

Zentrum für Neurologie der Universität Tübingen
Hertie-Institut für klinische Hirnforschung
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie

Funktionelle Analyse von vier *GABRA1*-Mutationen bei
schweren Epilepsieformen und idiopathischer
generalisierter Epilepsie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanwissenschaften

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Pfeffer, Stephanie Siona

2020

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Lerche

2. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Schwarz

Tag der Disputation:

14.02.2020

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 EPILEPSIE	1
1.1.1 <i>Epidemiologie und Definition der Epilepsie</i>	2
1.1.2 <i>Klassifikation der Epilepsie</i>	3
1.1.3 <i>Epilepsie-Syndrome</i>	6
1.1.4 <i>Genetische Epilepsien</i>	6
1.1.4.1 <i>Genetische/ idiopathische generalisierte Epilepsie</i>	8
1.1.4.2 <i>Entwicklungs- und/ oder epileptische Enzephalopathie</i>	9
1.2 GABA _A -REZEPTOREN	11
1.2.1 <i>Störung der GABAergen Wirkung im ZNS</i>	14
1.2.2 <i>Vier neue GABRA1-Mutationen bei Patienten mit Epilepsie</i>	16
1.3 ZIELSETZUNG	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 MATERIAL	21
2.1.1 <i>Geräte und Software</i>	21
2.1.2 <i>Verbrauchsmaterial</i>	22
2.1.3 <i>Substanzen</i>	22
2.1.4 <i>Lösungen und Medium</i>	25
2.2 METHODEN	27
2.2.1 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	27
2.2.1.1 <i>Insertion von Punktmutationen durch zielgerichtete Mutagenese</i>	27
2.2.1.2 <i>Transformation der Plasmid-cDNS in kompetente Bakterien durch Hitzeschock</i>	32
2.2.1.3 <i>Isolierung der Plasmid-cDNS aus Bakterien (Minipräparation)</i>	33
2.2.1.4 <i>Isolierung der Plasmid-cDNS aus Bakterien (Maxipräparation)</i>	34
2.2.1.5 <i>Analyse von cDNS mittels Agarosegelelektrophorese</i>	36
2.2.1.6 <i>Sequenzierung der cDNS</i>	36
2.2.1.7 <i>Linearisierung der cDNS durch enzymatischen Restriktionsverdau</i>	37
2.2.1.8 <i>cRNS-Synthese durch <i>in-vitro</i>-Transkription</i>	38
2.2.2 <i>Elektrophysiologische Methoden</i>	39
2.2.2.1 <i>Vorbereitung der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten</i>	39
2.2.2.2 <i>Automatisierte Injektion der cRNS in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten</i>	40
2.2.2.3 <i>Messung transmembraner Ionenströme mittels Zweielektroden- spannungsklemmen-Technik (TEVC) mit dem Robocyte2</i>	42
2.2.2.4 <i>Analyse und Auswertung der Rohdaten</i>	46

3	ERGEBNISSE.....	48
3.1	GENERIERUNG DER VIER PUNKTMUTATIONEN S76R, R214H, I389V UND F104C IM GABRA1-GEN.....	48
3.2	GENERIERUNG VON α_{1WT} -, α_{1-S76R} -, $\alpha_{1-R214H}$ -, $\alpha_{1-I389V}$ -, $\alpha_{1-F104C}$ -, β_2 - UND γ_{25} -CRNS	51
3.2.1	<i>Linearisierung der die vier Punktmutationen S76R, R214H, I389V und F104C im GABRA1-Gen tragenden Plasmidvektoren sowie der GABRA1_{WT}-, GABRB2- und GABRG2-Plasmidvektoren durch enzymatischen Restriktionsverdau.....</i>	51
3.2.2	<i>In-vitro-Transkription der die vier Punktmutationen S76R, R214H, I389V und F104C im GABRA1-Gen tragenden linearisierten Plasmidvektoren sowie der linearisierten GABRA1_{WT}-, GABRB2- und GABRG2-Plasmidvektoren.....</i>	52
3.3	FUNKTIONELLE ANALYSE DER DREI MIT SCHWEREN EPILEPSIE-FORMEN ASSOZIIERTEN PUNKTMUTATIONEN R214H, S76R UND I389V IM GABRA1-GEN.....	53
3.3.1	<i>Aufzeichnung von GABA-induzierten Ionenströmen in Oozyten mit injizierter α_{1WT}-, β_2- und γ_{25}-cRNS sowie in Oozyten mit injizierter $\alpha_{1-R214H}$- bzw. α_{1-S76R}- bzw. $\alpha_{1-I389V}$-, β_2- und γ_{25}-cRNS unter Verwendung der TEVC-Technik mit dem Robocyte2</i>	53
3.3.2	<i>Stromamplituden bei Applikation von 1 mM GABA</i>	56
3.3.3	<i>Dosis-Wirkungsbeziehung des WT-GABA_A-Rezeptors und der die Punktmutationen S76R, R214H und I389V enthaltenden GABA_A-Rezeptoren</i>	57
3.3.4	<i>EC₅₀-Werte des WT-GABA_A-Rezeptors und der die Punktmutationen S76R, R214H und I389V enthaltenden GABA_A-Rezeptoren.....</i>	60
3.3.5	<i>Heterozygote Situation</i>	61
3.4	FUNKTIONELLE ANALYSE DER MIT IGE ASSOZIIERTEN PUNKTMUTATION F104C IM GABRA1-GEN	67
3.4.1	<i>Aufzeichnung von GABA-induzierten Ionenströmen in Oozyten mit injizierter WT α_{1WT}-, β_2- und γ_{25}-cRNS oder mutierter α_1-subunit sowie in Oozyten mit injizierter $\alpha_{1-F104C}$-, β_2- und γ_{25}-cRNS unter Verwendung der TEVC-Technik mit dem Robocyte2.....</i>	67
3.4.2	<i>Stromamplitude bei 1 mM GABA</i>	68
3.4.3	<i>Dosis-Wirkungsbeziehung des WT-GABA_A-Rezeptors und der die Punktmutation F104C enthaltenden GABA_A-Rezeptoren</i>	69
3.4.4	<i>EC₅₀-Wert der die Punktmutation F104C enthaltenden GABA_A-Rezeptoren</i>	70
3.4.5	<i>Heterozygote Situation</i>	70
4	DISKUSSION.....	73
4.1	METHODIK	73
4.1.1	<i>Oozyten als heterologes Expressionsmodell zur funktionellen Analyse mutierter GABA_A-Rezeptoren</i>	73
4.1.2	<i>Automatisierte Injektion der cRNS in Xenopus laevis Oozyten und Messung transmembraner Ionenströme mittels TEVC-Technik.....</i>	74
4.2	FUNKTIONELLE ANALYSE VIER NEU DETEKTIERTER GABRA1-MUTATIONEN	76

4.2.1	<i>Funktionelle Analyse der Mutation R214H</i>	78
4.2.2	<i>Funktionelle Analyse der Mutation S76R</i>	79
4.2.3	<i>Funktionelle Analyse der Mutation I389V</i>	80
4.2.4	<i>Funktionelle Analyse der Mutation F104C</i>	81
4.3	GENOTYP-PHÄNOTYP-KORRELATION	82
4.4	WEITERE UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG MOLEKULARER PATHOMECHANISMEN DER <i>GABRA1</i> - MUTATIONEN	84
5	ZUSAMMENFASSUNG	86
6	LITERATURVERZEICHNIS	88
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	101
8	VERÖFFENTLICHUNG	102

Abkürzungsverzeichnis

bp	Englisch: base pair
BZ	Benzodiazepine
cDNS	Komplementäre (Englisch: complementary) Desoxyribonukleinsäure
cRNS	Komplementäre (Englisch: complementary) Ribonukleinsäure
DEE	Englisch: developmental and epileptic encephalopathy
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat; umfasst dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTP	Diphtherie, Tetanus, Pertussis
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Epileptische Enzephalopathie
EEG	Elektroenzephalogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Englisch: forward = vorwärts; gemeint ist der Vorwärts-Primer
GABA	Englisch: gamma-aminobutyric acid
GABRA1	Gen, das die α_1 -Untereinheit des GABA _A -Rezeptors kodiert
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTKA	Generalisierter tonisch-klonischer Anfall
HEK293	Englisch: human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IGE	Idiopathische generalisierte Epilepsie
ILAE	Englisch: International League Against Epilepsy
IPSP	Inhibitorisches, postsynaptisches Potential
JME	Juvenile myoklonische Epilepsie
LB	Englisch: lysogeny broth
OR2	Oozyten-Ringer-Lösung 2, kalziumfrei
PCR	Englisch: polymerase chain reaction
R	Englisch: reverse = rückwärts; gemeint ist der Rückwärts-Primer
SME	Schwere myoklonische Epilepsie
template	Muster, Vorlage, DNS-Template ist die DNS, die als Kopiervorlage bei der PCR dient
TEVC	Englisch: two electrodes voltage-clamp

1 EINLEITUNG

1.1 EPILEPSIE

„Fallsucht“, „Mondsucht“, „heilige Krankheit“, „dämonische Krankheit“; seit Beginn der Aufzeichnungen menschlicher Erkrankungen finden sich mannigfaltige Bezeichnungen für die Epilepsie. Die Gründe liegen darin, dass es sich schon immer um eine häufige Erkrankung handelte und dass das klinische Erscheinungsbild eines epileptischen Anfalls, insbesondere eines generalisierten tonisch-klonischen Anfalls, auf den Betrachter eindrucksvoll und (Ehr-)Furcht erregend wirkte.

Die ältesten Beschreibungen epileptischer Anfälle stammen aus Mesopotamien aus einer Zeit ca. 2000 v. Chr. Die unbekanntenen Autoren beschreiben die Symptomatik unterschiedlicher Formen der „antabbû“- oder „bênu“- Krankheit (übersetzt „Fallsucht“) äußerst präzise und gehen auch auf Prognose und Behandlung ein. Ätiologisch wurde die Epilepsie als göttliches Leiden oder dämonische Besessenheit eingeordnet (Magiorkinis et al., 2010). Auch die im antiken Griechenland gebräuchlichen Namen „epilambanein“ (übersetzt „erfassen“, „befallen“), von dem sich „Epilepsie“ ableitet oder „seliniasmos“ (übersetzt „heilige Krankheit“) zeugen von der Vorstellung der dämonischen, göttlichen, übernatürlichen Ursache der Erkrankung. In der Abhandlung „Über die heilige Krankheit“ als Teil des Corpus Hippocraticum wird erstmalig die Überzeugung des göttlichen Ursprungs der Epilepsie in Frage gestellt und die These vertreten, dass es sich um eine vererbte Erkrankung handelt, die auf einer Fehlfunktion des Gehirns beruht (Breitenfeld et al., 2014). Diese Auffassung teilte auch Galen (~130 - 200 n. Chr.), der das erste Klassifikationssystem der Epilepsie schuf, indem er drei Formen voneinander abgrenzte. Auch geht der bis heute gebräuchliche Begriff der „Aura“ auf ihn zurück (Bennett and Haynes, 1992). Das Mittelalter war geprägt von Stagnation des wissenschaftlichen Fortschritts. Vor einem geistig-religiös geprägten Weltbild galt die Epilepsie einmal mehr als Strafe Gottes für begangene Sünden, als Machwerk des Teufels, als Zeichen von Hexerei oder Besessenheit. Folglich bestand die Therapie aus

Sühne, Gebeten, Fasten oder Exorzismen (Diamantis et al., 2010). Die Vorstellung, dass es sich um eine ansteckende Krankheit handelte, führte zur sozialen Ausgrenzung und Stigmatisierung der Betroffenen (Bennett and Haynes, 1992). In der Renaissance erlebte die literarische Auseinandersetzung mit der Epilepsie einen neuen Höhepunkt. Die Gelehrten versuchten plausible Mechanismen zu eruieren, die das Auftreten von epileptischen Anfällen erklären konnten (Diamantis et al., 2010). Der Engländer John Hughlings Jackson läutete im 19. Jahrhundert den Beginn der wissenschaftlichen Erforschung der Epilepsie ein. Seine systematische Beschreibung von epileptischen Anfällen, die von ungeordneten Entladungen in einer lokalen Läsion im Gehirn auf andere Hirnareale übergehen, führte zur bis heute gebräuchlichen Bezeichnung des Jackson-Anfalls (Sidiropoulou et al., 2010). Sein Name ist auch eng mit der Gründung der „International League Against Epilepsy“ (ILAE) und der Herausgabe des Fachjournals *Epilepsia* ab 1908 verbunden. Seit dieser Zeit ist die ILAE die führende internationale Fachgesellschaft im Bereich der Epileptologie, mit dem Ziel, das Wissen über Epilepsie in der Gesellschaft zu verbreiten, die Erforschung der Epilepsie zu fördern sowie die adäquate Versorgung von Epilepsie-Patienten zu verbessern (Shorvon and Schwartzkroin, 2009, Shorvon et al., 2009).

1.1.1 Epidemiologie und Definition der Epilepsie

Mehr als 50 Millionen Menschen weltweit leiden an Epilepsie. Die Lebenszeitinzidenz liegt bei ca. 3 % (Hauser et al., 1996). Weltweit erhalten rund 2,4 Millionen Menschen jährlich die Diagnose Epilepsie. Eine Epilepsie-Erkrankung hat einen bedeutenden Einfluss auf den gesundheitlichen Zustand Betroffener. Studien zeigen, dass sie darüber hinaus häufig unter gesellschaftlicher Stigmatisierung und verminderter Lebensqualität leiden (Hermann and Jacoby, 2009, Fiest et al., 2014).

2005 definierte die ILAE Epilepsie als Störung des Gehirns, die durch eine fortwährende Bereitschaft für epileptische Anfälle charakterisiert ist. Ein epileptischer Anfall ist gekennzeichnet durch Symptome, die durch eine gestörte exzessive oder synchrone neuronale Aktivität des Gehirns verursacht werden (Fisher et al., 2005).

Zur Erleichterung der praktischen Anwendung der Epilepsie-Definition im klinischen Alltag wurde 2014 von der ILAE folgende Definition vorgeschlagen: Eine Epilepsie kann diagnostiziert werden, wenn der Patient (1) mindestens zwei unprovokierte Anfälle, die mit einer zeitlichen Differenz von > 24 h voneinander auftreten ODER (2) einen unprovokierten Anfall erleidet und die Wahrscheinlichkeit bei mindestens 60% liegt, dass weitere Anfälle auftreten ODER (3) bereits früher die Diagnose eines Epilepsie-Syndroms gestellt wurde (Fisher et al., 2014).

1.1.2 Klassifikation der Epilepsie

Aufgrund der großen Heterogenität und Komplexität der verschiedenen Erscheinungsformen der Epilepsie unterliegt das Klassifikationssystem immer wieder Änderungsvorschlägen und Revisionen.

1981 wurde von der ILAE ein Klassifikationssystem für epileptische Anfälle und 1989 für Epilepsien vorgelegt. In den folgenden Jahren wurden neue Klassifikationsvorschläge publiziert, die sich allerdings nicht durchsetzten. Im Jahr 2010 wurde von der ILAE-Kommission für Klassifikation und Terminologie eine erste überarbeitete Klassifikation („Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009“, Berg et al. (2010)) vorgelegt. In Bezug auf die Ätiologie von Epilepsien war bis dahin die Unterscheidung in idiopathisch, symptomatisch und kryptogen gebräuchlich. Die Epilepsieformen, denen ein bekannter oder vermuteter genetischer Defekt zugrunde liegt, wurden im Vorschlag von 2010 als genetische (zuvor: idiopathische) Epilepsien bezeichnet. Symptomatische Epilepsien hingegen manifestieren sich auf der Basis von strukturellen oder metabolischen Störungen oder Fehlbildung des Gehirns, weshalb vorgeschlagen wurde, sie als strukturelle/ metabolische Epilepsien zu bezeichnen. Beispiele für strukturelle Läsionen, die epileptische Anfälle auslösen können, sind Tumore, Abszesse oder Infarktfolgen. Führen genetische Erkrankungen zu strukturellen Läsionen, wie z. B. die tuberöse Sklerose, wurde die sich eventuell daraus manifestierende Epilepsie dennoch nicht den genetischen Epilepsien, sondern den strukturellen/ metabolischen zugeordnet. Die dritte Kategorie entsprach der Kategorie der Epilepsien (bisher)

unbekannter Ursache. Neben dieser Einordnung hinsichtlich der Ätiologie wurde eine Strukturierung nach Epilepsie-Syndromen vorgeschlagen. Diesem ersten Vorschlag folgte ein umfassender Prozess bis zur endgültigen Veröffentlichung der „ILAE Classification of the Epilepsies“ im Jahr 2017. Ziel war es die weltweit zunehmenden Epilepsie-Experten in eine fachliche Diskussion über Terminologie, Definition und Klassifikation von epileptischen Anfällen und Epilepsie miteinzubeziehen (Scheffer et al., 2017). 2013 wurden daher die Vorschläge aus dem Jahr 2010 von einer neu einberufenen Kommission („Commission on Classification and Terminology“) mit der Einladung zur regen Diskussion veröffentlicht (Berg and Millichap, 2013). Das kommentierende Feedback war so umfassend und teilweise widersprüchlich, dass in mehreren Etappen die Epilepsieklassifikation bis zur endgültigen Version im März 2017 angepasst wurde. Zeitgleich erfolgte die Vorlage der neuen Anfallsklassifikation („Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology“, (Fisher et al., 2017)).

Im neuen Diagnose-Algorithmus (siehe Abbildung 1) wird zunächst der Anfallstyp gemäß der o.g. Klassifikation der Anfallsarten (fokal beginnend, generalisiert beginnend und unklarer Beginn) diagnostiziert. Sollte der Patient die Kriterien zur Diagnose einer Epilepsie erfüllen (siehe Kapitel 1.1.1), wird in einem zweiten Schritt der Epilepsietyp festgelegt. Die vier Kategorien der Epilepsietypen sind (i) fokal, (ii) generalisiert, (iii) kombiniert generalisiert und fokal und (iv) unbekannt. Zu den fokalen Epilepsien zählen von einem Fokus oder von mehreren Foci ausgehende Anfälle, die nur eine Hemisphäre betreffen. Das Elektroenzephalogramm (EEG) kann interiktale epilepsietypische Potentiale zeigen. Bei den generalisierten Epilepsien können unterschiedliche Anfallstypen wie Absencen, atonische oder tonisch-klonische Anfälle auftreten. Das EEG zeigt typischerweise ein generalisiertes Spike-wave-Muster¹. Bei Patienten mit einer kombiniert fokalen und generalisierten Epilepsie treten sowohl fokale als auch

¹ Epilepsie-typisches Potential im EEG als Komplex aus Spitze (Spike) und langsamer Welle (Wave). Auftreten meist in Gruppen oder Serien, überwiegend generalisiert (Gibbs et al., 1935).

generalisierte Anfälle auf. In allen drei Kategorien wird die Diagnose klinisch und mit Hilfe von EEG-Resultaten gestellt.

In der dritten Stufe wird, wenn möglich die Diagnose eines Epilepsie-Syndroms gestellt (siehe hierzu Kapitel 1.1.3). Während aller Diagnoseschritte stellt sich die Frage nach der Ätiologie der epileptischen Anfälle bzw. der Epilepsie des Patienten. Eine ätiologische Einordnung ist insbesondere dann essentiell, wenn sie eine Therapiekonsequenz hat. Zu den ätiologischen, nicht hierarchischen Kategorien zählen: strukturell, genetisch (siehe auch Kapitel 1.1.4), infektiös, metabolisch, immunologisch und unbekannt. Im Gegensatz zum Revisionsvorschlag von 2010 wird eine Epilepsie bei einem Patienten mit tuberöser Sklerose ätiologisch nun sowohl als strukturell als auch als genetisch klassifiziert. Die neue Klassifikation legt darüber hinaus Wert auf die frühe Identifizierung, Diagnose und Behandlung von Komorbiditäten (Scheffer et al., 2017). Eine grafische Zusammenfassung der ILAE Klassifikation der Epilepsien zeigt Abbildung 1.

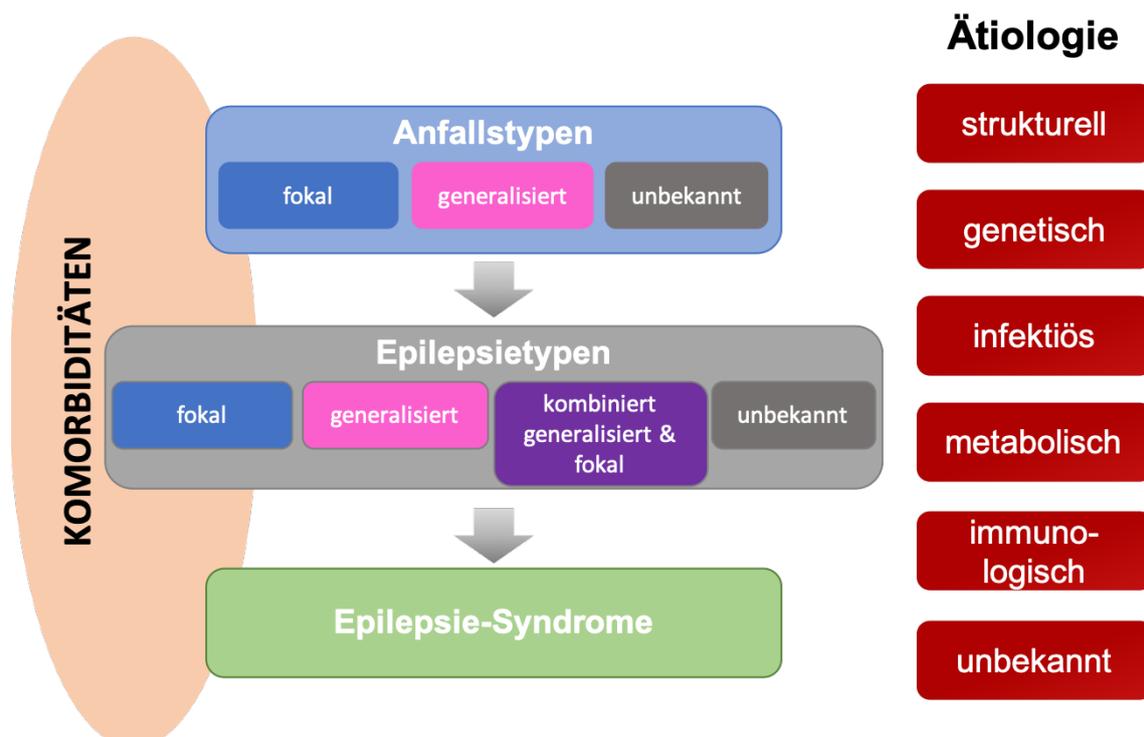


Abb. 1: ILAE-Klassifikation der Epilepsien (2017).

In der neuen Klassifikation der Epilepsien der ILAE von 2017 werden in drei Leveln zunächst der Anfallstyp, gefolgt vom Epilepsietyp festgelegt. Falls möglich folgt darauf die Diagnose eines Epilepsie-Syndroms. Begleitend wird ab der ersten Präsentation eines epileptischen Anfalls eine ätiologische Einordnung angestrebt. Komorbiditäten sollte hinlängliche Beachtung geschenkt werden. ILAE = International League Against Epilepsy. (Übersetzt nach Scheffer et al. (2017)).

1.1.3 Epilepsie-Syndrome

Epilepsie-Syndrome sind durch eindeutige elektroklinische Charakteristika (typisches Manifestationsalter und Art der epileptischen Anfälle, charakteristische EEG-Veränderungen, bildmorphologische Auffälligkeiten, Begleitsymptome wie psychomotorische Retardierung) gekennzeichnet (Covanis, 2012). Verschiedene ätiologische Kategorien (s.o.) sind vertreten. Dabei haben Patienten mit dem identischen Epilepsie-Syndrom nicht zwangsläufig dieselbe zugrundeliegende Ursache. So kann das West-Syndrom als Folge eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens, bei intrazerebraler Malformation oder bei der tuberösen Sklerose auftreten (Osborne et al., 2010). Umgekehrt kann ein- und dieselbe genetische Mutation (z. B. *SCN1A*-Mutationen) zu unterschiedlichen Phänotypen führen (Berg and Scheffer, 2011). Dahingegen ist die kindliche Absence-Epilepsie ätiologisch immer eine genetische Epilepsie. Generell ist die Bandbreite der klinischen Manifestationsschwere der Epilepsie-Syndrome sehr groß. So gibt es Syndrome mit ausschließlich milden Anfällen, selbstlimitierende Epilepsie-Syndrome oder aber Syndrome mit schweren Verlaufsformen der epileptischen Enzephalopathie, die mit schweren psychomotorischen Beeinträchtigungen einhergehen (Lerche et al., 2013).

1.1.4 Genetische Epilepsien

Ätiologisch spricht man von genetischen Epilepsien, wenn ein bekannter oder vermuteter genetischer Defekt maßgeblich ursächlich für die Epilepsieerkrankung ist (Falco-Walter et al., 2018). Epidemiologisch geht man davon aus, dass 70 – 80 % aller Epilepsien auf einen oder mehrere genetische Defekte zurückzuführen sind (Hildebrand et al., 2013, Myers and Mefford, 2015). Dabei ist es nach wie vor so, dass der zugrunde liegende genetische Defekt und gegebenenfalls der Vererbungsmodus unbekannt sein können. Anzumerken ist, dass „genetisch“ nicht gleichbedeutet mit „vererbt“ ist. Im Gegenteil, viele neu identifizierte Mutationen kommen *de novo* vor, d.h. die Mutation ist beim Indexpatienten neu entstanden und unterliegt keiner familiären Vererbung (Scheffer et al., 2017). In den letzten Dekaden wurden vielfach neue Epilepsiegene, *de novo* oder der mendelschen Vererbung folgend, detektiert. Dennoch geht man bei den meisten genetischen Epilepsien von einer

polygenetischen oder sogar multifaktoriellen Genese aus (Ottman, 2005, Tan et al., 2006, Helbig et al., 2008).

Monogenetische mit Epilepsie assoziierte Mutationen betreffen häufig Ionenkanäle (Gardiner, 2005, Lerche et al., 2013, Lerche et al., 2005, Wei et al., 2017). Man spricht von Ionenkanal- oder -transportererkrankungen (Englisch: „channelopathies“). Daneben wurden auch epilepsieverursachende Mutationen in Genen detektiert, die nicht direkt für Ionenkanäle kodieren, sondern für Proteine, die in die synaptische Signalübertragung involviert sind (Weber and Lerche, 2008, Hildebrand et al., 2013). Einige Beispiele listet Tabelle 1 auf.

Tabelle 1: Beispiele für Epilepsie-assoziierte Ionenkanal- oder -transportererkrankungen und Mutationen in für die synaptische Signalübertragung relevanten Proteinen

Protein	Gene	Epilepsietyp	Quelle
Spannungsgesteuerter Natriumkanal	<i>SCN1A</i>	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen	(Escayg et al., 2000)
		Dravet-Syndrom/schwere myoklonische Epilepsie des Kindesalters	(Claes et al., 2001)
Spannungsgesteuerter Kaliumkanal	<i>KCNQ2</i>	Benigne familiäre neonatale/ infantile Anfälle	(Biervert et al., 1998, Singh et al., 1998)
GABA _A -Rezeptor, γ_2 -Untereinheit	<i>GABRG2</i>	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen	(Baulac et al., 2001)
		Absence-Epilepsie des Kindesalters mit Fieberkrämpfen	(Wallace et al., 2001)
GABA-Transporter	<i>SLC6A1</i>	Myoklonisch-astatische Epilepsie	(Carvill et al., 2015)
Präsynaptisches Protein	<i>STX1B</i>	Fieber-assoziierte Epilepsie-Syndrome	(Schubert et al., 2014)

Wie auch aus Tabelle 1 ersichtlich, gibt es bei den meisten Epilepsiegenen eine große phänotypische Heterogenität (Johannesen et al., 2016, Helbig and

Tayoun, 2016, Guerrini and Buchhalter, 2014). So kann eine Mutation im *SCN1A*-Gen zu einem relativ milden Epilepsietyp oder zur Entwicklung eines Dravet-Syndroms, einer schweren, epileptischen Enzephalopathie mit pharmakoresistenten Anfällen und Entwicklungsstörung, führen. Zu den eher milde verlaufenden genetischen Epilepsien gehören die genetischen (idiopathischen) generalisierten Epilepsien.

1.1.4.1 Genetische/ idiopathische generalisierte Epilepsie

Die genetische/ idiopathische generalisierte Epilepsie (IGE) ist die häufigste Epilepsieentität innerhalb der genetischen Epilepsien (Lerche et al., 2013, Helbig, 2015). So zählen epidemiologischen Studien zufolge 15 – 20 % aller Epilepsien zu den IGE (Jallon and Latour, 2005). Die Bezeichnung „idiopathische generalisierte Epilepsie“ ist bis heute sehr gebräuchlich. Ursprünglich rührte die Einführung des Begriffs „idiopathisch“ von der vermuteten, allerdings nicht bewiesenen genetischen Genese bestimmter Epilepsietypen. Aufgrund der zunehmenden Erkenntnisse über mono- und polygenetische Ursachen von Epilepsien wird in der aktuellen ILAE-Klassifikation daher vorgeschlagen, den Begriff „idiopathisch“ zu streichen und von „genetischen generalisierten Epilepsien“ zu sprechen. Die Bezeichnung IGE wird noch für die vier Epilepsie-Syndrome „Absence-Epilepsie des Kindesalters“, „Absence-Epilepsie des Jugendalters“, „Juvenile myoklonische Epilepsie“ und „Epilepsie mit generalisiert tonisch-klonischen Anfällen“ akzeptiert (Scheffer et al., 2017). Im Folgenden wird weiter der Terminus „IGE“ verwendet, da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der betreffenden Patienten der Begriff weitergefasst verwendet wurde.

