 2004).

Tabelle 4: Genetische Heterogenität von generalisierter Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS⁺)

Genlokus	Gen	Protein	GEFS ⁺
19q13.1	<i>SCN1B</i>	β_1 -Untereinheit des Nav1.1	Typ 1
2q21-q33	<i>SCN1A</i>	α_1 -Untereinheit des Nav1.1	Typ 2
5q31.1-q33.1	<i>GABRG2</i>	γ_2 -Untereinheit des GABA _A -Rezeptors	Typ 3

1.2.3 Das Dravet-Syndrom (SMEI, Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy)

Das Dravet-Syndrom (Severe myoclonic epilepsy of infancy, SMEI) wurde erstmals von Charlotte Dravet im Jahre 1978 in Frankreich beschrieben und ist die schwerste Verlaufsform der GEFS⁺ (Dravet, 2011). Das Dravet-Syndrom ist durch klonische und tonisch-klonische Anfälle, die häufig anhaltend und mit Fieber assoziiert im 1. Lebensjahr auftreten, charakterisiert. Im Verlauf der Erkrankung entwickeln sich bei den Patienten afebrile generalisierte myoklonische Anfälle, Absencen oder tonisch-klonische Anfälle. Einfach- oder komplex-fokale Anfälle können auch auftreten. Bis zum 2. Lebensjahr kann die frühkindliche Entwicklung noch normal sein, dann kommt es aber zu einer Stagnation in der psychomotorischen Entwicklung (Spastik und Ataxie), zu einer mentalen Retardierung und zu progressiven neurologischen Auffälligkeiten. Die Erkrankung ist äußerst resistent gegen alle bisher bekannten antikonvulsiven Pharmakotherapien (Scheffer and Berkovic, 2003). *SCN1A*-Mutationen treten in Familien häufig *de novo* auf und zeigen Haploinsuffizienz des Nav1.1-Ionenkanals, sodass ein kompletter *loss of function* des Ionenkanals auftritt (Claes et al., 2001). SMEI-Patienten sind häufig Träger von *Frameshift*-, *Nonsense*- und *Splice-Site*-Mutationen (Lossin, 2009). Mildere Beeinträchtigung der Kanalfunktion ist bei *SCN1A*-Mutationen zu detektieren, die bei GEFS⁺-Patienten vorkommen; daraus resultiert die Hypothese, dass eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei familiären Epilepsiesyndromen möglich ist (Catterall et al., 2010). Das Dravet-Syndrom ist im Kindes- und Jugendalter mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden. Bis heute gibt es keine Erklärung, wie diese plötzlichen Todesfälle zustande kommen, noch irgendwelche sinnvollen Empfehlungen, diesen vorzubeugen.

1.3 SUDEP

1.3.1 Definition von SUDEP

SUDEP ist das englische Akronym für den plötzlichen, unerwarteten Tod bei Epilepsie (Sudden Unexpected Death in Epilepsy). SUDEP ist definiert als der unerwartete, plötzliche Tod eines an Epilepsie erkrankten Patienten, der interiktal einen weitgehend unauffälligen Gesundheitszustand aufweist. Der Tod tritt innerhalb von Minuten unter normalen Alltagsumständen ein, es gibt keine anderweitige medizinische Todesursache und ein Status epilepticus ist ausgeschlossen (Nashef et al., 2011). Anfallsassoziierte Unfälle, Todesfälle aufgrund von Begleiterkrankungen, Suizide und Status epileptici werden als Todesursache ausgeschlossen. Der Tod kann mit oder ohne Nachweis eines vorausgegangenen epileptischen Anfalls auftreten. Es erfolgt in der klinischen Praxis die Unterteilung in „definitiven SUDEP“, wenn im Rahmen einer Autopsie keine anderweitige medizinische oder toxische Todesursache festgestellt wird und „wahrscheinlicher SUDEP“ bei Fehlen einer Autopsie (Shorvon and Tomson, 2011).

1.3.2 Inzidenz von SUDEP

Die Inzidenz von SUDEP steigt mit der Schwere der Epilepsieerkrankung. Die Gesamtrate des plötzlichen Todes ist 2,6 mal höher bei Epilepsiepatienten als in der Gesamtbevölkerung (Neligan et al., 2011). Auf Videoüberwachungsstationen für Epilepsiepatienten liegt die geschätzte Inzidenz für SUDEP bei 5 pro 1000 Patientenjahre und 1,2 pro 10000 Video-EEG-Überwachungen (Ryvlin et al., 2013). Die Inzidenz für SUDEP ist mit 6,3 bis 9,3 pro 1000 Patientenjahre höher in der Gruppe von Epilepsiepatienten, die eine pharmakoresistente Epilepsie haben und bei denen die Epilepsiechirurgie keine Anfallsfreiheit erbringt (Tomson et al., 2008).

Epilepsiepatienten im jungen Erwachsenenalter haben ein 24-fach erhöhtes Risiko für SUDEP als ältere Patienten (Ficker et al., 1998). Risikofaktoren für SUDEP wurden bei insgesamt vier Fall-Kontroll-Studien analysiert, die lebende

Epilepsiepatienten als Kontrollgruppe hatten, und wurden von der Kommission für Epidemiologie der Internationalen Liga gegen Epilepsie zusammengefasst (Hesdorffer et al., 2011a). Männliche Epilepsiepatienten haben ein 1,4-fach erhöhtes Risiko für SUDEP gegenüber weiblichen Patienten.

In absoluten Zahlen ist in Deutschland mit minimal 500 SUDEP-Fällen pro Jahr zu rechnen (May and Pfäfflin).

1.3.3 Risikofaktoren für SUDEP

Bei einer langen Dauer der Epilepsieerkrankung über 15 Jahre verdoppelt sich das Risiko für SUDEP. Der wichtigste Risikofaktor ist die Frequenz von generalisiert tonisch-klonischen Anfällen pro Jahr. Die Odds Ratio für Patienten mit ein bis zwei bzw. mit über 50 generalisierten tonisch-klonischen Anfällen pro Jahr ist 2,94 bzw. 14,51 gegenüber Epilepsiepatienten ohne generalisiert tonisch-klonische Anfälle. Für Patienten mit einer Kombinationsbehandlung von Antiepileptika wird ein dreifach erhöhtes Risiko für SUDEP angegeben gegenüber solchen mit einer Monotherapie (Shorvon and Tomson, 2011).

Fall-Kontroll- und Kohorten-Studien deuten auf folgende klinische und demographische Anzeichen als Risikofaktor für SUDEP (Hesdorffer et al., 2011a, Hesdorffer et al., 2011b, Shorvon and Tomson, 2011):

- Alter (relative hohe Bedeutung im jungen Erwachsenenalter, 15 – 40 Jahre),
- männliches Geschlecht,
- Komorbiditäten wie psychiatrische Erkrankungen, mentale Retardierung oder auch Alkoholabusus,
- schwer behandelbare Epilepsien und Epilepsien von Kandidaten für Add-On-Behandlungen mit neuen Antiepileptika, für eine resektive Epilepsiechirurgie oder für eine Vagusnervstimulation,
- sekundär generalisierte tonisch-klonische Anfälle, insbesondere epileptische Anfälle in der Nacht,

- fokale Epilepsien, lange Epilepsiedauer (Dauer der Epilepsie >10 Jahre), hohe Anfallsfrequenz (Anfallshäufigkeit >1 / Monat)
- Polypharmakotherapie, rasche Umstellungen der Medikamente, plötzliches Absetzen von Antiepileptika,
- schlechte Compliance in der Medikamenteneinnahme
- Subtherapeutische oder schwankende Serumkonzentrationen der Antiepileptischen Medikation

Lamotrigin wird in Studien als Risikofaktor für SUDEP durch proarrhythmische Effekte bei Frauen mit generalisierter Epilepsie beschrieben (Aurlen et al., 2012).

1.4 Klinische und genetische Daten der 2 untersuchten Familien

1.4.1 Familie 1

1.4.1.1 *Epileptologische Daten*

Klinische und genetische Daten beider Familien wurden durch unsere Kollaborationspartner in Spanien erhoben. Es wurden 36 männliche und 36 weibliche Personen untersucht (Tabelle 5, Seite 28). Von den 72 Personen waren 22 an Epilepsie erkrankt. 17 betroffene Personen hatten die Diagnose Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS⁺, englisches Akronym für Generalized Epilepsy with Febrile Seizure Plus) (Abbildung 4, Seite 27). Detaillierte klinische Angaben waren für fünf Patienten nicht verfügbar, die nicht klassifizierbare Phänotypen zeigten. Sechs Personen (II-3, II-9, III-6, III-8 III-14 und IV-1) hatten Fieberkrämpfe, die über das sechste Lebensjahr hinaus persistierten (II-3) oder von afebrilen generalisierten tonisch-klonischen Anfällen begleitet wurden. Dieser Phänotyp, der in diesem Stammbaum am häufigsten auftrat, wird als Fieberkrämpfe Plus (FK⁺) bezeichnet. Drei Personen (III-10, III-26 und III-38) hatten nur bis zum 6. Lebensjahr Fieberkrämpfe. Die Personen II-5, III-11 und III-15 hatten FK⁺ und zusätzlich Absencen. Die Absencen traten bei diesen Patienten während der Adoleszenz auf und waren selten. Person III-17 hatte einen einzigen Fieberkrampf im Alter von zwei Jahren und zeigte im Alter von 15 Jahren generalisierte tonisch-klonische Krämpfe und vereinzelte myoklonische Krämpfe, die nicht in der Aufwachphase auftraten und eine Verschlechterung nach Einnahme von Carbamazepin zeigten. Dieser Phänotyp wurde als FK⁺ und myoklonische Krämpfe klassifiziert. Drei Personen (II-7, II-13 und III-27) hatten generalisierte Krämpfe im Kindesalter und keine Fieberkrämpfe. Person II-7 hatte im Alter von acht Jahren häufige generalisierte tonisch-klonische Krämpfe, die von Absencen und oralen Automatismen gefolgt wurden. Person III-18 hatte einfache fokale Krämpfe mit psychischen Phänomenen und autonomen Symptomen (Empfindungen von „*déjà-vu*“ und Panik, aufsteigende epigastrische Sensationen), komplex-fokalen Anfällen und gelegentlich folgenden generalisiert tonisch-klonischen Anfällen. Die Anfälle standen in keinem Zusammenhang mit Fieber. Dieser Patient zeigte temporale

Spikes und Spike-Waves im Elektroenzephalogramm und Temporallappenepilepsie wurde diagnostiziert. Mittels Magnetresonanztomografie wurde Hippokampussklerose ausgeschlossen. Genauere Angaben über die Epilepsien von fünf Personen (I-2, II-17, III-3, III-30 und IV-5) waren nicht verfügbar, sodass keine Klassifizierung des Phänotyps möglich ist. Bis auf drei waren alle Patienten in der neurologischen Untersuchung unauffällig. Diese drei Patienten zeigten eine mentale Retardierung: Patient III-3 litt an kongenitalem Hypothyroidismus, Patient III-30 und IV-5 erlitt Hypoxie bei der Geburt. Elektroenzephalogramme aus der interiktalen Phase waren von 14 Patienten verfügbar, davon waren sieben normal, fünf mit unregelmäßigen generalisierten Spike-Waves oder Polyspike-Waves und einer mit temporalen Spikes. Kernspintomografien des Schädels von acht erkrankten Personen waren ohne pathologischen Befund.

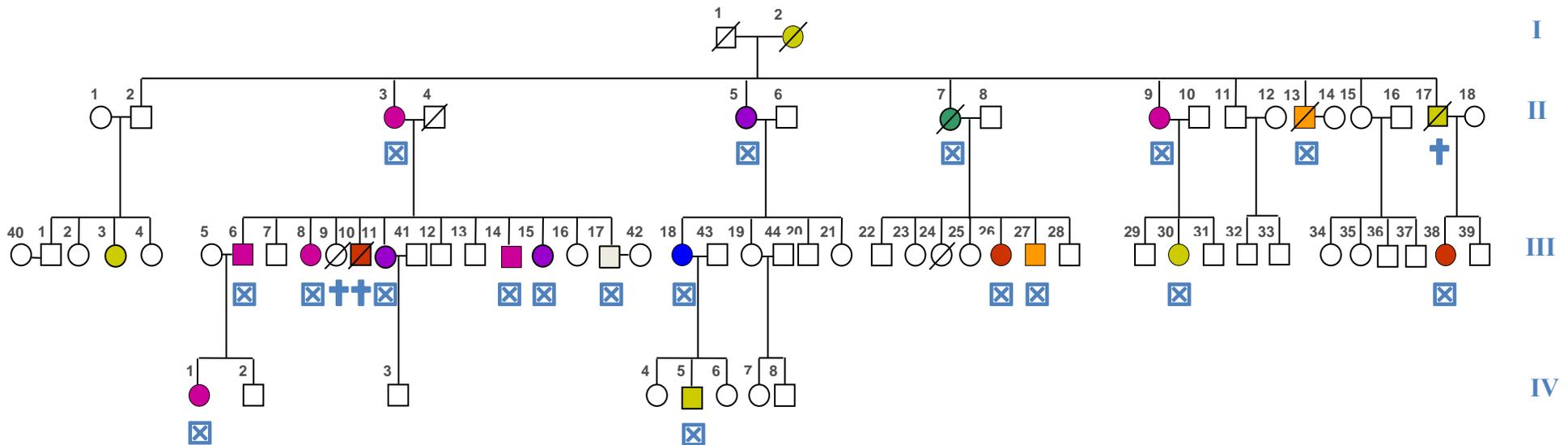
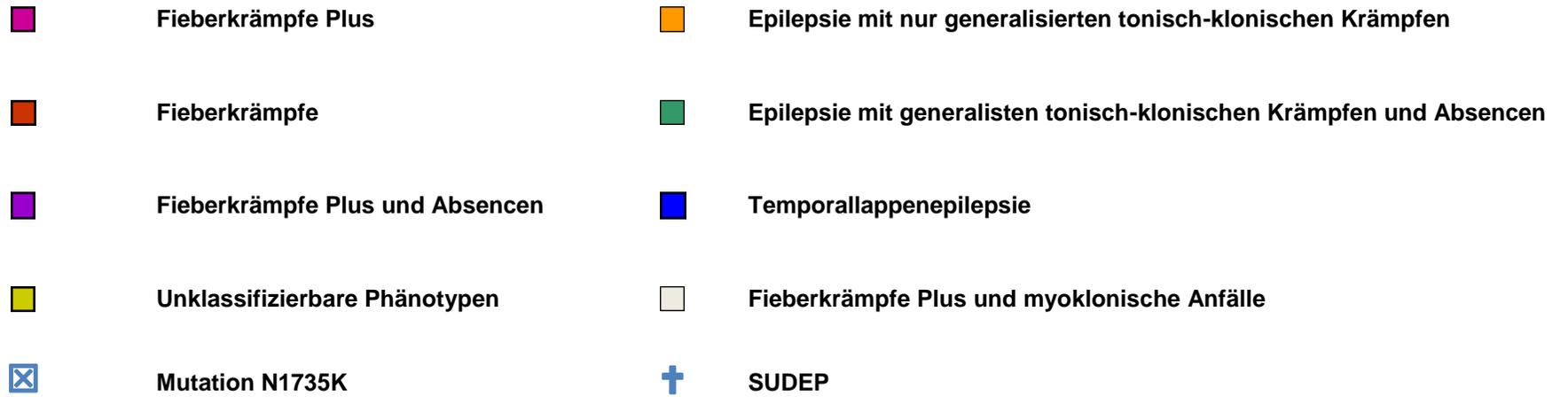


Abbildung 4: Stammbaum der 1. Familie

Tabelle 5: Zusammenfassung klinischer Daten der Betroffenen der 1. Familie

ID	Geschlecht / Alter	Fieber- krämpfe	Afebrile Krämpfe	Anfallsart	Neurologische Untersuchung	EEG	MRT / CT	Epilepsie- phänotyp
I-2	W / †	?	12 J / 14 J	GTKA	n	-	-	n.k.
II-3	W / 61 J	6 / 7 J	keine	-	n	n	-	FK+
II-5	W / 59 J	9 Mo / ?	9 Mo / 44 J	GTKA, Abs	n	n	-	FK+ und Abs
II-7	W / 56 J	keine	8 J / -	GTKA, Abs	n	GSW	n	EGA
II-9	W / 53 J	8 J / ?	8 J / 53 J	GTKA	n	GSW	n	FK+
II-13	M / † 62 J	keine	2 J / 47 J	GTKA	n	GSW	-	EGTKA
II-17	M / † 38 J	?	?	GTKA	n	-	-	n.k.
III-3	W / 28 J	keine	10 J / -	GTKA, Abs	r	n	-	n.k.
III-6	M / 36 J	3 J / ?	3 J / -	GTKA	n	n	n	FK+
III-8	W / 33 J	3 J / 6 J	3 J / -	GTKA	n	n	-	FK+
III-10	M / † 2 J	2 J / ?	?	-	-	-	-	FK
III-11	W / 29 J	1 J / ?	<1 J / -	GTKA, Abs	r	GSW	n	FK+ und Abs
III-14	M / 24 J	? / 6 J	? / 16 J	GTKA	n	n	n	FK+
III-15	W / 22 J	6 J / 6 J	16 J / -	GTKA, Abs	n	RTSW	n	FK+ und Abs
III-17	M / 20 J	2 J / 2 J	15 J / -	GTKA, Myo	n	n	n	FK+ und Myo
III-18	W / 39 J	keine	3 J / 30 J	EFK, KFA	n	RTSW	-	TLE
III-26	W / 28 J	5 J / 6 J	keine	-	n	-	-	FK
III-27	M / 24 J	keine	5 J / 18 J	GTKA	n	n	n	EGTKA
III-30	W / 26 J	2 J / ?	3 J / -	GTKA	r	-	-	n.k.

III-38	W / 22 J	1 J / 3 J	keine	-	n	-	-	FK
IV-1	W / 4 J	1 J / -	3 J / -	GTKA	n	-	-	FK+
IV-5	M / 12 J	keine	2 J / 6 J	GTKA, Abs	n	-	-	n.k.

Abs, Absencen; EEG, Elektroenzephalogramm; EFK, einfache fokale Krämpfe; EGTKA, Epilepsie mit nur generalisierten tonisch-klonischen Anfällen; FK, Fieberkrämpfe; FK+, Fieberkrämpfe Plus; FSWD, fokale Spike-und-Wave-Entladungen; GEA, generalisierte Epilepsie mit Absencen; GTKA, generalisierte tonisch-klonische Anfälle; GSW, generalisierte Spike-und-Wave-Entladungen; J, Jahre; KFA, komplexe fokale Anfälle; M, männlich; Mo, Monat; MRT/CT, Magnetresonanztomographie/Computertomographie des Schädels; Myo, myoklonische Anfälle; n, normal; n.k., nicht klassifizierbar; r, mental retardiert; RTSW, rechts temporale Spike-und-Wave-Entladungen; TLE, Temporallappenepilepsie; †, verstorben

1.4.1.2 SUDEP-Fälle und -Rate

Vier Personen sind an einem plötzlichem Tod verstorben: Individuen II-13, II-17 und III-10 waren an Epilepsie erkrankt, Person III-9 war nicht an Epilepsie erkrankt. Person II-13 verstarb plötzlich im Alter von 62 Jahren, als er alleine auf dem Sofa saß. Es gab keine sekundären Hinweise für einen assoziierten epileptischen Anfall. Person II-17 verstarb im Alter von 38 Jahren plötzlich im häuslichen Umfeld. Der Tod war unbeobachtet und es gab keinen Anhalt für ein Anfallsereignis. Eine Herz-Kreislaufkrankung war bei diesem Patienten nicht bekannt und die Autopsie erbrachte keine Todesursache. Person III-10 hatte mehrere Episoden von Fieberkrämpfen und starb unerwartet im Schlaf im Alter von zwei Jahren. Person III-9 verstarb unerwartet im Schlaf im Alter von zwei Jahren. Es wird berichtet, dass er am Tag zuvor Fieber hatte, das auf einen ersten unbeobachteten nächtlichen Fieberkrampf hindeuten könnte. Insgesamt wurden 397 Patientenjahre Fieberkrämpfe und / oder Epilepsie und vier Fälle von plötzlichem Tod beobachtet. Die Rate für plötzlichen Tod war 7,5 – 10 pro 1000 Patientenjahre.

1.4.1.3 Herzuntersuchungen

Eine komplette kardiologische Untersuchung wurde an vier an Epilepsie erkrankten Patienten (II-3, III-11, III-14 und III-17) und an drei Verwandten als Kontrollgruppe (III-7, III-12 und III-16) durchgeführt. Es wurden keine Herzerkrankungen festgestellt.

1.1.1.1 Genetische Daten

Die genetischen Untersuchungen wurden in einem molekulargenetischen Labor in Auftrag unserer spanischen Kollaborationspartner durchgeführt. Die initiale Screening-Untersuchung ergab keine Mutationen in der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors bei vier erkrankten Familienmitgliedern (II-3, II-7, II-9 und II-13).

Bei denselben vier erkrankten Familienmitgliedern ergab die Sequenzierung der kodierenden Region für das *SCN1A*-Gen (II-3, II-7, II-9 und II-13) eine neue heterozygote Mutation c.5172 C→G (Abbildung 5, unten).

```

5161 ACAACCTCTGCTGGCTGGGATGGATTGCTAGCACCCATTCTCAACAGTAAGCCACCCGAC
5161 ACAACCTCTGCTGGCTGGGATGGATTGCTAGCACCCATTCTCAAAGTAAGCCACCCGAC
1721 -T--T--S--A--G--W--D--G--L--L--A--P--I--L--S--K--P--P--D-

5221 TGTGACCCTAATAAAGTTAACCCCTGGAAGCTCAGTTAAGGGAGACTGTGGGAACCCATCT
5221 TGTGACCCTAATAAAGTTAACCCCTGGAAGCTCAGTTAAGGGAGACTGTGGGAACCCATCT
1741 -C--D--P--N--K--V--N--P--G--S--S--V--K--G--D--C--G--N--P--S-

```

Abbildung 5: Sequenz des *SCN1A*-Gens mit der neuen heterozygoten Mutation c.5172 C→G

Diese Mutation führte zur Substitution von Lysin anstelle von Aspartat (N1735K) in der letzten extrazellulären Schleife zwischen der Porenhelix und Segment S6 der Domäne IV des Natriumkanals Nav1.1 (Abbildung 6, unten). Die Sequenzierung der Mutation c.5172 C→G wurde auch bei allen anderen Familienmitgliedern durchgeführt. Die Mutation wurde bei allen getesteten Personen, außer III-3, festgestellt. Die Mutation war auch bei drei asymptomatischen Familienmitgliedern (III-19, III-20 und III-21) vorhanden, wohingegen sie bei 234 Kontroll-Chromosomen und in verfügbaren Datenbanken nicht nachweisbar war (<http://www.molgen.vib-ua.be/scn1amutations/Mutations/MutBycDNA.cfm>).

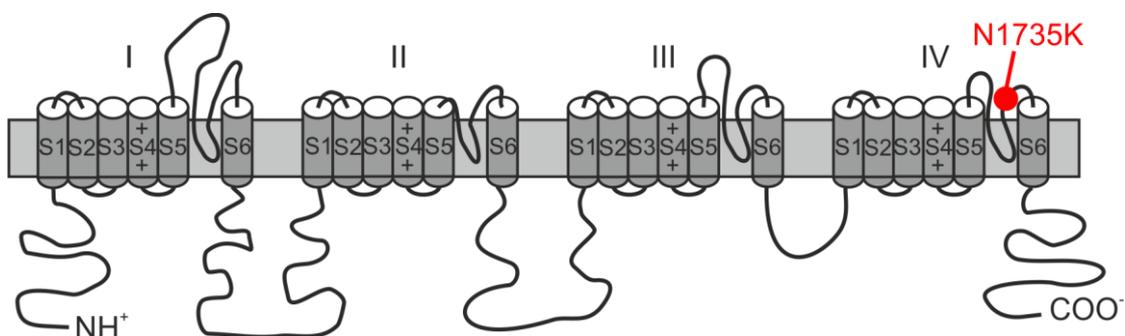


Abbildung 6: N1735K-Mutation in der letzten extrazellulären Schleife zwischen der Porenhelix und dem Segment 6 der Domäne IV

1.4.2 Familie 2

1.4.2.1 *Epileptologische Daten*

Von untersuchten 28 Personen in der 2. Familie litten 12 Personen an verschiedenen Arten von Epilepsie (Tabelle 6, Seite 33). Fünf Personen hatten eine positive Anamnese für afebrile Krämpfe in ihrer Kindheit, die nicht näher klassifizierbar waren (I-1, II-1, II-3, II-4 und III-1). Drei Personen hatten in ihrer Kindheit Fieberkrämpfe und afebrile generalisierte tonisch-klonische Krämpfe, die als Fieberkrämpfe Plus klassifiziert wurden (III-2, IV-1 und IV-4). Eine Person zeigte zunächst Fieberkrämpfe im Alter von neun Monaten, hatte einen hemiklonischen Status epilepticus im Alter von 12 Monaten und drei Jahren, und entwickelte später Ataxie und schwere mentale Retardierung, die als Dravet-Syndrom klassifiziert wurde (IV-2). Person III-3 hatte im Alter von zwei Jahren myoklonisch-astatische Anfälle und häufige Stürze, die am ehesten als myoklonisch-astatische Epilepsie klassifizierbar war, obwohl jedoch keine Fieberkrämpfe berichtet wurden. Diese Person entwickelte auch Ataxie. Person III-9 wurde im Alter von sieben Monaten tot in der Wiege gefunden. Es gab keine Vorgeschichte mit Anfällen. Person III-7 und III-8 zeigten häufige generalisiert tonisch-klonische Anfälle und wurden als Dravet-Syndrom klassifiziert, Fieberkrämpfe wurden nicht berichtet.

Tabelle 6: Zusammenfassung klinischer Daten der Betroffenen der 2. Familie

Identität	Geschlecht / Alter	Krämpfe Altersbeginn / Ende	Anfallsart	Epilepsie-Phänotyp
I-1				Anfälle in der Kindheit
II-1	W / 87 J	5 J / 12 J	GTKA	nicht klassifizierbar
II-3				Anfälle in der Kindheit
II-4				Anfälle in der Kindheit
III-1	W / 60 J	3 J / -	GTKA	nicht klassifizierbar
III-2	W / 58 J	15 J / 38 J	GTKA	FK+
III-3	M / 55 J	2 J / 52 J	GTKA und Myo	Dravet-Syndrom
III-7	M / † 6 J	2 J / 6 J	häufige GTKA	Dravet-Syndrom
III-8	M / † 4 J	2 J / 4 J	häufige GTKA	Dravet-Syndrom
III-9	M / † 7 Mo	-	keine	keine
IV-1	W / 28 J	11 Mo / 22 J	GTKA	FK+
IV-2	M / 33 J	1 J / -	GTKA	Dravet-Syndrom
IV-4	W / 26 J	7 Mo / 26 J	FK, GTKA	FK+

FK, Fieberkrämpfe; FK+, Fieberkrämpfe Plus; GTKA, generalisierte tonisch-klonische Anfälle; GSW, generalisierte Spike-und-Wave-Entladungen; J, Jahre; M, männlich; Mo, Monat; Myo, myoklonische Anfälle; †, verstorben

1.4.2.2 SUDEP-Fälle und -Rate

Drei Personen in der 2. Familie sind an plötzlichem Tod verstorben. Person III-7 verstarb im Alter von sechs Jahren im Krankenhaus während einer Episode von vielen Anfällen (kein sicherer Status epilepticus). Person III-8 starb zuhause unter unbekanntem Umständen (die Mutter war alt und hatte Demenz). Person III-9 wurde im Alter von sieben Monaten in der Wiege tot aufgefunden, ohne Krämpfe in der Vorgeschichte. Daraus resultierten 163 Patiententjahre an febrilen / afebrilen Krämpfen und eine SUDEP-Rate von 18,4 pro 1000 Patiententjahre. Es lagen keine Herzuntersuchungen vor.

1.4.2.3 Genetische Daten

Die Sequenzierung der kodierenden Region für das *SCN1A*-Gen bei Person IV-2 ergab eine heterozygote Mutation c.4280 T→C, die zur Substitution von Methionin anstelle von Threonin (M1438T) in der extrazellulären Schleife zwischen den α -helikalen Segmenten S5 und S6 der Domäne III des Natriumkanals Nav1.1 führte (Abbildung 7, unten).

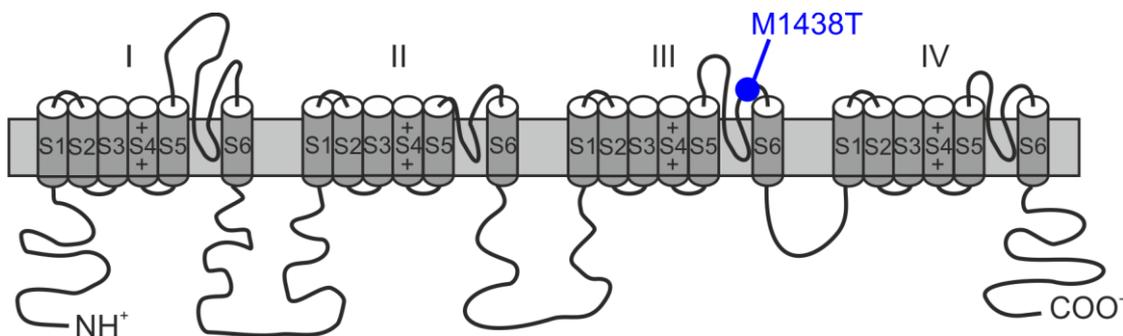


Abbildung 7: M1438T-Mutation in der letzten extrazellulären Schleife zwischen den α -helikalen Segmenten S5 und S6 der Domäne III

Die Mutation c.4280 T→C (Abbildung 8, Seite 35) wurde durch Sanger Sequenzierung auch bei allen anderen erkrankten Familienmitgliedern gefunden (II-2, II-3, III-1, III-2, III-3, IV-1, IV-2 und IV-4) und war nicht zu finden bei zwei gesunden Familienmitgliedern.

```

4261 GGGTATCTCTCTTTGCTTCAAGTTGCCACATTCAAAGGATGGATGGATATAATGTATGCA
4261 GGGTATCTCTCTTTGCTTCAAGTTGCCACATTCAAAGGATGGATGGATATAA█GTATGCA
1421 -G--Y--L--S--L--L--Q--V--A--T--F--K--G--W--M--D--I--█--Y--A-

4321 GCAGTTGATTCCAGAAATGTGGAACTCCAGCCTAAGTATGAAGAAAGTCTGTACATGTAT
4321 GCAGTTGATTCCAGAAATGTGGAACTCCAGCCTAAGTATGAAGAAAGTCTGTACATGTAT
1441 -A--V--D--S--R--N--V--E--L--Q--P--K--Y--E--E--S--L--Y--M--Y-

```

Abbildung 8: Sequenz des *SCN1A*-Gens mit der neuen heterozygoten Mutation c.4280 T→C

1.5 Wissenschaftliche Fragestellung und Ziele der Arbeit

Mutationen im Nav1.1 Kanal führen zur generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS⁺) und schweren frühkindlichen myoklonischen Epilepsie (SMEI, Dravet-Syndrom). In zwei spanischen Familien mit GEFS⁺ traten gehäufte plötzliche Todesfälle auf. In den Familien wurde jeweils eine *de novo* heterozygote Mutation im *SCN1A*-Gen gefunden, das für die α -Untereinheit des spannungsabhängiger Natriumkanals (Nav1.1) kodiert. Bisher ist in der Literatur eine *SCN1A*-Mutation in einer GEFS⁺ Familie mit zwei Fällen von SUDEP (*sudden unexpected death of epilepsy patients*) beschrieben.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden die beiden *SCN1A*-Mutationen N1735K und M1438T transient *in vitro* in tsA201-Zellen exprimiert und elektrophysiologisch analysiert. Beide Mutationen liegen in der hochkonservierten und funktionell relevanten Porenregion des humanen Nav1.1 Kanals. Elektrophysiologische Untersuchungen wurden mit der *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Technik durchgeführt.