Die wenigsten IGE-Subtypen folgen einer monogenetischen Vererbung. Bei den meisten wird eine oligo- oder polygenetische Genese vermutet (Marini et al., 2004, Hempelmann et al., 2006). Bei den monogenetischen IGE sind z. B. GABA_A-Rezeptoren, Natriumkanäle und Kaliumkanäle betroffen; wobei man auch hier eher von einem Hauptgenedefekt ausgeht (siehe auch Kapitel 1.1.4). Der klinische Verlauf der vier oben genannten Epilepsie-Syndrome wird als benigne, mild oder prognostisch günstig beschrieben. Dies bezieht sich auf eine normale psychomotorische Entwicklung, keine Notwendigkeit für oder ein gutes Ansprechen auf antiepileptische Medikation oder ein Ausbleiben einer

langfristigen geistigen Beeinträchtigung (Chan and Lee, 2011, Gallentine and Mikati, 2012). Neueste Studien zeigen allerdings eine Reihe von Komorbiditäten, (Wei and Lee, 2015) sodass Begriffe wie „selbstlimitierend“ oder „pharmakosensibel“ anstelle von „benigne“ vorgeschlagen werden (Scheffer et al., 2017). Auch wenn beispielsweise bei der juvenilen myoklonischen Epilepsie (JME) die psychomotorische Entwicklung häufig unauffällig ist, kann es dennoch zu psychischen (Angst- oder Persönlichkeitsstörung) und kognitiven Auffälligkeiten bzw. Komorbiditäten kommen. Auswertungen standardisierter neuropsychologischer Tests bei Patienten mit JME zeigen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Dysfunktion des Frontallappens (Wolf et al., 2015).

Die JME ist eine der häufigsten genetischen Epilepsien (Genton and Gelisse, 2013). Sie zählt zu den Epilepsie-Syndromen, die insbesondere bei Jugendlichen (das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 14 Jahren) auftreten (Canevini et al., 1992, Murthy et al., 1998). Auch hier ist die Ätiopathogenese in den meisten Fällen unklar. Nur ein kleiner Prozentsatz ist durch einen monogenetischen Defekt verursacht. Eine bekannte, autosomal-dominant vererbte Mutation betrifft z. B. das Gen *GABRA1* (Cossette et al., 2002).

Die Patienten leiden an kurzen, symmetrischen, einschließenden Muskelzuckungen insbesondere der Arme, die einzeln oder in Serie auftreten. Daneben kann es zu generalisierten, tonisch-klonischen Anfällen (GTKA) und seltener zu Absencen kommen (Genton et al., 2013). Ein großer Anteil der JME-Patienten wird mit antiepileptischen Medikamenten (v.a. Valproat) anfallsfrei (Chowdhury and Brodie, 2016).

Neben der IGE zählen zu den genetischen Epilepsien auch die Epilepsie-Syndrome mit epileptischer Enzephalopathie.

1.1.4.2 Entwicklungs- und/ oder epileptische Enzephalopathie

2010 wurde von Berg et al. der zuvor schon verwendete Begriff „epileptische Enzephalopathie“ als eine epileptische Aktivität, die selbst zur schweren kognitiven Beeinträchtigung über das Maß der zugrundeliegenden Pathologie des Gehirns hinaus beiträgt, definiert. Dies bedeutet, dass häufige Anfälle und/ oder interiktale epileptiforme Entladungen die Gehirnfunktion nachhaltig schädigen (Howell et al., 2016).

Prinzipiell kann es in jedem Alter zum Auftreten einer epileptischen Enzephalopathie kommen. Allerdings tritt sie v.a., und dann mit besonders schwerwiegenden Folgen, bei Säuglingen und Kleinkindern auf, da es nicht nur zur Schädigung bereits entwickelter Hirnfunktionen kommt, sondern die altersabhängige Entwicklung neuer Hirnfunktionen beeinträchtigt wird (Covanis, 2012).

Zu den Epilepsie-Syndromen, die mit einer epileptischen Enzephalopathie einhergehen, gehört das Dravet-Syndrom, auch schwere myoklonische Epilepsie (SME) des Kleinkindalters genannt. Es manifestiert sich meist im ersten Lebensjahr mit prolongierten febrilen, später auch afebrilen Anfällen bei bis dahin normal entwickelten Kindern. Im weiteren Verlauf kommen andere Anfallstypen wie myoklonische Anfälle oder Absencen hinzu. Antiepileptische Medikamente sind häufig wirkungslos und die betroffenen Kinder zeigen ab dem 2. Lebensjahr deutliche psychomotorische Einschränkungen (Brunklaus and Zuberi, 2014). Bei über 80 % der untersuchten Patienten lassen sich Mutationen, zumeist *de novo* Mutationen, im für die α_1 -Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanals Nav1.1 kodierenden Gen *SCN1A* finden (McTague et al., 2016, Nieh and Sherr, 2014). Mutationen, die zu einer epileptischen Enzephalopathie führen, sind häufig sporadische Fälle, d.h. sie treten *de novo* bei den Patienten auf (Allen et al., 2013).

In der ILAE-Klassifikation von 2017 wird vorgeschlagen den Begriff „epileptische Enzephalopathie“ terminologisch zu erweitern. Hintergrund ist die Erkenntnis, dass es bei genetischen Enzephalopathien neben der durch die epileptische Aktivität verursachten Entwicklungsverzögerung auch solche gibt, die unabhängig von der Epilepsie direkt durch die genetische Erkrankung verursacht sind. Klinisch können sich unterschiedliche Verläufe manifestieren. So kann sich eine Entwicklungsverzögerung durch das Auftreten von epileptischen Anfällen verstärken oder es zeigt sich eine Entwicklungsverzögerung lange bevor es zum Auftreten von epileptischen Anfällen oder epileptiformen Aktivitäten im EEG kommt. Auch gibt es Erkrankungen, bei denen epileptische Anfälle sistieren, die Verschlechterung der kognitiven, sensorischen und/ oder motorischen Fertigkeiten jedoch fortschreitet. Je nach Hauptmerkmal soll daher von einer

„epileptischen Enzephalopathie“ (EE), einer „entwicklungsbedingten Enzephalopathie“ oder einer „entwicklungsbedingten und epileptischen Enzephalopathie“ (DEE, Englisch: „developmental and epileptic encephalopathy“) gesprochen werden (Scheffer et al., 2017).

1.2 GABA_A-REZEPTOREN

Der wichtigste inhibitorische Botenstoff im Gehirn ist die γ -Aminobuttersäure, kurz GABA (Englisch: *gamma-aminobutyric acid*). GABA_A-Rezeptoren sind ionotrope, ligandengesteuerte Transmembranproteine, die sich bei Bindung von GABA öffnen und dann permeabel für Chlorid- und Bikarbonationen sind. GABA_A-Rezeptoren gehören zur Familie der Cys-Schleifen-Pentamer-Ionenkanäle. Als Heteropentamere sind sie aus 5 unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt. Es wurden 19 Gene identifiziert, die für GABA_A-Rezeptoruntereinheiten (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π und ρ_{1-3}) kodieren. Jede Untereinheit besitzt eine relativ kurze C-terminale, extrazelluläre Region sowie ein langes N-terminales extrazelluläres, hydrophiles Ende, das die Cys-Schleife enthält (siehe Abbildung 2). Diese Cys-Schleife wird aus 13 Aminosäuren gebildet, die über eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten verbunden sind (Miller and Smart, 2010). Zwischen C- und N-terminalem Ende durchspannen vier Transmembrandomänen (M1-M4) die Zellmembran. Zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne befindet sich eine lange intrazelluläre Schleife, die für die Modulation des Rezeptors durch Phosphorylierung bedeutsam ist. Die M2-Domänen aller 5 Untereinheiten bilden zusammen die Pore des Ionenkanals (Stephenson, 1988). Die GABA-Bindungsstelle befindet sich an den N-terminalen Enden der Verbindungsstellen zwischen α - und β -Untereinheit (Sieghart, 1995). GABA_A-Rezeptoren werden von einer ganzen Reihe endogener und exogener Stoffe reguliert. Zu den bekanntesten gehören die Benzodiazepine, die als positive allosterische Liganden (die Bindungsstelle befindet sich zwischen der α - und γ -Untereinheit)

die Affinität von GABA zu seiner Bindungsstelle erhöhen (Graham et al., 1996, Mihic and Harris, 1997).

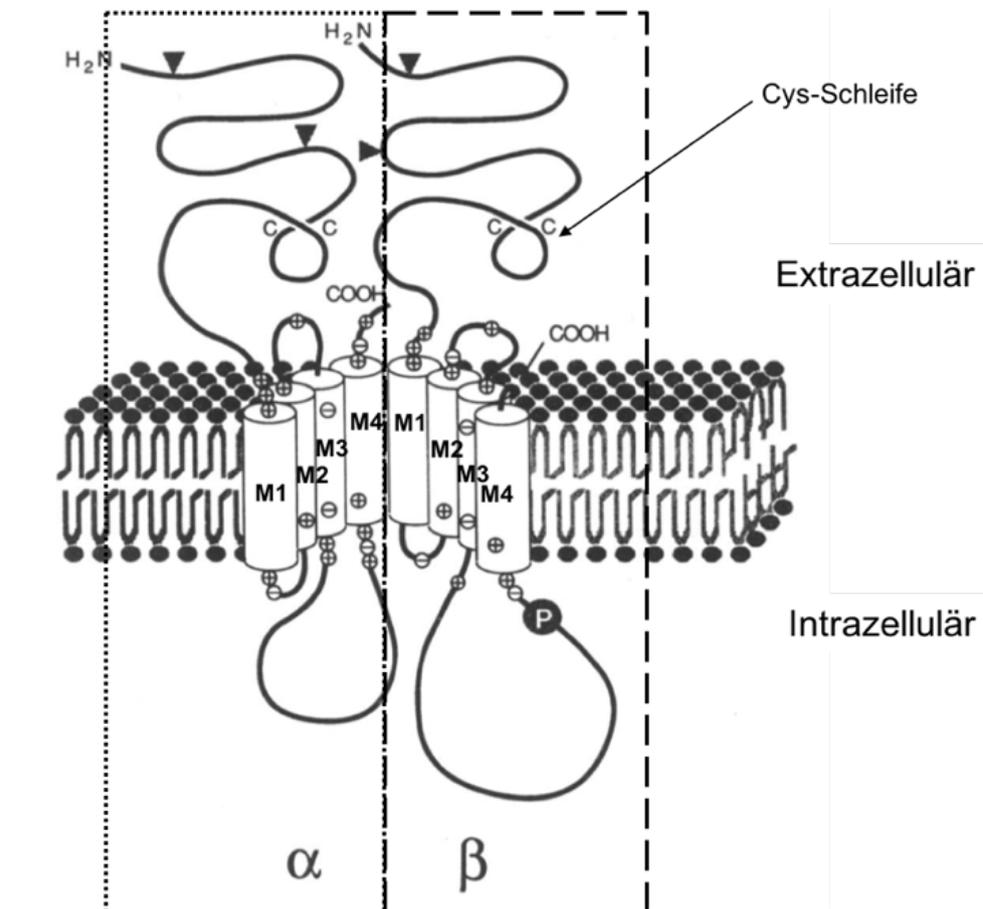


Abb. 2: Schematische Struktur des GABA_A-Rezeptors

Dargestellt ist ein Teil eines GABA_A-Rezeptors mit einer α- und einer β-Untereinheit. Jede Untereinheit besteht aus 4 Transmembrandomänen (M1 - 4). Am N-terminalen Ende ist die Cys-Schleife zu sehen. Zwischen M3 und M4 befindet sich eine lange intrazelluläre Domäne, die Angriffsort für die Modulation der Rezeptoraktivität ist. (Modifiziert nach Jacob et al. (2008)).

Betrachtet man die Anzahl bisher identifizierter Gene, die für Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors kodieren (s.o.), ist zumindest theoretisch eine enorme Vielfalt an unterschiedlichen GABA_A-Rezeptoren denkbar. Alternative Spleissvarianten und RNS-Editierung tragen zu weiteren Veränderungen hinsichtlich der Rezeptorzusammensetzung bei (Daniel and Ohman, 2009). Umfassende Studien haben allerdings gezeigt, dass nur ein geringer Bruchteil der theoretischen Kombinationen tatsächlich auch im menschlichen Gehirn exprimiert wird (Sieghart et al., 1999, Mehta and Ticku, 1999).

Zur Charakterisierung der GABA_A-Rezeptoren können einerseits ihre Verteilung bzw. die Verteilung der Untereinheiten im menschlichen Gehirn, andererseits die pharmakologischen Eigenschaften ihrer Untereinheiten herangezogen werden (Kralic et al., 2002). So zeigen GABA_A-Rezeptoren mit einer γ_2 -Untereinheit eine höhere Benzodiazepin-Sensitivität als Rezeptoren, die eine γ_1 -Untereinheit enthalten (Pritchett et al., 1989b). Die α -Untereinheit scheint den größten Einfluss sowohl auf die Benzodiazepin-Pharmakologie als auch auf die GABA-Affinität des GABA_A-Rezeptors zu haben (Burt and Kamatchi, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass GABA_A-Rezeptoren mit den Untereinheiten $\alpha_1\beta_x\gamma_2$ (wobei β_x für jegliche β -Untereinheit steht) eine hohe Sensitivität für einige Benzodiazepine (BZ) wie Quazepam oder Cinolazepam sowie für Zolpidem, CL218-872 (Triazolopyridazine) und einige β -Carboline besitzen (Typ I BZ-Rezeptoren), während $\alpha_2\beta_x\gamma_2$ -, $\alpha_3\beta_x\gamma_2$ - oder $\alpha_5\beta_x\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptoren eine deutlich geringere Affinität für diese Wirkstoffe zeigen (Typ II BZ-Rezeptoren) (Pritchett et al., 1989a, Sieghart, 1989, Seeburg et al., 1990).

Die α_1 -Untereinheit ist rein quantitativ die am häufigsten vorkommende Untereinheit im menschlichen Gehirn (Duggan and Stephenson, 1990, McKernan et al., 1991a, McKernan et al., 1991b, Endo and Olsen, 1993). Bestimmte Untereinheiten sind wiederum nur in einigen wenigen Hirnarealen zu detektieren. So ist die α_6 -Untereinheit ausschließlich in den Körnerzellen des Kleinhirns zu finden (Hortnagl et al., 2013). Die weitaus häufigste Kombination der Untereinheiten im menschlichen ZNS ist die $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Kombination (60 % aller GABA_A-Rezeptoren). Die Untereinheiten sind dabei in der Reihenfolge $\gamma_2\beta_2\alpha_1\beta_2\alpha_1$ gegen den Uhrzeigersinn angeordnet (Tretter et al., 1997, Baumann et al., 2002, Baur et al., 2006).

GABA_A-Rezeptoren, die die α_1 -Untereinheit enthalten und (post)-synaptisch an Interneuronen liegen, vermitteln v.a. die so genannte phasische Inhibition (Brunig et al., 2002, Rudolph and Mohler, 2004). Die phasische Inhibition ist ein transienter, räumlich definierter, spezifischer Neuron-zu-Neuron-Prozess (Farrant and Nusser, 2005, Walker and Kullmann, 2012). Der durch Liganden- (GABA-) Bindung verursachte Einstrom von Anionen führt zur Hyperpolarisation des Neurons und zu einem inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP)

(Bormann, 1988, Olsen and Sieghart, 2008, Krnjevic and Schwartz, 1967). Die GABA_A-Rezeptoren verhindern durch diese phasische Inhibition die Übererregung von Neuronen, synchronisieren und rhythmisieren die Aktivität von z. B. Pyramidenzellen und sind an der Erzeugung der Theta²- und Gamma-Wellen³ im menschlichen Gehirn beteiligt (Farrant and Nusser, 2005). An Gehirnschnitten von Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass diese α_1 -GABAergen Interneurone eine Hauptrolle bei der Inhibition der Erregungsweiterleitung von Pyramidenzellen während eines epileptischen Anfalls spielen. Eine Beeinträchtigung ihrer inhibitorischen Funktion kann zur Ausbreitung der epileptischen Aktivität über den gesamten Cortex führen (Cammarota et al., 2013, Ferando and Mody, 2014).

1.2.1 Störung der GABAergen Wirkung im ZNS

Aufgrund seiner Rolle als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im Gehirn, birgt die Störung der GABAergen Wirkung im ZNS das Risiko für Übererregbarkeit und das Auftreten von epileptischen Anfällen. Veränderungen bei GABA_A-Rezeptoren stehen daher schon lange im Verdacht, an der Pathogenese der Epilepsie beteiligt zu sein (Haefely, 1980). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass einige antiepileptische Medikamente einen agonistischen Effekt am GABA_A-Rezeptor zeigen.

Eine Beeinträchtigung der GABAergen Wirkung kann einerseits daraus resultieren, dass die Biosynthese von GABA oder die Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt gestört ist. Andererseits kann die Störung auch im postsynaptischen GABA_A-Rezeptor begründet liegen (Olsen et al., 1984, Treiman, 2001). Diese Störung der Rezeptorfunktion wiederum kann durch eine verringerte Rezeptorexpression bzw. verringerte Rezeptorstabilität an der postsynaptischen Zellmembran, eine verminderte GABA-Sensitivität oder eine veränderte Aktivierungskinetik des Rezeptors verursacht sein (Krampfl et al., 2005, Hirose, 2014). Gleich welcher Pathomechanismus zu Grunde liegt, führt er doch immer zu einer „Inhibierung der neuronalen Inhibition“ (Desinhibierung) mit

² Frequenz 4 – 8 Hz

³ Frequenz > 30 Hz

konsekutiver Übererregbarkeit des Neurons (Lerche et al., 2005, Macdonald et al., 2004).

Bis heute wurde eine Vielzahl an Mutationen in den Genen verschiedener Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors mit unterschiedlichen Epilepsieformen in Verbindung gebracht. Dazu gehören die Gene der Untereinheiten α_1 (*GABRA1*) (Allen et al., 2013, Lachance-Touchette et al., 2011, Maljevic et al., 2006), α_6 (*GABRA6*) (Dibbens et al., 2009), β_2 (*GABRB2*) (Allen et al., 2013), β_3 (*GABRB3*) (Tanaka et al., 2008), γ_2 (*GABRG2*) (Harkin et al., 2002, Wallace et al., 2001) (Ishii et al., 2014, Kananura et al., 2002) und δ (*GABRD*) (Dibbens et al., 2004).

Die erste beschriebene Mutation des GABA_A-Rezeptors wurde im Gen der γ_2 -Untereinheit bei einer Familie mit generalisierter Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus identifiziert (Baulac et al., 2001). Diese *missense*-Punktmutation K289M zeigte in funktionellen Analysen reduzierte GABA-induzierte Stromamplituden der in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Die erste Mutation der α_1 -Untereinheit wurde 2002 von Cossette et al. beschrieben. Sie wurde in einer großen kanadischen Familie mit von autosomal-dominant vererbter JME betroffenen Familienmitgliedern entdeckt. Alle betroffenen Familienmitglieder zeigten den gleichen Phänotyp. Bei allen acht betroffenen Verwandten wurde eine heterozygot vorliegende Exonvariante in Exon 9 des *GABRA1*-Gens gefunden. Diese Variante konnte bei den klinisch nicht betroffenen Familienmitgliedern nicht detektiert werden. Die gefundene Variante A322D führt zu einem Austausch der Aminosäure Alanin zu Aspartat in der M3-Transmembrandomäne der α_1 -Untereinheit. Auch hier zeigten funktionelle Untersuchungen in HEK293-Zellen, die den die Mutation enthaltenden GABA_A-Rezeptor ($\alpha_{1Ala322Asp}\beta_2\gamma_2$) exprimieren, eine reduzierte Stromamplitude der durch GABA induzierten Ströme im Vergleich zu den Wildtyp-(WT) GABA_A-Rezeptoren ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$). Untersuchungen der Dosis-Wirkungsbeziehung ergaben eine reduzierte GABA-Bindungsaffinität der mutierten Rezeptoren, die sich durch eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve zeigte (Krampfl et al., 2005). In ersten Experimenten, die den Mechanismus der beschriebenen Funktionseinschränkung des mutierten GABA_A-Rezeptors weiter untersuchten, konnte zunächst kein Hinweis auf eine

reduzierte Rezeptorexpression an der Zellmembran detektiert werden (Cossette et al., 2002). Weitere Untersuchungen zeigten dann, dass der Hauptmechanismus der reduzierten Stromamplituden der A322D mutierten GABA_A-Rezeptoren in der verminderten Gesamt- und Oberflächenmenge der α_1 -Untereinheit liegt (Gallagher et al., 2004). Falsch gefaltete α_{1A322D} -Untereinheiten werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeichert und abgebaut (Gallagher et al., 2007, Gallagher et al., 2005). Der dominant-negative Effekt der Mutation A322D beruht darauf, dass α_{1A322D} -Untereinheiten im ER mit WT- α_1 -Untereinheiten assoziiert werden und dadurch den „Trafficking“-Prozess der Rezeptoren zur Zelloberfläche stören (Ding et al., 2010) (siehe auch Kapitel 4.2.). Die weiteren bisher entdeckten *GABRA1*-Mutationen zeigen ein großes phänotypisches Spektrum. Dieses reicht von Absence-Epilepsie des Kindesalters (Maljevic et al., 2006) zu Dravet-Syndrom und anderen schweren Formen der DEE (Lachance-Touchette et al., 2011, Allen et al., 2013, Carvill et al., 2014).

1.2.2 Vier neue *GABRA1*-Mutationen bei Patienten mit Epilepsie

Im Rahmen einer internationalen Kollaboration unter Beteiligung europäischer und US-amerikanischer Epilepsiezentren und humangenetischer Institute und Diagnostik-Firmen wurden Patienten, die an verschiedenen Epilepsien des Kindesalters leiden, erfasst. Mittels „next generation sequencing“ wurden bei einer Kohorte von 432 Probanden 85 bekannte Epilepsie-Gene untersucht. Bei drei Probanden konnten verschiedene Mutationen im *GABRA1*-Gen identifiziert werden. Weitere 13 *GABRA1*-Mutation-positive Probanden wurden an den beteiligten Zentren ermittelt. Alle Probanden wurden eingehend klinisch untersucht. Zudem wurden bildgebende Verfahren und EEG-Untersuchungen durchgeführt. Die epileptischen Anfälle der Probanden wurden anhand der ILAE-Klassifikation eingeordnet und gegebenenfalls erfolgte die Diagnose eines Epilepsie-Syndroms. Auf diese Weise ergibt sich ein komplexes Bild des phänotypischen Spektrums von *GABRA1*-Mutationen (Johannesen et al., 2016). Im Rahmen dieser Dissertation wurden die funktionellen Konsequenzen von vier ausgewählten *GABRA1*-Mutationen mit Hilfe der Zweielektrodenspannungsklemmen-Technik in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht. Die Ergebnisse gingen

in den Fachartikel „Phenotypic spectrum of *GABRA1* - From generalized epilepsies to severe epileptic encephalopathies“ (Johannesen et al., 2016) ein. Die vier ausgewählten Mutationen sind auf Proteinebene: R214H = p.Arg214His, S76R = p.Ser76Arg, I389V = p.Ile389Val und F104C = p.Phe104Cys (im Folgenden wird der Einbuchstabencode verwendet). Molekularbiologisch führen die genannten Mutationen jeweils zu Punktmutationen in der Aminosäurekette der α_1 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors. So ist bei der Mutation R214H Arginin durch Histidin an der Stelle 214 der Aminosäurekette ersetzt. Entsprechend kommt es bei der Mutation S76R zu einem Austausch von Serin zu Arginin an Position 76, bei der Mutation I389V zu einem Austausch von Isoleucin zu Valin an Position 389 und bei der Mutation F104C zu einem Austausch von Phenylalanin zu Cystein an Position 104. Einen Überblick über die Lokalisation der Punktmutationen in der α_1 -Untereinheit gibt Abbildung 3.

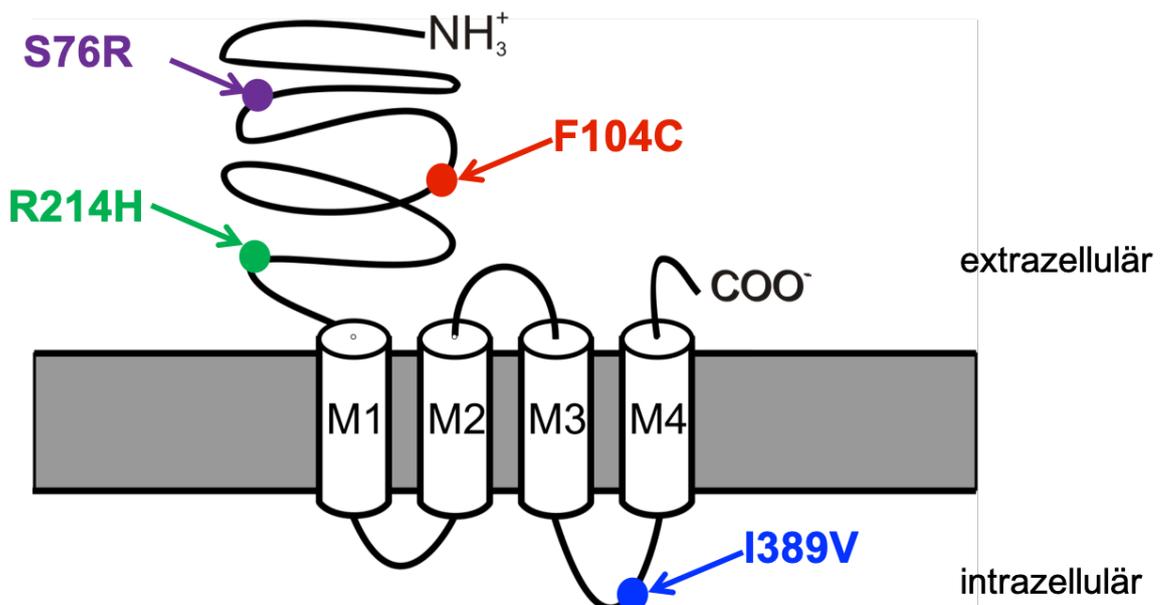


Abb. 3: Lokalisation der vier untersuchten Punktmutationen in der α_1 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors.

Die vier Transmembrandomänen M1-M4 durchziehen die Zellmembran. Die Mutationen p.S76R, p.F104C und p.R214H liegen im N-terminalen Ende, die Mutation p.I389V in der intrazellulären Schleife zwischen M3 und M4. (Modifiziert nach Johannesen et al. (2016)).

Drei der ausgewählten vier Mutationen (R214H, S76R und I389V) sind phänotypisch mit einer schweren Epilepsieform verbunden, während die Träger der Mutation F104C klinisch an milden Epilepsie-Formen leiden.

Im Folgenden werden die Phänotypen der vier ausgewählten *GABRA1*-Mutationen kurz umrissen.

Die bei Erscheinen des Fachartikels 35 Jahre alte Trägerin der *de novo* Mutation R214H erlitt im Alter von 15 Monaten den ersten prolongierten Fieberkrampf. Im Verlauf zeigte sie auch GTKA, myoklonische, atonische und auch fokale Anfälle. Hinsichtlich der psychomotorischen Entwicklung war sie bei Geburt unauffällig, zeigte aber im weiteren Verlauf schwere Entwicklungsrückstände. Ihr EEG zeigte ein generalisiertes Polyspike-wave-Muster, während sich bildmorphologisch mittels MRT keine Auffälligkeiten zeigten. Mit antiepileptischer Medikation konnte keine Anfallsfreiheit erreicht werden. Insgesamt konnte die Diagnose EE gestellt werden.

Die *de novo* Mutation S76R wurde sowohl bei einem 8-jährigen Mädchen als auch bei einem 16 Jahre alten männlichen Jugendlichen gefunden. In beiden Fällen war die Familienanamnese hinsichtlich Epilepsieerkrankungen unauffällig. Die epileptischen Anfälle manifestierten sich im Alter von 6 bzw. 5 Monaten. Während das Mädchen an asymmetrischen GTKA, Myoklonien und atypischen Absencen litt, zeigte der Jugendliche zunächst Hemiklonien, im weiteren Verlauf jedoch auch fokale, GTKA und einen konvulsiven Status epilepticus. Bei beiden wurden schwere psychomotorische Entwicklungsverzögerungen diagnostiziert. Die MRT zeigte jeweils keine strukturellen Auffälligkeiten. Die epileptischen Anfälle waren pharmakoresistent. Das 8-jährige Mädchen erhielt die Diagnose „Dravet-Syndrom-ähnliches Epilepsie-Syndrom“, bei dem 16-jährigen Jungen wurde eine EE diagnostiziert (Johannesen et al., 2016).