2 Material und Methodik

2.1 Zellkultur der tsA-Zelllinie

Die tsA201-Zelllinie stammt von einem mit dem „Simian Vacuolating Virus 40 large T-Antigen“ stabil transfizierten Klon der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293. Das Simian Vacuolating Virus 40 T-Antigen bindet an die „*origin of replication*“ der viralen, zum Beispiel Zytomegalievirus (CMV), Promoterregion des Plasmids und initiiert somit die Replikation und Transkription des eingebrachten Plasmids, sodass eine sehr gute transiente Expression der eingebrachten cDNA stattfindet. Das bedeutet, dass bei der Transfektion von der gleichen Menge an cDNA mit einem CMV-Promoter in jeweils tsA201- und naive HEK293-Zellen, die Proteinexpression in tsA-Zellen deutlich höher ist (Heinzel et al., 1988). TsA201 ist eine adhärenz wachsende Zelllinie. Sie besitzt nur wenige endogene Natriumkanäle und ist daher für eine Transfektion mit Natriumkanälen sehr gut geeignet und Messungen von Natriumströmen mittels der *Whole-Cell*-Patch-Clamp-Technik sind sehr gut etabliert.

TsA201-Zellen wurden in 25 ml sterilen Flaschen in 50% Dulbecco's MEM und 50% HAMS Medium mit 10% FKS (Fetales Kälberserum) bei 37° Celsius unter 5 Vol.% CO₂ in einem luftbefeuchteten Inkubator kultiviert (Tabelle 7, Seite 38). Die Zellen wurden dreimal pro Woche vorsichtig mit Ca²⁺ und Mg²⁺ freier PBS Lösung gewaschen, um den pH-Wert des Mediums zu stabilisieren und die Verbindung der Zellen untereinander und mit den Gefäßwänden zu lösen. Die überschüssige Puffer-Lösung wurde verworfen und anschließend wurden die Zellen mit neuem Nährmedium suspendiert. Hierzu wurden die Flaschenwände mit frischem Medium gespült und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellklumpen in Suspension gebracht. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 in frisches Medium in sterilen Flaschen überführt und täglich mikroskopisch nach Anheftung am Flaschenboden und Wachstum untersucht. Die Zellen wurden bis zu ihrer 40. Passage für die Transfektion genutzt.

Tabelle 7: Lösen und Verdünnen von tsA201-Zellen

Lösen	PBS Ca ²⁺ (-) und Mg ²⁺ (-)	PAA Laboratories, Linz / Österreich
Verdünnung	1 : 10	
Sterile Pipette	5 ml sterile Plastikpipette	Greiner, Frickenhausen / Deutschland
Nährmedium	50% Dulbeco's MEM 50% HAMS Nährmedium 10% (v / v) Fetales Kälberserum	GIBCO BRL, Paisley / Schottland PAA Laboratories, Linz / Österreich Lonza, Schweiz
Sterile Flaschen	25 ml sterile Flaschen	Greiner, Frickenhausen / Deutschland
Inkubation	37° Celsius und 5% CO ₂	Zellinkubator IG 150, Jouan, Unterhachingen / Deutschland

2.2 Transiente Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode, um fremde DNA in eine eukaryote Zelle einzubringen. Es gibt stabile und transiente Transfektionsmethoden. Bei der stabilen Transfektion wird die aufgenommene DNA in das Genom der Zelle integriert und damit nicht abgebaut. Bei der transienten Transfektion wird die DNA nicht in das Genom der Zelle aufgenommen und innerhalb von wenigen Tagen abgebaut. Weitere Versuche, die geplant sind, müssen deshalb in kurzer Zeit nach der Transfektion erfolgen. Es gibt vielfältige Transfektionsmethoden, die sich auch in ihrer Effizienz unterscheiden. Für diese Arbeit wurde das

Transfektionsreagenz Mirus TransIT-2020 (Mirus Bio LLC, WI, USA) verwendet. Laut Hersteller bildet das Reagenz einen Komplex mit der zu transfizierenden DNA und wird dann in die Zelle transportiert. Dabei wird die DNA in eine weit verzweigte Struktur aus Dendrimeren eingelagert. Dieser Komplex aus kationischen Polymeren bindet dann auf Grund seiner positiven Gesamtladung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und wird endosomal von der Zelle aufgenommen. So wird die DNA in die Zelle geschleust. Der Vorteil der Reagenzien besteht in einer hohen Effizienz und geringer Toxizität gegenüber den Zellen. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Zellen wurden 18 – 24 Stunden vor der Transfektion gesplittet und $2 - 6 \times 10^5$ Zellen in 35 mm Schalen überführt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 – 80% mit der jeweiligen Mutation (M1438T oder N1735K) und den beiden β 1- und β 2-Untereinheiten transfiziert. Die Plasmid DNA der beiden β -Untereinheiten waren jeweils mit GFP (Grün fluoreszierendes Protein) oder CD8 (CD8-Rezeptor-Oberflächenprotein) gekoppelt. Am nächsten Tag wurde kurz vor der Transfektion das Transfektionsreagenz Mirus auf Raumtemperatur gebracht. 250 μ l Opti-MEM-Medium wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß pipettiert. Zuerst wurden 7,5 μ l Mirus-Reagenz hinzugefügt und dabei wurde darauf geachtet, dass sich das Reagenz nicht mit der Gefäßwand berührt. Nach 5 Minuten wurden 2,5 μ g Plasmid DNA der α -Untereinheit und jeweils 0,2 μ g der β -Untereinheiten hinzugefügt und vorsichtig auf- und abpipettiert. Nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurde das Gemisch bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Danach wurde der Mirus-DNA-Komplex tröpfchenweise auf die Zellen in der Schale pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und für die elektrophysiologische Messung vorbereitet. Durch Kotransfektion der Plasmide für die α -Untereinheit des Nav1.1 Kanals mit β 1 gekoppeltem GFP-Plasmid und β 2 gekoppeltem CD8-Plasmid konnten geeignete Zellen für die Messung identifiziert werden. Zur Identifikation transfizierter Zellen wurden vor den elektrophysiologischen Messungen Anti-CD8 umhüllte Microbeads (Dynabeads M450, Dynal) in die Schale pipettiert. Dynabeads sind 4,5 μ m groß und werden mit Anti-CD8

umhüllt. Dadurch heften sie an der Oberfläche der Zellen und machen immunomagnetisch die transfizierten Zellen mikroskopisch sichtbar. Von einer guten Transfektion, die die Messung ausreichend großer Ströme erlaubte, konnte ausgegangen werden, wenn die Zellen eine hohe Fluoreszenzintensität aufwiesen und zwei bis fünf CD8-Dynabeads an der Zellmembran gebunden hatten.

2.3 Elektrophysiologie

2.3.1 Das elektrophysiologische Setup und die Durchführung der Experimente

Der Versuchsaufbau wurde auf einem schwingungsgedämpften Tisch und in einen Faraday-Käfig zur Minimierung von elektromagnetischen Störungen installiert.

Ein inverses Mikroskop Axiovert 10 (Zeiss, Germany) mit dem daran befestigten motorisierten Mikromanipulator (LN Unit Junior, Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, Germany), der den Pipettenhalter und Vorverstärker (Headstage CV 201) trägt, wurde auf dem schwingungsgedämpften Tisch befestigt. Computer, Steuerungsmodul des Mikromanipulators, Verstärker und Analog/Digital-Wandler wurden in einem geschirmten und geerdeten Schrank neben dem eigentlichen Stand untergebracht.

Auf dem Objektisch des Mikroskops wurden in eine Aussparung Gewebekulturschalen eingesetzt. In diesen befanden sich die transient transfizierte tsA201-Zellen, umgeben von einer Extrazellulärlösung. Die mit Intrazellulärlösung befüllte Patchpipette wurde direkt am Vorverstärker befestigt, ein chlorierter Silberdraht diente hierbei als Messelektrode. Das Ausgangssignal des Vorverstärkers wurde von einem steuerbaren Hauptverstärker (Axopatch 200A) weiterverarbeitet und über einen Analog/Digital-Wandler an einen Computer weitergeleitet, auf welchem die digitalisierten Daten mit der Software Clampex 6.0 (Axon Instruments, Union City, USA) unter Microsoft Windows (Microsoft Corp. Redmond, USA) erhoben wurden. Um ein hochfrequentes Rauschen zu unterdrücken, wurden die ermittelten Ströme durch einen 5 kHz-Filter geleitet.

Mit dem Verstärker Axopatch 200B (Molecular Devices, Union City, CA, USA) wurde über die Pipette der Zellmembran ein bestimmtes Potential angelegt, welches konstant gehalten wurde.

Nach Ausbildung der *Cell-attached*-Konfiguration wurden die kapazitiven Ströme kompensiert und das Kommandopotential wurde auf einen Wert in der Nähe des Ruhemembranpotentials (-70 mV) eingestellt.

Nun wurde am Pipettenschlauch gesaugt, was einen Durchbruch der Zellmembran bewirkte. Durch das Loch in der Zellmembran erhielt man einen Zugang zum Inneren der Zelle. Dies ermöglicht eine Messung des Natriumstroms durch die in der Membran gelegenen Natriumkanäle der gesamten Zelle. Durch diesen Zugang zum Inneren der Zelle findet ein Auswaschen des Zellinhalts (Zytoplasma) mit der Pipettenlösung (siehe 2.3.4, Seite 45) statt.

Die Stromantwort auf den Testpuls änderte sich nach dem Durchbruch der Zellmembran schlagartig, denn statt des Patches musste jetzt bei der Spannungsänderung die gesamte Fläche der Zellmembran umgeladen werden (Abbildung 9, Seite 43). Es nahmen also die kapazitiven Ladeströme zu. Gleichzeitig nahm der Strom zu, der nach dem Umladen bei dem Spannungssprung für die Aufrechterhaltung des um 10 mV erhöhten Potentials benötigt wurde. Denn die große Membranfläche hatte einen geringeren Widerstand (R) als der kleine Patch, sodass gemäß $\Delta U = \Delta I \times R$ der Offsetstrom I_{offset} zunahm. Anschließend optimierte man die Ableitung noch, indem man den Serienwiderstand (R_{Serie}) reduzierte, und die Kompensationen für Kapazität C_m und Serienwiderstand aktivierte.

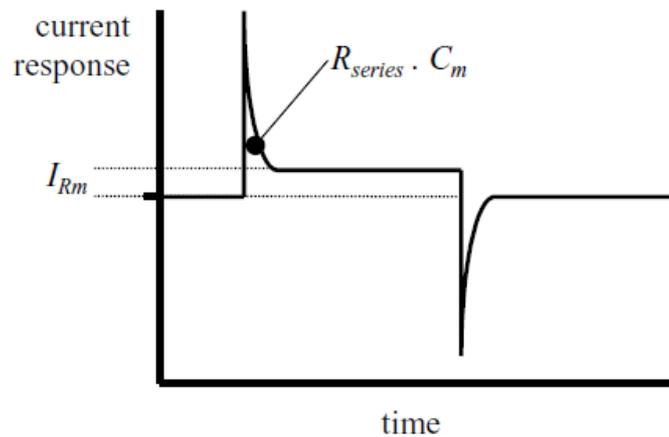


Abbildung 9: Stromantwort bei der Ganzzelleableitung (Molleman, 2003b)

I_{Rm} ist der Offsetstrom; R_{series} ist der Serienwiderstand; C_m ist die Membrankapazität; *current response* ist die Stromantwort

2.3.2 Die Ganzzelleableitung

Die Ganzzelleableitung ist heute wohl die am häufigsten verwendete Methode der Patch-Clamp-Technik. Bei den Experimenten dieser Arbeit kam ausschließlich diese *Whole-Cell*-Konfiguration zur Anwendung (Abbildung 10, Seite 44). Sie unterscheidet sich von anderen Konfigurationen, indem sie die gesamte Membran einer Zelle erfasst, nicht nur den Bereich unter der Pipettenmündung.

Hierzu wurde eine feine Glaspipette mit einem Spitzendurchmesser von etwa 1 μm unter mikroskopischer Sicht an die Membran einer Zelle herangeführt und aufgesetzt. Durch die vorsichtige Erzeugung eines leichten Unterdrucks in der Pipette wurde nun die Zellmembran an die Pipettenspitze angesaugt, wobei ein hoher elektrischer Abdichtwiderstand von mehreren Gigaohm aufgebaut wurde. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde ein Abdichtungswiderstand von $>1 \text{ G}\Omega$ erzeugt. Dieser hohe Abdichtwiderstand zwischen Zellmembran und Pipette wird Gigaseal genannt. Vorteil des Gigaseal ist, dass der Leckstrom, welcher durch die Verletzung der Zellmembran entsteht, auf eine nicht nennenswerte Größe reduziert wird. Eine glatte Zelloberfläche, saubere Pipetten sowie die

Verwendung gefilterter Lösungen sind Grundvoraussetzungen für das Erzielen eines hohen Gigaseal.

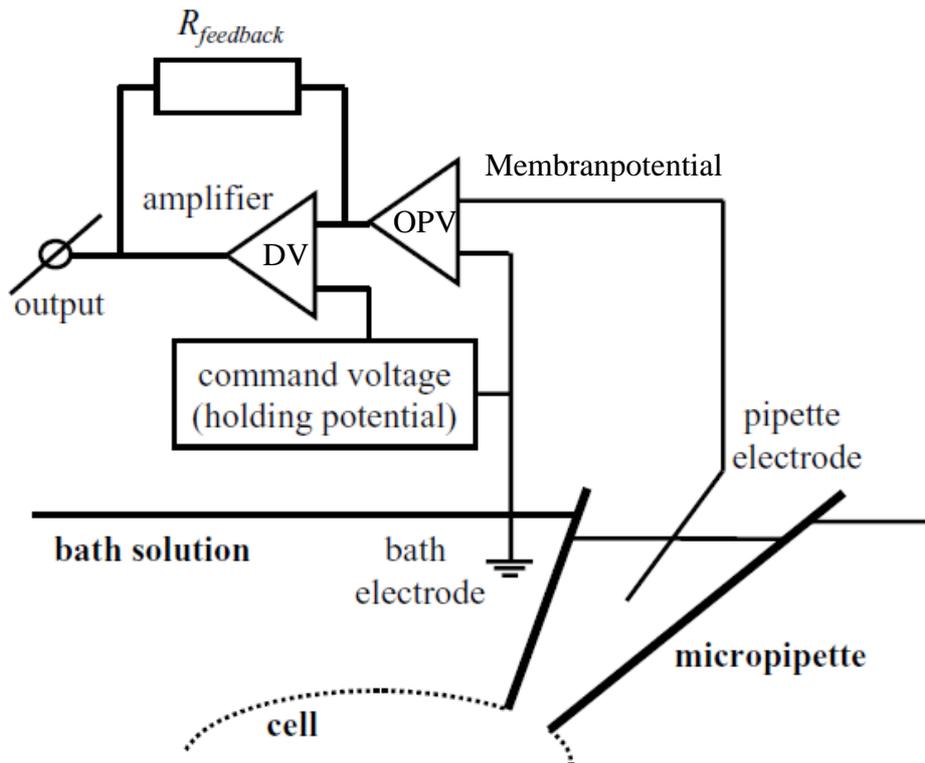


Abbildung 10: Die *Whole-Cell-Konfiguration* nach Molleman (2003a)

Der Verstärker (*amplifier*) besteht aus einem Operationsverstärker (OPV) mit einem Rückkopplungswiderstand ($R_{feedback}$), der das Membranpotential so lange ändert bis es zu einem Ausgleich zwischen Membranpotential und Kommandopotential (*command voltage*) kommt. Der dazu benötigte Strom wird am Strom-Monitor (output) des Differenzverstärkers (DV) gemessen.

2.3.3 Herstellung von Glas-Patchpipetten und Ag/AgCl-Elektroden

Für die Herstellung der Mikropipetten wurden Kapillaren aus Borosilikatglas mit Filament mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 1,17 mm verwendet (Science Products, Hofheim, Deutschland). Die Pipetten wurden jeweils kurz vor dem Experiment mit einem horizontalen Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal Puller, Zeitz Instrumente, Augsburg, Deutschland) hergestellt. Die Glaskapillare wird unter Zug im Lumen einer mit definierten elektrischen Strömen durchflossenen Wendel in zwei

Patchpipetten getrennt. Die Pipetten wurden luftfrei von hinten mit der Intrazellulärlösung (Pipettenlösung) befüllt. Bei den vorliegenden Experimenten hatten die Pipetten beim Eintauchen in die Badlösung einen elektrischen Widerstand zwischen 1 und 2 M Ω . Jede Pipette wurde nur für ein einziges Experiment benutzt.

Um Ag/AgCl-Elektroden zu erhalten, wurden Silberdrähte ($l = 5 \text{ cm}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, Science Products, Hoffheim, Deutschland) in Hypochlorid-Lösung chloridiert. Hierzu wurden die Silberdrähte für ca. 30 min. in eine Chloridlösung getaucht bis sich eine graue, dunkle Beschichtung entwickelte. Diese wurden in die Pipettenhalter eingespannt. Die mit Intrazellulärlösung befüllten Pipetten wurden so in den Pipettenhaltern fixiert, dass die Ag/AgCl-Elektroden in die Lösung eintauchten. Die Elektroden wurden während des Experiments auf ihre Beschichtung hin überprüft und ggf. erneut chloriert, um ein konstantes Pipettenpotential zu erzeugen.

2.3.4 Herstellung von Pipetten- und Badlösung

Für die Herstellung der Pipetten- und Badlösung wurden Reagenzien von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany) verwendet.

Die Pipettenlösung für die Ganzzelleableitung von tsA201-Zellen enthielt 105 mM CsF, 35 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH = 7,4.

Die Badlösung enthielt 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH = 7,4. Der pH-Wert wurde auf 7,4 mit CsOH titriert.

2.4 Analyse der Patch-Clamp-Daten

2.4.1 Strom-Spannungs-Kurve

Beim Aktionspotential werden bestimmte spannungsabhängige Ionenkanäle durch Depolarisation geöffnet und mit einer gewissen Verzögerung inaktiviert. Nach Wiederherstellung des negativen Ruhemembranpotentials gehen die Kanäle dann erneut in den aktivierbaren Zustand über.

Die Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle erfolgte durch depolarisierende Spannungssprünge. Ausgehend von einem Haltepotential von -140 mV wurde das Membranpotential für kurze Zeit erhöht, sodass Natriumkanäle öffneten und Na^+ entlang eines elektrischen und chemischen Gradienten in die Zelle einströmte. Die Spannungssprünge waren jeweils 25 ms lang und erhöhten sich mit jedem Durchgang um $7,5$ mV. Insgesamt wurde die Zellmembran im Bereich von -105 bis $+67,5$ mV also 23 mal depolarisiert (Abbildung 11, unten).

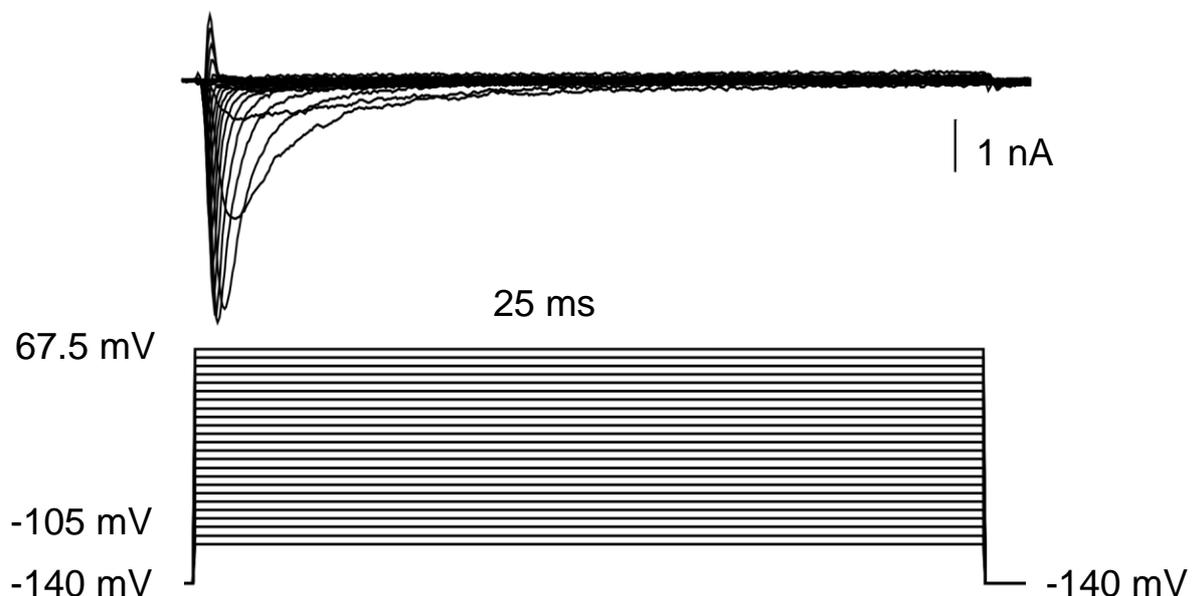


Abbildung 11: Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle. Oben: Stromantwort, unten: vorgegebene Spannung.

Die Depolarisation bewirkte Einwärtsströme (negatives Vorzeichen, Auslenkung nach unten), die nach Erreichen einer maximalen Amplitude wieder kleiner wurden (Abbildung 11, Seite 46). Bei Spannungen positiver als das Nernst-Potential für Na⁺ kehrten die Ströme ihre Richtung um und werden als Auswärtsströme (positives Vorzeichen, Auslenkung nach oben) dargestellt. Das Nernst-Gleichgewichts-Potential für Natrium liegt bei +70 mV.

2.4.2 Die spannungsabhängige Aktivierung

Die spannungsabhängige Aktivierung beschreibt den Zusammenhang zwischen der Membranspannung V und der Leitfähigkeit g der Natriumkanäle. Die Leitfähigkeit für Na⁺ (g_{Na^+}) wurde wie folgt berechnet:

$$g_{Na^+} = \frac{I_{Na^+}}{V - V_{rev}}$$

I_{Na^+} steht für den Strom, der bei einem vorgegebenen Potential V gemessen wurde. V_{rev} ist das Umkehrpotential, das anhand der I - V -Kurve bestimmt wurde. Nach Auftragen der Leitfähigkeit g_{Na^+} gegen die Spannung V , zeigten die Datenpunkte einen annähernd sigmoiden Verlauf. Dieser wurde durch eine Boltzmann-Funktion beschrieben:

$$g_{Na^+}(V) = \frac{g_{max}}{1 + \exp\left(\frac{V - V_{1/2}}{k_V}\right)}$$

Die Leitfähigkeitswerte g_{Na^+} wurden auf den Maximalwert g_{max} normiert. k_V ist ein Maß für die Steilheit der Kurve, d. h. für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung: je steiler die Kurve, desto mehr Natriumkanäle waren in dem Spannungsfenster aktiviert. $V_{1/2}$ ist der Wert für die Spannung, bei der genau die Hälfte der Kanäle geöffnet war.

2.4.3 Die spannungsabhängige Inaktivierung

Bei anhaltender Depolarisation schlossen die Natriumkanäle wieder. Nach ihrer Aktivierung inaktivieren die Natriumkanäle mit einer zeitlichen Verzögerung von

wenigen Millisekunden. Die Inaktivierung ist zusammen mit dem verzögerten Öffnen spannungsabhängiger Kaliumkanäle während eines Aktionspotentials für die Repolarisation der Zellmembran zurück zum Ruhemembranpotential verantwortlich. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Natriumkanälen im Gleichgewichtszustand (*steady state*) wurde untersucht, indem die Zelle durch einen konditionierenden Spannungssprung von -170 bis -27,5 mV in 7,5 mV Schritten depolarisiert wurde. Durch die Spannungsschritte wurden die Natriumkanäle unterschiedlich stark inaktiviert. Die Dauer der Depolarisation mit 300 ms war lang genug, um den *steady state* der Inaktivierung zu erreichen. Anschließend wurden Spannungssprünge auf 0 mV für 4 ms angelegt, wodurch die Zellmembran auf ein Potential in der Nähe von V_{peak} depolarisiert wurde (Abbildung 12, unten).

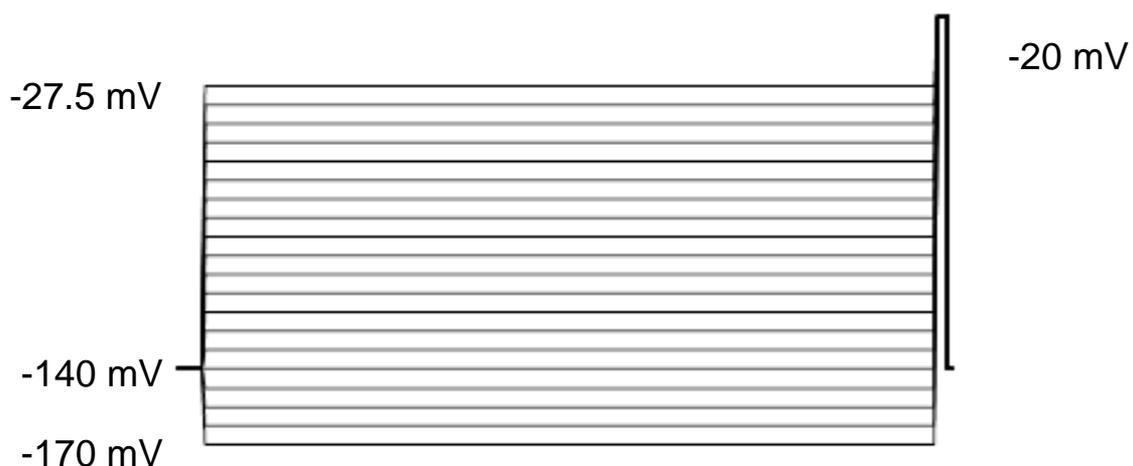


Abbildung 12: Patch Clamp-Protokoll für die Inaktivierung

Die Amplituden der durch den Sprung nach V_{peak} erzeugten Natriumströme wurden auf den größten Wert I_{max} normiert. Nach Auftragen des Quotienten I / I_{max} gegen die Spannung V des konditionierenden Pulses, erhielt man eine sog. *steady state* Inaktivierungskurve mit einem charakteristischen sigmoiden Verlauf, der durch die Boltzmann-Funktion beschrieben wurde:

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

$V_{1/2}$ entsprach in diesem Fall der Spannung, bei der die Hälfte der Natriumkanäle inaktiviert waren. Bei einem annähernd physiologischen Ruhemembranpotential standen nur noch die Hälfte der von der Zelle exprimierten Natriumkanäle zur Verfügung.

Die Zeitkonstante der Inaktivierung τ_h kann durch eine Exponentialfunktion 2. Ordnung beschrieben werden:

$$I(t) = A_f \exp[-(t - t_0)\tau_f] + A_s \exp[-(t - t_0)\tau_s] + C$$

Hierbei war der Wert für die Zeitkonstante der langsamen Inaktivierung τ_s (*tau slow*) klein, sodass die Zeitkonstante τ_f (*tau fast*) der Zeitkonstante für die schnelle Inaktivierung τ_h entsprach.

2.4.4 Refraktärität

Nach einem Aktionspotential schließt sich eine Phase der Unerregbarkeit an. In der absoluten Refraktärzeit sind keine weiteren Aktionspotentiale auslösbar. Hierauf folgt eine relative Refraktärzeit. Die Erholung (*Recovery*) beginnt, sobald das Membranpotential nach Depolarisation wieder den Ruhewert von -70 mV erreicht. Durch ein Doppelpulsprotokoll wurde der zeitliche Verlauf gemessen: die Zellmembran wurde zunächst von einem Haltepotential aus von -140 mV für 100 ms auf -20 mV hyperpolarisiert (Referenzstrom), um alle Natriumkanäle zu inaktivieren. Diese erste Depolarisation nach -20 mV induzierte einen großen transienten Natriumstrom (Amplitude A_1), der mit der oben untersuchten Kinetik inaktiviert und als Referenz für die zweite Stromamplitude (Amplitude A_2) diente. Anschließend wurden Spannungssprünge nach -100 mV durchgeführt, die durch variable Zeitintervalle voneinander getrennt waren, um die spannungsabhängige Inaktivierung aufzuheben und die Funktion der Natriumkanäle wiederherzustellen. Die darauffolgende zweite Depolarisation (-20 mV) wurde

nach zunehmenden Zeitintervallen durchgeführt. Die Zeitkonstante der Recovery τ_{rec} fand mit einer anfänglichen Verzögerung statt und konnte durch eine Exponentialfunktion 2. Ordnung beschrieben werden ($t_0 = delay$, $C = offset$, $\tau_1 = \text{Zeitkonstante 1}$, $\tau_2 = \text{Zeitkonstante 2}$):

$$I(t) = A_1 \left(1 - \exp \left[- \frac{t - t_0}{\tau_1} \right] \right) + A_2 \left(1 - \exp \left[- \frac{t}{\tau_2} \right] \right) + C$$

2.5 Auswertung und statistische Verfahren

Die erhobenen Daten wurden mit dem Software-Programm pCLAMP (Molecular Devices, USA) aufgezeichnet und mit Origin 6.0 (OriginLab Inc., Northampton, USA.) und Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) analysiert. Die statistischen Berechnungen erfolgten durch die Software *Graph Pad Prism 6* (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die Daten wurden auf Normalverteilung hin überprüft und für die statistische Auswertung wurde der *Student's t-test* verwendet. Die Anzahl der gewerteten Zellen wird durch „n“ beziffert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) angegeben. Das Signifikanzniveau ist durch $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Elektrophysiologische Analyse der Mutation in der 1. Familie

An transient transfizierten tsA201-Zellen wurden durch Depolarisationen, ausgehend vom Ruhemembranpotential von -140 mV, Natriumströme gemessen. N1735K-mutierte Ionenkanäle zeigten eine Reduktion der Stromdichte auf die Hälfte im Vergleich zu Wildtyp-Kanälen (Abbildung 13, unten).

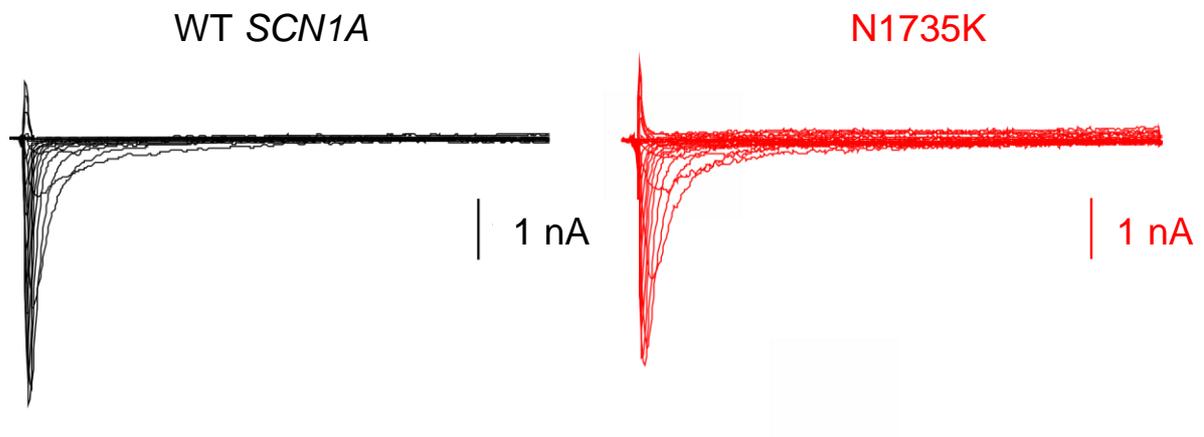


Abbildung 13: Repräsentative Aufzeichnung von Natriumströme in transfizierten tsA201-Zellen. Schwarz: *SCN1A* Wildtyp; Rot: Mutation N1735K.

4.1.1 Natriumstromdichte der Zellen

Die spannungsabhängigen Stromdichten wurden aus dem Quotienten des gemessenen Maximalstroms und der Zellkapazität ermittelt (pA/pF), da letztere proportional zur Zellgröße ist und die Kapazität der Zelle als 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ angenommen wird (Kandel et al., 2000). Da die Zellgröße proportional zur Amplitude des gemessenen Stromes einer Zelle ist, wurde als Angabe der Stromdichte auf die Zellgröße normiert.