Die Eltern der I389V-Mutationsträgerin waren konsanguin (Cousine/Cousin). Der jüngere Bruder war schwer-mehrfach behindert und litt unter einer schweren Epilepsie. Er starb im Alter von 15 Jahren. Eine genetische Testung war nicht erfolgt. Bei der Mutter konnte die Mutation I389V nicht nachgewiesen werden. Der Vater konnte nicht mehr getestet werden. Es ist daher unklar, ob die Mutation I389V bei der Probandin *de novo* vorlag oder vom Vater vererbt wurde. In der mütterlichen Linie (Großmutter und Ur-Großmutter) gab es Fälle von einer *SPAST*-assoziierten hereditären spastischen Paraplegie. Bei der Mutter und

Schwester der Probandin wurde ebenfalls eine heterozygote *SPAST*-Mutation (p.S545X) detektiert. Bei der Probandin lag dieselbe Mutation homozygot vor. Phänotypisch kam es bei der Patientin erstmals im Alter von 5 Monaten zu einem GTKA von 20 - 30 min Dauer 24 Stunden nach einer DTP-Impfung. Im Verlauf zeigten sich Anhalte für eine generelle Entwicklungsverzögerung. Dysmorphie-Zeichen lagen keine vor. Innerhalb des ersten Lebensjahres kam es erneut zu drei komplizierten generalisierten Fieberkrämpfen. Im Alter von 2 Jahren war sie motorisch und mental auf dem Entwicklungsstand eines 2 Monate bzw. 3 Monate alten Kindes. Unter einer spiegelkontrollierten Therapie mit Phenobarbital und Phenytoin persistierten die Anfälle in Form von GTKA und Absencen. Myoklonische Anfälle kamen hinzu. Im EEG zeigten sich anhaltende, generalisierte Spikes und Polyspikes. Eine im Alter von 7 Jahren durchgeführte MRT zeigte u.a. eine zerebelläre Hypoplasie, eine Verjüngung des Corpus callosum und der Medulla sowie eine Pachygyrie des rechten Frontallappens. Die Mutation F104C wurde bei einer Mutter und ihren beiden Söhnen gefunden. Während die Mutter und der ältere Sohn an GTKA mit vorangehender Übelkeit, Kopfschmerzen und Skotomen litten, manifestierte sich bei dem jüngeren Sohn eine JME. In allen drei Fällen zeigte das EEG ein generalisiertes Spike-wave-Muster. Die psychomotorische Entwicklung war unauffällig. Die MRT zeigte bei keinem der drei Probanden strukturelle Auffälligkeiten. Der erste epileptische Anfall der Mutter manifestierte sich im Alter von 14 Jahren. Im Verlauf der nächsten Jahre zeigte sie seltene GTKA und war ab dem 19. Lebensjahr ohne antiepileptische Medikation anfallsfrei. Die Diagnose lautete IGE mit tonisch-klonischen Anfällen. Die tonisch-klonischen Anfälle zeigten sich bei dem älteren Bruder erstmals mit 7,5 Jahren. Unter Valproat und Lamotrigin war er anfallsfrei. Auch nach einem Auslassversuch war er dauerhaft anfallsfrei. Auch hier lautete die Diagnose IGE mit tonisch-klonischen Anfällen. Die myoklonischen Anfälle der JME des jüngeren Bruders manifestierten sich im Alter von 13 Jahren. Unter einer Therapie mit Valproat war er anfallsfrei (Johannesen et al., 2016).

1.3 ZIELSETZUNG

Die Entdeckung spezifischer, epilepsieassoziierter Gendefekte und das Verstehen der funktionellen molekularen Folgen bilden die Grundlage für die

Optimierung und Entwicklung von Epilepsitherapien. Daraus ergibt sich als Zielsetzung dieser Arbeit, die Auswirkung der vier *GABRA1*-Punktmutationen R214H, S76R, I389V und F104C auf die Funktionsweise des GABA_A-Rezeptors *in vitro* zu untersuchen. Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Inwiefern unterscheidet sich die Stromamplitude der durch die Applikation von GABA evozierten Ionenströme der mutierten GABA_A-Rezeptoren von der des WT-GABA_A-Rezeptors?
- Gibt es einen Unterschied in der GABA-Sensitivität zwischen mutierten und WT-GABA_A-Rezeptoren?
- Welche Parameter GABA-induzierter Ionenströme können bei Simulation der heterozygoten Situation mit Koexpression mutierter und WT-GABA_A-Rezeptoren *in vitro* gemessen werden?

Da die untersuchten Mutationen bei Epilepsie-Patienten mit unterschiedlicher Schwere des klinischen Phänotyps gefunden wurden, stellte sich darüber hinaus die Frage:

- Inwiefern gibt es eine Korrelation zwischen elektrophysiologischen *in-vitro*-Messergebnissen und klinischer Präsentation der Epilepsie?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Geräte und Software

Gerät/ Software	Hersteller
Thermocycler	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Eppendorf, Heraeus
Elektrophoresekammer DNS	Biometra
Elektrophoresekammer RNS	Biometra
Schüttelinkubator	Biobase
Vortexer	Fisher Scientific
Gefrierschrank	Liebherr
Präzisionswaage	Kern
Nanodrop™ Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Flachbettschüttler	Thermo Fisher Scientific
Stereomikroskop	Kern
uEYE Kamera	Imaging Development Systems
Design-Programm DNASTar	DNASTar Inc
Primer Select (Primer Select 5.07)	
Roboinject + Software + Mikroskop	Multi Channel Systems
Robocyte2	Multi Channel Systems
Messkopf	Multi Channel Systems
Injektionsnadel	Multi Channel Systems
Robocyte2+ Software	Multi Channel Systems
Origin® 9	OriginLab Corporation
Clampfit	pClamp 8.2, Axon Instruments
Microsoft Excel	Microsoft
Prism 6	GraphPad Prism Software

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pipetten	BioHit/Eppendorf
Mikroreaktionsgefäß, Vol. 1,5 ml	Eppendorf
Phase Lock Gel™	Eppendorf
Petrischale	Thermo Fisher Scientific
Spezielle Tubes für Maxiprep	Quiagen
Polypropylengefäß, Vol. 50 ml, Ø 30 mm	Sigma Aldrich
Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (96-well-Platte)	Sigma Aldrich

2.1.3 Substanzen

Grundsubstanzen	Hersteller
DEPC-H ₂ O 0,1 %	Sigma Aldrich
Ethanol 70 %	SAV Liquid Production
Ethanol 100 %	SAV Liquid Production
B-Trypton	Sigma Aldrich
Yeastextrakt	Sigma Aldrich
Ampuwa-H ₂ O	Fresenius Kabi

Mutagenese	Hersteller
QuikChange site-directed mutagenesis kit	Agilent Technologies
Nucleotides dNTP mix	GeneON
Reaktionspuffer 10x	Agilent Technologies
DNS-Template (50 ng/µl)	Thermo Fisher Scientific
pcDNA3.1(-)	
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase	Agilent Technologies
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega GmbH
DPN I Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific

Primer	Gensequenz 5' → 3'	Hersteller
GABRA1-R214H-F (10 pM)	CAG AAG ATG GAT CAC ATC TAA ACC AGT ATG A	
GABRA1-R214H-R (10 pM)	TCA TAC TGG TTT AGA TGT GAT CCA TCT TCT G	
GABRA1-I389V-F (10 pM)	GGG CTT AGC CAC CGT TGC TAA AAG TGC	
GABRA1-I389V-R (10 pM)	GCA CTT TTA GCA ACG GTG GCT AAG CCC	Thermo Fisher
GABRA1-F10C-F (10 pM)	ATG AAA GGT TAA AAT GTA AAG GAC CTA TGA C	Scientific
GABRA1-F104C-R (10 pM)	GTC ATA GGT CCT TTA CAT TTT AAC CTT TCA T	
GABRA1-S76R-F (10 pM)	ATC TTC GTC ACC CGT TTC GGA CCC G	
GABRA1-S76R-R (10 pM)	CGG GTC CGA AAC GGG TGA CGA AGA T	

Transformation, Minipräparation und Maxipräparation

Hersteller

Top10 E. coli Bakterien	Thermo Fisher Scientific
illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit	GE Healthcare Europe
PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Fisher Scientific
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma Aldrich
Glycerol 50 %	Carl Roth
Ampicillin	Car Roth
Glycerol 80 %	Carl Roth

DNS-Linearisierung

Hersteller

Enzym Hind III	Sigma Aldrich
----------------	---------------

Enzym BamH I	Sigma Aldrich
Puffer	Sigma Aldrich
Phenol-Chloroform-Gemisch (Verhältnis 1:1)	Sigma Aldrich
Chloroform/Isomylalkohol (Verhältnis 24:1)	Sigma Aldrich
Ammoniumacetat	Sigma Aldrich

Gelelektrophorese

Hersteller

Agarose	Carl Roth
Tris-Borate-EDTA (TBE)-Puffer	AppliChem
Red Safe™ Nucleic Acid Staining Solution	iNtRON Biotechnology
DNA-Leiter Mix, peqGOLD	VWR Life Science Competence Center
Ladepuffer Orange G (C.I. 16230)	Carl Roth GmbH

***In-vitro*-Transkription**

Hersteller

mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific
Natriumacetat 3M, pH 5,2	Carl Roth

Oozyten

Hersteller

Xenopus laevis Oozyten	Ecocyte Bioscience, Castrop-Rauxel
	Physiologie I, Tübingen
KCl	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Sigma Aldrich
HEPES	Biochrom
NaHCO ₃	Sigma Aldrich
CaCl ₂	Sigma Aldrich
MgSO ₄	Sigma Aldrich
Tris HCl	Sigma Aldrich
Gentamicin	Carl Roth
Kollagenase Typ III	Biochrom

GABA	Sigma Aldrich
Kac	Sigma Aldrich

2.1.4 Lösungen und Medium

Lösung/ Medium	Zusammensetzung
TBE-Puffer 1 x	17,028 g TBE-Puffer in 1 L vollentsalztem H ₂ O
LB-Medium	10 g B-Trypton 5 g Yeastextrakt 10 g NaCl 1000 ml H ₂ O pH 7,0 eingestellt mit NaOH Autoklavieren
LB-Agarplatte mit Ampicillin	3,75 g Agar-Agar 250 ml LB-Medium in Mikrowelle erhitzen, abkühlen lassen 500 µl Ampicillin Ca. 15 ml pro Petrischale
Oozyten-Ringer-Lösung kalziumfrei (OR2-Lösung)	2, 82,5 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,0 mM MgCl ₂ 5 mM HEPES pH 7,6 eingestellt mit NaOH
Barth-Lösung	88 mM NaCl 1mM KCl 2,4 mM NaHCO ₃ 0,41mM CaCl ₂ 0,82 mM MgSO ₄ 5 mM Tris HCl 50 mg/L Gentamicin pH 7,4 eingestellt mit NaOH

ND96-Lösung	93,5 mM NaCl
	2 mM KCl
	1,8 mM CaCl ₂
	2 mM MgCl ₂
	5 mM HEPES
	pH 7,5, eingestellt mit NaOH
Kollagenase-Lösung	100 mg Kollagenase Typ III, CLS III
	50 ml OR2-Lösung
Elektrolytlösung	für 1 M KCl
Glaselektroden des Robocyte2	1,5 M Kac
Messkopf	pH 7,2, eingestellt mit NaOH
GABA-Stocklösung	10 mM GABA
	ND96-Lösung

2.2 METHODEN

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Insertion von Punktmutationen durch zielgerichtete Mutagenese

Bevor die Gensequenz des *GABRA1*-Gens durch zielgerichtete Mutagenese verändert wurde, erfolgte die Klonierung der cDNS, die für die α_1 -, β_2 - und γ_2 -Untereinheit kodieren, in einen Vektor. Bei der Klonierung werden cDNS-Fragmente mit dem Ziel der Vervielfältigung, stabilen Lagerung und Verwendung sowie der Möglichkeit zur *in-vitro*-Transkription der cDNS-Sequenz in einen Vektor eingefügt. Als Vektor wurde ein Plasmid verwendet. Plasmide sind extrachromosomale, doppelsträngige, zirkuläre cDNS-Moleküle, die in Bakterien autonom repliziert werden. Ein Plasmid enthält immer einen Replikationsursprung, ein Selektionsgen (zumeist eine Antibiotikumresistenz) und eine Klonierungsstelle, die dazu dient, fremde cDNS in das Plasmid einzubauen (Mülhardt, 2013). Zur Regulation der Genexpression ist häufig ein Promotor der Klonierungsstelle vorgeschaltet. Für das zielgerichtete Einfügen der Punktmutationen (Mutagenese) wurde der Vektor pcDNA™3.1/Hygro (-) (siehe Abbildung 4) genutzt. Dieser enthält eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker, einen CMV-Promotor, sowie einen T7 Promotor für die cRNS Synthese. Die Klonierungsstelle enthält Basensequenzen, die von unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen spezifisch erkannt und geschnitten werden. Darunter befinden sich die Schnittstellen für Hind III und BamH I.

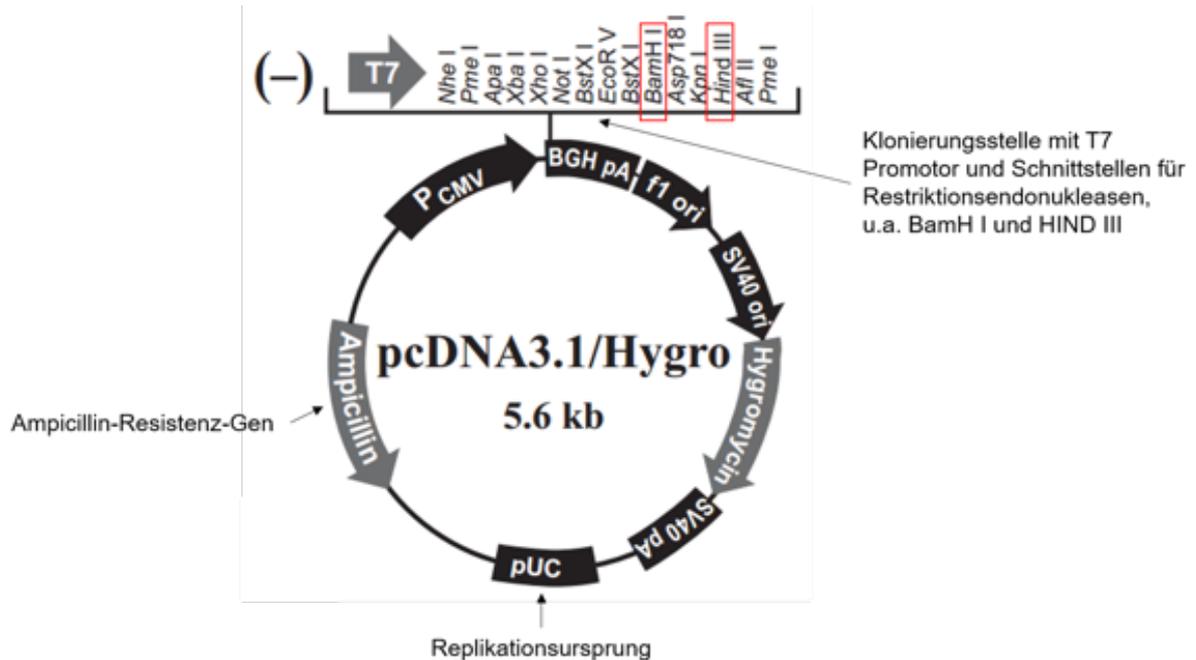


Abb. 4: pcDNA3.1/Hygro (-) – Vektor

Die Abbildung zeigt den für die Klonierung der Gene *GABRA1*, *GABRB2* und *GABRG2* verwendeten Plasmidvektor pcDNA3.1/Hygro (-) mit Replikationsursprung, Ampicillin-Resistenz-Gen als Selektionsgen und Klonierungsstelle mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und unter Kontrolle des T7-Promotors. (Modifiziert nach invitrogen, User guide: pcDNA™3.1/Hygro (+) and pcDNA™3.1/Hygro (-), (2012), 2012c)).

Die Klonierung der Gene *GABRA1*, *GABRB2* und *GABRG2* in jeweils einen pcDNA3.1/Hygro (-) Vektor wurde von Dr. Patrick Cossette, der uns die entstandenen Plasmide freundlicherweise zur Verfügung stellte, vorgenommen. Das Plasmid mit der klonierten *GABRA1*-WT-Sequenz diente als Template für die anschließende zielgerichtete Mutagenese. Dabei macht man sich das Funktionsprinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Englisch: polymerase chain reaction = PCR) zunutze. Die PCR dient ursprünglich der Amplifikation, d.h. Vervielfältigung von cDNS, wobei in mehreren Zyklen bereits produzierte cDNS-Moleküle als Vorlage für weitere Kopien dienen. Als Ausgangssubstrate werden ein cDNS-Template, eine thermostabile cDNS-Polymerase, Oligonukleotidprimer und Nukleotide benötigt. Ein Zyklus besteht aus drei temperaturabhängigen Teilschritten: die Denaturierung, d.h. die Auftrennung der komplementären cDNS-Templatestränge, das Annealing, wobei die Oligonukleotideprimer an die komplementären cDNS-Sequenzen binden (Hybridisierung) und die Elongation, bei der die cDNS-Polymerase die Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang

vervollständigt. Über die Amplifikation eines cDNS-Abschnitts zwischen zwei Primern hinaus, kann die PCR zum Einfügen einer Punktmutation verwendet werden (Weiner et al., 1994). Für den Einbau der jeweiligen Punktmutation in das *GABRA1*-Gen wurde das QuikChange site-directed mutagenesis kit von Agilent Technologies verwendet. Mit Hilfe des Design-Programms DNASTar Primer Select wurden Oligonukleotidprimer, die den gewünschten Basenaustausch tragen, designt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten Punktmutationen

Aufgelistet sind alle untersuchten Punktmutationen mit Angabe der Position des Aminosäureaustauschs im Protein, der Position des Basenaustauschs in der cDNS sowie die für die Mutagenese designten Vorwärts- und Rückwärts-Primer.

	Mutation	Punktmutation im Protein	Punktmutation in der cDNS	Sequenz der für die Mutagenese verwendeten Primer
I.	R214H	Arg → His, 214	G → A, 642	F: 5'-CAGAAGATGGATCA CATCTAAACCAGTATGA-3'
II.				R: 5'-TCATACTGGTTTAGA TGTGATCCATCTTCTG-3'
III.	I389V	Ile → Val, 389	A → G, 1167	F: 5'-GGGCTTAGCCACC GTTGCTAAAAGTGC-3'
IV.				R: 5'-GCACTTTTAGCAA CGGTGGCTAAGCCC-3'
V.	S76R	Ser → Arg, 76	A → C, 228	F: 5'-ATCTTCGTCACCCGT TTCGGACCCG-3'
VI.				R: 5'-CGGGTCCGAAACGGG TGACGAAGAT-3'
VII.	F104C	Phe → Cys, 104	T → G, 312	F: 5'-ATGAAAGGTTAAAA TGTAAGGACCTATGAC-3'
VIII.				R: 5'-GTCATAGGTCCTTTAC ATTTAACCTTTCAT-3'

Die so amplifizierte Plasmide enthalten an der entsprechenden Stelle die gewünschte Mutation. Abbildung 5 zeigt das Prinzip der zielgerichteten Mutagenese.

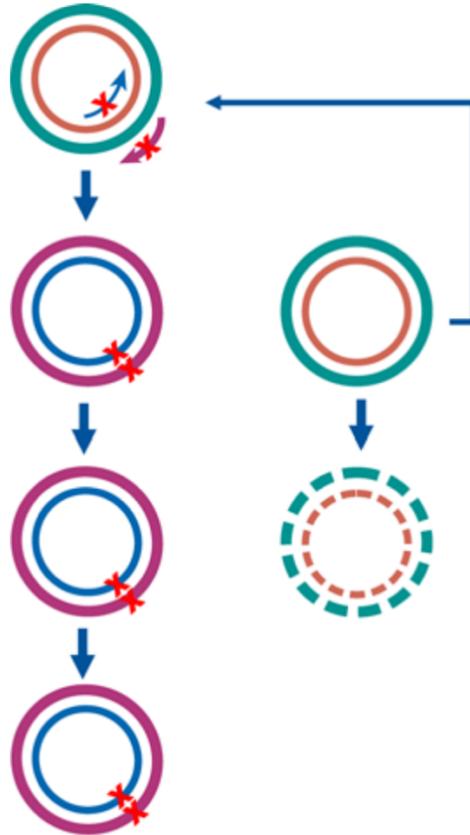


Abb. 5: Das Prinzip der zielgerichteten Mutagenese mit Hilfe von Strang- und Gegenstrangprimern.

Das **X** symbolisiert den Basenaustausch im Strang- und Gegenstrangprimer. Während eines PCR-Zyklus werden die Stränge durch die hitzestabile Pfu-Polymerase vervollständigt und es entstehen Plasmide, die die gewünschte Punktmutation tragen. Nach Zerstörung der methylierten WT-Plasmide durch Dpn I werden die mutationstragenden Plasmide gereinigt und in kompetente Zellen transformiert. (Modifiziert nach Agilent Technologies, QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Instruction Manual, (2015), 2015).

Die PCR-Reaktion wurde wie in Tabelle 3 aufgeführt angesetzt und in einem Thermocycler nach dem in Tabelle 4 gezeigten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 3: PCR-Ansatz zur zielgerichteten Mutagenese

Für die Reaktionsmischung wurden die designten Vorwärts- und Rückwärts-Primer, eine gebrauchsfertige Mischung aus dNTP, der pcDNA3.1-Vektor mit dem klonierten *GABRA1*-Gen als Template, eine hitzestabile cDNS-Polymerase und Reaktionspuffer in der angegebenen Menge zusammengegeben und mit DEPC-H₂O auf ein Zielvolumen von 25 µl aufgefüllt.

Substanz	Menge in µl
Vorwärts-Primer, c = 10 pM	0,5
Rückwärts-Primer, c = 10 pM	0,5
Gebrauchsfertige dNTP-Mischung	0,5
Reaktionspuffer 10x	2,5
pcDNA3.1-Vektor mit kloniertem <i>GABRA1</i> -Gen als cDNS-Template, c = 50 ng/µl	1,0
Pfu Ultra Turbo Polymerase	0,5
DEPC-H ₂ O	19,5 (ad 25)

Tabelle 4: Häufigkeit, Temperatur und Dauer der einzelnen PCR-Phasen

Nach einer initialen Aufwärmphase auf 95 °C für 1 min wurden die sich anschließenden 3 Phasen 17-mal wiederholt. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben für 7 min bei 68 °C belassen und anschließend bei 4 °C über Nacht gelagert.

Häufigkeit	Temperatur	Dauer
1	95 °C	1 min
	95 °C	50 sec
17	57 °C	50 sec
	68 °C	6 min
1	68 °C	7 min
1	4 °C	∞

Um die Qualität (Reinheit) und Quantität (Konzentration) der PCR-Produkte abschätzen zu können, wurde von jedem der vier Ansätze eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Parallel zur Gelelektrophorese wurde ein Verdau mit Dpn I vorgenommen, um die WT-Plasmide aus dem Ansatz zu entfernen. Dazu wurden alle Proben mit jeweils 1 µl Dpn I versetzt und bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Die Restriktionsendonuklease Dpn I erkennt und

zerschneidet spezifisch methylierte cDNS anhand der Sequenz GA^{m6}TC (Pingoud and Jeltsch, 2001). Auf diese Weise werden die cDNS-Templates, die im Gegensatz zum PCR-Produkt methyliert sind, abgebaut.

2.2.1.2 Transformation der Plasmid-cDNS in kompetente Bakterien durch Hitzeschock

In der Molekularbiologie versteht man unter Transformation die Aufnahme von freier cDNS in z. B. kompetente Bakterien (Smith et al., 1981). Auf diese Weise kann Plasmid-cDNS durch die Proliferation der Bakterien vervielfältigt werden. Die natürlicherweise nicht kompetenten *E. coli* Bakterien können durch verschiedene Verfahren Transformationskompetenz erlangen. Die Herstellung der bei dieser Arbeit genutzten kompetenten *E. coli* Zellen des Stamms Top10 wurde freundlicherweise von Nicole Zepezauer durchgeführt. Dabei wurde die Calciumchlorid-Methode angewandt (Cohen et al., 1972). Es wurden nur autoklavierte Materialien und Lösungen verwendet sowie der Arbeitsplatz und -geräte stets desinfiziert. Die *E. coli*-Bakterien des Stamms Top10 wurden in einer Übernachtkultur in LB-Medium bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator (200 – 300 UpM) bis zu einer OD von 0,6 – 0,7 wachsen gelassen. Die Bakterienkultur wurde dann auf Eis gestellt, zentrifugiert und das entstandenen Pellet mit CaCl₂-Lösung gelöst. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in CaCl₂ und Glycerol 50 % in einem Verhältnis von 3:1 gelöst, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 50 µl der aufgetauten, kompetenten *E. coli* Zellen vorsichtig mit 8 µl des PCR-Produktes in einem Gefäß gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s in einem vorgeheizten Thermocycler durchgeführt und die Proben anschließend sofort für 2 min auf Eis überführt. 250 µl warmes LB-Medium wurden hinzugegeben und 1 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden 200 µl des Überstandes verworfen und 50 µl der Bakterien auf einer auf 37 °C vorgewärmten LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert und für 24 h bei 37 °C gelagert.

2.2.1.3 Isolierung der Plasmid-cDNS aus Bakterien (Minipräparation)

Ziel der Minipräparation ist die Gewinnung der Plasmid-cDNS aus Bakterien zur Überprüfung der Nukleotidsequenz der Plasmid-cDNS durch Sequenzierung. Dazu wird in einem ersten Schritt die bakterielle Zellwand zerstört und in den folgenden Schritten die Plasmid-cDNS von Proteinen, Phospholipiden, genomischen DNS und RNS gereinigt. Als Verfahren wurde die alkalische Lyse gewählt. Dabei wurde das illustra plasmidPrep Mini Spin Kit von GE Healthcare verwendet und nach Herstellerprotokoll verfahren. Von jeder der für 24 h inkubierten Agarplatten wurden 6 Einzelkolonien gepickt, d.h. mit einem Zahnstocher wurde Material einer Bakterienkultur in 5 ml LB-Medium versetzt mit 10 µl Ampicillin überführt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zugleich wurde von jeder gepickten Einzelkolonie ein Glycerolstock angelegt. Dazu wurden Glycerol 80 % und Bakteriensuspension im Verhältnis 1:1 (meist je 500 µl) gemischt und bei -80 °C eingefroren. Von der Übernachtskultur wurden 1,5 µl in ein Gefäß überführt und für 30 s bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und weitere 1,5 µl der Übernachtskultur hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 175 µl Lysepuffer Typ 7 (enthält RNase A) resuspendiert. Anschließend wurden 175 µl Lysepuffer Typ 8 (alkalische Lyse der Bakterien und Denaturierung der genomischen DNS und Proteine) und 350 µl Lysepuffer Typ 9 (enthält eine Acetatpufferlösung zur Neutralisierung des pH-Wertes) hinzugegeben und der Ansatz vorsichtig durch Invertieren gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 4 min bei 13.000 UpM. Der Überstand wurde in eine gebrauchsfertige Säule in einem Auffanggefäß überführt und 30 s bei 13.000 UpM zentrifugiert. Dabei bindet die Plasmid-cDNS an die Säulenmembran, während z. B. Proteine durch die Membran in das Auffanggefäß filtriert werden. Es wurden 400 µl Waschpuffer Typ 1 hinzugefügt und erneut für 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das Auffanggefäß samt Inhalt wurde verworfen und die Säule in ein neues Gefäß überführt. Abweichend vom Herstellerprotokoll (100 µl) wurden 50 µl Elutionspuffer Typ 4 beigefügt, der Ansatz 30 s bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 30 s bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die Konzentration der durch den Elutionspuffer aus der Säulenmembran gelösten Plasmid-cDNS wurde

mittels Nanodrop™ Spektrophotometer bestimmt. Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung des Plasmids (siehe 2.2.1.6).

2.2.1.4 Isolierung der Plasmid-cDNS aus Bakterien (Maxipräparation)

Nach Überprüfung der Nukleotidsequenz der isolierten Plasmide wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Ziel ist es, aus den transformierten Bakterienkulturen mit korrekter Nukleotidsequenz der Plasmid-cDNS eine möglichst große Menge an Plasmid-cDNS zu isolieren. Dazu wurde von den jeweiligen Glycerolstocks, die im Zuge der Minipräparation angefertigt wurden (siehe 2.2.1.3) mit einem Zahnstocher etwas Material in ein Gefäß mit 5 ml LB-Medium + 10 µl Ampicillin überführt. Diese sogenannte Vorkultur wurde bei 37 °C für 5 – 8 h auf einem Flachbettschüttler (180 UpM) inkubiert. Anschließend wurde ein Erlenmeyerkolben mit 250 ml LB-Medium und 500 µl Ampicillin gefüllt und die Vorkultur hinzugefügt. Diese Kultur wurde über Nacht erneut bei 37 °C auf einem Flachbettschüttler (180 UpM) inkubiert. Die Übernachtskultur wurde auf Polypropylengefäße mit einem Fassvolumen von 50 ml aufgeteilt und für 10 min bei 4000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Für die weiteren Schritte wurde das PureLink® HiPure Plasmid Filter Purification Kit von Invitrogen verwendet. Darin enthalten sind gebrauchsfertige Säulen, die eine zusätzliche innere Filterkartusche besitzen (siehe Abbildung 6). Die Säule besteht aus einem Anionenaustauschharz, an das die stark negativ geladenen Nukleinsäuren binden.