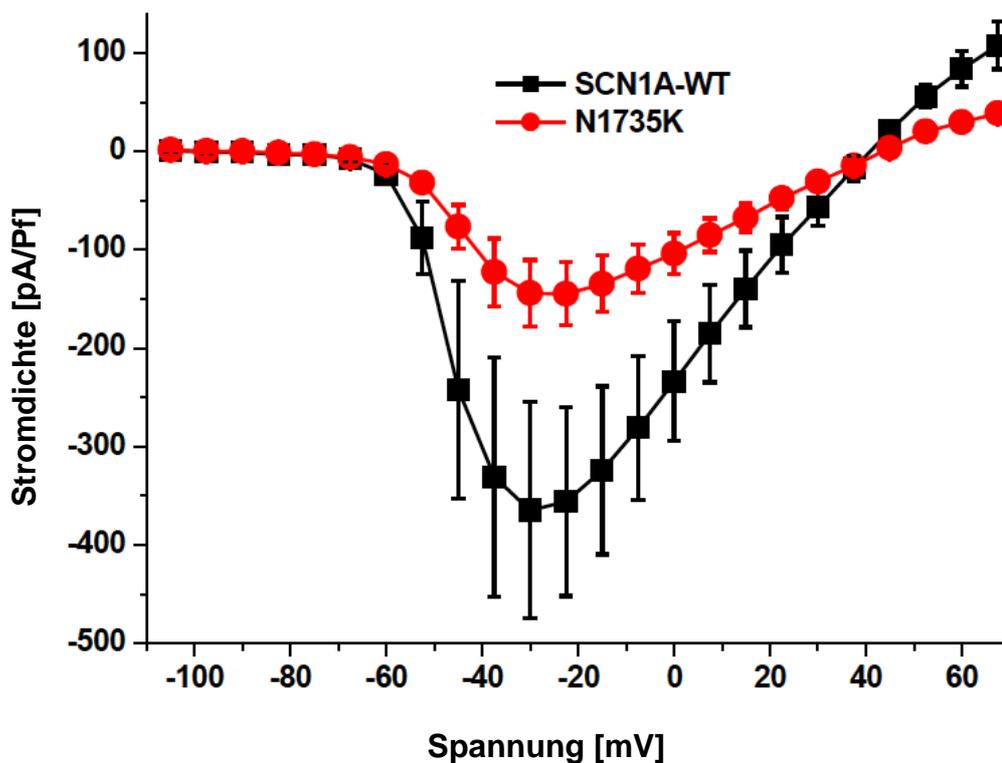


Abbildung 14: Stromdichte bei verschiedenen Depolarisationen. Schwarz: *SCN1A* Wildtyp; Rot: Mutation N1735K (Farbkodierung in allen folgenden Darstellungen beibehalten).

N1735K-mutierte Ionenkanäle zeigten eine Reduktion der maximalen Stromdichte auf ca. ein Drittel ($-382,53 \pm 129,44$ vs. $-129,38 \pm 24,53$ pA/pF, $n = 9$) im Vergleich zu Wildtyp-Kanälen (Abbildung 14, oben; Tabelle 8, Seite 57).

4.1.2 Aktivierung und Inaktivierung der Natriumkanäle

Die *steady state* Aktivierungskinetik der Natriumkanäle wurde mit einer Boltzmann-Gleichung gefittet. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung (Abbildung 15, unten). Bei den Messungen des Aktivierungsverhaltens der Natriumkanäle der transfizierten Zellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($-42,4 \pm 1,9$ vs. $-41,2 \pm 2,0$ mV, $n = 10$ bzw. 6 , $p = 0,69$) hinsichtlich $V_{1/2}$ als Wert für die Spannung, bei der die Hälfte aller Natriumkanäle geöffnet ist (Tabelle 8, Seite 57). Bei der Steigung k zeigte sich ein gering signifikanter Unterschied ($-5,1 \pm 0,4$ vs. $-6,5 \pm 0,4$, $n = 10$ bzw. 6 , $*p < 0,05$) zwischen Wildtyp und Mutation des transfizierten Natriumkanals (Tabelle 8, Seite 57).

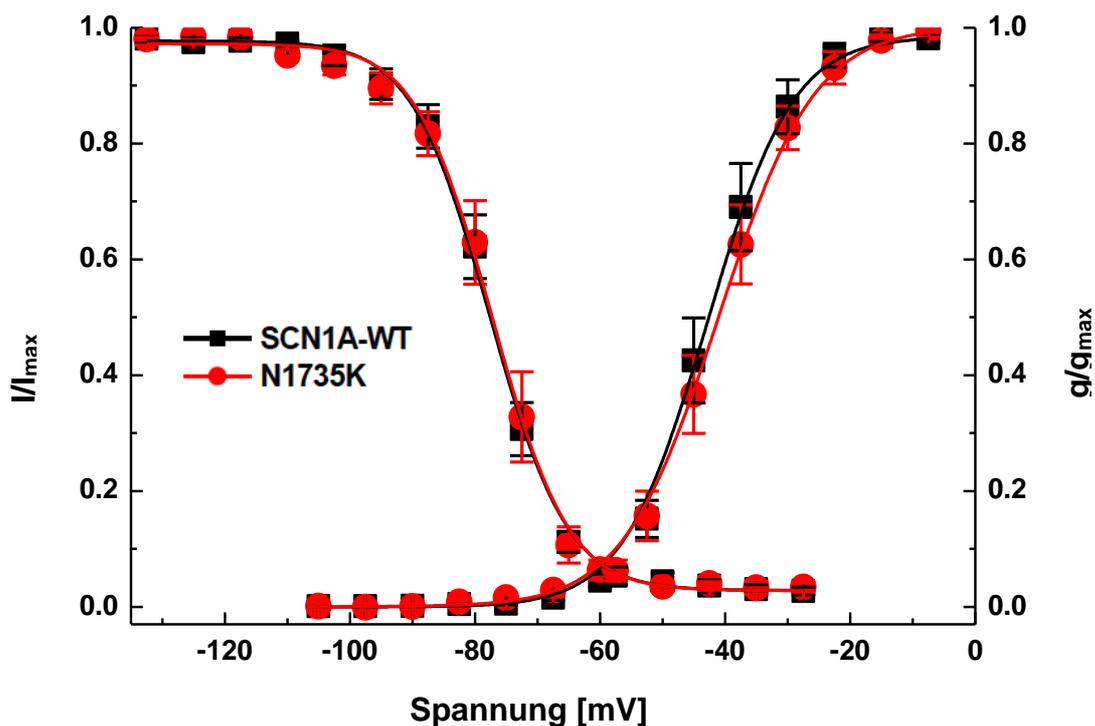


Abbildung 15: Spannungsabhängigkeit der Natriumströme bei der *steady state* Aktivierung und Inaktivierung.

Bei den Messungen des Inaktivierungsverhaltens der Natriumkanäle der transfizierten Zellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($-77,7 \pm 1,4$ vs. $-77,3 \pm 2,0$ mV, $n = 8$ bzw. 6 , $p = 0,89$) hinsichtlich $V_{1/2}$ als Wert für die Spannung, bei der die Hälfte aller Natriumkanäle inaktiviert ist (Abbildung 15, Seite 54; Tabelle 8, Seite 57). Bei der Steigung k zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($5,5 \pm 0,3$ vs. $5,4 \pm 0,4$, $n = 6$ bzw. 6 , $p = 0,84$) zwischen Wildtyp und Mutation des transfizierten Natriumkanals (Tabelle 8, Seite 57).

4.1.3 Zeitkonstante Tau der schnellen Inaktivierung

Um den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung der Natriumkanäle zu bestimmen, wurde die schnelle Zeitkonstante τ_h bestimmt. Die Kinetik der schnellen Inaktivierung zeigte im Vergleich zum Wildtyp keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 16, unten; Tabelle 8, Seite 57).

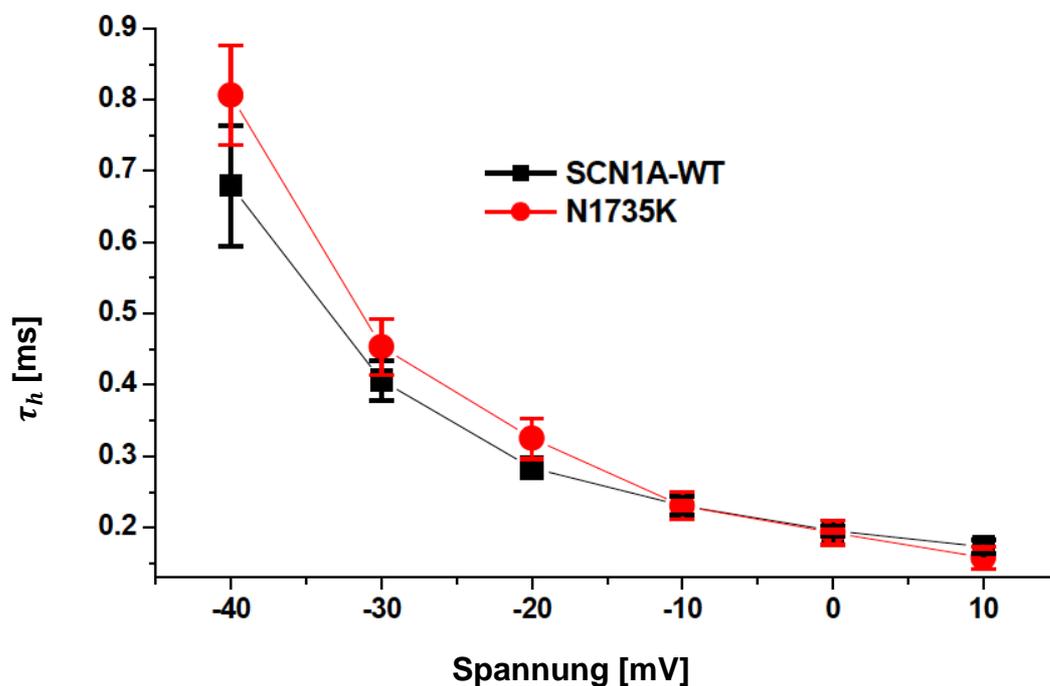


Abbildung 16: Spannungsabhängige Zeitkonstante der Inaktivierung.

4.1.4 Erholung der Natriumkanäle ausgehend von einem Membranpotential von -100 mV

Um die Refraktärität nach der schnellen Inaktivierung zu bestimmen, wurde die Erholung von der schnellen Inaktivierung gemessen. Dazu wurden die Erholungszeiten der Kanäle vom Haltepotential von -140 mV ausgehend, nach immer länger gewählten Zeitabständen, gemessen. Es fand sich eine signifikante Verlangsamung ($3,5 \pm 0,4$ vs. $6,7 \pm 0,5$ ms, $n = 7$ bzw. 6 , $***p < 0.001$) im zeitlichen Verlauf der Erholung von der schnellen Inaktivierung (Abbildung 17, unten; Tabelle 8, Seite 57). Somit zeigt die N1735K-Mutation einen deutlichen Funktionsverlust (*loss of function*).

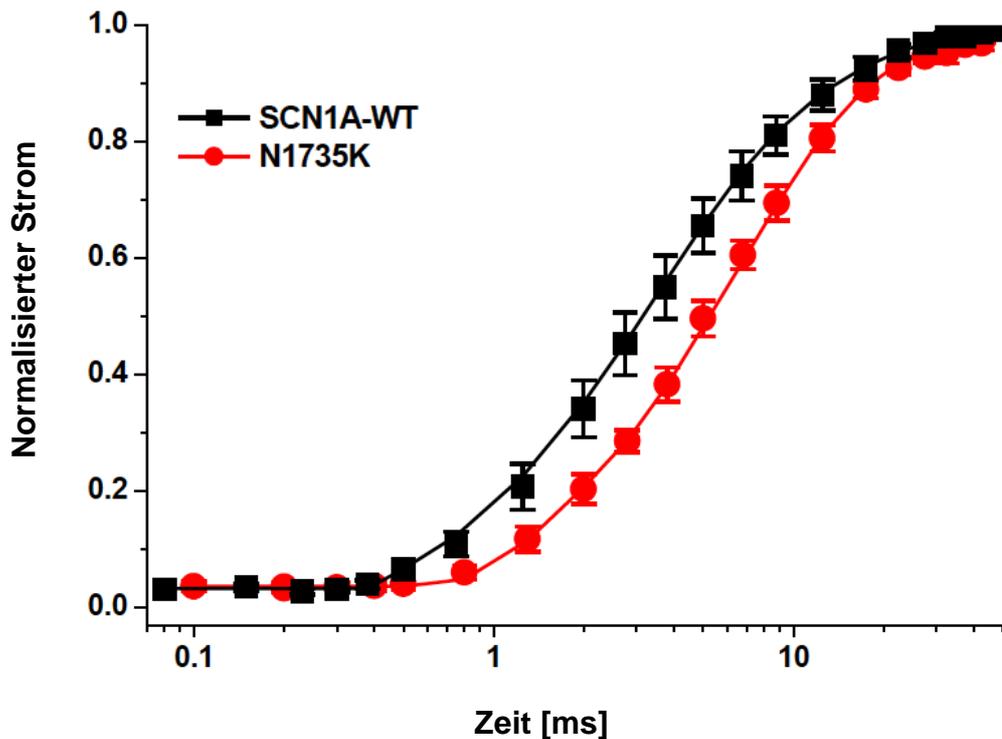


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Erholung der Natriumkanäle von der schnellen Inaktivierung. $***p < 0.001$

Tabelle 8: Elektrophysiologische Ergebnisse (Mittelwert \pm Standardfehler) für die Untereinheiten α_1 Wildtyp + β_1 + β_2 und α_1 mit der Mutation N1735K + β_1 + β_2

		n	Wildtyp	n	N1735K
Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	$V_{1/2}$ [mV]	10	$-42,4 \pm 1,9$	6	$-41,2 \pm 2,0$
	k	10	$-5,1 \pm 0,4$	6	$-6,5 \pm 0,4$
Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung	$V_{1/2}$ [mV]	8	$-77,7 \pm 1,4$	6	$-77,3 \pm 2,0$
	k	8	$5,5 \pm 0,3$	6	$5,4 \pm 0,4$
Erholung nach der schnellen Inaktivierung bei -100 mV	τ_{rec} [ms]	7	$3,5 \pm 0,4$	6	$6,7 \pm 0,5$
Zeitkonstante der Inaktivierung bei 0 mV	τ_h [ms]	8	$0,2 \pm 0,01$	5	$0,2 \pm 0,01$
Maximale Stromdichte	[pA/pF]	9	$-382,53 \pm 129,44$	9	$-129,38 \pm 24,53$

4.2 Elektrophysiologische Analyse der Mutation in der 2. Familie

Ionenkanäle mit der M1438T-Mutation zeigten sehr kleine Natriumströme, die ähnlich den endogenen Strömen in Zellen waren, die nicht transfiziert wurden (Abbildung 18, unten). Das bedeutet, dass die M1438T-Mutation zu einem kompletten Funktionsverlust (*loss of function*) des Natriumkanals führt. Der gemessene Strom war so klein, dass auf eine weitere Auswertung der Inaktivierung verzichtet wurde.

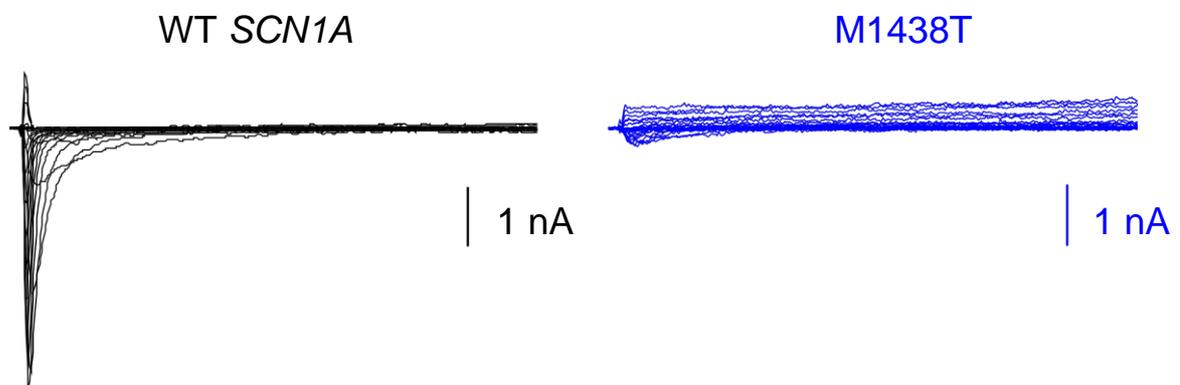


Abbildung 18: Repräsentative Aufzeichnung von Natriumströme in transfizierten tsA201-Zellen. Schwarz: *SCN1A* Wildtyp; Blau: Mutation M1438T.

5 Diskussion

5.1 Beschreibung der klinischen Daten der zwei Familien und der gefundenen Mutationen

Es handelt sich um zwei spanische Familien mit GEFS⁺ (Generalisierte genetische Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus), eine Erkrankung mit familiärer Assoziation von Fieberkrämpfen und epileptischen Anfällen, die dominant mit reduzierter Penetranz vererbt wird. Die erste Familie hatte relativ milde Verlaufsformen von epileptischen Anfällen. Die häufigsten Anfallstypen waren Fieberkrämpfe, Fieberkrämpfe Plus und Fieberkrämpfe Plus mit Absencen. Fokale Anfälle, wie sie bereits in anderen Familien mit GEFS⁺ beschrieben sind, zeigten sich im Elektroenzephalogramm als temporale Spikes bei drei Personen und eine Person zeigte eine Temporallappenepilepsie. In der ersten Familie tauchten keine schweren Phänotypen wie Dravet-Syndrom, myoklonisch-astatische Epilepsie oder schwer kontrollierbare Epilepsie im Kindesalter mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen auf.

In der zweiten Familie war das Dravet-Syndrom (Severe myoclonic epilepsy of infancy, SMEI) die schwerste Verlaufsform. Das Dravet-Syndrom ist die schwerste Verlaufsform der GEFS⁺. Weitere Familienmitglieder hatten Fieberkrämpfe oder Fieberkrämpfe Plus. In Familien mit Dravet-Syndrom treten *SCN1A*-Mutationen häufig *de novo* auf.

Der plötzliche Tod trat in beiden Familien mit einer höheren Inzidenz als in der Restbevölkerung auf und war auch häufiger als bei anderen Epilepsieformen. In der 1. Familie starben drei Familienmitglieder unerwartet ohne erkennbare Todesursache. Zwei der drei Personen hatten eine diagnostizierte Epilepsie. Eine Person verstarb unbeobachtet im Alter von 38 Jahren im häuslichen Umfeld. Es gab keine Anzeichen von einem vorausgegangenen Anfallsgeschehen oder Herz- und Lungenerkrankungen. Auch in der Autopsie konnte keine Todesursache festgestellt werden. Zwei Familienmitglieder

verstarben im Alter von zwei Jahren im Schlaf, wobei nur bei einer Person eine Epilepsieerkrankung zum Zeitpunkt des Todes bekannt war.

In der zweiten Familie starben drei Familienmitglieder unerwartet. Zwei von den drei Personen hatten eine Phase von wiederholten und häufigen Krämpfen und starben im Alter von sechs und vier Jahren. Die dritte Person hatte keine bekannte Epilepsie als sie im Alter von sieben Monaten verstarb.

Mit einer Inzidenz von 6 – 18,4 pro 1000 Patientenjahre ist SUDEP in den beiden untersuchten Familien viel höher als in der Kohorte der Epilepsiepatienten.

14 – 20% der Patienten mit Dravet-Syndrom sterben im frühen Kindesalter oder jungen Erwachsenenalter. Eine häufige Ursache ist SUDEP (*Sudden Unexpected Death in Epilepsy Patients*), der plötzlich auftretende, unerwartete Tod bei Epilepsie (Genton et al., 2011, Oguni et al., 2001, Akiyama et al., 2010).

Hindocha et al. (2008) berichteten erstmalig über eine Familie mit GEFS⁺ und einer identifizierten *SCN1A*-Mutation, in der zwei Fälle von SUDEP auftraten. Bisher sind nur sehr wenige Fälle in der Literatur von SUDEP bei GEFS⁺-Patienten beschrieben.

Der Hypothese folgend, dass kardiale Störungen zu SUDEP führen könnten, wurde die Herzfunktion bei betroffenen und nicht betroffenen Mitgliedern der ersten Familie evaluiert. Die komplette kardiologische Untersuchung bei vier betroffenen Personen und drei Kontrollpersonen zeigte keinen Zusammenhang der *SCN1A*-Mutation mit einer Herzrhythmusstörung. Daher ist eher davon auszugehen, dass SUDEP bei diesen Patienten nicht durch eine persistierende Funktionsstörung bedingt ist.

Insgesamt wurden im Auftrag unserer spanischen Kollaborationspartner in einem externen Molekulargenetischen Labor Analysen an 46 Personen der ersten Familie und an 10 Personen der zweiten Familie durchgeführt. DNA wurde aus Leukozyten aus dem peripheren Blut extrahiert. Durch Mangel an

DNA von den betroffenen Personen, die an SUDEP oder durch plötzlichen Tod (SUD) verstarben, konnte nicht bewiesen werden, dass sie die Mutation trugen. Jedoch waren die Stammbaumdaten und die Phänotypen starke Indizien dafür, dass mindestens vier der sechs plötzlich verstorbenen Personen dieselbe familiäre Mutation trugen. Angenommen, dass die zwei Personen, die nicht an Epilepsie erkrankt waren, Mutationsträger waren, könnte dies dafür sprechen, dass der plötzliche Tod in keinem Zusammenhang mit epileptischen Anfällen steht.

In der ersten Familie wurde bei vier an Epilepsie erkrankten Familienmitgliedern die kodierende Region für das *SCN1A*-Gen sequenziert und eine neue heterozygote Mutation c.5172 C→G gefunden. Anschließend wurde die Sequenzierung auch bei allen anderen Familienmitgliedern durchgeführt und bei allen Personen, außer bei einer Person, festgestellt. Auch bei nicht an Epilepsie erkrankten Familienmitgliedern war die Mutation nachweisbar. Diese Mutation führte zur Substitution von Lysin anstelle von Aspartat (N1735K) in der letzten extrazellulären Schleife zwischen der Porenhelix und Segment S6 der Domäne IV des Natriumkanals Nav1.1.

In der zweiten Familie wurde bei einem Familienmitglied eine Sequenzierung der kodierenden Region für das *SCN1A*-Gen durchgeführt und eine neue heterozygote Mutation c.4280 T→C gefunden. Diese Mutation war auch bei allen erkrankten Familienmitgliedern nachweisbar. Diese Mutation führte zur Substitution von Methionin anstelle von Threonin (M1438T) in der extrazellulären Schleife zwischen den α -helikalen Segmenten S5 und S6 der Domäne III des Natriumkanals Nav1.1.

5.2 Elektrophysiologische Konsequenzen der Mutationen und Diskussion der Methodik

Für die elektrophysiologische wurden sowohl der WT als auch die beiden *SCN1A*-Mutationen einzeln in tsA201-Zellen überexprimiert. Die elektrophysiologischen Messungen der Natriumströme wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durchgeführt und die Ergebnisse von WT und Mutationen miteinander verglichen. In der elektrophysiologischen Analyse der gefundenen Mutationen zeigte sich in der ersten Familie eine Reduktion der Stromdichte auf die Hälfte im Vergleich zu Wildtyp-Kanälen. Zudem wurde eine signifikante Verlangsamung bei der Erholung von der schnellen Inaktivierung aufgezeichnet. Somit zeigte die N1735K-Mutation einen deutlichen Funktionsverlust (*loss of function*). In der zweiten Familie zeigte die M1438T-Mutation nur sehr kleine Natriumströme und somit einen kompletten *loss of function*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden Mutationen c.5172 C→G und c.4280 T→C eine pathophysiologisch relevante Strukturänderung des Nav1.1 Kanals bewirkte und es dadurch zu einer Abnahme bzw. einem Verlust der regulären elektrophysiologischen Funktion des Kanals kam. Der Funktionsverlust der Kanäle, die für den Einwärtsstrom der Natriumionen in die Zelle sorgen, könnte ursächlich für die familiären Epilepsiesyndrome und die gehäuften, plötzlichen Todesfälle bei diversen Familienmitgliedern sein.

Die Methode der Patch-Clamp-Technik an tsA-Zellen ist ein etabliertes Verfahren für die Untersuchung von Natriumkanälen. Sie stellt jedoch lediglich ein *in vitro* Modell für die physiologische Funktion der mutierten Natriumkanäle dar. Das Verhalten der Ionenkanäle wird durch die chemische Zusammensetzung der Pipetten- und Badlösung, die Osmolarität, den pH-Wert, sowie die Temperatur, bei der die Experimente durchgeführt werden, beeinflusst. Eine Kontrolle über die Zusammensetzung der Intra- und Extrazellulärlösung ist von Vorteil und dient beispielsweise auch pharmakologischen Untersuchungen. Aber es könnte sich auch als Nachteil

erweisen, da es beim Öffnen der Zelle mit der Pipettenspitze zu einem Austausch zwischen der Intra- und Extrazellulärlösung kommt und Botenstoffe ausgewaschen werden, die einen Einfluss auf Signalwege der Zelle und Modulationen der Kanäle haben könnten.

Eine Expression der Mutationen in Neuronen oder im Mausmodell ist notwendig, um die molekularen Mechanismen, die zum Funktionsverlust des Nav1.1 Kanals führen, besser zu verstehen.

5.3 Einordnung der Mutationen in den physiologischen Kontext

Der spannungsabhängige Natriumkanal Nav1.1 kommt in den Zellkörpern und Dendriten der Neurone vor (Westenbroek et al., 1989). Mutationen des kodierenden *SCN1A*-Gens verursachen GEFS⁺ und das Dravet-Syndrom, wie sie in den beiden Familien vorkamen. In Familien mit Dravet-Syndrom treten *SCN1A*-Mutationen häufig *de novo* auf und zeigen Haploinsuffizienz des Nav1.1-Ionenkanals, sodass ein kompletter *loss of function* des Ionenkanals auftritt (Claes et al., 2001).

Loss of function Mutationen, wie die hier untersuchten Mutationen N1735K und M1438T können in unterschiedlichen Hirnarealen die Natriumkanalströme reduzieren und die Generierung des Aktionspotentials stören. Die Inhibitionswirkung von inhibitorischen Interneuronen kann aufgehoben werden und es kann durch Hyperexzitabilität zu epileptischen Anfällen kommen.

Epileptische Anfälle können lebenswichtige Funktionen des Hirnstamms unterdrücken (Devinsky, 2011). Ein Netz von Nervenzellen, welches das ganze Hirnstammtegmentum durchzieht, wird *Formatio reticularis* genannt. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, lebensnotwendige Funktionen wie zum Beispiel den Schlaf-Wach-Rhythmus oder den Hustenreflex zu koordinieren. In der *Formatio reticularis* lassen sich weniger morphologisch, vielmehr funktionell einzelne Zentren abgrenzen, u.a. das „Weckzentrum“ (ARAS, aufsteigendes retikuläres aktivierendes System) und das Atemzentrum. Das Atemzentrum befindet sich hauptsächlich im Bereich der *Medulla oblongata* und besteht aus (ventro)lateralen Teilen der *Formatio reticularis*, dem sog. PräBötzinger Komplex. Der PräBötzinger Komplex spielt dabei eine essentielle Rolle bei der Generierung des Atemrhythmus (Abbildung 19, Seite 65).

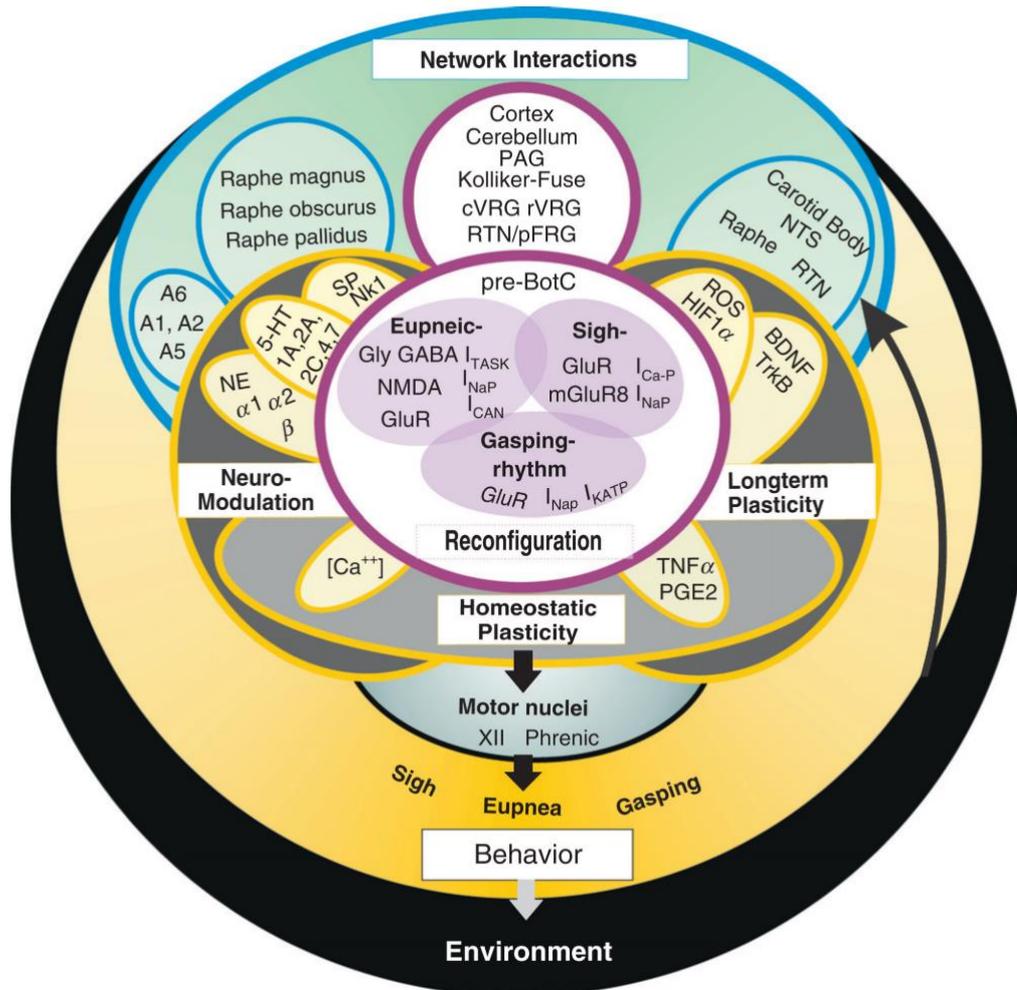


Abbildung 19: Schema von von Garcia et al. (2011) der neurophysiologischen Netzwerke, die an der Atmung beteiligt sind. Der PräBötzinger Komplex (pre-BotC) spielt mit dem persistierenden Natriumstrom I_{NaP} und dem Kalzium-aktivierten unspezifischen Kationenstrom I_{CAN} eine zentrale Rolle.

Für den Atemrhythmus spielen zwei Arten von Einwärtsströmen, der persistierende Natriumstrom I_{NaP} und der Kalzium-aktivierte unspezifische Kationenstrom I_{CAN} , eine Rolle. Diese Ionenströme steuern die autonome Schrittmacheraktivität in Neuronen des Atemzentrums (Ramirez et al., 2011). Der persistierende Natriumstrom I_{NaP} im PräBötzinger Komplex wird bestimmt durch die α -Untereinheiten der Nav1.1- und Nav1.2-Kanäle (Ptak et al., 2005).

Der persistierende Natriumstrom ist verantwortlich für die Schnappatmung (Koch et al., 2011). Kinder, die am plötzlichen Säuglingstod versterben, haben eine normal Atmung (Eupnoe), wohingegen ihre Schnappatmung, die einen

lebenswichtigen Schutzmechanismus darstellt und ein Aufwachen bewirkt, gestört ist. *In vitro* pharmakologische Blockade des persistierenden Natriumstroms mit Riluzol unterdrückte die Schnappatmung von Mäusen (Pena and Aguilera, 2007). Das weist darauf hin, dass durch *loss of function* Mutationen an Natriumkanälen es zu einer gestörten Schnappatmung kommen kann.