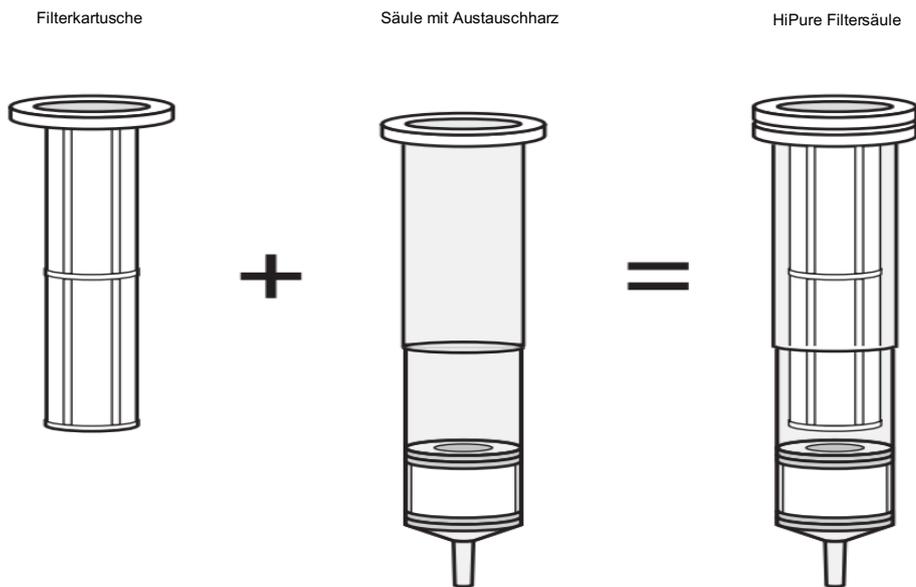


Abb. 6: Filterkartusche und Säule mit Austauschharz

Die Filterkartusche ist gebrauchsfertig in die Säule mit dem Austauschharz integriert und kann nach dem ersten Waschschrift entnommen und verworfen werden. Mit Hilfe der Filterkartusche wird das Lysat gereinigt. An das positiv geladene Austauschharz der Säule binden die negativ geladenen Nukleinsäuren. (Modifiziert nach invitrogen, User guide: PureLink® HiPure Plasmid Filter Purification Kits, (2011), 2011).

Eine Säule wurde in einen speziellen Ständer mit Auffangbecken gestellt und mit 30 ml Äquilibrierungspuffer (EQ1) befüllt. Bei diesem Schritt wird das Austauschharz positiv geladen. Während der Puffer durch die Säule drainierte, wurden die Bakterienpellets in 10 ml Resuspensionspuffer mit RNase A (R3) gelöst. Dabei wurde zunächst ein Pellet mit 10 ml Puffer resuspendiert und die entstandene Suspension in das nächste Polypropylengefäß mit Bakterienpellet überführt. Auf diese Weise wurden alle Pellets in insgesamt 10 ml Resuspensionspuffer gelöst und in einem Gefäß gesammelt. 10 ml Lysepuffer (L7) wurden hinzugegeben und der Ansatz durch Invertieren gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml Präzipitationspuffer (N3) beigefügt, erneut invertiert und der Ansatz über die Säule gegeben. Mit insgesamt 10 ml Waschpuffer (W8) wurden die Polypropylengefäße nachgespült und die Suspension ebenfalls über die Säule gegeben. Während die Suspension vollständig durch die Säule tropfte, wurde eine Zentrifuge auf 4 °C vorgekühlt. Im Anschluss wurde die innere Filterkartusche entfernt. Die Säule wurde mit 50 ml Waschpuffer gewaschen und der gesamte Durchfluss verworfen. Ein neues Polypropylengefäß (Fassvermögen 50 ml) wurde unter der Säule platziert und

die Plasmid-cDNS mit 15 ml Elutionspuffer (E4) aus der Säule gewaschen. Die Säule wurde verworfen und der im Elutionspuffer gelösten Plasmid-cDNS 10,5 ml Isopropanol hinzugefügt. Nach Invertieren wurde die Lösung für 40 – 60 min bei 4 °C und 8500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Nach Zugabe von 5 ml Ethanol 70 % wurde erneut für 15 min bei 4 °C und 8500 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in Abhängigkeit von der abgeschätzten Größe des Pellets in 50 – 500 µl Ampuwa-H₂O gelöst. Die gelöste Plasmid-cDNS wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, die Konzentration photospektrometrisch bestimmt und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.5 Analyse von cDNS mittels Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung und damit Identifikation von cDNS- bzw. cRNS-Fragmenten. Die Elektrophoresekammer wurde vor der Benutzung mit vollentsalztem H₂O gereinigt. 1,5 g Agarose wurden in 150 ml TBE-Puffer gegeben (Agarosegel 1 %) und in einer Mikrowelle erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst und die Flüssigkeit klar war. Nach Abkühlung wurden 7 µl der Nukleinsäure-Färbelösung Red Safe™ hinzugegeben und in die Elektrophoresekammer gefüllt. Nach 10 - 15-minütiger Aushärtephase wurde die Kammer bis zum Füllstrich mit TBE-Puffer 1x aufgefüllt. 1 µl der cDNS bzw. cRNS wurde mit 8 µl DEPC-H₂O und 2 µl Orange G Ladepuffer verdünnt. Der Ladepuffer dient dazu, den Lauf der Proben durch das Gel verfolgen zu können. 10 µl je Ansatz wurden in die Geltaschen gefüllt. In die letzte Tasche wurde ein Standard-cDNS-Längenmarker, der cDNS-Fragmente bekannter Länge enthält, gegeben. Es wurde eine Spannung von 120 V für ca. 1 h angelegt. Anschließend wurden die Proben mittels UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis auf einem Foto dokumentiert.

2.2.1.6 Sequenzierung der cDNS

Um die Nukleotid-Abfolge der isolierten Plasmid-cDNS und den erfolgreichen Einbau der Punktmutation zu überprüfen, wurde eine Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde die cDNS-Probe sowie der Sequenzierungsprimer auf die geforderte Konzentration

c eingestellt ($c_{\text{cDNS}} = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $c_{\text{Primer}} = 5 \text{ pmol}/\text{L}$) und im Verhältnis 1:1 (je $5 \mu\text{l}$) gemischt. Das Sequenzierungsergebnis wurde geprüft und Proben mit fehlender Punktmutation bzw. nicht gewünschten Basenaustauschen verworfen.

2.2.1.7 Linearisierung der cDNS durch enzymatischen Restriktionsverdau

Vor der *in-vitro*-Transkription erfolgte die Linearisierung der Plasmid-cDNS, die für die Untereinheiten α_1 (WT ohne Punktmutation sowie punktmutierte cDNS), β_2 bzw. γ_2 kodieren, durch Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen. Durch das Schneiden der Restriktionsenzyme an der Stelle, an der das 3'-Ende der RNS sein soll, erhält man RNS-Fragmente bekannter Länge und vermeidet die Transkription von Vektorsequenzen (Mülhardt, 2013). Für das Plasmid mit dem klonierten *GABRA1*-Gen (α -Untereinheit) wurde das Enzym HIND III, für die Plasmide mit dem *GABRB2*-bzw. *GABRG2*-Gen (β - und γ -Untereinheit) das Enzym BamH I verwendet. Die jeweiligen Schnittstellen sind wie folgt:



Abb. 7: Schnittstelle von HIND III (Thermo Fisher Scientific, User guide: HINDIII, 2012)



Abb. 8: Schnittstelle von BamH I, (Thermo Fisher Scientific, User guide: BamH I, 2012)

Eingesetzt wurden $10 \mu\text{g}$ cDNS, $5 \mu\text{l}$ Puffer und $2 \mu\text{l}$ Enzym. Der Ansatz wurde mit DEPC- H_2O auf $50 \mu\text{l}$ Gesamtvolumen aufgefüllt, mit dem Vortexer gemischt und für 2,5 Stunden in den Thermocycler gestellt. Die linearisierte cDNS wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Dazu wurden $150 \mu\text{l}$ Phenol-Chloroform-Gemisch und $100 \mu\text{l}$ DEPC- H_2O zu dem Ansatz pipettiert und durch Invertieren gemischt. Aufgrund der unterschiedlichen Polarität von Phenol und Wasser bilden sich zwei Phasen. Die durch dieses Verfahren denaturierten Proteine sammeln sich in der unteren Phenolphase, während die cDNS in der wässrigen Phase gelöst ist. Der Ansatz wurde 2 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde im Anschluss in ein frisches Gefäß überführt

und 100 µl Chloroform/ Isoamylalkohol dazugegeben. Es folgten die erneute Zentrifugation und Überführung der oberen Phase in ein frisches Gefäß. Auf diese Weise wird verbliebenes Phenol entfernt. Durch Zugabe von 10 µl Ammoniumacetat und 300 µl Ethanol 100 %, 30 – 60-minütiger Ruhephase bei -80 °C und 15 – 60-minütiger Zentrifugation (4 °C, 12.000 UpM) wurde die cDNS gefällt. Der Überstand wurde abgekippt und die gefällte cDNS mit 200 µl Ethanol 70 % gereinigt. Nach Zentrifugation (15 min, 4 °C, 12.000 UpM) wurde der Überstand verworfen, das entstandene cDNS-Pellet getrocknet und anschließend in 10 µl DEPC-H₂O gelöst. Die linearisierte cDNS wurde bei -20 °C gelagert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Linearisierung wurde 1 µl der cDNS mittels Gelelektrophorese untersucht (siehe Kapitel 2.2.1.5).

2.2.1.8 cRNS-Synthese durch *in-vitro*-Transkription

Zur *in-vitro*-Transkription der linearisierten cDNS wurde das mMACHINE® T7 Transcription Kit von ThermoFisher Scientific nach Herstelleranleitung verwendet. Sämtliche Komponenten wurden während der Versuchsdurchführung auf Eis gelagert. 2 µl der linearisierten cDNS als Template, 16 µl DEPC-H₂O, 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 2,5 µl Cap-Analogon, 1 µl rNTP Mix, 1 µl RNase Inhibitor und 1 µl T7-Polymerase wurden in ein Gefäß pipettiert, durch Invertieren gemischt, kurz abzentrifugiert und 60 min bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator (350 UpM) inkubiert. Um das cDNS-Template zu entfernen, wurde im Anschluss 1 µl RNase-frei DNase hinzugegeben und bei 37 °C für 15 min auf dem Schüttelinkubator (350 UpM) inkubiert. Der Ansatz wurde mit 115 µl DEPC-H₂O und 15 µl Ammoniumacetat verdünnt und in ein Phase Lock Gel™-Gefäß pipettiert. Durch Zugabe von 150 µl Phenol-Chloroform wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Reinigung der cRNS durchgeführt. Es folgte das Mischen durch Invertieren und die Zentrifugation für 2 min mit 14.000 UpM. Die obere wässrige Phase wurde im Anschluss in ein frisches Gefäß überführt und 100 µl Chloroform/ Isoamylalkohol dazugegeben. Es folgten die erneute Zentrifugation für 2 min mit 14.000 UpM und Überführung der oberen Phase in ein frisches Gefäß. Zur Fällung der cRNS wurden 150 µl Isopropanol dazu pipettiert. Der Ansatz wurde durch Invertieren gemischt und bei -80 °C 30 – 60

min ruhen gelassen. Anschließend wurde für 15 – 30 min bei 4 °C und 14.000 UpM zentrifugiert, der Überstand abgekippt, das Pellet mit 500 µl Ethanol 70 % gewaschen und erneut zentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und abschließend in 15 µl DEPC-H₂O gelöst. Zur Überprüfung der cRNS-Synthese wurde eine Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.1.5) in einer ausschließlich für cRNS verwendeten Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Konzentration der cRNS wurde am Nanodrop™ Spektrophotometer bestimmt und anschließend auf eine Konzentration $c = 2,0$ µg/µl eingestellt. cRNS niedrigerer Konzentration wurden nicht verwendet. Die cRNS wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Elektrophysiologische Methoden

2.2.2.1 Vorbereitung der *Xenopus laevis* Oozyten

Oozyten von *Xenopus laevis* wurden sowohl von Ecocyte Bioscience als auch vom Institut für Physiologie I, Tübingen bezogen. Oozyten der Firma Ecocyte Bioscience wurden präpariert und selektiert in einem Standardreaktionsgefäß geliefert. Vor der weiteren Verwendung wurden die Oozyten in einer Petrischale mit OR2-Lösung für 10 min sanft auf einem Schüttelinkubator geschwenkt. Anschließend wurden sie mit Barth-Lösung fünfmal gewaschen und in eine Mikrotiterplatte ausplattiert. Dabei wurde je eine Oozyte in ein mit 200 µl Barth-Lösung gefülltes Well gegeben (Well H12 wurde frei gelassen), die Platte mit Parafilm versiegelt und für mindestens 1 h (teilweise über Nacht) bei 17 °C gelagert.

Die Oozyten des Institutes für Physiologie I wurden unmittelbar nach der operativen Entnahme durch Mitarbeiter des Institutes für die Injektion der cRNS vorbereitet. Der Transport ins Labor erfolgte dabei in OR2-Lösung. Das frisch entnommene Oozytenmaterial wurde in eine Petrischale mit OR2-Lösung gegeben und das zwischen den Oozyten befindliche Bindegewebe vorsichtig mit 2 Pinzetten zerrissen. Um das die Oozyten umgebende Follikel- und Bindegewebe zu entfernen, wurden die Oozyten in einer Kollagenaselösung ($c = 2$ mg/ml) für 90 – 120 min bei Raumtemperatur sanft auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Sobald die Oozyten vereinzelt waren, wurde die Kollagenaselösung

abgegossen und die Oozyten in einer Petrischale mindestens fünfmal mit Barth-Lösung gewaschen. Anschließend wurden sie in OR2-Lösung für 10 min auf dem Schüttelinkubator geschwenkt und erneut zweimal mit Barth-Lösung gewaschen. Die manuelle Selektion der Oozyten erfolgte mit einem Stereomikroskop nach den im Folgenden aufgeführten Kriterien. Es ist keine Beschädigung der Zelle zu erkennen, die Zelle ist groß (im Durchmesser $> 1 \text{ mm}$) und hat einen hellen und einen dunklen (braunen) Pol, die scharf voneinander getrennt sind. Die braune Pigmentierung erscheint fein-gekörnt. Oozyten, die diese Voraussetzungen erfüllen, befinden sich im Entwicklungsstadium V und VI (Dumont, 1972). Die Oozyten wurden anschließend in eine Mikrotiterplatte ausplattiert (s.o.).

2.2.2.2 Automatisierte Injektion der cRNS in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Injektion der *in vitro* transkribierten cRNS in die Oozyten erfolgte unter Verwendung des automatischen Oozyteninjektionssystems Roboinject von Multi Channel Systems (Schnizler et al., 2003). Der Roboinject besteht aus einem Träger für handelsübliche Mikrotiterplatten, der sich auf einem Luftkissen in x- und y-Richtung über den x/y Magnetisch bewegt. Das Injektionselement bewegt sich auf einer vertikalen Achse und beinhaltet die Injektionsnadel.



Abb. 9: Automatisierte Injektion von cRNS in Oozten mit Hilfe des Roboinject.

Träger mit Mikrotiterplatte mit 96 Wells, in denen die Oozyten liegen. Jedes Well kann durch Bewegung des Trägers in x und y Richtung angesteuert werden. Die Injektionsnadel senkt sich dann in das Well hinab und injiziert die cRNS in die Oozyte.

Zunächst wurde der Zustand der Oozyten unter dem Stereomikroskop überprüft. Veränderte oder beschädigte Oozyten wurden entfernt. Die zu injizierende cRNS wurde in einem Mikroreaktionsgefäß vorbereitet. Dazu wurden α_1 -WT-cRNS bzw. mutierte α_1 -cRNS mit der für die Untereinheiten β_2 und γ_2 kodierenden cRNS im Verhältnis $\alpha_1:\beta_2:\gamma_2$ von 1:1:2 ($2 \mu\text{l } \alpha_1 + 2 \mu\text{l } \beta_2 + 4 \mu\text{l } \gamma_2$) gemischt. Um die Situation bei Patienten mit heterozygot vorliegender Mutation im *GABRA1*-Gen zu simulieren, wurde in einem weiteren Experiment ein Ansatz mit α_1 -WT-cRNS (α_{1WT}) und mutierten α_1 -cRNS (α_{1Mut}) in gleicher Menge angesetzt ($\alpha_{1WT}:\alpha_{1Mut}:\beta_2:\gamma_2$ von 0,5:0,5:1:2). Der Roboinject sowie der mit dem Roboinject verbundene Computer wurden gestartet und die spezielle Roboinject-Software geöffnet. Nach Öffnen einer neuen Datei wurden die cRNS-Ansätze jeweils einem virtuellen Gefäß zugeordnet und für jedes Well der zu injizierende cRNS-Ansatz festgelegt. Die Mikroreaktionsgefäße mit den cRNS-Ansätzen wurden in die dafür vorgesehene Befestigungsstelle platziert. Zusätzlich wurden zwei mit je 400 μl DEPC- H_2O befüllte Spülgefäße sowie ein Abfallgefäß in die festgelegte

Position gestellt. Die Durchgängigkeit der Injektionsnadel wurde durch eine Test-Injektion überprüft. Dafür wurde aus einem beliebigen cRNS-Ansatz durch den Roboinject ein gewisses Volumen aspiriert und die Abgabe der Test-Injektion in die Luft mit Hilfe eines Mikroskops beobachtet. Bildete sich kein Tropfen an der Spitze der Injektionsnadel wurde der Test wiederholt. Bei erneut erfolgloser Test-Injektion wurde die Nadel getauscht. Jede neue Injektionsnadel wurde vor dem Einbau in den Roboinject luftblasenfrei mit Mineralöl befüllt. Die 96-Well-Platte wurde in die vorgesehene Halterung eingebracht und das sogenannte Ausrichtungselement in das Well H12 gesetzt. Danach erfolgte die möglichst optimale Ausrichtung der Injektionsnadel mit Hilfe des Mikroskops auf die Mitte des Fadenkreuzes des Ausrichtungselements. Durch diesen Arbeitsschritt wurden die ordnungsgemäße Durchbohrung der Oozytenmembran und damit die intrazelluläre Injektion der cRNS gewährleistet. Abschließend wurde die Eindringtiefe der Injektionsnadel und das zu applizierende Volumen an cRNS definiert. In jede Oozyte wurde ein Volumen von 70 nl cRNS injiziert. Der Roboinject wurde gestartet und die korrekte Injektion der cRNS in die Oozyten live mit einer Kamera überprüft. Um eine unbeabsichtigte Vermischung zu vermeiden, wurde zwischen der Injektion unterschiedlicher cRNS-Ansätze die Injektionsnadel dreimal mit DEPC-H₂O automatisch gereinigt. Die Injektion wurde unter Raumtemperatur durchgeführt.

Nach abgeschlossener Injektion wurde die 96-Well-Platte mit Parafilm verschlossen und für 2 Tage bei 17 °C inkubiert. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe wurde als optimaler Expressionszeitraum 2 Tage ermittelt. In dieser Zeit wurden die GABA-Untereinheiten durch die Oozyte translatiert, zu GABA-Rezeptoren zusammengebaut und in die Zellmembran integriert.

2.2.2.3 Messung transmembraner Ionenströme mittels

Zweielektroden Spannungsklemmen-Technik (TEVC) mit dem Robocyte2

Die Messungen der Ionenströme über die gesamte Zellmembran der Oozyten wurden mit Hilfe des automatischen Zweielektroden Spannungsklemmen-Systems Robocyte2 von Multi Channel Systems durchgeführt. Bei der Zweielektroden Spannungsklemmen-Technik (Englisch: two electrodes voltage-

clamp = TEVC) handelt es sich um ein elektrophysiologisches Verfahren zur Messung von Ionenströmen über eine Zellmembran. Das zugrundeliegende Voltage-clamp-Prinzip wurde erstmals 1949 von Marmont und Cole beschrieben und im Jahr 1952 von Hodgkin und Huxley weiterentwickelt. Dabei wird das Membranpotential einer Zelle kontrolliert, während der Stromfluss über die Membran gemessen wird. Der Robocyte2 verwendet einen Messkopf, der aus vier Elektroden – zwei extrazellulären Referenzelektroden und zwei Glaselektroden – besteht. Die extrazellulären Elektroden dienen als Referenzelektrode für die intrazelluläre Spannungselektrode bzw. als Aufnahmeelektrode für den applizierten Strom. Die zwei Glaselektroden werden in die Oozyte eingebracht. Eine dieser Glaselektroden misst das Membranpotential (Spannungselektrode), das über einen Verstärker mit dem definierten Membranpotential abgeglichen wird. Die Differenz zwischen gemessenem und definiertem Membranpotential wird in Form eines Stromflusses über die zweite Glaselektrode (Stromelektrode) durch die Oozytenmembran zur extrazellulären Elektrode abgegeben und dort als Grundlinienstrom aufgezeichnet. Der durch GABA evozierte Ionenfluss über die Membran wird als Ausschlag dieses Grundlinienstroms gemessen (Cole, 1949, Hodgkin et al., 1952, Marmont, 1949, Guan et al., 2013). Vergleichbar mit dem Roboinject besteht der Robocyte2 aus einem sich auf einem Luftkissen über den magnetischen x/y-Tisch bewegenden Träger, in den handelsübliche Mikrotiterplatten eingespannt werden können. Der Messkopf ist in eine Halterung, die sich vertikal bewegt, integriert. Auf einem Display werden alle wichtigen Einstellungen und der aktuelle Protokollschritt des Robocyte2 visualisiert. Das Perfusionssystem Roboflow, das die Applikation von Lösungen zu den Oozyten erlaubt, ergänzt den Robocyte2. Der Roboflow arbeitet mit zwölf Quetschventilen und zwei peristaltischen Pumpen. Die Ventulpumpe sorgt für den Zustrom der Lösungen in die Wells mit den Oozyten, die Abfallpumpe aspiriert die Flüssigkeit aus den Wells und führt sie einem Abfallbehälter zu. Die zuführenden Perfusionsschläuche sind unter Zwischenschaltung eines Verteilers an den Zuflussanschluss des Messkopfes des Robocyte2 angeschlossen. Das andere Ende der Schläuche hängt jeweils in einer Glasflasche mit definierter

GABA-Konzentration. Ein weiterer Schlauch verbindet den Abflussanschluss des Messkopfes mit einem Abfallbehälter. Gesteuert wird der Robocyte2 über eine auf einem verbundenen Computer installierte Software. Mit Hilfe dieser Software können in einem Skript alle Einstellungen zur Messung definiert werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Variablen wie dargestellt festgelegt.

Tabelle 5: Einstellung der Variablen vor jeder Messung auf definierte Werte

Vor jeder Messung wurden in einem Dialogfenster die dargestellten Variablen angezeigt. Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden überprüft und gegebenenfalls angepasst.

Variable	Wert
Aufnahmezeit vor GABA-Applikation	5 s
Dauer der Applikation der GABA-Lösung	15 s
Waschzeit mit ND96-Lösung nach GABA-Applikation	3 min
Geschwindigkeit der Pumpe	16.000 µl/min
Absenkschritte des Messkopfes bis zum Eindringen in die Oozyte (jeweils um 50 µm)	15
Minimales Membranpotential nach Eindringen	-35 mV
Haltepotential	-70 mV
Minimale Antwort beim Expressionstest	-50 nA
Maximale Antwort beim Expressionstest	-30.000 nA
Ventilnummer der ersten und der letzten zu applizierenden GABA-Konzentration	Je nach zugeordneter GABA-Konzentration

Im Skript wurde das in Tabelle 6 gezeigte Messprotokoll programmiert.

Tabelle 6: Messprotokoll zur Durchführung der TEVC-Messung mit dem Robocyte2

Die Tabelle zeigt die aufeinander folgenden Schritte der Messung, wie sie im Skript des Robocyte2 programmiert wurden.

Schritt	Beschreibung
1	Positionierung des ersten ausgewählten Wells unter den Messkopf
2	Absenken des Messkopfes in die Flüssigkeit des Wells
3	Starten des Current-Clamp-Modus (der Stromfluss wird konstant gehalten, Spannungsänderungen werden gemessen)

- 4 Kompensation der Offset-Spannung
- 5 Kontrolle des Elektrodenwiderstandes (0,3 – 1 M Ω)
- 6 Eindringen der Elektroden in die Oozyte
- 7 10 s Wartezeit zur Wiederherstellung der Integrität der Oozytenmembran
- 8 Wechsel in den Voltage-Clamp-Modus (die Spannung wird konstant gehalten, der Stromfluss wird gemessen)
- 9 Installierung des Haltepotentials (-70 mV)
- 10 Erste Messung der Leckströme (bis 200 nA akzeptabel)
- 11 Applikation von ND96-Lösung bei gleichzeitiger Aspiration der Barth-Lösung
- 12 Erneute Messung der Leckströme (bis 100 nA akzeptabel)
- 13 Testpuls von anfänglich 1 mM, später 100 μ M als Expressionstest
- 14 Bei erfolgreichem Expressionstest: 5 min Waschen mit ND96-Lösung
- 15 - 27 Applikation der GABA-Lösung in aufsteigender GABA-Konzentration (in μ M 1, 3, 10, 30/40, 100, 300 und 1000), dazwischen je 3 min Waschen mit ND96-Lösung
- 28 Wiederholung des Protokolls bei der nächsten Oozyte

Die bei Raumtemperatur durchgeführten Messungen erfolgten nach einer Expressionszeit von zwei Tagen (d.h. die Messungen wurden am dritten Tag nach der Injektion der cRNS vorgenommen). Die Oozyten wurden zunächst unter dem Stereomikroskop hinsichtlich ihrer Integrität untersucht. Tote oder beschädigte Oozyten wurden entfernt. Aus einer 10 mM GABA-Stocklösung wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden GABA-Konzentrationen hergestellt: 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1 mM. Als Verdünnungsmedium diente ND96-Lösung. Der Computer und der Robocyte2 wurden gestartet und die entsprechende Software geöffnet. Die mit der Roboinject-Software erstellte Datei und das Skript wurden geladen. Die Schläuche, die die Lösungen über den Messkopf in die Wells abgeben, wurden mit der jeweiligen GABA-Lösung bzw. mit ND96-Lösung ausgiebig gespült (je Schlauch mind. 45 s). Die 96-Well-Platte wurde in die vorgesehene Halterung

eingebraucht und das Ausrichtungselement in das Well H12 gesteckt. Die Glaselektroden des Messkopfes wurden zu $\frac{2}{3}$ luftblasenfrei mit einer spezifischen Elektrolytlösung (siehe Kapitel 2.1.4) befüllt und zwei mit Silberchlorid beschichtete Elektroden hineingeführt. Der Elektrodenwiderstand betrug 0,3 – 1 M Ω . Der Messkopf wurde an der vorgesehenen Halterung fixiert und die vier Verbindungsstecker in die Fassungen gesteckt. Zu- und Abflussschlauch wurden befestigt. Im Anschluss erfolgte die Einstellung auf das Ausrichtungselement, vergleichbar mit dem Vorgehen beim Roboinject. Ziel ist, dass die beiden Glaselektroden den gleichen Abstand zum Knotenpunkt des Fadenkreuzes haben. Abschließend wurden die zu messenden Wells markiert und die Messung nach den im Skript definierten Schritten (siehe Tabelle 6) vollautomatisch durch den Robocyte2 durchgeführt.

2.2.2.4 Analyse und Auswertung der Rohdaten

Die Analyse der Rohdaten wurde mit Hilfe der Robocyte2+-Software, Clampfit, Origin®9, Microsoft Excel und Prism 6 durchgeführt.

Bei jeder gemessenen Oozyte wurde für jede applizierte GABA-Konzentration die maximale Stromamplitude dokumentiert.

Zur Berechnung der EC₅₀-Werte und der Dosis-Wirkungskurven wurden die maximalen Stromamplituden gegen die Stromamplitude, die von der höchsten GABA-Konzentration (1 mM) ausgelöst wurde, normalisiert. Dies bedeutet, dass alle in einer Oozyte gemessenen Werte durch die maximale durch 1 mM GABA evozierte Stromstärke dieser Oozyte geteilt wurden. Die auf diese Weise normalisierten GABA-evozierten Stromamplituden jeder Zelle wurden gegen die aufsteigenden GABA-Konzentrationen aufgetragen und die folgende logistische Gleichung mit vier Variablen als Ausgleichsrechnung angewandt:

$$Y = \min + ((\max - \min)) / (1 + [10]^{((\text{LogEC50} - X) * nH)})$$

max und *min* sind dabei die maximalen bzw. minimalen evozierten Stromamplituden. X ist die jeweilige korrespondierende GABA-Konzentration. Der Wert EC₅₀ bezeichnet die GABA-Konzentration, bei der die Hälfte der maximalen Stromamplitude erzielt wird. nH ist der sogenannte Hill-Koeffizient, der die Steilheit der Dosis-Wirkungskurve angibt.

Für den Vergleich der evozierten Stromamplituden bei Applikation von 1 mM GABA wurden die Stromamplituden der WT- und der mutierten GABA_A-Rezeptoren eines Messtages am Mittelwert der WT-Stromamplitude normalisiert und gemittelt. Die präsentierten Daten entsprechen Mittelwerten und Standardfehlern der Mittelwerte. Beim Vergleich der normalverteilten Stromamplituden von WT- und mutierten GABA_A-Rezeptoren sowie von WT- und koexprimierenden GABA_A-Rezeptoren bei Applikation von 1 mM GABA wurde zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Die statistische Signifikanz der EC₅₀-Werte wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Das Signifikanzniveau ist mit *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 GENERIERUNG DER VIER PUNKTMUTATIONEN S76R, R214H, I389V UND F104C IM *GABRA1*-GEN

Um die Struktur-Funktionsbeziehung der vier Mutationen in der α_1 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors zu analysieren, wurde eine zielgerichtete Mutagenese wie im Kapitel 2.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die Punktmutationen in die in den Vektor pcDNA3.1 klonierte, komplementäre *GABRA1*_{WT}-DNS mittels PCR inseriert und anschließend die PCR-Produkte in einer Gelelektrophorese untersucht.