Es ist unklar, welchen Zusammenhang es zwischen einem Anfallsereignis und Todesfall gibt. Im Rahmen der MORTEMUS-Studie (Mortality in Epilepsy Monitoring Unit Study) fanden systematischen retrospektiven Befragungen in Epilepsie-Monitoring-Einheiten in Europa, Israel, Australien und Neuseeland statt (Ryvlin et al., 2013)..

Aus Aufzeichnungen von Patienten, die während eines Langzeit-Video-EEG-Monitoring verstarben, wurden Daten zu allen aufgetretenen Fällen eines Herz- und Atemstillstands gesammelt, die in diesen Einheiten erhoben worden waren. Eine Gruppe von Fachleuten überprüfte die vorliegenden Daten, die Langzeit-Video-EEG-Aufzeichnungen und Elektrokardiogramme. Die Fälle mit einem Herz- und Atemstillstand wurden folgendermaßen unterteilt:

- SUDEP-Todesfall (definitiv oder wahrscheinlich),
- Beinahe-SUDEP (tödlich oder nicht-tödlich) und
- Nicht-SUDEP.

Es wurden 29 Fälle mit einem Herz- und Atemstillstand festgestellt, darunter waren:

- 16 SUDEP-Todesfälle (14 Fälle traten nachts auf),
- 9 Beinahe-SUDEP-Todesfälle und
- 4 Todesfälle aus anderen Ursachen.

Die vorliegenden Daten der MORTEMUS-Studie für zehn SUDEP-Todesfälle zeigten folgendes Muster: Nach einem sekundären generalisierten tonisch-klonischen Anfall begannen die Patienten, schnell zu atmen (18 – 50 Atemzüge pro Minute), und anschließend kam es innerhalb von drei Minuten zu einer vorübergehenden oder endgültigen kardiorespiratorischen Dysfunktion; war die Dysfunktion vorübergehend, kam es später zu einem Rezidiv mit einer terminalen Apnoe innerhalb von elf Minuten nach dem Ende des Anfalls, gefolgt von einem Herzstillstand (Ryvlin et al., 2013).

In den meisten SUDEP-Fällen der MORTEMUS-Studie lag Bauchlage vor. Die Patienten blieben während des Anfalls und bis zum Tod in derselben Bauchlage und bewegten sich in keine andere Position. Zusätzlich wird während eines generalisierten tonisch-klonischen Anfalls die Atmung angehalten, die in 33% der Fälle zur Sauerstoffsättigung des peripheren Blutes von weniger als 85% führt (Bateman et al., 2008).

Eine andere Möglichkeit ist, dass serotonerge Neurone, die im Atemzentrum und Weckzentrum eine Rolle spielen, betroffen sind. Eine postiktale Unterdrückung serotonerger Neurone führt bei manchen Epilepsiepatienten zur Atemdepression und gestörtem Aufwachen. Dies kann dazu führen, dass postiktal die Atmung gestört ist und eine reflexartige Lageveränderung bei Obstruktion von Mund und Nase, z. B. in Bauchlage, nicht möglich ist (Richerson and Buchanan, 2011).

Es gibt indirekte Evidenz dafür, dass kardiogene Mechanismen bei SUDEP eine Rolle spielen. Manche Epilepsiepatienten zeigen während eines Anfalls Bradykardie oder sogar Asystolie. Eine retrospektive Analyse von Elektrokardiogrammen während 1277 Anfällen bei 69 untersuchten Patienten zeigte bei fünf Patienten ictale Bradykardien in 18% der Anfälle; zwei Patienten hatten asystolische Episoden (Odier et al., 2009). Eine weitere Studie zeichnete Elektrokardiogramme mit einem implantierten Rekorder während des Zeitraums von durchschnittlich 18 Monaten bei 19 Patienten mit refraktärer Epilepsie auf. Bei vier Patienten wurden Bradykardien oder Asystolien aufgezeichnet, sodass sie einer Herzschrittmacher-Implantation zugeführt werden mussten. Drei dieser

Episoden traten während eines Anfalls auf (Rugg-Gunn et al., 2004). Asystolien, die länger als acht Sekunden dauern, treten häufig zusammen mit diffuser Atonie auf und es kann zu Stürzen kommen (Winesett et al., 2009). Die Herzschrittmacher-Implantation reduziert Stürze bei Patienten mit anfallsbegleitender Asystolie und Bradykardie, wenn die Anfälle nicht anderweitig therapierbar sind (Strzelczyk et al., 2011).

Verlängerte QT-Intervalle wurden in einer Studie von kombinierten Elektroenzephalogramm-Elektrokardiogramm-Daten aus telemetrischen Aufzeichnungen bei 12 bis 23% der Patienten erfasst. Verlängerte QT-Intervalle können zu potentiell lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien führen (Surges et al., 2010). Diese Studie zeigte, dass Arrhythmien möglicherweise bei manchen SUDEP-Fällen beteiligt sind. Jedoch fehlt die direkte Evidenz für die Mortalität durch anfallsinduzierte kardiale Arrhythmien. Ein direkter Zusammenhang zwischen epileptischen Anfällen und kardialen Arrhythmien mit plötzlichem Herztod ist unbekannt.

5.4 Ausblick

Mausmodelle, welche die hier beschriebenen Natriumkanalmutationen tragen, können dazu beitragen, die Rolle der Mutationen in den verschiedenen Hirnarealen, wie z. B. dem PräBötzinger Komplex, für das Auftreten der plötzlichen Todesfälle bei GEFS⁺ und Dravet-Syndrom zu analysieren. Auch pharmakologische Wirkungen der Antiepileptika auf das Atemzentrum können untersucht werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen etablierten *SCN1A*-defiziente Mausmodelle oder Mausmodelle mit *SCN1A*-Mutationen. Yu et al. (2006) zeigten, dass Mäuse mit homozygoter Mutation und somit komplettem Verlust der Nav1.1 Kanäle frühzeitig innerhalb der ersten 4 Lebenswochen verstarben. Bei Mäusen mit heterozygoter *loss of function* Mutation traten epileptische Anfälle in den frühen Lebenswochen auf und der Phänotyp des epileptischen Syndroms glich dem Dravet Syndrom beim Menschen. Die Untersuchungen zeigten, dass reduzierte Natriumströme in GABAergen inhibitorischen Interneuronen zur Hyperexzitabilität führen und somit Epilepsie bei Patienten mit Dravet Syndrom verursachen können. Es wurden auch sporadische Todesfälle der Mäuse nach dem 21. Lebenstag beobachtet. Solche Mausmodelle können dazu dienen, sowohl Pharmakotherapien zu testen als auch die Pathophysiologie des SUDEP zu untersuchen. Auch beim *knock-in* Mausmodell für RX Mutationen von Ogiwara et al. (2007) wurden frühe sporadische Todesfälle in den ersten Lebensmonaten beobachtet. Sie etablierten ein Mausmodell mit dem Stopcodon R1407X im Exon 21 des *SCN1A*-Gens. RX Mutationen wurden bisher bei 3 nicht verwandten Dravet-Syndrom Patienten gefunden (Sugawara et al., 2002, Fujiwara et al., 2003, Fukuma et al., 2004) und gelten als geeignet für Mausmodelle zur Untersuchung des Dravet-Syndroms. Die Expression der Nav1.1 Kanäle befindet sich hauptsächlich im Zellkörper von Neuronen des Neokortex. Zum weiteren Verständnis der Funktion der Kanäle können die Expression des Kanals in Neuronen verschiedener Hirnareale und neurophysiologische Untersuchungen am Mausmodell beitragen. Eine derartige neurophysiologische Untersuchung am Mausmodell mit R1648H Mutation des

Nav1.1 Kanals führten Hedrich et al. (2014) durch. Patienten mit dieser Mutation präsentierten eine große Variabilität an Krämpfen wie Fieberkrämpfe, afebrile Krämpfe, generalisierte tonisch-klonische Krämpfe und Absenzen. In diesem Modell konnte in thalamokortikalen und hippocampalen Hirnschnitten eine Hyperexzitabilität festgestellt werden, die dadurch verursacht wird, dass ein Defekt der Interneuronen die Generierung eines Aktionspotentials verhindert und die Inhibition verschiedener Netzwerksysteme stört. Durch die gestörte Inhibition kommt es zur Hyperexzitabilität und epileptischen Anfällen.

Ein besseres Verständnis von Risikofaktoren, möglichen Pathomechanismen und Effekten der Behandlung fließen in das Beratungsgespräch zwischen Arzt und Patient ein. Das SUDEP-Risiko kann nicht patientenindividuell aus interiktalen Registrierungen des EEG oder anderer physiologischer Parameter abgeschätzt werden. Eine eindeutige Indikation zur SUDEP-Aufklärung besteht bei Patienten mit schwer behandelbarer Epilepsie und Hinweisen für eine mangelnde Compliance. Der beste Schutz ist eine Therapieoptimierung mit dem Ziel einer vollständigen Anfallskontrolle. Die Compliance bei der regelmäßigen Medikamenteneinnahme ist ein wichtiger Baustein. Eine weitere Risikosituation besteht bei Reduktionen oder Absetzversuchen von Antiepileptika, z. B. im Rahmen einer prächirurgischen Diagnostik. Eine epilepsiechirurgisch erzielte Anfallskontrolle kann auch unter dem Gesichtspunkt des SUDEP relevant werden. Postoperativ anfallsfreie Patienten haben ein geringeres SUDEP-Risiko als solche, die nicht anfallsfrei werden (Sperling et al., 2005).

Eine verbesserte personelle oder apparative Supervision von Patienten während Anfällen und das Vermeiden einer Bauchlage und großer Bettkissen können wahrscheinlich zu einer Reduktion von apnoebedingten SUDEP-Fällen beitragen (So, 2006).

Erkenntnisse zeigen, dass es notwendig ist, die Überwachung in Epilepsie-Monitoring-Einheiten zu verbessern. Eine Überwachung der Atmung in diesen Einheiten ist zu empfehlen und prognostische Parameter müssen durch klinische Studien untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Mutationen im Nav1.1 Kanal führen zur generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS⁺) und schweren frühkindlichen myoklonischen Epilepsie (SMEI, Dravet-Syndrom). In zwei spanischen Familien mit GEFS⁺ traten gehäufte plötzliche Todesfälle auf. In den Familien wurde jeweils eine *de novo* heterozygote Mutation im *SCN1A*-Gen gefunden, das für die α -Untereinheit des spannungsabhängiger Natriumkanals (Nav1.1) kodiert. Bisher ist in der Literatur eine *SCN1A*-Mutation in einer GEFS⁺ Familie mit zwei Fällen von SUDEP (*sudden unexpected death of epilepsy patients*) beschrieben.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden die beiden *SCN1A*-Mutationen N1735K und M1438T transient *in vitro* in tsA201-Zellen exprimiert und elektrophysiologisch analysiert. Beide Mutationen liegen in der hochkonservierten und funktionell relevanten Porenregion des humanen Nav1.1 Kanals. Elektrophysiologische Untersuchungen wurden mit der *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Technik durchgeführt.

In der elektrophysiologischen Analyse der gefundenen Mutationen zeigte sich in der ersten Familie eine Reduktion der Stromdichte auf ein Drittel im Vergleich zu Wildtyp-Kanälen. Zudem wurde eine signifikante Verlangsamung bei der Erholung von der schnellen Inaktivierung aufgezeichnet. Somit zeigte die N1735K-Mutation einen deutlichen Funktionsverlust (*loss of function*). In der zweiten Familie zeigte die M1438T-Mutation nur sehr kleine Natriumströme und somit einen kompletten *loss of function*.

Wegen fehlender klinischer Evidenz für potentiell lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen, muss davon ausgegangen werden, dass die beiden *SCN1A*-Mutationen durch andere Pathomechanismen zu SUDEP führen. Prinzipiell können alle Mechanismen, die die Sauerstoffversorgung des Gehirns oder des Herzens beeinträchtigen, letale Folgen haben.

Es ist anzunehmen, dass beide neuen *SCN1A*-Mutationen, die hier beschrieben wurden, zumindest teilweise für die plötzlichen Todesfälle in den jeweiligen Familien mit hereditärer Epilepsie verantwortlich sein könnten.

Erkenntnisse in der Pathophysiologie sollen dazu beitragen, Risikofaktoren zu analysieren und Patienten mit erhöhtem Risiko zu identifizieren, sodass Präventivmaßnahmen getroffen werden können. Durch Mutationsanalysen können Präventionsmaßnahmen in Familien mit *SCN1A*-Mutationen getroffen werden.

7 Literaturverzeichnis

- AKIYAMA, M., KOBAYASHI, K., YOSHINAGA, H. & OHTSUKA, Y. 2010. A long-term follow-up study of Dravet syndrome up to adulthood. *Epilepsia*, 51, 1043-52.
- ALEKOV, A., RAHMAN, M. M., MITROVIC, N., LEHMANN-HORN, F. & LERCHE, H. 2000. A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro. *J Physiol*, 529 Pt 3, 533-9.
- AUDENAERT, D., CLAES, L., CEULEMANS, B., LÖFGREN, A., VAN BROECKHOVEN, C. & DE JONGHE, P. 2003. A deletion in SCN1B is associated with febrile seizures and early-onset absence epilepsy. *Neurology*, 61, 854-6.
- AURLIEN, D., LARSEN, J. P., GJERSTAD, L. & TAUBOLL, E. 2012. Increased risk of sudden unexpected death in epilepsy in females using lamotrigine: a nested, case-control study. *Epilepsia*, 53, 258-66.
- BATEMAN, L. M., LI, C. S. & SEYAL, M. 2008. Ictal hypoxemia in localization-related epilepsy: analysis of incidence, severity and risk factors. *Brain*, 131, 3239-45.
- BAULAC, S., GOURFINKEL-AN, I., NABBOUT, R., HUBERFELD, G., SERRATOSA, J., LEGUERN, E. & BAULAC, M. 2004. Fever, genes, and epilepsy. *Lancet Neurol*, 3, 421-30.
- BERG, A. T., BERKOVIC, S. F., BRODIE, M. J., BUCHHALTER, J., CROSS, J. H., VAN EMDE BOAS, W., ENGEL, J., FRENCH, J., GLAUSER, T. A., MATHERN, G. W., MOSHE, S. L., NORDLI, D., PLOUIN, P. & SCHEFFER, I. E. 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51, 676-85.
- CATTERALL, W. A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26, 13-25.
- CATTERALL, W. A., GOLDIN, A. L. & WAXMAN, S. G. 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 397-409.
- CATTERALL, W. A., KALUME, F. & OAKLEY, J. C. 2010. NaV1.1 channels and epilepsy. *J Physiol*, 588, 1849-59.
- CESTELE, S., YAROV-YAROVYOY, V., QU, Y., SAMPIERI, F., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. A. 2006. Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 21332-44.

CLAES, L., DEL-FAVERO, J., CEULEMANS, B., LAGAE, L., VAN BROECKHOVEN, C. & DE JONGHE, P. 2001. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet*, 68, 1327-32.

DENAC, H., MEVISSSEN, M. & SCHOLTYSIK, G. 2001. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362, 453-79.

DEVINSKY, O. 2011. Sudden, unexpected death in epilepsy. *N Engl J Med*, 365, 1801-11.

DIBBENS, L. M., FENG, H. J., RICHARDS, M. C., HARKIN, L. A., HODGSON, B. L., SCOTT, D., JENKINS, M., PETROU, S., SUTHERLAND, G. R., SCHEFFER, I. E., BERKOVIC, S. F., MACDONALD, R. L. & MULLEY, J. C. 2004. GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet*, 13, 1315-9.

DICHGANS, M., FREILINGER, T., ECKSTEIN, G., BABINI, E., LORENZ-DEPIEREUX, B., BISKUP, S., FERRARI, M. D., HERZOG, J., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M., PUSCH, M. & STROM, T. M. 2005. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet*, 366, 371-7.

DRAVET, C. 2011. Dravet syndrome history. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 53, 1-6.

ESCAYG, A. & GOLDIN, A. L. 2010. Sodium channel SCN1A and epilepsy: mutations and mechanisms. *Epilepsia*, 51, 1650-8.

FETVEIT, A. 2008. Assessment of febrile seizures in children. *Eur J Pediatr*, 167, 17-27.

FICKER, D. M., SO, E. L., SHEN, W. K., ANNEGERS, J. F., O'BRIEN, P. C., CASCINO, G. D. & BELAU, P. G. 1998. Population-based study of the incidence of sudden unexplained death in epilepsy. *Neurology*, 51, 1270-4.

FUJIWARA, T., SUGAWARA, T., MAZAKI-MIYAZAKI, E., TAKAHASHI, Y., FUKUSHIMA, K., WATANABE, M., HARA, K., MORIKAWA, T., YAGI, K., YAMAKAWA, K. & INOUE, Y. 2003. Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain*, 126, 531-46.

FUKUMA, G., OGUNI, H., SHIRASAKA, Y., WATANABE, K., MIYAJIMA, T., YASUMOTO, S., OHFU, M., INOUE, T., WATANACHAI, A., KIRA, R., MATSUO, M., MURANAKA, H., SOFUE, F., ZHANG, B., KANEKO, S., MITSUDOME, A. & HIROSE, S. 2004. Mutations of neuronal voltage-gated Na⁺ channel alpha 1 subunit gene SCN1A in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia*, 45, 140-8.

- GAMBARDELLA, A. & MARINI, C. 2009. Clinical spectrum of SCN1A mutations. *Epilepsia*, 50 Suppl 5, 20-3.
- GARCIA, A. J., ZANELLA, S., KOCH, H., DOI, A. & RAMIREZ, J.-M. 2011. Networks within networks: The neuronal control of breathing. *Progress in brain research*, 188, 31-50.
- GENTON, P., VELIZAROVA, R. & DRAVET, C. 2011. Dravet syndrome: the long-term outcome. *Epilepsia*, 52 Suppl 2, 44-9.
- GOLDIN, A. L. 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annual Review of Physiology*, 63, 871-94.
- GOLDIN, A. L. 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol*, 13, 284-90.
- HARKIN, L. A., BOWSER, D. N., DIBBENS, L. M., SINGH, R., PHILLIPS, F., WALLACE, R. H., RICHARDS, M. C., WILLIAMS, D. A., MULLEY, J. C., BERKOVIC, S. F., SCHEFFER, I. E. & PETROU, S. 2001. Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet*, 70, 530-6.
- HEDRICH, U. B., LIAUTARD, C., KIRSCHENBAUM, D., POFAHL, M., LAVIGNE, J., LIU, Y., THEISS, S., SLOTTA, J., ESCAYG, A., DIHNE, M., BECK, H., MANTEGAZZA, M. & LERCHE, H. 2014. Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Na(V)1.1 mutation. *J Neurosci*, 34, 14874-89.
- HEDRICH, U. B. S. & MALJEVIC, S. 2016. Pathophysiologische Mechanismen genetischer Epilepsien. *Zeitschrift für Epileptologie*, 29, 77-83.
- HEINZEL, S. S., KRYSAN, P. J., CALOS, M. P. & DUBRIDGE, R. B. 1988. Use of simian virus 40 replication to amplify Epstein-Barr virus shuttle vectors in human cells. *J Virol*, 62, 3738-46.
- HESDORFFER, D. C., TOMSON, T., BENN, E., SANDER, J. W., NILSSON, L., LANGAN, Y., WALCZAK, T. S., BEGHI, E., BRODIE, M. J. & HAUSER, A. 2011a. Combined analysis of risk factors for SUDEP. *Epilepsia*, 52, 1150-9.
- HESDORFFER, D. C., TOMSON, T., BENN, E., SANDER, J. W., NILSSON, L., LANGAN, Y., WALCZAK, T. S., BEGHI, E., BRODIE, M. J. & HAUSER, W. A. 2011b. Do antiepileptic drugs or generalized tonic-clonic seizure frequency increase SUDEP risk? A combined analysis. *Epilepsia*.
- HINDOCHA, N., NASHEF, L., ELMSLIE, F., BIRCH, R., ZUBERI, S., AL-CHALABI, A., CROTTI, L., SCHWARTZ, P. J. & MAKOFF, A. 2008. Two cases of sudden unexpected death in epilepsy in a GEFS+ family with an SCN1A mutation. *Epilepsia*, 49, 360-5.

- HIYAMA, T. Y., WATANABE, E., ONO, K., INENAGA, K., TAMKUN, M. M., YOSHIDA, S. & NODA, M. 2002. Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci*, 5, 511-2.
- ILAE, C. 1989. Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. *Epilepsia*, 30, 389-399.
- ISOM, L. L. 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*, 7, 42-54.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. 2000. *Principles of Neural Science*, New York, McGraw-Hill.
- KOCH, H., GARCIA, A. J., 3RD & RAMIREZ, J. M. 2011. Network reconfiguration and neuronal plasticity in rhythm-generating networks. *Integr Comp Biol*, 51, 856-68.
- KUGLER, S. L. & JOHNSON, W. G. 1998. Genetics of the febrile seizure susceptibility trait. *Brain and Development*, 20, 265-74.
- LERCHE, H., JURKAT-ROTT, K. & LEHMANN-HORN, F. 2001. Ion channels and epilepsy. *American Journal of Medical Genetics*, 106, 146-59.
- LOSSIN, C. 2009. A catalog of SCN1A variants. *Brain Dev*, 31, 114-30.
- LOSSIN, C., RHODES, T. H., DESAI, R. R., VANOYE, C. G., WANG, D., CARNICIU, S., DEVINSKY, O. & GEORGE, A. L., JR. 2003. Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel SCN1A. *Journal of Neuroscience*, 23, 11289-95.
- MAIER, S. K., WESTENBROEK, R. E., MCCORMICK, K. A., CURTIS, R., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. A. 2004. Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation*, 109, 1421-7.
- MARBAN, E., YAMAGISHI, T. & TOMASELLI, G. F. 1998. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol*, 508 (Pt 3), 647-57.
- MAY, T. W. & PFÄFFLIN, M. 2006. Epidemiology of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Zeitschrift für Epileptologie*, 19, 60-70.
- MOLLEMAN, A. 2003a. Basic Theoretical Principles. *Patch Clamping*. John Wiley & Sons, Ltd.
- MOLLEMAN, A. 2003b. The Practice of Patch Clamping. *Patch Clamping*. John Wiley & Sons, Ltd.
- MULLEY, J. C., SCHEFFER, I. E., PETROU, S., DIBBENS, L. M., BERKOVIC, S. F. & HARKIN, L. A. 2005. SCN1A mutations and epilepsy. *Human Mutation*, 25, 535-42.

NAKAYAMA, J. 2009. Progress in searching for the febrile seizure susceptibility genes. *Brain Dev*, 31, 359-65.

NASHEF, L., SO, E. L., RYVLIN, P. & TOMSON, T. 2011. Unifying the definitions of sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsia*.

NELIGAN, A., BELL, G. S., JOHNSON, A. L., GOODRIDGE, D. M., SHORVON, S. D. & SANDER, J. W. 2011. The long-term risk of premature mortality in people with epilepsy. *Brain*, 134, 388-95.

NELSON, L. P., URELES, S. D. & HOLMES, G. 1991. An update in pediatric seizure disorders. *Pediatr Dent*, 13, 128-35.

ODIER, C., NGUYEN, D. K., BOUTHILLIER, A., GIARD, N., SAINT-HILAIRE, J. M. & COSSETTE, P. 2009. Potentially life-threatening ictal bradycardia in intractable epilepsy. *Can J Neurol Sci*, 36, 32-5.

OGIWARA, I., MIYAMOTO, H., MORITA, N., ATAPOUR, N., MAZAKI, E., INOUE, I., TAKEUCHI, T., ITOHARA, S., YANAGAWA, Y., OBATA, K., FURUICHI, T., HENSCH, T. K. & YAMAKAWA, K. 2007. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *Journal of Neuroscience*, 27, 5903-14.

OGUNI, H., HAYASHI, K., AWAYA, Y., FUKUYAMA, Y. & OSAWA, M. 2001. Severe myoclonic epilepsy in infants--a review based on the Tokyo Women's Medical University series of 84 cases. *Brain and Development*, 23, 736-48.

PENA, F. & AGUILETA, M. A. 2007. Effects of riluzole and flufenamic acid on eupnea and gasping of neonatal mice in vivo. *Neurosci Lett*, 415, 288-93.

PTAK, K., ZUMMO, G. G., ALHEID, G. F., TKATCH, T., SURMEIER, D. J. & MCCRIMMON, D. R. 2005. Sodium currents in medullary neurons isolated from the pre-Botzinger complex region. *J Neurosci*, 25, 5159-70.

RAMIREZ, J. M., KOCH, H., GARCIA, A. J., 3RD, DOI, A. & ZANELLA, S. 2011. The role of spiking and bursting pacemakers in the neuronal control of breathing. *J Biol Phys*, 37, 241-61.

RICHERSON, G. B. & BUCHANAN, G. F. 2011. The serotonin axis: Shared mechanisms in seizures, depression, and SUDEP. *Epilepsia*, 52 Suppl 1, 28-38.

RUGG-GUNN, F. J., SIMISTER, R. J., SQUIRRELL, M., HOLDRIGHT, D. R. & DUNCAN, J. S. 2004. Cardiac arrhythmias in focal epilepsy: a prospective long-term study. *Lancet*, 364, 2212-9.

RYVLIN, P., NASHEF, L., LHATOO, S. D., BATEMAN, L. M., BIRD, J., BLEASEL, A., BOON, P., CREPEL, A., DWORETZKY, B. A., HOGENHAVEN, H., LERCHE, H., MAILLARD, L., MALTER, M. P., MARCHAL, C., MURTHY, J. M., NITSCHKE, M., PATARAIA, E., RABBEN, T., RHEIMS, S., SADZOT, B.,

- SCHULZE-BONHAGE, A., SEYAL, M., SO, E. L., SPITZ, M., SZUCS, A., TAN, M., TAO, J. X. & TOMSON, T. 2013. Incidence and mechanisms of cardiorespiratory arrests in epilepsy monitoring units (MORTEMUS): a retrospective study. *Lancet Neurol*, 12, 966-77.
- SCHEFFER, I. E. & BERKOVIC, S. F. 1997. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*, 120 (Pt 3), 479-90.
- SCHEFFER, I. E. & BERKOVIC, S. F. 2003. The genetics of human epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24, 428-33.
- SCHEFFER, I. E., HARKIN, L. A., GRINTON, B. E., DIBBENS, L. M., TURNER, S. J., ZIELINSKI, M. A., XU, R., JACKSON, G., ADAMS, J., CONNELLAN, M., PETROU, S., WELLARD, R. M., BRIELLMANN, R. S., WALLACE, R. H., MULLEY, J. C. & BERKOVIC, S. F. 2007. Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations. *Brain*, 130, 100-9.
- SHORVON, S. & TOMSON, T. 2011. Sudden unexpected death in epilepsy. *Lancet*, 378, 2028-38.
- SINGH, R., SCHEFFER, I. E., CROSSLAND, K. & BERKOVIC, S. F. 1999. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a common childhood-onset genetic epilepsy syndrome. *Ann Neurol*, 45, 75-81.
- SO, E. L. 2006. Demystifying sudden unexplained death in epilepsy--are we close? *Epilepsia*, 47 Suppl 1, 87-92.
- SPERLING, M. R., HARRIS, A., NEI, M., LIPORACE, J. D. & O'CONNOR, M. J. 2005. Mortality after epilepsy surgery. *Epilepsia*, 46 Suppl 11, 49-53.
- STRZELCZYK, A., CENUSA, M., BAUER, S., HAMER, H. M., MOTHERSILL, I. W., GRUNWALD, T., HILLENBRAND, B., EBNER, A., STEINHOFF, B. J., KRAMER, G. & ROSENOW, F. 2011. Management and long-term outcome in patients presenting with ictal asystole or bradycardia. *Epilepsia*, 52, 1160-7.
- SUGAWARA, T., MAZAKI-MIYAZAKI, E., FUKUSHIMA, K., SHIMOMURA, J., FUJIWARA, T., HAMANO, S., INOUE, Y. & YAMAKAWA, K. 2002. Frequent mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology*, 58, 1122-4.
- SURGES, R., TAGGART, P., SANDER, J. W. & WALKER, M. C. 2010. Too long or too short? New insights into abnormal cardiac repolarization in people with chronic epilepsy and its potential role in sudden unexpected death. *Epilepsia*, 51, 738-44.
- TOMSON, T., NASHEF, L. & RYVLIN, P. 2008. Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. *Lancet Neurol*, 7, 1021-31.

WALLACE, R. H., SCHEFFER, I. E., BARNETT, S., RICHARDS, M., DIBBENS, L., DESAI, R. R., LERMAN-SAGIE, T., LEV, D., MAZARIB, A., BRAND, N., BEN-ZEEV, B., GOIKHMAN, I., SINGH, R., KREMMIDIOTIS, G., GARDNER, A., SUTHERLAND, G. R., GEORGE, A. L., JR., MULLEY, J. C. & BERKOVIC, S. F. 2001. Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet*, 68, 859-65.

WALLACE, R. H., SCHEFFER, I. E., PARASIVAM, G., BARNETT, S., WALLACE, G. B., SUTHERLAND, G. R., BERKOVIC, S. F. & MULLEY, J. C. 2002. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: mutation of the sodium channel subunit SCN1B. *Neurology*, 58, 1426-9.

WALLACE, R. H., WANG, D. W., SINGH, R., SCHEFFER, I. E., GEORGE, A. L., JR., PHILLIPS, H. A., SAAR, K., REIS, A., JOHNSON, E. W., SUTHERLAND, G. R., BERKOVIC, S. F. & MULLEY, J. C. 1998. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nature Genetics*, 19, 366-70.

WARUIRU, C. & APPLETON, R. 2004. Febrile seizures: an update. *Arch Dis Child*, 89, 751-6.

WESTENBROEK, R. E., MERRICK, D. K. & CATTERALL, W. A. 1989. Differential subcellular localization of the RI and RII Na⁺ channel subtypes in central neurons. *Neuron*, 3, 695-704.

WIMMER, V. C., REID, C. A., MITCHELL, S., RICHARDS, K. L., SCAF, B. B., LEAW, B. T., HILL, E. L., ROYECK, M., HORSTMANN, M. T., CROMER, B. A., DAVIES, P. J., XU, R., LERCHE, H., BERKOVIC, S. F., BECK, H. & PETROU, S. 2010. Axon initial segment dysfunction in a mouse model of genetic epilepsy with febrile seizures plus. *J Clin Invest*, 120, 2661-71.

WINESETT, P., FELICIANO, C. A. & TATUM, W. O. T. 2009. Temporal lobe seizures triggering recurrent syncope by ictal asystole. *Epilepsy Behav*, 14, 258-60.

YU, F. H., MANTEGAZZA, M., WESTENBROEK, R. E., ROBBINS, C. A., KALUME, F., BURTON, K. A., SPAIN, W. J., MCKNIGHT, G. S., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. A. 2006. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci*, 9, 1142-9.

YU, F. H., WESTENBROEK, R. E., SILOS-SANTIAGO, I., MCCORMICK, K. A., LAWSON, D., GE, P., FERRIERA, H., LILLY, J., DISTEFANO, P. S., CATTERALL, W. A., SCHEUER, T. & CURTIS, R. 2003. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci*, 23, 7577-85.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Neurologie, Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie, Arbeitsgruppe Experimentelle Epileptologie unter Betreuung von Prof. Dr. Holger Lerche durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. biol. hum. Yunxiang Liao, ehemalige Labormitarbeiterin der Arbeitsgruppe Experimentelle Epileptologie.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. Liao und Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch, Labormitarbeiterin der Arbeitsgruppe Experimentelle Epileptologie) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Liao und Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Freiburg, den 12.11.2018

Hatice Bunea

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Holger Lerche, Leiter der Arbeitsgruppe Experimentelle Epileptologie und Ärztlicher Direktor der Klinik für Neurologie, Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Für die hervorragende Betreuung danke ich Frau Dr. rer. biol. hum. Yunxiang Liao und Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch. Frau Dr. Hedrich-Klimosch danke ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Ehemann Dr. Andrei Bunea für den starken emotionalen Rückhalt, unermüdliche Unterstützung und Motivation.