Abbildung 10 zeigt die Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit Insertion der R214H-Mutation. Die Banden sind deutlich sichtbar (ausreichender Ertrag an cDNS) und klar abgegrenzt (keine Verunreinigung mit PCR-Produkten anderer Länge). Auch die erwartete Länge von etwa 7.000 Basenpaaren (bp) ist anhand des Größenmarkers ablesbar.

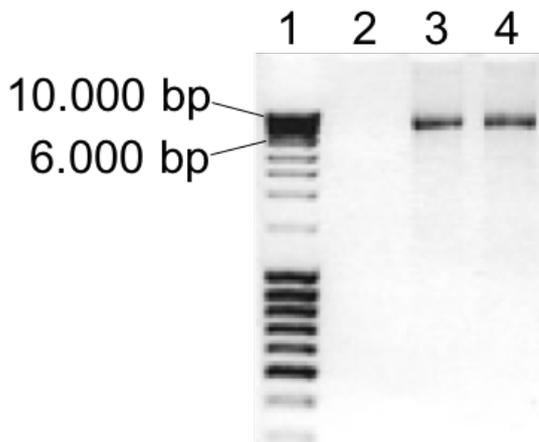


Abb. 10: Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Mutagenese R214H.

In die beim Gießen des 1 % Agarosegels entstandenen Taschen (1 - 4) wurden 10 µl eines Standard-cDNS-Längenmarkers (1), 10 µl H₂O als Kontrolle (2) sowie je 10 µl der PCR-Produkten (3 und 4) gegeben und eine Spannung von 120 V für eine Stunde angelegt. Die cDNS-Banden werden durch den hinzugefügten Fluoreszenzfarbstoff mittels UV-Licht sichtbar. Die zur Anode wandernden cDNS-Fragmente können mit Hilfe des Längenmarkers hinsichtlich ihrer Größe und durch die Dicke der Bande hinsichtlich ihrer Menge beurteilt werden. In Spur 3 und 4 sind die PCR-Produkte aus zwei verschiedenen Ansätzen mit inserierter R214H-Mutation bei einer Größe von 7.000 bp zu sehen.

Das Ergebnis der Mutagenese S76R wurde ebenfalls in einer Gelelektrophorese untersucht (siehe Abbildung 11). Die Bande ist auch hier deutlich sichtbar und abgrenzbar. Die Größe des cDNS-Fragments beträgt wie erwartet 7.000 bp.

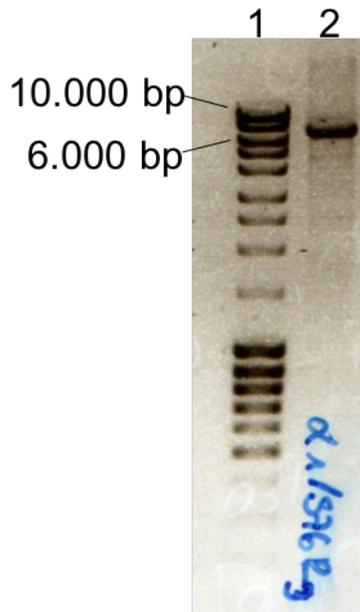


Abb. 11: Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Mutagenese S76R.

In die beim Gießen des 1 % Agarosegels entstandenen Taschen (1 und 2) wurden 10 µl eines Standard-cDNS-Längenmarkers (1) bzw. 10 µl des PCR-Produktes (2) gegeben und eine Spannung von 120 V für eine Stunde angelegt. Die cDNS-Banden werden durch den hinzugefügten Fluoreszenzfarbstoff mittels UV-Licht sichtbar. Das zur Anode wandernde cDNS-Fragment kann mit Hilfe des Längenmarkers hinsichtlich der Größe und durch die Dicke der Bande hinsichtlich der Menge beurteilt werden. Das die Mutation S76R enthaltende PCR-Produkt ist in Spur 2 zu sehen.

Abbildung 12 zeigt die Gelelektrophorese der Mutagenese F104C. Alle Banden sind hinsichtlich Qualität und Quantität der PCR-Produkte brauchbar.

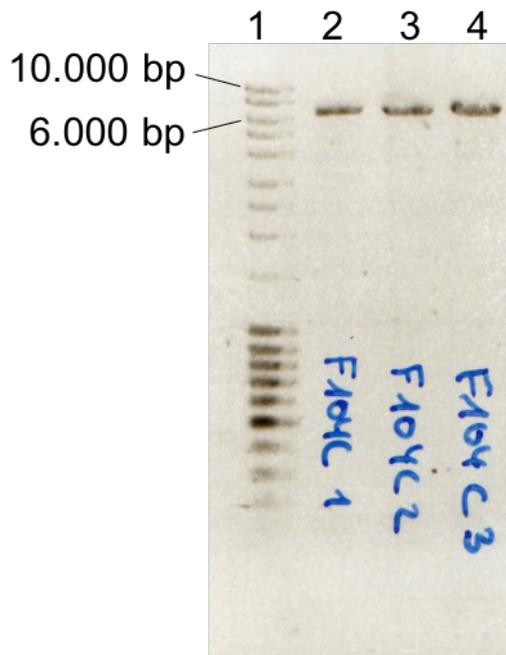


Abb. 12: Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Mutagenese F104C.

In die beim Gießen des 1 % Agarosegels entstandenen Taschen (1 - 7) wurden 10 µl eines Standard-cDNS-Längenmarkers (1) sowie je 10 µl der PCR-Produkten (2 - 7) gegeben und eine Spannung von 120 V für eine Stunde angelegt. Die cDNS-Banden werden durch den hinzugefügten Fluoreszenzfarbstoff mittels UV-Licht sichtbar. Die zur Anode wandernden cDNS-Fragmente können mit Hilfe des Längenmarkers hinsichtlich ihrer Größe und durch die Dicke der Bande hinsichtlich ihrer Menge beurteilt werden. Die Spuren 2 - 4 enthalten die PCR-Produkte dreier verschiedener Mutagenese-Ansätze zur Insertion der Mutation F104C.

Für die Mutation I389V wurde das Gelbild nach Überprüfung der Qualität und Quantität der PCR-Produkte nicht archiviert.

Die PCR-Produkte wurden dann, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert und im Anschluss isoliert. Durch Sanger-Sequenzierung wurde die erfolgreiche Mutagenese validiert.

3.2 GENERIERUNG VON α_{1WT} -, α_{1-S76R} -, $\alpha_{1-R214H}$ -, $\alpha_{1-I389V}$, $\alpha_{1-F104C}$, β_2 - UND γ_{2S} -cRNS

3.2.1 Linearisierung der die vier Punktmutationen S76R, R214H, I389V und F104C im *GABRA1*-Gen tragenden Plasmidvektoren sowie der *GABRA1*_{WT}-, *GABRB2*- und *GABRG2*-Plasmidvektoren durch enzymatischen Restriktionsverdau

Um aus der cDNS durch *in-vitro*-Transkription cRNS zu gewinnen, musste die cDNS nach der Bestätigung der inserierten Mutationen durch Sanger-Sequenzierung zunächst linearisiert werden (siehe 2.2.1.7). Die Plasmid-cDNS aller Untereinheiten (α_{1WT} , $\alpha_{1-R214H}$, α_{1-S76R} , $\alpha_{1-I389V}$, $\alpha_{1-F104C}$, β_2 und γ_{2S}) wurde durch Enzymverdau linearisiert und anschließend mittels Gelelektrophorese in Bezug auf Reinheit, Menge und erwartete Fragmentlänge untersucht. Die mit Hind III (α_1 -Untereinheit) geschnittenen Plasmidfragmente haben eine Größe von 7.000 bp (siehe Abbildung 13). Für den Restriktionsverdau der Plasmide mit dem klonierten *GABRB2*-bzw. *GABRG2*-Gen (β_2 - und γ_2 -Untereinheit) wurde das Enzym BamH I verwendet. Die dabei entstandenen cDNS-Fragmente haben eine Größe von 7.000 bp (siehe ebenfalls Abbildung 13). Alle Banden erscheinen kräftig und klar abgetrennt. Die zusätzlichen dünnen Banden in den Spuren 7 und 11 – 15 entsprechen nicht geschnittenen Plasmiden, die bestehen bleiben, wenn der Verdau mit dem entsprechenden Enzym nicht vollständig erfolgt ist.

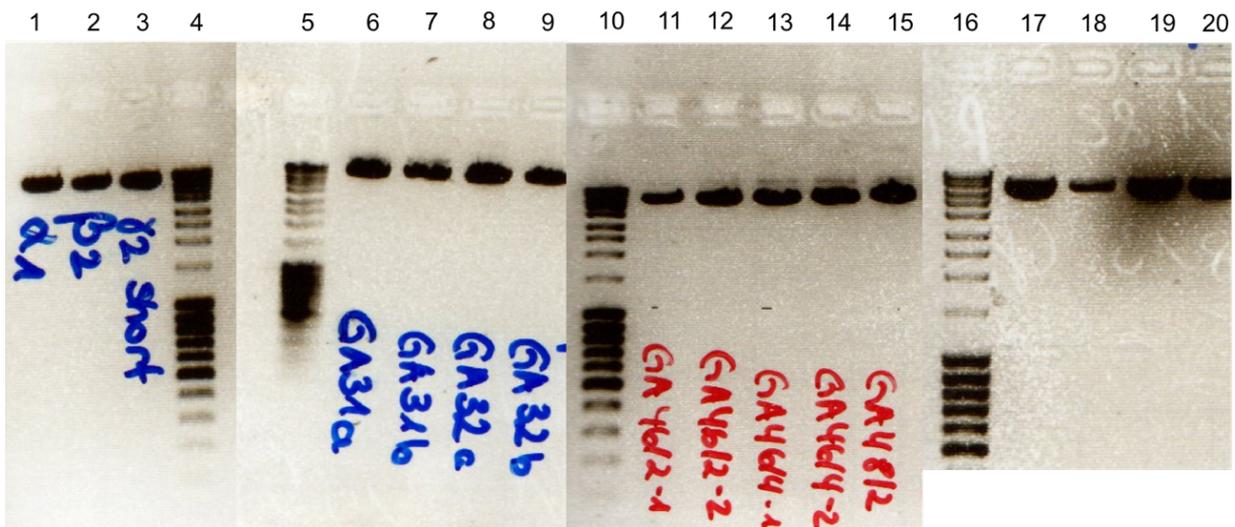


Abb. 13: Gelelektrophorese linearisierter Plasmid-cDNS

In die beim Gießen des 1 % Agarosegels entstandenen Taschen (1 - 20) wurden 10 µl eines Standard-cDNS-Längenmarkers (4, 5, 10, 16) sowie je 10 µl der linearisierten cDNS-Plasmide gegeben und eine Spannung von 120 V für eine Stunde angelegt. Die Spuren 1 - 3 enthalten die linearisierten *GABRA1*_{WT}-, *GABRB2*- bzw. *GABRG2*-Plasmidvektoren. Spuren 6 - 9: *GABRA1*_{R214H}, Spuren 11 - 14: *GABRA1*_{S76R}, Spur 15: *GABRA1*_{F104C}, Spuren 17 - 20: *GABRA1*_{I389V}.

3.2.2 *In-vitro*-Transkription der die vier Punktmutationen S76R, R214H, I389V und F104C im *GABRA1*-Gen tragenden linearisierten Plasmidvektoren sowie der linearisierten *GABRA1*_{WT}-, *GABRB2*- und *GABRG2*-Plasmidvektoren

Die Qualität der durch *in-vitro*-Transkription generierten cRNS wurde ebenfalls in einer Gelelektrophorese überprüft (siehe Abbildung 14). Da RNS generell zur Ausbildung von ausgeprägten Sekundärstrukturen, die die Laufeigenschaften bei der Gelelektrophorese maßgeblich beeinflussen, neigt, wird sie üblicherweise in einer denaturierenden Gelelektrophorese untersucht. Hierzu können verschiedenen Substanzen dem Gel beigegeben werden, die die Ausbildung der Sekundärstrukturen vermeiden. In Vorarbeiten wurden die cRNS-Moleküle bereits im Labor untersucht. Hier zeigte sich eine gute Expression. Da das Augenmerk dem generellen Nachweis von cRNS in der Probe galt, wurde für diese Arbeit eine native Gelelektrophorese verwendet. Abbildung 14 zeigt daher teilweise mehrere Banden. In der Analyse wurde darauf geachtet nur solche Proben für die weiteren Experimente zu verwenden, deren Banden sich ohne

Schmierer darstellten. Diese Schmierer können auf eine Degradierung der cRNS dieser Probe hinweisen.

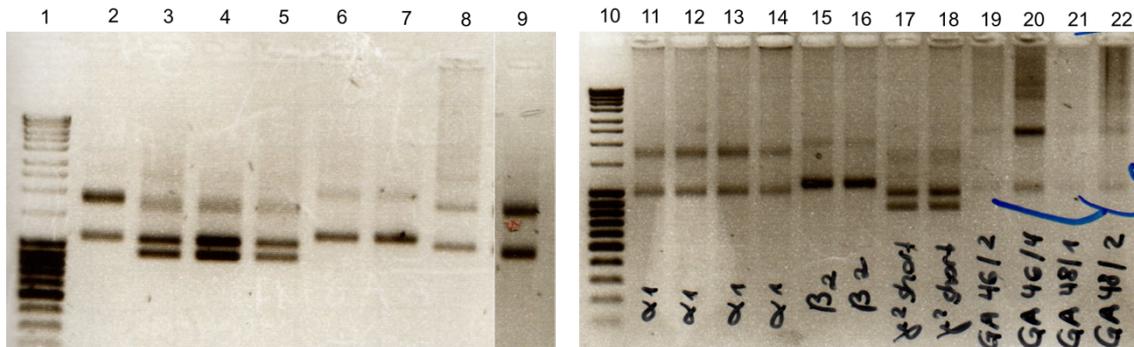


Abb. 14: Gelelektrophorese

In die beim Gießen des 1 % Agarosegels entstandenen Taschen (1 - 22) wurden 10 μ l eines Standard-cRNS-Längenmarkers (1 und 10) sowie je 10 μ l der cRNS gegeben und eine Spannung von 120 V für eine Stunde angelegt. Spuren 2 und 11 - 14: WT- α_1 -cRNS, Spuren 3 - 5 und 17 und 18: γ_{2s} -cRNS, Spuren 6, 7, 15 und 16: β_2 -cRNS, Spur 8: α_1 -I389V-cRNS, Spur 9: α_1 -R214H-cRNS, Spuren 19 und 20: α_1 -S76R-cRNS, Spuren 21 und 22: α_1 -F104C-cRNS.

3.3 FUNKTIONELLE ANALYSE DER DREI MIT SCHWEREN EPILEPSIE-FORMEN ASSOZIIERTEN PUNKTMUTATIONEN R214H, S76R UND I389V IM GABRA1-GEN

3.3.1 Aufzeichnung von GABA-induzierten Ionenströmen in Oozyten mit injizierter α_{1WT} -, β_2 - und γ_{2s} -cRNS sowie in Oozyten mit injizierter $\alpha_{1-R214H}$ - bzw. α_{1-S76R} - bzw. $\alpha_{1-I389V}$, β_2 - und γ_{2s} -cRNS unter Verwendung der TEVC-Technik mit dem Robocyte2

Nach der Injektion der cRNS in die Oozyten (siehe Kapitel 2.2.2.2) wurden am dritten darauffolgenden Tag die durch die Applikation von GABA induzierten Stromamplituden bei aufsteigender GABA-Konzentration für WT- und mutierte GABA_A-Rezeptoren gemessen (siehe Kapitel 2.2.2.3). Abbildung 15 zeigt die exemplarischen an einem Tag in einer Oozyte gemessenen Stromstärken des WT-Rezeptors bei unterschiedlichen GABA-Konzentrationen. Je höher die GABA-Konzentration, desto größer ist die evozierte Stromstärke. Die maximale Stromstärke stieg um das 300 - 400-fache bei Anstieg der GABA-Konzentration von 1 μ M auf 1 mM und erreichte dabei Werte von bis zu 7 μ A.

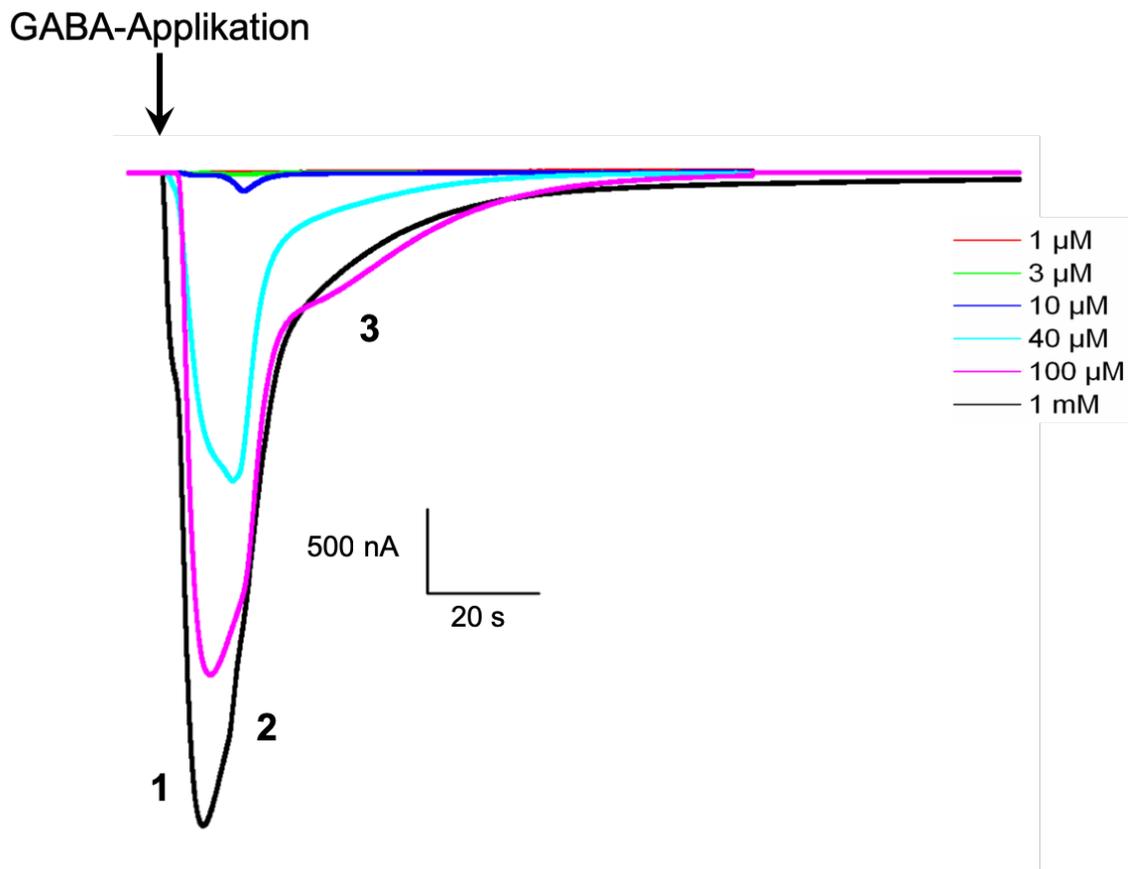


Abb. 15: GABA-induzierte Ströme für WT- $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ -GABA_A-Rezeptoren.

Exemplarische in *Xenopus laevis* Oozyten aufgenommene Stromkurven nach Injektion von WT- α_1 -cRNS zusammen mit β_2 - und γ_{2s} -cRNS. Unterschiedliche Stromamplituden in Abhängigkeit von der GABA-Konzentration. Die Ströme zeigen typische Merkmale der GABA_A-Rezeptoren: die schnelle Aktivierungsphase nach GABA-Bindung (1), die Desensibilisierungsphase durch Abnahme der Öffnungswahrscheinlichkeit (2) und die Deaktivierungsphase durch GABA-Dissoziation (3). (Entnommen und modifiziert aus Johannesen et al. (2016)).

Auch die GABA-induzierten Stromamplituden der GABA_A-Rezeptoren mit den drei Mutationen R214H, S76R und I389V in der α_1 -Untereinheit sind abhängig von der GABA-Konzentration (siehe Abbildungen 16, 17 und 18). Mit steigender GABA-Konzentration nimmt die Stromstärke zu. Dabei zeigen die Mutationen für alle GABA-Konzentrationen bei diesen exemplarisch gezeigten Kurven niedrigere Stromamplituden als der WT-GABA_A-Rezeptor (vergleiche Abbildung 15).

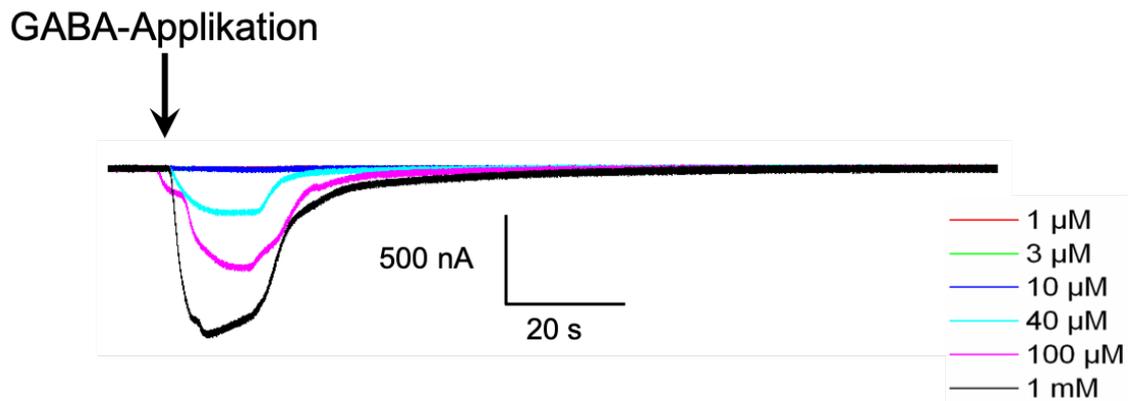


Abb. 16: GABA-induzierte Ströme für $\alpha_{1-R214H}\beta_2\gamma_{2s}$ -GABA_A-Rezeptoren.

Exemplarische in *Xenopus laevis* Oozyten aufgenommene Stromkurven nach Injektion von $\alpha_{1-R214H}$ -cRNS zusammen mit β_2 - und γ_{2s} -cRNS. Unterschiedliche Stromamplituden in Abhängigkeit von der GABA-Konzentration.

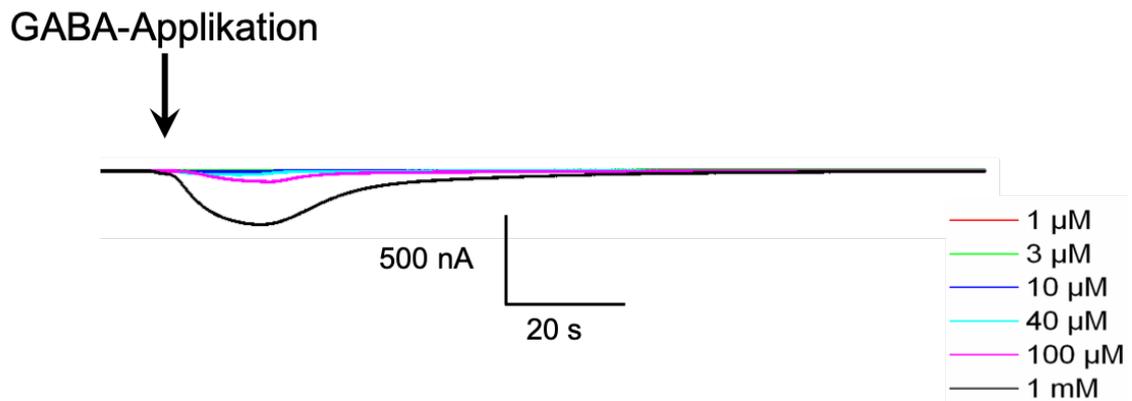


Abb. 17: GABA-induzierte Ströme für $\alpha_{1-S76R}\beta_2\gamma_{2s}$ -GABA_A-Rezeptoren.

Exemplarische in *Xenopus laevis* Oozyten aufgenommene Stromkurven nach Injektion von α_{1-S76R} -cRNS zusammen mit β_2 - und γ_{2s} -cRNS. Unterschiedliche Stromamplituden in Abhängigkeit von der GABA-Konzentration.

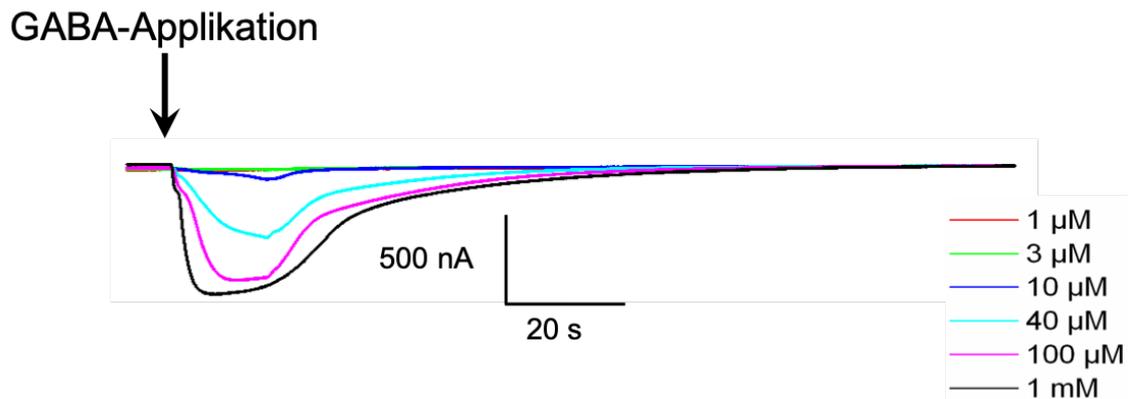


Abb.18: GABA-induzierte Ströme für $\alpha_{1-1389V}\beta_2\gamma_{2s}$ -GABA_A-Rezeptoren.

Exemplarische in *Xenopus laevis* Oozyten aufgenommene Stromkurven nach Injektion von $\alpha_{1-1389V}$ -cRNS zusammen mit β_2 - und γ_{2s} -cRNS. Unterschiedliche Stromamplituden in Abhängigkeit von der GABA-Konzentration.

3.3.2 Stromamplituden bei Applikation von 1 mM GABA

Verglichen wurden die Stromamplituden der mutierten GABA_A-Rezeptoren und des WT-GABA_A-Rezeptors bei einer GABA-Konzentration von 1 mM. Für jede Mutation wurden separat und zeitgleich zur jeweiligen Mutation Messungen an WT-GABA_A-Rezeptoren durchgeführt. Zunächst wurden die Mittelwerte der durch 1 mM GABA evozierten Stromamplituden des WT-GABA_A-Rezeptors eines jeden Messtages berechnet. Alle an einem Messtag aufgezeichneten Messwerte bei 1 mM GABA-Applikation der WT- und der mutierten GABA_A-Rezeptoren wurden dann auf den Mittelwert des WT des jeweiligen Messtages normalisiert. Anschließend erfolgte die Berechnung aller normalisierten Mittelwerte für den WT- und die mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Für die Mutation S76R betrug die Anzahl der in die Berechnung eingehenden Werte für den WT $n = 21$ und für die Mutation $n = 17$. Bei der Mutation R214H flossen für den WT $n = 49$ und für die Mutation $n = 32$ Werte mit ein. Die Anzahl der Messwerte betrug bei der Mutation I389V für den WT $n = 37$ und für die Mutation $n = 24$.

Die drei Mutationen S76R, R214H und I389V zeigen eine im Vergleich zum WT reduzierte Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA (siehe Abbildung 19). Die Rezeptoren mit der S76R-Mutation erreichen dabei $32 \pm 4 \%$, die Rezeptoren mit der R214H-Mutation $59 \pm 7 \%$ und die Rezeptoren mit der I389V-Mutation 35

$\pm 5\%$ der am selben Tag aufgezeichneten Stromamplituden der WT-Rezeptoren. Die Unterschiede sind bei allen Mutationen statistisch signifikant ($p < 0,001$; ungepaarter t-Test).

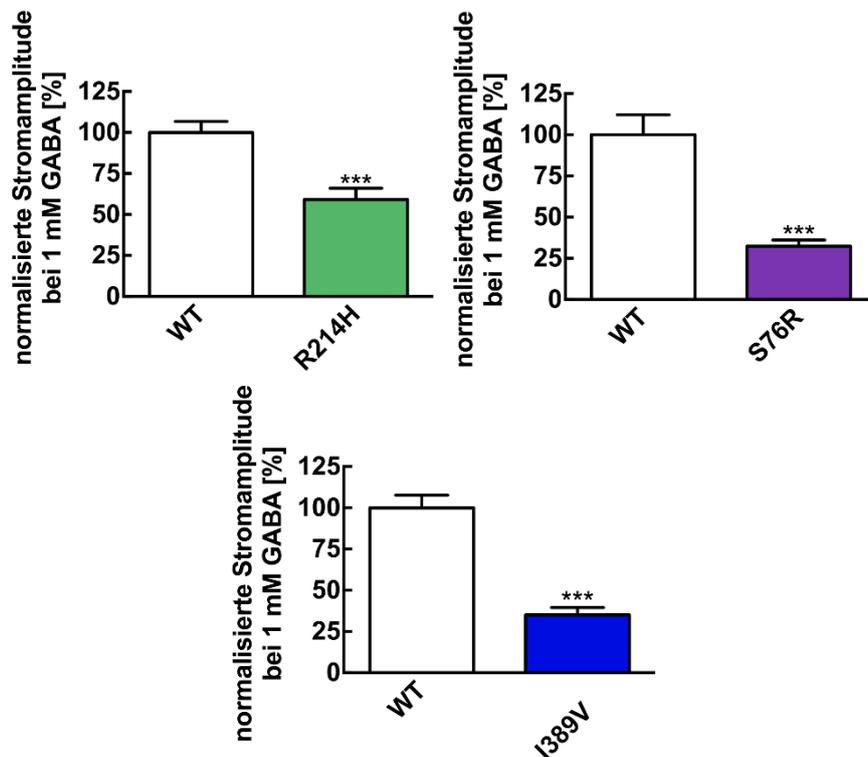


Abb. 19: Vergleich der gemittelten, normalisierten durch 1 mM GABA evozierten Stromamplituden der WT- und der mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Die Stromamplituden der WT- und der mutierten GABA_A-Rezeptoren eines Messtages bei Applikation von 1 mM GABA wurde am Mittelwert der WT-Stromamplitude normalisiert, gemittelt und in Prozent dargestellt. Die Anzahl der in die Berechnung eingeflossenen Werte betrug für WT $n = 49$ und für R214H $n = 32$, für WT $n = 21$ und für S76R $n = 17$ und für WT $n = 37$ und für I389V $n = 24$. Der Standardfehler der Mittelwerte ist jeweils als Fehlerbalken eingezeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit $***p < 0,001$ markiert; ungepaarter t-Test. Alle Mutationen zeigen eine im Vergleich zum WT signifikant reduzierte Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA. (Entnommen und übersetzt aus Johannesen et al. (2016)).

3.3.3 Dosis-Wirkungsbeziehung des WT-GABA_A-Rezeptors und der die Punktmutationen S76R, R214H und I389V enthaltenden GABA_A-Rezeptoren

Die Dosis-Wirkungskurven für WT- und mutierte GABA_A-Rezeptoren wurden durch Applikation von aufsteigenden GABA-Konzentrationen (in μM : 1, 3, 10, 30 (R214H) bzw. 40 (WT, S76R, I389V), 100, 300 (WT und R214H) und 1000) und

Normalisierung aller Werte einer Zelle an der Maximalantwort bei 1 mM generiert (siehe Kapitel 2.2.2.4).

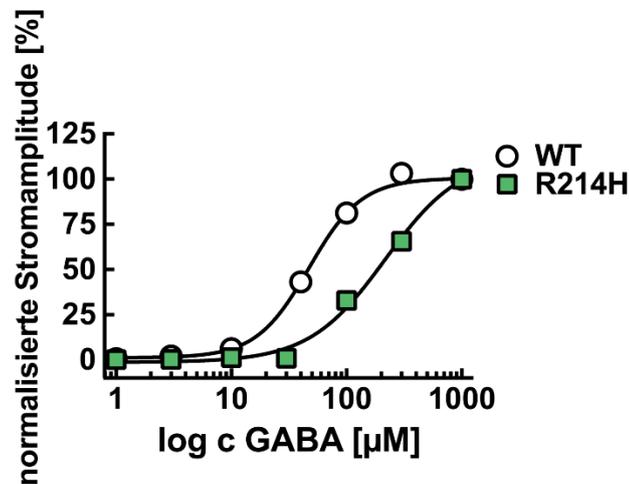


Abb. 20: Dosis-Wirkungskurve der WT- und der mutierten $\alpha_{1-R214H}\beta_{2\gamma_{2s}}$ -GABA_A-Rezeptoren. Die erzeugten Stromamplituden bei aufsteigender GABA-Konzentration (in μM : 1, 3, 10, 30 bzw. 40, 100, 300 und 1000) der WT- (weiße Kreise, $n = 109$) und der die Mutation R214H tragenden (grüne Quadrate, $n = 20$) GABA_A-Rezeptoren wurden an der maximalen Stromamplitude jeder Zelle bei Applikation von 1 mM GABA normalisiert und gegen die GABA-Konzentration (logarithmische Skala) aufgetragen. Die Dosis-Wirkungskurve der Mutation R214H zeigt eine Rechtsverschiebung im Vergleich zum WT. (Entnommen und übersetzt aus Johannesen et al. (2016)).

Für die Mutationen R214H und S76R zeigt sich eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven (siehe Abbildungen 20 und 21) und damit reduzierte Stromamplituden im gesamten Bereich der GABA-Konzentration von 1 bis 1000 μM . Eine vollständige Sättigung der mutierten GABA_A-Rezeptoren wurde nicht erreicht.

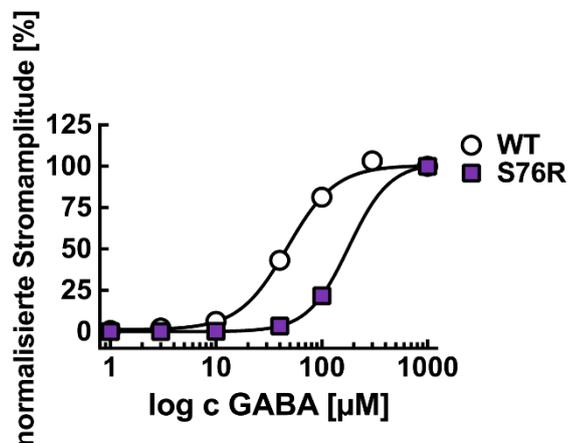


Abb. 21: Dosis-Wirkungskurve der WT- und der mutierten $\alpha_{1-S76R}\beta_{2\gamma_{2s}}$ -GABA_A-Rezeptoren. Die erzeugten Stromamplituden bei aufsteigender GABA-Konzentration (in μM : 1, 3, 10, 40, 100, (300) und 1000) der WT- (weiße Kreise, $n = 109$) und der die Mutation S76R tragenden (violette Quadrate, $n = 13$) GABA_A-Rezeptoren wurden an der maximalen Stromamplitude jeder Zelle bei Applikation von 1 mM GABA normalisiert und gegen die GABA-Konzentration (logarithmische Skala) aufgetragen. Die Dosis-Wirkungskurve der Mutation S76R zeigt eine Rechtsverschiebung im Vergleich zum WT. (Entnommen und übersetzt aus Johannesen et al. (2016)).

Bei der Dosis-Wirkungskurve der Mutation I389V kommt es zu einer Linksverschiebung im Vergleich zur Dosis-Wirkungskurve der WT-Rezeptoren. Die evozierte Stromamplitude ist bei einigen GABA-Konzentrationen (am besten sichtbar bei 40 μM) leicht erhöht.

Wendet man allerdings die bei der Applikation von 1 mM GABA erreichten $35 \pm 5\%$ der I389V mutierten GABA_A-Rezeptoren in Bezug auf die WT-Rezeptoren (siehe Kapitel 3.3.2) auf alle übrigen GABA-Konzentrationen (in μM : 1, 3, 10, 40, 100) an und trägt die so berechneten Stromstärken in Abhängigkeit von der GABA-Konzentration auf, so ergibt sich die als Prognose-Dosis-Wirkungskurve bezeichnete in Abbildung 22 gezeigte, gestrichelte Kurve. Es zeigt sich ein flacherer Verlauf dieser Prognose-Dosis-Wirkungskurve und eine deutliche Reduzierung der maximalen Stromamplitude der I389V mutierten GABA_A-Rezeptoren im Vergleich zu den WT-Rezeptoren.

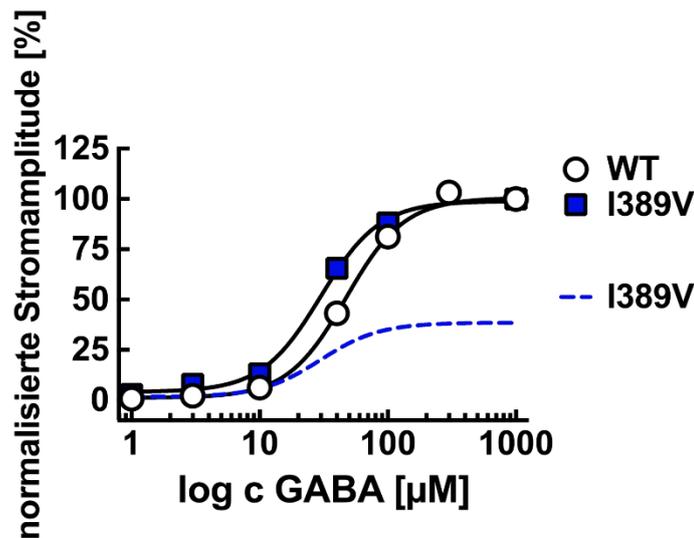


Abb. 22: Dosis-Wirkungskurve der WT- und der mutierten α_1 -I389V $\beta_2\gamma_{2s}$ -GABA_A-Rezeptoren. Die erzeugten Stromamplituden bei aufsteigender GABA-Konzentration (in μM : 1, 3, 10, 40, 100, (300) und 1000) der WT- (weiße Kreise, $n = 109$) und der die Mutation I389V tragenden (blaue Quadrate, $n = 16$) GABA_A-Rezeptoren wurden an der maximalen Stromamplitude jeder Zelle bei Applikation von 1 mM GABA normalisiert und gegen die GABA-Konzentration (logarithmische Skala) aufgetragen. Die Dosis-Wirkungskurve der Mutation I389V zeigt eine Linksverschiebung im Vergleich zum WT. Die Prognose-Dosis-Wirkungskurve wurde rechnerisch durch Anwendung des Verhältnisses zwischen mutierten und WT-GABA_A-Rezeptoren bei 1 mM GABA-Applikation auf alle anderen GABA-Konzentrationen erzeugt und als gestrichelte Kurve dargestellt.

3.3.4 EC₅₀-Werte des WT-GABA_A-Rezeptors und der die Punktmutationen S76R, R214H und I389V enthaltenden GABA_A-Rezeptoren

Der EC₅₀-Wert bezeichnet die Konzentration bei der die halbmaximale Stromamplitude erreicht wird.

Für den WT ergab sich ein Wert von $49 \pm 2 \mu\text{M}$ ($n = 109$), für die Mutation S76R $174 \pm 10 \mu\text{M}$ ($n = 13$), für die Mutation R214H $222 \pm 13 \mu\text{M}$ ($n = 20$) und für die Mutation I389V $32 \pm 3 \mu\text{M}$ ($n = 16$). Da für die Mutationen S76R und R214H keine vollständige GABA-Sättigung erzielt wurde, sind die EC₅₀-Werte dieser Mutationen sehr wahrscheinlich unterschätzt. Die Mutation I389V zeigt als einzige einen niedrigeren EC₅₀-Wert als der WT. Eine Zusammenfassung der EC₅₀-Werte und der Signifikanzniveaus ist in Tabelle 7 zu finden.

Tabelle 7: Übersicht über die EC_{50} -Werte, deren Signifikanzniveau und die Anzahl der in die Berechnung eingegangenen Messwerte des WT-GABA_A-Rezeptors und der die Mutationen R214H, S76R bzw. I389V tragenden GABA_A-Rezeptoren

GABA _A - Rezeptoren	Anzahl der Messwerte	EC_{50} -Wert und Standard- fehler des Mittelwerts [μ M]	Signifikanzniveau (Mann-Whitney-U-Test)
WT $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$	109	49 ± 2	
α_1 -R214H $\beta_2\gamma_{2s}$	20	222 ± 13	$p < 0,0001$
α_1 -S76R $\beta_2\gamma_{2s}$	13	174 ± 10	$p < 0,0001$
α_1 -I389V $\beta_2\gamma_{2s}$	16	$32 \pm 3 \mu$ M	$p < 0,01$

3.3.5 Heterozygote Situation

Da alle vier untersuchten Mutationen im *GABRA1*-Gen bei ihren Trägern in heterozygoter Form vorliegen, wurden die mutierten GABA_A-Rezeptoren in einem weiteren, separaten Experiment zusammen mit dem WT-GABA_A-Rezeptor im Verhältnis 1:1 in einer Oozyte exprimiert. Dazu wurde die Hälfte der injizierten WT-cRNS durch cRNS, die für eine der vier Mutationen kodiert, ersetzt. Am Messtag wurden die Stromamplituden von WT- und koexprimierenden GABA_A-Rezeptoren gemessen. Zunächst wurde wie in Kapitel 3.3.2 für die WT- und die mutierten GABA_A-Rezeptoren beschrieben, die gemittelte, normalisierte Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA für die koexprimierenden GABA_A-Rezeptoren berechnet.

Für die Mutation R214H wurde die Stromamplitude bei 1 mM GABA-Applikation von 30 Oozyten, die sowohl WT- als auch R214H mutierte GABA_A-Rezeptoren exprimieren, aufgezeichnet. Wie in Abbildung 23 gezeigt, ergab der Vergleich der Stromamplitude der koexprimierenden GABA_A-Rezeptoren (dunkelgrün) mit der Stromamplitude der WT-GABA_A-Rezeptoren (weiß) keinen signifikanten Unterschied. Die Stromamplitude lag rechnerisch zwischen der von WT- und mutierten Rezeptoren. Zur Veranschaulichung ist die signifikant reduzierte Stromamplitude der R214H mutierten GABA_A-Rezeptoren (hellgrün) mit dargestellt (vgl. Abbildung 19).

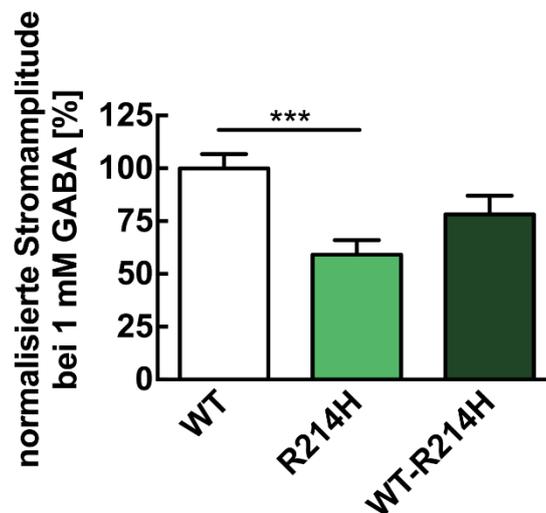


Abb. 23: Vergleich der gemittelten, normalisierten durch 1 mM GABA evozierten Stromamplituden der WT-, der R214H mutierten und der Koexpression von WT- und R214H mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Im Vergleich zur Abbildung 19 ist neben der normalisierten, gemittelten Stromamplitude bei 1 mM GABA der WT- (weißer Balken) und der R214H mutierten (hellgrüner Balken) GABA_A-Rezeptoren auch die normalisierte, gemittelte Stromamplitude der Oozyten, die sowohl WT- als auch R214H mutierte GABA_A-Rezeptoren koexprimieren (dunkelgrüner Balken, n = 30), gezeigt. Im Vergleich zu den WT-Rezeptoren zeigt die Koexpression von WT- und R214H mutierten GABA_A-Rezeptoren keine signifikante Reduktion der Stromamplitude bei 1 mM GABA.

In die Berechnung der gemittelten, normalisierten Stromamplitude der die S76R mutierten und WT-GABA_A-Rezeptoren koexprimierenden GABA_A-Rezeptoren flossen 17 Werte mit ein. Die koexprimierenden Rezeptoren (dunkelviolet) zeigen im Vergleich zu den WT-Rezeptoren (weiß) eine um 37 % signifikant ($p < 0,05$, ungepaarter t-Test) reduzierte Stromamplitude bei 1 mM GABA-Applikation (siehe Abbildung 24). Die evozierte Stromamplitude liegt in etwa in der rechnerischen Mitte zwischen der Stromamplitude der WT- und der S76R mutierten Rezeptoren.

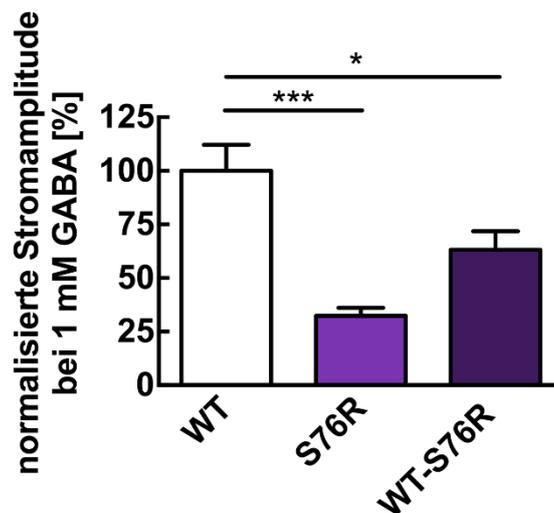


Abb. 24: Vergleich der gemittelten, normalisierten durch 1 mM GABA evozierten Stromamplituden der WT-, der S76R mutierten und der Koexpression von WT- und S76R mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Im Vergleich zur Abbildung 19 ist neben der normalisierten, gemittelten Stromamplitude bei 1 mM GABA der WT- (weißer Balken) und der S76R mutierten (hellvioletter Balken) GABA_A-Rezeptoren auch die normalisierte, gemittelte Stromamplitude der Oozyten, die sowohl WT- als auch S76R mutierte GABA_A-Rezeptoren koexprimieren (dunkelvioletter Balken, n = 17), gezeigt. Im Fall einer Koexpression von WT- und S76R mutierten GABA_A-Rezeptoren ist die durch 1 mM GABA evozierte Stromamplitude (63 ± 9 % der WT-GABA_A-Rezeptoren) im Vergleich zu WT-GABA_A-Rezeptoren signifikant reduziert (* $p < 0,05$; ungepaarter t-Test)

Für die Berechnung der Stromamplitude bei 1 mM GABA bei Koexpression von WT- und I389V mutierten GABA_A-Rezeptoren wurden 14 Oozyten gemessen. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Mutation R214H ist die Stromamplitude der koexprimierenden Rezeptoren (dunkelblau) nicht signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 25). Die erzielte gemittelte Stromamplitude der koexprimierenden Oozyten (dunkelblau) liegt ungefähr in der Mitte zwischen WT- (weiß) und I389V mutierten (hellblau) GABA_A-Rezeptoren.

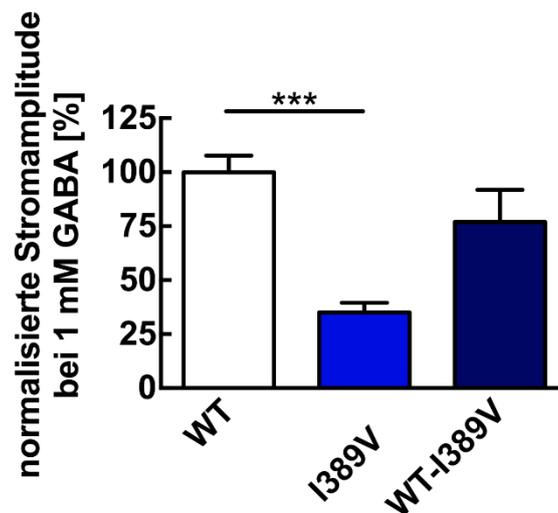


Abb. 25: Vergleich der gemittelten, normalisierten durch 1 mM GABA evozierten Stromamplituden der WT-, der I389V mutierten und der Koexpression von WT- und I389V mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Im Vergleich zur Abbildung 19 ist neben der normalisierten, gemittelten Stromamplitude bei 1 mM GABA der WT- (weißer Balken) und der I389V mutierten (hellblauer Balken) GABA_A-Rezeptoren auch die normalisierte, gemittelte Stromamplitude der Oozyten, die sowohl WT- als auch I389V mutierte GABA_A-Rezeptoren koexprimieren (dunkelblauer Balken, n = 14), gezeigt. Im Vergleich zu den WT-Rezeptoren zeigt die Koexpression von WT- und I389V mutierten GABA_A-Rezeptoren keine signifikante Reduktion der Stromamplitude bei 1 mM GABA.

In einem zweiten Schritt wurden die Stromamplituden der koexprimierenden Oozyten bei aufsteigender GABA-Konzentration erfasst und an der Maximalantwort bei 1 mM GABA jeder Zelle normalisiert (vergleiche Kapitel 2.2.2.4 und 3.3.3). Die Ergebnisse der drei Mutationen R214H, S76R und I389V unterscheiden sich grundsätzlich voneinander.

Während die Mutation R214H für alle GABA-Konzentrationen geringere Stromamplituden als der WT zeigt (zu sehen an der Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve, hellgrüne Quadrate), ist diese Rechtsverschiebung bei Koexpression von R214H mutierten und WT-GABA_A-Rezeptoren nicht mehr zu finden (siehe Abbildung 26). Die Dosis-Wirkungskurve der koexprimierenden Oozyten (dunkelgrüne Dreiecke) verläuft nahezu deckungsgleich mit der Dosis-Wirkungskurve der WT-GABA_A-Rezeptoren (weiße Kreise).

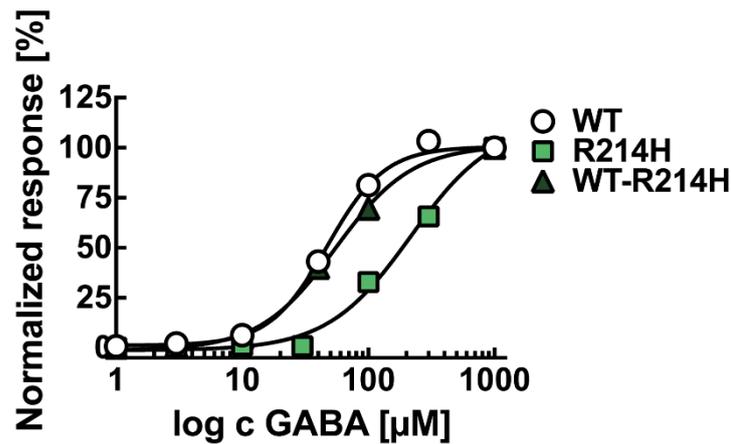


Abb. 26: Dosis-Wirkungskurve der WT-, der R214H mutierten und der Koexpression von WT- und R214H mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Neben der in Abbildung 20 gezeigten Dosis-Wirkungskurven der WT- (weiße Kreise) und der R214H mutierten (hellgrüne Quadrate) GABA_A-Rezeptoren wird hier die Dosis-Wirkungskurve der Oozyten, die sowohl WT- als auch R214H mutierte GABA_A-Rezeptoren koexprimieren (dunkelgrüne Dreiecke, n = 28), gezeigt. Die erzeugten Stromamplituden bei aufsteigender GABA-Konzentration (in µM: 1, 3, 10, 30, 100 und 1000) wurden an der maximalen Stromamplitude jeder Zelle bei Applikation von 1 mM GABA normalisiert und gegen die GABA-Konzentration (logarithmische Skala) aufgetragen. Die Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve der R214H mutierten GABA_A-Rezeptoren ist bei Koexpression mit WT-GABA_A-Rezeptoren nicht zu finden.

Im Gegensatz dazu zeigt sowohl die Dosis-Wirkungskurve der die Mutation S76R exprimierenden Oozyten (hellviolette Quadrate), als auch die Dosis-Wirkungskurve der die Mutation S76R sowie die WT-GABA_A-Rezeptoren koexprimierenden Oozyten (dunkelviolette Dreiecke) eine Rechtsverschiebung im Vergleich zum WT (siehe Abbildung 27). Die Stromamplituden der Mutation S76R sowie der Koexpression der Mutation S76R mit dem WT sind für alle GABA-Konzentration im Vergleich zum WT erniedrigt, wobei die Stromamplituden der Koexpression mittig zwischen WT und Mutation S76R liegen.

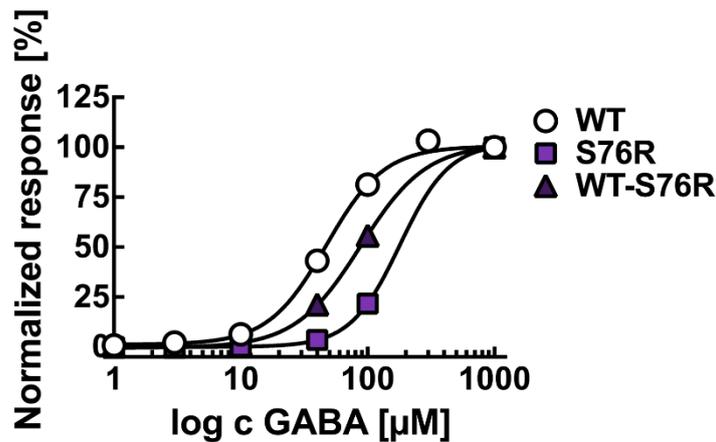


Abb. 27: Dosis-Wirkungskurve der WT-, der S76R mutierten und der Koexpression von WT- und S76R mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Neben der in Abbildung 21 gezeigten Dosis-Wirkungskurven der WT- (weiße Kreise) und der S76R mutierten (hellviolette Quadrate) GABA_A-Rezeptoren wird hier die Dosis-Wirkungskurve der Oozyten, die sowohl WT- als auch S76R mutierte GABA_A-Rezeptoren koexprimieren (dunkelviolette Dreiecke, n = 15), gezeigt. Die erzeugten Stromamplituden bei aufsteigender GABA-Konzentration (in µM: 1, 3, 10, 40, 100 und 1000) wurden an der maximalen Stromamplitude jeder Zelle bei Applikation von 1 mM GABA normalisiert und gegen die GABA-Konzentration (logarithmische Skala) aufgetragen. Auch die Dosis-Wirkungskurve der koexprimierenden Oozyten zeigt eine Rechtsverschiebung im Vergleich zur Dosis-Wirkungskurve der WT-GABA_A-Rezeptoren.

Während die Mutation I389V für alle GABA-Konzentrationen höhere Stromamplituden als der WT zeigt und damit die Dosis-Wirkungskurve im Vergleich zum WT nach links verschoben ist (siehe Abbildung 28, hellblaue Quadrate), wird dieser Effekt bei Koexpression der Mutation I389V mit dem WT aufgehoben. Die Dosis-Wirkungskurve der die Mutation I389V und den WT koexprimierenden Oozyten (dunkelblaue Dreiecke) verläuft deckungsgleich mit der Dosis-Wirkungskurve des WT (weiße Kreise).

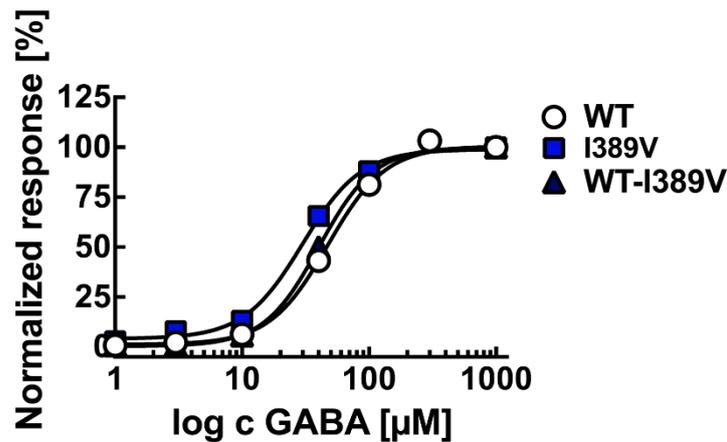


Abb. 28: Dosis-Wirkungskurve der WT-, der I389V mutierten und der Koexpression von WT- und I389V mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Neben der in Abbildung 22 gezeigten Dosis-Wirkungskurven der WT- (weiße Kreise) und der I389V mutierten (hellblaue Quadrate) GABA_A-Rezeptoren wird hier die Dosis-Wirkungskurve der Oozyten, die sowohl WT- als auch I389V mutierte GABA_A-Rezeptoren koexprimieren (dunkelblaue Dreiecke, n = 13), gezeigt. Die erzeugten Stromamplituden bei aufsteigender GABA-Konzentration (in µM: 1, 3, 10, 40, 100 und 1000) wurden an der maximalen Stromamplitude jeder Zelle bei Applikation von 1 mM GABA normalisiert und gegen die GABA-Konzentration (logarithmische Skala) aufgetragen. Die Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve der I389V mutierten GABA_A-Rezeptoren ist bei Koexpression mit WT-GABA_A-Rezeptoren nicht zu finden.

3.4 FUNKTIONELLE ANALYSE DER MIT IGE ASSOZIIERTEN PUNKTMUTATION F104C IM GABRA1-GEN

3.4.1 Aufzeichnung von GABA-induzierten Ionenströmen in Oozyten mit injizierter WT α_{1WT} -, β_2 - und γ_{2s} -cRNS oder mutierter α_1 -subunit sowie in Oozyten mit injizierter $\alpha_{1-F104C}$ -, β_2 - und γ_{2s} -cRNS unter Verwendung der TEVC-Technik mit dem Robocyte2

Im Vergleich zu den Stromkurven des WT-Rezeptors bei aufsteigender GABA-Konzentration (siehe Abbildung 15) zeigen die die Mutation F104C enthaltenden Rezeptoren bei jeder GABA-Konzentration geringere Stromamplituden (siehe Abbildung 29).

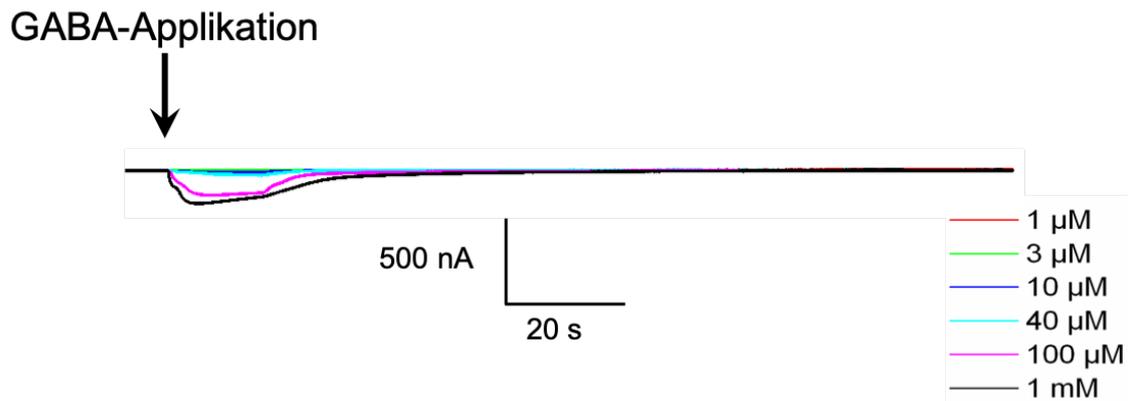


Abb. 29: GABA-induzierte Ströme für $\alpha_{1-F104C}\beta_2\gamma_{2s}$ -GABA_A-Rezeptoren.
Exemplarische in *Xenopus laevis* Oozyten aufgenommene Stromkurven nach Injektion von $\alpha_{1-F104C}$ -cRNS zusammen mit β_2 - und γ_{2s} -cRNS. Unterschiedliche Stromamplituden in Abhängigkeit von der GABA-Konzentration.

3.4.2 Stromamplitude bei 1 mM GABA

Zum Vergleich der durch 1 mM GABA evozierten Stromamplituden von WT-GABA_A-Rezeptoren und von die Mutation F104C tragenden GABA_A-Rezeptoren wurde wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben vorgegangen. In die Berechnung der normalisierten Mittelwerte flossen für den WT $n = 25$ und für die Mutation F104C $n = 18$ Werte mit ein. Wie in der Abbildung 30 zu sehen, zeigen die mutierten Rezeptoren eine um mehr als das 4-fache reduzierte Stromamplitude im Vergleich zu den WT-Rezeptoren. Die Stromstärke der F104C mutierten Rezeptoren betrug dabei $24 \pm 3 \%$ der Stromstärke der WT-Rezeptoren. Der Unterschied in den gemessenen Stromamplituden ist signifikant ($p < 0,001$; ungepaarter t-Test).

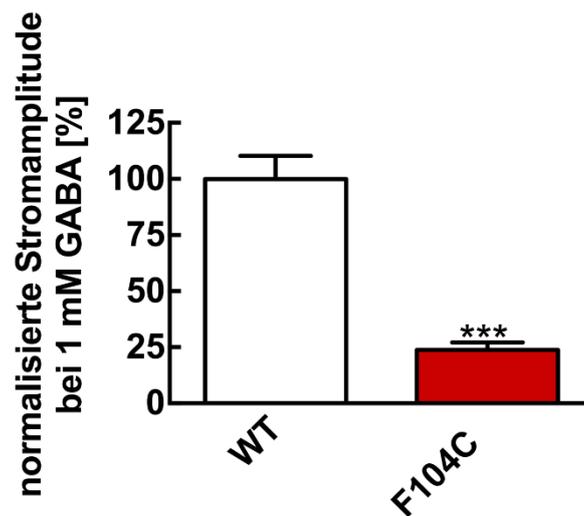


Abb. 30: Vergleich der gemittelten, normalisierten durch 1 mM GABA evozierten Stromamplituden der WT- und der F104C mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Die Stromamplituden der WT- und der F104C mutierten GABA_A-Rezeptoren eines Messtages bei Applikation von 1 mM GABA wurde am Mittelwert der WT-Stromamplitude normalisiert, gemittelt und in Prozent dargestellt. Die Anzahl der in die Berechnung eingeflossenen Werte betrug für WT $n = 25$ und für F104C $n = 18$. Der Standardfehler der Mittelwerte ist jeweils als Fehlerbalken eingezeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit ungepaartem t-Test berechnet und mit $***p < 0,001$ markiert. Die F104C mutierten GABA_A-Rezeptoren zeigen im Vergleich zu den WT-GABA_A-Rezeptoren eine signifikant reduzierte Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA. (Entnommen und übersetzt aus Johannesen et al. (2016)).

3.4.3 Dosis-Wirkungsbeziehung des WT-GABA_A-Rezeptors und der die Punktmutation F104C enthaltenden GABA_A-Rezeptoren

Durch Applikation von GABA in aufsteigender Konzentration (in μM : 1, 3, 10, 40, 100, 300 (WT) und 1000), Normalisierung aller gemessenen Stromamplituden einer Zelle an der Maximalantwort bei 1 mM und Auftragen der normalisierten Stromamplituden gegen die GABA-Konzentration zeigt sich die in Abbildung 31 dargestellte Dosis-Wirkungskurve.

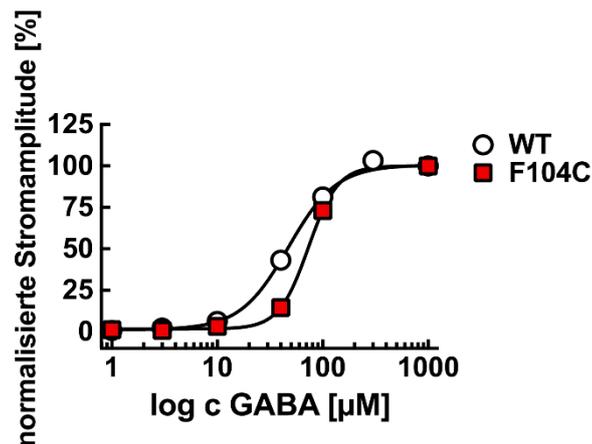


Abb. 31: Dosis-Wirkungskurve der WT- und der mutierten $\alpha_{1-F104C}\beta_{2\gamma_{2s}}$ -GABA_A-Rezeptoren. Die erzeugten Stromamplituden bei aufsteigender GABA-Konzentration (in μM : 1, 3, 10, 40, 100 (300) und 1000) der WT- (weiße Kreise, $n = 109$) und der die Mutation F104C tragenden (rote Quadrate, $n = 18$) GABA_A-Rezeptoren wurden an der maximalen Stromamplitude jeder Zelle bei Applikation von 1 mM GABA normalisiert und gegen die GABA-Konzentration (logarithmische Skala) aufgetragen. Die Dosis-Wirkungskurve der Mutation F104 zeigt für GABA-Konzentrationen kleiner 100 μM eine Rechtsverschiebung im Vergleich zum WT. (Entnommen und übersetzt aus Johannesen et al. (2016)).

Die Dosis-Wirkungskurve der Mutation F104C ist bei GABA-Konzentrationen kleiner 100 μM im Vergleich zum WT nach rechts verschoben.

3.4.4 EC₅₀-Wert der die Punktmutation F104C enthaltenden GABA_A-Rezeptoren

Der EC₅₀-Wert der Mutation F104C betrug $75 \pm 4 \mu\text{M}$ ($n = 18$). Er unterscheidet sich signifikant ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test) vom EC₅₀-Wert des WT ($49 \pm 2 \mu\text{M}$).

3.4.5 Heterozygote Situation

Um die Situation der heterozygoten Mutationsträger zu simulieren, wurden wie in Kapitel 3.3.5 bereits dargelegt Oozyten, die WT- und F104C mutierte GABA_A-Rezeptoren im Verhältnis 1:1 koexprimieren, elektrophysiologisch untersucht.

Die gemittelte Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA gemessen in 20 WT- und F104C mutierte GABA_A-Rezeptoren koexprimierenden Oozyten ist nicht signifikant im Vergleich zu den WT-GABA_A-Rezeptoren erniedrigt (siehe Abbildung 32). Die Stromamplitude liegt rechnerisch zwischen der von WT- und mutierten Rezeptoren.

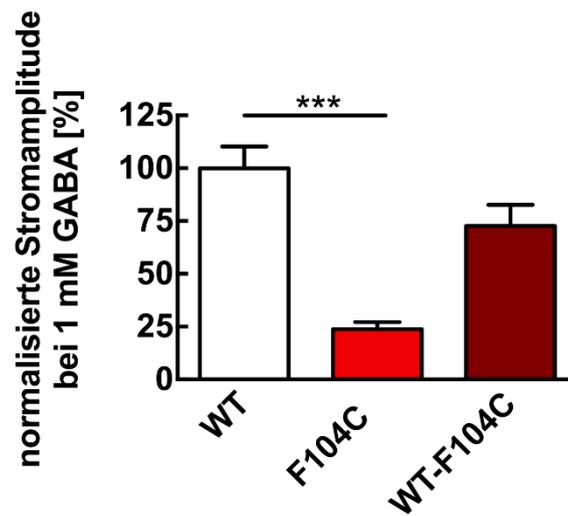


Abb. 32: Vergleich der gemittelten, normalisierten durch 1 mM GABA evozierten Stromamplituden der WT-, der F104C mutierten und der Koexpression von WT- und F104C mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Im Vergleich zur Abbildung 30 ist neben der normalisierten, gemittelten Stromamplitude bei 1 mM GABA der WT- (weißer Balken) und der F104C mutierten (hellroter Balken) GABA_A-Rezeptoren auch die normalisierte, gemittelte Stromamplitude der Oozyten, die sowohl WT- als auch F104C mutierte GABA_A-Rezeptoren koexprimieren (dunkelroter Balken, n = 20), gezeigt. Im Vergleich zu den WT-Rezeptoren zeigt die Koexpression von WT- und F104C mutierten GABA_A-Rezeptoren keine signifikante Reduktion der Stromamplitude bei 1 mM GABA.

Bei der Analyse der Dosis-Wirkungskurve der die Mutation F104C und den WT koexprimierenden Oozyten ergibt sich Folgendes (siehe Abbildung 33): Die Stromamplituden bei GABA-Konzentration kleiner 100 sind im Vergleich zum WT (weiße Kreise) bei der Koexpression (dunkelrote Dreiecke) im gleichen Maße reduziert wie die Stromamplituden der Mutation F104C (hellrote Quadrate). Die Dosis-Wirkungskurven der Koexpression und der Mutation F104C verlaufen deckungsgleich und im Vergleich zur Dosis-Wirkungskurve des WT nach rechts verschoben.

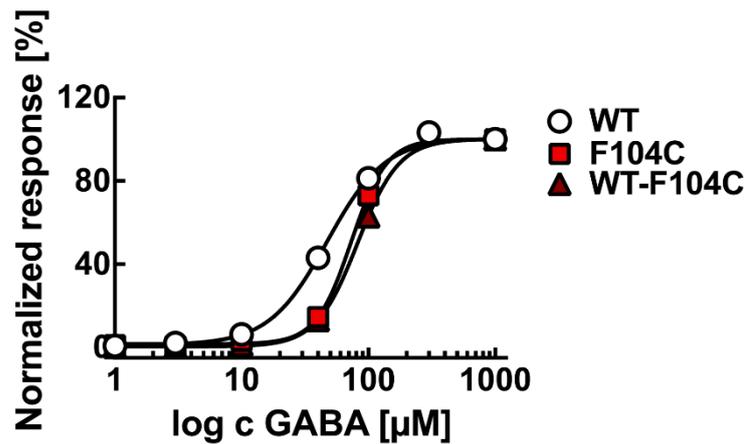


Abb. 33: Dosis-Wirkungskurve der WT-, der F104C mutierten und der Koexpression von WT- und F104C mutierten GABA_A-Rezeptoren.

Neben der in Abbildung 31 gezeigten Dosis-Wirkungskurven der WT- (weiße Kreise) und der F104C mutierten (hellrote Quadrate) GABA_A-Rezeptoren wird hier die Dosis-Wirkungskurve der Oozyten, die sowohl WT- als auch F104C mutierte GABA_A-Rezeptoren koexprimieren (dunkelrote Dreiecke, n = 19), gezeigt. Die erzeugten Stromamplituden bei aufsteigender GABA-Konzentration (in µM: 1, 3, 10, 40, 100 und 1000) wurden an der maximalen Stromamplitude jeder Zelle bei Applikation von 1 mM GABA normalisiert und gegen die GABA-Konzentration (logarithmische Skala) aufgetragen. Die Dosis-Wirkungskurven der F104C mutierten und der Koexpression von WT- und F104C mutierten GABA_A-Rezeptoren zeigen eine deckungsgleiche Rechtsverschiebung im Vergleich zur Dosis-Wirkungskurve der WT-GABA_A-Rezeptoren.

4 DISKUSSION

4.1 METHODIK

4.1.1 Oozyten als heterologes Expressionsmodell zur funktionellen Analyse mutierter GABA_A-Rezeptoren

Zur Beurteilung der Funktionalität der mutierten GABA_A-Rezeptoren wurden die Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert, die durch die Applikation von GABA induzierten Stromamplituden mittels TEVC-Technik gemessen und mit der Stromamplitude der WT-GABA_A-Rezeptoren verglichen. Das Oozytenexpressionsmodell ist eines der gängigen Expressionssysteme zur Untersuchung von Ionenkanälen (Buckingham et al., 2006). Die Gründe liegen in der für Zellen herausragenden Größe (> 1,0 mm) und damit guten experimentellen Zugänglichkeit der Oozyten. Die Mikroinjektion von cRNS sowie die elektrophysiologischen Messungen an einzelnen Zellen sind technisch gut zu bewerkstelligen. Die Eiablage (Laichen) erfolgt unter natürlichen Gegebenheiten in einer widrigen Umgebung. Die Oozyten sind daher widerstandsfähig und auf eine autarke Proteinsynthese ausgerichtet. Sie exprimieren nur eine geringe Anzahl an endogenen Transmembranproteinen, können allerdings eine große Menge heterologer Proteine nach Injektion von cRNS sehr zuverlässig translatieren (Zampighi et al., 1995). Ein weiterer Vorteil ist die gute Verfügbarkeit der Oozyten von kommerziellen Lieferanten zu niedrigen Kosten. (Dascal, 1987, Wagner et al., 2000, Mülhardt, 2013). Ferner ist es durch cRNS-Injektion möglich bestimmte Mengen und Kombinationen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten kontrolliert zu untersuchen. Dies ist zum Beispiel bei einer transienten Transfektion von Zellen nicht möglich.

Bei all diesen Vorteilen muss man sich der Limitationen, möglichen Interaktionen und Fehlerquellen dieses Expressionsmodells gewahr sein.

Die Oozyten des *Xenopus laevis* sind aufgrund ihrer Poikilothermie sehr temperaturempfindlich. In Bezug auf die Vitalität der Oozyten besteht je nach Jahreszeit und Außentemperatur eine große Schwankungsbreite. Dies beeinflusst nicht nur die Proteinexpression, sondern auch die Integrität der

Oozyten. Eine Reduktion der Lebensfähigkeit auf nur 1 Tag wurde mehrfach beobachtet (Delpire et al., 2011). Aufgrund dieser qualitativen Unterschiede und des damit verbundenen Einflusses auf die abgeleitete Stromamplitude muss eine große Anzahl an Oozyten untersucht werden.

Mag die Zahl der exprimierten endogenen Ionenkanäle auch klein sein, haben sie doch das Potential die Ergebnisse und Interpretation von Ionenströmen über exogene Kanäle zu beeinflussen. Diese mögliche Fehlerquelle sollte jedem der dieses Expressionsmodell wählt, bewusst sein (Dascal, 1987, Weber, 1999, Terhag et al., 2010). Als Kontrolle können Messungen von Oozyten verwendet werden, in die reines Wasser injiziert wurde. Da es dieser Arbeit aber um den direkten Vergleich von WT und mutierten Rezeptoren ging und Messungen an Wasser-injizierten Oozyten im Labor sehr häufig durchgeführt wurden, ohne signifikante Ionenströme zu zeigen, wurde hier darauf verzichtet.

Darüber hinaus lassen sich durch die Verwendung der *Xenopus laevis* Oozyten keine Aussagen hinsichtlich der neuronenspezifischen molekularen und physiologischen Mechanismen treffen. Zur Beantwortung der Frage nach Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse auf menschliche Neurone sind weitergehende Untersuchungen notwendig. Es ist allerdings möglich mit diesen Messungen einen Einblick in die Funktion des mutierten Rezeptors im Vergleich mit der des WT zu bekommen. Damit bietet das Oozytenexpressionsmodell eine gute Screening-Möglichkeit zur funktionellen Analyse neu detektierter Rezeptormutationen (Johannesen et al., 2016).

4.1.2 Automatisierte Injektion der cRNS in *Xenopus laevis* Oozyten und Messung transmembraner Ionenströme mittels TEVC-Technik

Der Roboinject wurde zur automatisierten Injektion der cRNS in die Oozyten verwendet. Dabei wurden in jede Zelle 70 nl eines Gemischs aus $\alpha_{1(WT \text{ oder Mut})}$ -, β_2 - und γ_2 -cRNS injiziert.

Die manuelle Injektion von cRNS in Zellen ist ein limitierender Faktor bei Screening-Verfahren mit einem hohen Durchsatz. Dazu muss bei Verwendung manueller oder elektrischer Pipetten zunächst die Glasinjektionskapillare mit Hilfe eines Ziehgerätes fein gezogen und dann die Spitze unter einem Mikroskop

abgebrochen werden. Im Anschluss muss für jede Oozyte das entsprechende Volumen an cRNS in die Pipette aufgenommen, die Oozyte angesteuert und punktiert werden. Die Vorteile des Roboinject liegen in der Automatisierung und Standardisierung des Injektionsverfahrens. Durch die Automatisierung lassen sich ein hoher Durchsatz und damit in kürzester Zeit die statistisch notwendigen Fallzahlen realisieren (Clemencon et al., 2015). Durch die Standardisierung werden Anwendungsfehler minimiert, die Manipulationen an den Oozyten reduziert und die Reproduzierbarkeit gesteigert.

Als nachteilig wurden folgende Punkte bewertet: Die zentrierte Einstellung der Injektionsnadel auf das Fadenkreuz des Ausrichtungselements ist von entscheidender Bedeutung. Ein zu tiefes Absenken der Injektionsnadel führt zu einem Absplittern der Nadelspitze und damit zu ihrer Unbrauchbarkeit, während bei einem zu großen Abstand die vollständige Punktion der Oozytenmembran nicht gewährleistet werden kann. Dies führte zu einem hohen Verschleiß an Injektionsnadel und damit zu hohen Materialkosten.

Vor Beginn eines Injektionszyklus wird die Durchgängigkeit der Injektionsnadel einmalig überprüft. Hier zeigte sich immer wieder eine verstopfte, nicht durchgängige Kapillare. Sollte es während des Injektionszyklus zu einem Verschluss der Nadelspitze kommen, wird unbemerkt keine cRNS in die punktierten Oozyten appliziert.

Nach einer Expressionszeit von 2 Tagen wurden die Oozyten für die anschließende Messung vorbereitet. Die automatisierte TEVC-Technik ist ein häufig verwendetes elektrophysiologisches Verfahren zur Funktionsanalyse von Ionenkanälen in *Xenopus laevis* Oozyten. Dabei wird der Stromfluss, der zur Aufrechterhaltung eines festgelegten Membranpotentials notwendig ist, wenn es z. B. durch Ligandenbindung zu einer Änderung der Membranleitfähigkeit kommt, gemessen (siehe Kapitel 2.2.2.3). Die mittels TEVC-Technik gemessenen Ionenströme über die gesamte Zellmembran (Englisch: *whole-cell currents*) der Oozyten mit WT-GABA_A-Rezeptoren liegen bei Applikation von 1mM GABA im Mittel bei 3.000 nA. Beispielströme wurden in Kapitel 3.3.1 dargestellt.

Wie oben bereits aufgezeigt, bietet die Verwendung von *Xenopus laevis* Oozyten auch in Kombination mit der TEVC-Technik durch die Automatisierung den

Vorteil, einen großen Durchsatz an gemessenen Zellen zu generieren. Die gemessenen Ionenströme haben eine vergleichsweise hohe Stromamplitude, sodass die elektrische Störanfälligkeit gering ist (Terhag et al., 2010). Die Anwendung der TEVC-Technik ist leicht zu erlernen. Die elektrophysiologischen Messungen erfordern kein kompliziertes Setup (Buckingham et al., 2006).

Aber auch die TEVC-Methode hat Nachteile. Aufgrund der großen Oberfläche der Oozyten besitzt die Zellmembran eine hohe elektrische Kapazität. Aufgrund dessen ändert sich das Membranpotential nur langsam. Die zeitliche Auflösung, die sich im Sekundenbereich bewegt, erlaubt es daher nicht, den Stromfluss schnell aktivierender und inaktivierender Ionenkanäle zu messen. Es können nur *steady-state* Stromflüsse aufgezeichnet werden (Terhag et al., 2010, Hermey et al., 2011). Der zur Erhebung der hier präsentierten Ergebnisse konzipierte Versuchsaufbau führte zu einer langen Auswaschphase nach der Applikation von GABA in steigender Konzentration. Das Messen aller GABA-Konzentrationen dauerte daher pro Zelle mehr als 20 min. In Folge kam es immer wieder zum Verlust der Zellmembranintegrität und die Messung musste abgebrochen werden.

4.2 FUNKTIONELLE ANALYSE VIER NEU DETEKTIERTER *GABRA1*-MUTATIONEN

In dieser Arbeit wurden vier Mutationen im *GABRA1*-Gen funktionell untersucht. Zwei Mutationen (R214H und S76R) wurden in Patienten mit EE gefunden. Eine weitere vermutlich *de novo* Mutation (I389V) wurde in einer schwer entwicklungsverzögerten, unter therapierefraktären epileptischen Anfällen leidenden Patientin detektiert, die auch für eine *SPAST*-Mutation homozygote Trägerin ist. Die vierte Mutation (F104C) manifestierte sich bei verwandten Mutationsträgern in Form einer mildereren Epilepsie, der IGE bzw. der JME.

Zur Darlegung der Interpretation und Diskussion der erhobenen Ergebnisse ist die Definition einiger Begriffe notwendig.

In Bezug auf die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand (z. B. ein Neurotransmitter oder Arzneistoff) definiert sich die „Affinität“ als „Bindungsstärke eines Arzneistoffs (...) für seine Zielstruktur“ (Herdegen and Böhm, 2014, Seite 49). Bei einer Dosis- (Konzentrations-) Wirkungsbeziehung, beispielsweise der

Beziehung von GABA-Konzentration zu evozierter Stromamplitude, bedeutet eine Rechtsverschiebung im Vergleich zu einer Ausgangskurve eine erniedrigte Affinität von GABA zum entsprechenden Rezeptor (Herdegen and Böhm, 2014, Cossette et al., 2002). Dies ist damit zu erklären, dass für die gleiche Wirkung (Stromstärke) eine höhere Konzentration des Liganden (GABA) notwendig ist.

Der EC_{50} -Wert (oder ED_{50} = Effektivdosis 50 %) wurde weiter oben schon definiert als „die Dosis (oder Konzentration), die zu einer Reaktion führt, die 50 % der maximalen beträgt“ (Lüllmann et al., 2016, Seite 39). Er ist ein Maß für die Potenz, die „dosisbezogene Wirkstärke“ (Freissmuth et al., 2016, Seite 44) des Liganden. Je kleiner der EC_{50} -Wert, desto höher ist die Potenz. Daraus lässt sich schließen, dass ein potenter Ligand eine hohe Affinität zu seinem Rezeptor haben muss (Freissmuth et al., 2016). Andersherum bedeutet ein hoher EC_{50} -Wert eine niedrige Potenz und Affinität.

Genetisch spricht man von einer *loss-of-function*-Mutation, wenn das Genprodukt eines mutierten Gens eine geringere Funktionsfähigkeit als das WT-Genprodukt hat (Behe, 2010). Die meisten *loss-of-function*-Mutationen werden rezessiv vererbt, sodass die Gendosis des WT-Allels für eine volle Funktionsfähigkeit, d.h. einen „WT-Phänotyp“ ausreicht. Ist dies nicht der Fall, spricht man von einer Haploinsuffizienz. Dies bedeutet, dass bei heterozygoten Mutationsträgern die Wirkung des WT-Allels zur Kompensation des mutierten Allels nicht ausreicht. Damit liegt ein dominanter Erbgang der Mutation vor (Buselmaier and Tariverdian, 2007). Ein dominant-negativer Effekt liegt vor, wenn „das Produkt des mutierten Allels die Funktion des normalen Allels stört“ (Buselmaier and Tariverdian, 2007, S. 180). Dies bedeutet nicht nur, dass bei einer heterozygot vorliegenden dominanten Mutation die Funktion des „gesunden“ Allels nicht ausreicht, um die Wirkung des „kranken“ Allels in einem gewissen Maß zu kompensieren, sondern auch, dass das „kranke“ Allel eine pathologische Wirkung auf das Genprodukt des „gesunden“ Allels hat (Herskowitz, 1987).

„Trafficking“ und „Gating“ sind wichtige Begriffe zur Funktionsbeschreibung von Rezeptoren. „Trafficking“ bezeichnet den intrazellulären Transport von Rezeptoren vom Ort der Synthese im ER zum Golgi-Apparat (oder aber zum Proteasom bei falsch gefalteten Proteinen), zur Zellmembran mit Integration in

die Membran bis zum Lysosom zur Degradierung (Collingridge et al., 2004, Deutsch, 2002). Aufgrund seines komplexen Prozesses kommt dem „Trafficking“ eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Expression von z. B. GABA_A-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche zu (Jacob et al., 2008).

Unter „Gating“ versteht man den Mechanismus des Öffnens und Schließens eines ionotropen Rezeptors (Alberts et al., 2017). Auch dieser Prozess unterliegt einer vielschichtigen Regulation. Untersuchungen haben gezeigt, dass es zehn verschiedene geschlossene und drei geöffnete Zustände des GABA_A-Rezeptors gibt (Lema and Auerbach, 2006).

4.2.1 Funktionelle Analyse der Mutation R214H

Die funktionelle Analyse der Mutation R214H erbrachte eine signifikant reduzierte Stromamplitude um $41 \pm 7 \%$ bei Applikation von 1 mM GABA im Vergleich zum WT. Zudem zeigte die Mutation R214H eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve im Vergleich zum WT. Der EC₅₀-Wert der mutierten Rezeptoren lag bei einer 4,5-fach höheren GABA-Konzentration als der EC₅₀-Wert der WT-Rezeptoren. Die Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve sowie der erhöhte EC₅₀-Wert deuten auf eine reduzierte GABA-Affinität der mutierten Rezeptoren hin. Diese Ergebnisse sind zusammenfassend als Funktionsverlust der GABA_A-Rezeptoren mit der R214H mutierten α_1 -Untereinheit zu werten. Um die *in vivo* Situation von der Mutation R214H heterozygot betroffenen Patienten *in vitro* zu simulieren, wurden mutierte und WT-Rezeptoren im Verhältnis 1:1 koexprimiert. Hier zeigte sich eine im Vergleich zu WT- und mutierten Rezeptoren nicht signifikante intermediäre maximale Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA. In der Dosis-Wirkungskurve konnte kein Unterschied zwischen WT-Rezeptoren und koexprimierten Rezeptoren festgestellt werden. Dies zeigt, dass das Vorliegen von mutierten α_1 -Untereinheiten die Funktion der WT- α_1 -Untereinheiten nicht stört. Die Mutation R214H im *GABRA1*-Gen ist eine *loss-of-function*-Mutation ohne dominant negativen Effekt.

Die Punktmutation R214H liegt im N-terminalen Ende, genauer in der Pre-M1-Domäne der α_1 -Untereinheit. Diese Aminosäuresequenz verbindet den langen extrazellulären N-Terminus mit der ersten Transmembrandomäne M1. Die Pre-M1 Region umfasst 12 Aminosäurereste und hat entscheidende Bedeutung bei

der Übersetzung von Ligandenbindung an der extrazellulären Region in Konformationsänderungen der Transmembrandomäne, die zur Öffnung des Kanals führt („Gating“ s.o.). Dies konnten Mercado und Czajkowski durch Einführen von Punktmutationen an den Positionen 219, 220 und 221 der α_1 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors zeigen (Mercado and Czajkowski, 2006).

Auch Keramidas et al. demonstrierten, dass der Pre-M1-Region eine Schlüsselrolle bei der Signalübermittlung im Rahmen der Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren zukommt. Mutationen an Position 212 und 220 der α_1 -Untereinheit führten zu einer Rechtsverschiebung der GABA-Dosis-Wirkungskurve. Die Mutation an Position 220 war zudem mit einer langsameren Öffnungsgeschwindigkeitskonstanten, einer verkürzten Öffnungsphase des Kanals sowie einer reduzierten GABA-Affinität assoziiert (Keramidas et al., 2006).

Auch die hier untersuchte Mutation R214H zeigt einen signifikant höheren EC₅₀-Wert als WT-Rezeptoren. Die GABA-Affinität ist damit reduziert. Dies könnte bedeuten, dass die Mutation R214H zu einer relevanten Veränderung in der Pre-M1-Region mit konsekutiver Störung der Signalübermittlung nach Bindung von GABA führt. Dies wäre eine Störung des „Gating“.

4.2.2 Funktionelle Analyse der Mutation S76R

In der funktionellen Untersuchung der Mutation S76R ergab sich bei der Applikation von 1mM GABA eine um 68 ± 4 % reduzierte Stromamplitude im Vergleich zu den WT-Rezeptoren. Dieser Unterschied war signifikant. Die Dosis-Wirkungskurve der Mutation S76R war im Vergleich zum WT im gesamten GABA-Konzentrationsbereich nach rechts verschoben. Der EC₅₀-Wert der Mutation S76R lag mehr als 3,5-mal so hoch wie der EC₅₀-Wert des WT. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,0001$. Auch für diese Mutation konnte damit eine reduzierte GABA-Affinität neben der reduzierten Stromamplitude attestiert werden. Die Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA der Zellen, die sowohl S76R mutierte als auch WT-Rezeptoren im Verhältnis 1:1 exprimieren, lag signifikant reduziert bei 63 ± 9 % der nur die WT-Rezeptoren exprimierenden Zellen. Auch die Dosis-Wirkungskurve der koexprimierenden Zellen zeigte eine Rechtsverschiebung im Vergleich zu den WT-Rezeptoren. Die Kurve verlief

dabei mittig zwischen den Dosis-Wirkungskurven der WT- bzw. S76R mutierten Rezeptoren. Der Phänotyp der S76R-Mutationsträger ließe sich also auf eine Haploinsuffizienz des *GABRA1*-Gens zurückführen.

Die Position 76 befindet sich im extrazellulären N-terminalen Ende der α_1 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors. Bestimmte Sequenzen innerhalb dieses N-terminalen Endes spielen bei der Oligomerisierung der Untereinheiten zum GABA_A-Rezeptor-Pentamer im ER eine Rolle. Die N-terminalen Sequenzen interagieren dabei mit ER-assoziierten Chaperons und machen so die Assemblierung der Untereinheiten möglich. Eine weitere Funktion kommt dem N-Terminus bei der Ligandenbindung zu (Jacob et al., 2008). So befinden sich hier die GABA- und Benzodiazepine-Bindungsstellen des GABA_A-Rezeptors. Die für die beiden Aufgaben relevanten Aminosäuresequenzen liegen sehr nahe beieinander (Luscher et al., 2011). Die Mutation S76R könnte also zu einem Assemblierungs-Defekt und damit zu einer verminderten Oberflächenexpression der mutierten GABA_A-Rezeptoren und/oder zur einer Störung der GABA-Bindung führen.

4.2.3 Funktionelle Analyse der Mutation I389V

Auch die Mutation I389V zeigte eine signifikant reduzierte maximale Stromstärke bei Applikation von 1 mM GABA im Vergleich zum WT. Die Dosis-Wirkungskurve war leichtgradig nach links verschoben. Der EC₅₀-Wert war auf einem schwächeren Signifikanzniveau als die Werte der übrigen Mutationen signifikant im Vergleich zu WT erniedrigt. Die GABA-Affinität dieser Mutation war somit erhöht. Die sowohl I389V mutierte als auch WT-Rezeptoren koexprimierenden Zellen zeigten eine nicht signifikant reduzierte maximale Stromamplitude bei 1 mM GABA im Vergleich zum WT. Die Dosis-Wirkungskurve der Koexpression verläuft deckungsgleich zur Kurve der WT-Rezeptoren.

Die Mutation I389V zeigt also eine reduzierte maximale Stromamplitude bei gesteigerter GABA-Affinität. Letztere schwächt den Effekt der reduzierten Stromamplitude ab. Die Mutation I389V im *GABRA1*-Gen ist eine *loss-of-function*-Mutation ohne dominant negativen Effekt.

Die Probandin mit der heterozygot vorliegenden I389V Mutation zeigte einen schweren Phänotyp mit pharmakoresistenten Anfällen, schwerwiegender

Entwicklungsverzögerung und zerebralen Fehlbildungen (siehe Kapitel 1.2.2). Neben der Mutation im *GABRA1*-Gen fand sich im Genom der Probandin eine homozygote Veränderung im *SPAST*-Gen. Das *SPAST*-Gen kodiert für das Protein Spastin. Spastin wird v.a. in Neuronen gefunden und ist dort an der Funktion der Mikrotubuli beteiligt (Salinas et al., 2007, Hazan et al., 1999). Es wurden mittlerweile über 240 Mutationen, die zur spastischen Paraplegie 4 (SPG4) führen, im *SPAST*-Gen detektiert (Alvarez et al., 2010). Die SPG4 gehört zu den hereditären spastischen Paraplegien (HSP) und macht mit 40 % den größten Teil dieser Erberkrankungen aus. Charakteristisch ist eine spastische Lähmung der unteren Extremität. Bei der selteneren, komplizierten Form der SPG4 kann es zudem zu einer Hyperreflexie der oberen Extremitäten, zerebellären Ataxie und mentalen Retardierung kommen (McDermott et al., 2006, Fonknechten et al., 2000). Die meisten *SPAST*-Mutationen werden autosomal-dominant vererbt. Es gibt aber auch Fälle von *compound*-heterozygoten *SPAST*-Mutationen (Chinnery et al., 2004). 2010 wurde von zwei für eine *SPAST*-Mutation homozygoten Geschwistern konsanguiner Eltern berichtet, die an einer reinen, nicht komplizierten SPG4 litten. Die Erkrankung manifestierte sich im Alter von 39 Jahren. Beide Elternteile waren asymptomatisch heterozygot für die Mutation (de Bot et al., 2010).

Die *SPAST*-Mutation (p.S545X) unserer Probandin führt zu einem Stopcodon und einem vorzeitigen Abbruch der Aminosäurekette und damit zu einem nicht funktionsfähigen Protein (*loss-of-function*-Mutation). Die für die Mutation heterozygote Mutter und Schwester waren zum Zeitpunkt der Analyse klinisch asymptomatisch. Dies ließe sich auch durch eine altersabhängige Penetranz der Mutation erklären. Es ist wahrscheinlich, dass die homozygote *loss-of-function*-Mutation im *SPAST*-Gen sowie die *loss-of-function*-Mutation I389V im *GABRA1*-Gen der Probandin den schweren Phänotyp aus mentaler Retardierung und schweren epileptischen Anfällen verursachen.

4.2.4 Funktionelle Analyse der Mutation F104C

Bei der funktionellen Analyse der Mutation F104C zeigt sich eine signifikant reduzierte maximale Stromstärke im Vergleich zum WT. Bei der Dosis-Wirkungskurve konnte eine Rechtsverschiebung nur bei Konzentrationen < 100

μM beobachtet werden. Der EC_{50} -Wert lag signifikant höher als der EC_{50} -Wert des WT, allerdings weniger stark erhöht als bei den Mutationen R214H und S76R. Damit zeigt auch die Mutation F104C eine reduzierte GABA-Affinität. Bei der Koexpression von F104C mutierten und WT-Rezeptoren konnte in Bezug auf die maximale Stromamplitude kein signifikanter Unterschied zu den reinen WT-Rezeptoren festgestellt werden. Die Dosis-Wirkungskurve verlief deckungsgleich mit der Dosis-Wirkungskurve der mutierten Rezeptoren und war damit bei GABA-Konzentrationen $< 100 \mu\text{M}$ nach rechts verschoben, ohne eine Signifikanz zu erzielen. Dies könnte auf einen dominant-negativen Effekt der Mutation F104C hindeuten. Um diese Vermutung zu stützen, müssten weitere Messungen zur Gesamtexpressions- und Oberflächenexpressionsmenge der α_1 -Untereinheit bei WT- und F104C mutierten koexprimierenden GABA_A -Rezeptoren erfolgen.

Auch die Position 104 befindet sich im N-terminalen Ende der α_1 -Untereinheit. Pathophysiologisch könnte die Mutation F104C wie die Mutation S76R (vergleiche Kapitel 4.2.2) zu einem Assemblierungs-Defekt oder Störung der GABA-Bindung führen.

Die wie die Mutation F104C mit JME assoziierte Mutation A322D ist als erste entdeckte *GABRA1*-Mutation funktionell sehr gut untersucht (siehe auch Kapitel 1.2.1). Diese Arbeit unterstreicht, dass *GABRA1*-Mutationen zu den seltenen monogenetischen Ursachen einer JME zählen.

4.3 GENOTYP-PHÄNOTYP-KORRELATION

Wie oben beschrieben gehen wir bei der Patientin mit der *GABRA1*-Mutation I389V und der *SPAST*-Mutation von einem Zusammenwirken beider Mutationen aus. Da dadurch eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation in Bezug auf die *GABRA1*-Mutation schwer herzustellen ist, wird im Folgenden nur auf die Mutationen R214H, S76R und F104C eingegangen.

In Anbetracht der Tatsache, dass GABA der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS ist, liegt die Annahme nahe, dass eine gestörte inhibitorische Funktion von mutierten GABA_A -Rezeptoren zu einer überschießenden Aktivierung von Neuronen und konsekutiv durch Disinhibition zur Entstehung von epileptischen Anfällen führen kann.

Mutationen im *GABRA1*-Gen galten lange als mit mildereren Epilepsien-Formen/IGE assoziiert. So waren die Familienmitglieder der ersten entdeckten *GABRA1*-Mutation A322D von der JME betroffen (siehe Kapitel 1.2.1) (Cossette et al., 2002). Bei einem Probanden mit einer kindlichen Absence-Epilepsie wurde *de novo* eine Basenpaardeletion (975delC) im *GABRA1*-Gen gefunden (Maljevic et al., 2006) und die Familienmitglieder, deren Genom die Punktmutation D219N enthielt, zeigten phänotypisch Fieberkrämpfe mit oder ohne GTKA und Absencen (Lachance-Touchette et al., 2011). Jüngst wurden *GABRA1*-Mutationen auch bei Patienten mit EE/ DEE inklusive Dravet-, Ohtahara- oder West-Syndrom detektiert (Allen et al., 2013, Carvill et al., 2014, Kodera et al., 2016). Damit tragen *GABRA1*-Mutationen zur genetischen Ätiologie sowohl milder als auch schwererer Epilepsie-Formen bei (Johannesen et al., 2016). Diese Beispiele zeigen auch – mit Ausnahme der *de novo* Basenpaardeletion 975delC – was viele genetische Untersuchungen bestätigen. DEE werden häufig durch *de novo* Mutationen verursacht (Weckhuysen and Korff, 2014). Auch die hier untersuchten *de novo* Mutationen S76R und R214H sind mit einer EE bzw. einem Dravet-ähnlichem Syndrom assoziiert, während die vererbte Mutation F104C zu einer mildereren Epilepsie führt.

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, zeigen die beiden nicht-verwandten Träger der Mutation S76R ein sehr ähnliches phänotypisches Krankheitsbild. Diesem ähneln ebenso die phänotypischen Charakteristika der R214H-Mutationsträgerin.

Auch die drei betroffenen Familienmitglieder der Mutation F104C zeigen eine hohe phänotypische Konkordanz. Dies könnte auf eine gewissen Genotyp-Phänotyp-Korrelation hindeuten.

Allen *GABRA1*-Mutationsträgern ist gemein, dass sich die epileptischen Anfälle in Form von tonisch-klonischen bzw. myoklonischen Anfällen manifestierten. Im EEG zeigten sich fast durchgängig generalisierte Spike-wave-Muster. Auch bei weiteren *GABRA1*-Mutationen ließen sich diese Charakteristika feststellen, sodass anzunehmen ist, dass tonisch-klonische und myoklonische Anfälle mit vorherrschenden generalisierten Spike-waves ein Kennzeichen von *GABRA1*-Mutationen ist. Die Heterogenität insbesondere in Bezug auf die Schwere der

Erkrankung ließe sich durch den Einfluss von modifizierenden Genen als Teil des genetischen Hintergrundes⁴ erklären.

In der funktionellen Analyse zeigen sich Unterschiede zwischen den mit EE assoziierten Mutationen R214H und S76R und der Mutation F104C. Während die Mutationen R214H und S76R im gesamten GABA-Konzentrationspektrum eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve mit signifikant reduzierter GABA-Affinität zeigen, ist die Dosis-Wirkungskurve der Mutation F104C nur im Bereich $< 100 \mu\text{M}$ nach rechts verschoben. Eventuell lässt sich aus der Kombination aus deutlich reduzierter GABA-Affinität und reduzierter Stromamplitude ein funktionelles Charakteristikum der mit EE/ DEE assoziierten *GABRA1*-Mutationen ableiten (Johannesen et al., 2016).

4.4 WEITERE UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG MOLEKULARER PATHOMECHANISMEN DER *GABRA1*-MUTATIONEN

Wie oben bereits erwähnt, können mit dem Oozytenexpressionsmodell elektrophysiologische Eigenschaften von Rezeptoren analysiert werden. Um die Pathogenese und die molekularen Mechanismen der mutations-assoziierten funktionellen Veränderungen der GABA_A -Rezeptoren noch besser erklären zu können, würden sich darüber hinaus weitere Untersuchungen anbieten.

Zu den bisher in der Literatur beschriebenen Pathomechanismen gehören z. B. eine reduzierte Oberflächenexpression von GABA_A -Rezeptoren durch beispielsweise den vorzeitigen Abbruch der Translation durch eine Nonsense-Mutation, ein Assemblierungsdefekt der Untereinheiten zu einem Pentamer mit konsekutiver ER-assoziierten Degradierung und ein „Trafficking“-Defekt. Auch kann ein Funktionsdefekt mit reduzierter GABA-Affinität oder veränderter „Gating“-Kinetik der GABA_A -Rezeptoren pathogenetisch sein (Macdonald et al., 2010).

Alle vier analysierten Mutationen zeigen eine reduzierte Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Störung

⁴ Als genetischer Background versteht man die Summe aller Gene, also das Genom. Die Relevanz des genetischen Backgrounds ergibt sich daraus, dass Gene einander in ihrer Wirkung beeinflussen oder sie modifizieren können. Dieses Phänomen wird Epistasie genannt (Gerlai, 2005).

der Proteinsynthese oder der „Trafficking“-Prozesse zumindest teilweise zur Pathophysiologie beiträgt.

Folgende Experimente könnten zur Aufklärung beitragen. Um in die Zellmembran integrierte Rezeptoren sichtbar zu machen, können sogenannte Fusionsproteine mit dem „grün fluoreszierenden Protein“ (GFP) erzeugt werden. Das GFP ist ein 1962 entdecktes Protein, das bei Anregung mit Licht eines bestimmten Frequenzbereiches grün fluoresziert (Shimomura et al., 1962). Die cDNS des GFP kann in einem Vektor in die cDNS eines zu untersuchenden Proteins inseriert und durch Transfektion in Zellen aufgenommen werden. Die Zelle exprimiert das mit GFP markierte Protein, das dabei nicht in seiner Funktion eingeschränkt ist. So kann man Fusionsproteine der WT- α_1 - sowie der mutierten α_1 -Untereinheit erzeugen und sie zusammen in Zellen mit β_2 - und γ_2 -Untereinheiten koexprimieren. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops lässt sich visualisieren, inwiefern die GABA_A-Rezeptoren mit der WT- bzw. mutierten α_1 -Untereinheit in die Zellmembran von z. B. kortikalen Neuronen integriert wird. Durch Biotinylierung und Western Blots sowie Durchflusszytometriemessungen in z. B. HEK293-Zellen können „Trafficking“-Defekte beispielsweise durch Akkumulation von WT- α_1 -Untereinheiten mit mutierten α_1 -Untereinheiten im ER oder auch Veränderungen in der Zusammensetzung der WT-GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche detektiert werden (Ding et al., 2010). Aufschluss über Veränderungen der „Gating“-Kinetik können Patch-Clamp-Experimente liefern (Lachance-Touchette et al., 2011). Untersuchungen an hippocampalen Neuronen aus *knock-in*-Mausmodelle stellen weitere, aufwendigere Versuche dar (Arain et al., 2015).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von genetisch veränderten GABA_A-Rezeptoren als Teil der inhibitorischen Synapsen im menschlichen ZNS und ihren Zusammenhang mit dem Auftreten von Epilepsie-Erkrankungen zu untersuchen. Konkret wurden hierzu die vier *GABRA1*-Punktmutationen (Mutationen im Gen, das für die α_1 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors kodiert) R214H, S76R, I389V und F104C, deren Träger alle - jedoch in unterschiedlicher klinischer Schwere - unter Epilepsie leiden, hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Funktion des GABA_A-Rezeptors *in vitro* untersucht.

Der ionotrope GABA_A-Rezeptor ist ein Heteropentamer, zusammengesetzt aus 5 verschiedenen Untereinheiten; die häufigste Kombination besteht aus zwei α_1 -, zwei β_2 - und einer γ_2 -Untereinheit. Die untersuchten und für diese Arbeit in einer internationalen Kooperation detektierten Mutationen befinden sich alle in der α_1 -Untereinheit. Klinisch zeigten die Träger der drei Mutationen R214H (*de novo*), S76R (*de novo*) und I389V (unklar ob vererbt oder *de novo*) kognitive und motorische Entwicklungsverzögerungen und pharmakoresistente epileptische Anfälle. Von den klinischen Partnern wurden die Diagnosen epileptische Enzephalopathie (EE) und Dravet-Syndrom-ähnliches Epilepsie-Syndrom gestellt. Bei der Trägerin der Mutation I389V fand sich zudem eine Mutation im *SPAST*-Gen, die die Genotyp-Phänotyp-Korrelation zusätzlich beeinflussen könnte. Sie zeigte eine schwerwiegende Entwicklungsverzögerung, spastische Tetraplegie und pharmakoresistente Anfälle. Die Träger der vererbten Mutation F104C erhielten die Diagnose idiopathische generalisierte Epilepsie (IGE) mit tonisch-klonischen Anfällen bzw. juvenile myoklonische Epilepsie (JME).

Um die Pathogenität der Punktmutationen *in vitro* zu erforschen, wurden sie in die cDNS des *GABRA1*-Gens eingeführt und Wildtyp- (WT-) GABA_A-Rezeptoren sowie mutierte GABA_A-Rezeptoren im *Xenopus laevis* Oozyten-Modell exprimiert. GABA induzierte Ionenströme wurden mittels Zweielektroden-spannungsklemmen-Technik erfasst.

Die Mutationen R214H und S76R zeigen eine im Vergleich zum WT signifikant reduzierte Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA. Die Dosis-Wirkungs-

kurven sind im Vergleich zum WT nach rechts verschoben. Die EC_{50} -Werte sind um das 4,5- bzw 3,5-fache erhöht. Bei der Koexpression von WT- und R214H mutierten $GABA_A$ -Rezeptoren zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum WT; ganz im Gegensatz zur Mutation S76R, die bei der Koexpression mit WT- $GABA_A$ -Rezeptoren reduzierte Stromamplituden gegenüber dem WT alleine zeigt. Die Mutation R214H ist somit eine *loss-of-function*-Mutation ohne dominant- negativen Effekt, während die Mutation S76R als Krankheitsmechanismus eine Haploinsuffizienz des *GABRA1*-Gens aufweist. Die Mutation I389V zeigt eine reduzierte maximale Stromamplitude bei Applikation von 1 mM GABA und zudem eine gesteigerte GABA-Affinität im Vergleich zum WT. Es kann weder eine Haploinsuffizienz noch ein dominant-negativer Effekt nachgewiesen werden. Ein Zusammenwirken der Mutation I389V im *GABRA1*-Gen und der homozygoten *loss-of-function*-Mutation im *SPAST*-Gen in Bezug auf den Phänotyp erscheint wahrscheinlich.

Die Analyse der Mutation F104C ergibt eine reduzierte Stromamplitude und GABA-Affinität. Bei der Koexpression kann kein signifikanter Unterschied zum WT festgestellt werden, somit ist der Mechanismus ebenfalls eine Haploinsuffizienz.

Zusammenfassend tragen *GABRA1*-Mutationen zur genetischen Ätiologie sowohl milder als auch schwerer Epilepsie-Formen bei, indem sie zu einer reduzierten Funktion von $GABA_A$ -Rezeptoren und damit mutmaßlich zu einer Disinhibition führen, die das Auftreten epileptischer Anfälle sehr gut erklären kann. Die Heterogenität in Bezug auf die klinische Schwere der Erkrankung impliziert den Einfluss weiterer genetischer Faktoren. Die Beobachtung, dass schwere Epilepsie-Formen, wie EE, zumeist durch *de novo* Mutationen verursacht werden, die auch funktionell klare Auswirkungen haben, lässt sich in dieser Arbeit bestätigen. Die Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass eine Kombination aus deutlich reduzierter GABA-Affinität und reduzierter Stromamplitude ein funktionelles Charakteristikum der mit EE assoziierten *GABRA1*-Mutationen ist, die den schwereren Phänotyp erklären könnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

invitrogen by life technologies (2011). User guide: PureLink® HiPure Plasmid Filter Purification Kits. K2100-14, K2100-15, K2100-16, K2100-17, K2100-26, and K2100-27, Page 2 of 28.

Thermo Fisher Scientific (2012a). User Guide: BamHI. Page 1 of 3.

Thermo Fisher Scientific (2012b). User Guide: HindIII. Page 1 of 3.

invitrogen by life technologies (2012c). User guide: pcDNA™3.1/Hygro (+) and pcDNA™3.1/Hygro (-) V870–20, V875–20, Page 10 of 16.

Agilent Technologies (2015). QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Instruction Manual. #200523, Page 3 of 15.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. H., Morgan, D., Raff, M. C., Roberts, K., Walter, P. & Schäfer, U. (2017). *Molekularbiologie der Zelle*, Weinheim, Germany, Wiley-VCH.

Allen, A. S., Berkovic, S. F., Cossette, P., Delanty, N., Dlugos, D., Eichler, E. E., Epstein, M. P., Glauser, T., Goldstein, D. B., Han, Y., Heinzen, E. L., Hitomi, Y., Howell, K. B., Johnson, M. R., Kuzniecky, R., Lowenstein, D. H., Lu, Y. F., Madou, M. R., Marson, A. G., Mefford, H. C., Esmaeeli Nieh, S., O'Brien, T. J., Ottman, R., Petrovski, S., Poduri, A., Ruzzo, E. K., Scheffer, I. E., Sherr, E. H., Yuskaitis, C. J., Abou-Khalil, B., Alldredge, B. K., Bautista, J. F., Berkovic, S. F., Boro, A., Cascino, G. D., Consalvo, D., Crumrine, P., Devinsky, O., Dlugos, D., Epstein, M. P., Fiol, M., Fountain, N. B., French, J., Friedman, D., Geller, E. B., Glauser, T., Glynn, S., Haut, S. R., Hayward, J., Halmers, S. L., Joshi, S., Kanner, A., Kirsch, H. E., Knowlton, R. C., Kossoff, E. H., Kuperman, R., Kuzniecky, R., Lowenstein, D. H., Mcguire, S. M., Motika, P. V., Novotny, E. J., Ottman, R., Paolicchi, J. M., Parent, J. M., Park, K., Poduri, A., Scheffer, I. E., Shellhaas, R. A., Sherr, E. H., Shih, J. J., Singh, R., Sirven, J., Smith, M. C., Sullivan, J., Lin Thio, L., Venkat, A., Vining, E. P., Von Allmen, G. K., Weisenberg, J. L., Widdess-Walsh, P. & Winawer, M. R. (2013). De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*, 501, 217-21.

Alvarez, V., Sanchez-Ferrero, E., Beetz, C., Diaz, M., Alonso, B., Corao, A. I., Gamez, J., Esteban, J., Gonzalo, J. F., Pascual-Pascual, S. I., Lopez De Munain, A., Moris, G., Ribacoba, R., Marquez, C., Rosell, J., Marin, R., Garcia-Barcina, M. J., Del Castillo, E., Benito, C., Coto, E. & Group for the Study of the Genetics of Spastic, P. (2010). Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia. *BMC Neurol*, 10, 89.

Arain, F., Zhou, C., Ding, L., Zaidi, S. & Gallagher, M. J. (2015). The developmental evolution of the seizure phenotype and cortical inhibition in mouse models of juvenile myoclonic epilepsy. *Neurobiol Dis*, 82, 164-175.

Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An, I., Mitropoulou, G., Beranger, A., Prud'homme, J. F., Baulac, M., Brice, A., Bruzzone, R. & Leguern, E. (2001). First genetic

- evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet*, 28, 46-8.
- Baumann, S. W., Baur, R. & Sigel, E. (2002). Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement. *J Biol Chem*, 277, 46020-5.
- Baur, R., Minier, F. & Sigel, E. (2006). A GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits. *FEBS Lett*, 580, 1616-20.
- Behe, M. J. (2010). Experimental evolution, loss-of-function mutations, and "the first rule of adaptive evolution". *Q Rev Biol*, 85, 419-45.
- Bennett, T. & Haynes, S. (1992). *The Neuropsychology of Epilepsy*, New York, Springer Science+Business Media.
- 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.
- Berg, A. T. & Millichap, J. J. (2013). The 2010 revised classification of seizures and epilepsy. *Continuum (Minneap Minn)*, 19, 571-97.
- Berg, A. T. & Scheffer, I. E. (2011). New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. *Epilepsia*, 52, 1058-62.
- Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J. & Steinlein, O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*, 279, 403-6.
- Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci*, 11, 112-6.
- Breitenfeld, T., Jurasic, M. J. & Breitenfeld, D. (2014). Hippocrates: the forefather of neurology. *Neurol Sci*, 35, 1349-52.
- Brunig, I., Scotti, E., Sidler, C. & Fritschy, J. M. (2002). Intact sorting, targeting, and clustering of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *J Comp Neurol*, 443, 43-55.
- Brunklaus, A. & Zuberi, S. M. (2014). Dravet syndrome--from epileptic encephalopathy to channelopathy. *Epilepsia*, 55, 979-84.
- Buckingham, S. D., Pym, L. & Sattelle, D. B. (2006). Oocytes as an expression system for studying receptor/channel targets of drugs and pesticides. *Methods Mol Biol*, 322, 331-45.
- Burt, D. R. & Kamatchi, G. L. (1991). GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *Faseb j*, 5, 2916-23.

- Buselmaier, W. & Tariverdian, G. (2007). *Humangenetik mit ... 162 Tabellen*, Heidelberg, Springer Medizin Verl.
- Cammarota, M., Losi, G., Chiavegato, A., Zonta, M. & Carmignoto, G. (2013). Fast spiking interneuron control of seizure propagation in a cortical slice model of focal epilepsy. *J Physiol*, 591, 807-22.
- Canevini, M. P., Mai, R., Di Marco, C., Bertin, C., Minotti, L., Pontrelli, V., Saltarelli, A. & Canger, R. (1992). Juvenile myoclonic epilepsy of Janz: clinical observations in 60 patients. *Seizure*, 1, 291-8.
- Carvill, G. L., McMahon, J. M., Schneider, A., Zemel, M., Myers, C. T., Saykally, J., Nguyen, J., Robbiano, A., Zara, F., Specchio, N., Mecarelli, O., Smith, R. L., Leventer, R. J., Moller, R. S., Nikanorova, M., Dimova, P., Jordanova, A., Petrou, S., Euro, E. R. E. S. M.-a. E., Dravet Working, G., Helbig, I., Striano, P., Weckhuysen, S., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E. & Mefford, H. C. (2015). Mutations in the GABA Transporter SLC6A1 Cause Epilepsy with Myoclonic-Atonic Seizures. *Am J Hum Genet*, 96, 808-15.
- Carvill, G. L., Weckhuysen, S., McMahon, J. M., Hartmann, C., Moller, R. S., Hjalgrim, H., Cook, J., Geraghty, E., O'roak, B. J., Petrou, S., Clarke, A., Gill, D., Sadleir, L. G., Muhle, H., Von Spiczak, S., Nikanorova, M., Hodgson, B. L., Gazina, E. V., Suls, A., Shendure, J., Dibbens, L. M., De Jonghe, P., Helbig, I., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E. & Mefford, H. C. (2014). GABRA1 and STXBP1: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology*, 82, 1245-53.
- Chan, S. C. & Lee, W. T. (2011). Benign epilepsy in children. *J Formos Med Assoc*, 110, 134-44.
- Chinnery, P. F., Keers, S. M., Holden, M. J., Ramesh, V. & Dalton, A. (2004). Infantile hereditary spastic paraparesis due to codominant mutations in the spastin gene. *Neurology*, 63, 710-2.
- Chowdhury, A. & Brodie, M. J. (2016). Pharmacological outcomes in juvenile myoclonic epilepsy: Support for sodium valproate. *Epilepsy Res*, 119, 62-6.
- 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.
- Clemençon, B., Fine, M., Schneider, P. & Hediger, M. A. (2015). Rapid method to express and purify human membrane protein using the *Xenopus* oocyte system for functional and low-resolution structural analysis. *Methods Enzymol*, 556, 241-65.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 2110-4.
- Cole, K. S. (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Archives des sciences physiologiques*, 3, 253-258.

- Collingridge, G. L., Isaac, J. T. & Wang, Y. T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 5, 952-62.
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J. M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W. Y., Wang, Y. T. & Rouleau, G. A. (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet*, 31, 184-9.
- Covanis, A. (2012). Epileptic encephalopathies (including severe epilepsy syndromes). *Epilepsia*, 53 Suppl 4, 114-26.
- Daniel, C. & Ohman, M. (2009). RNA editing and its impact on GABAA receptor function. *Biochem Soc Trans*, 37, 1399-403.
- Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem*, 22, 317-87.
- De Bot, S. T., Van Den Elzen, R. T., Mensenkamp, A. R., Schelhaas, H. J., Willemsen, M. A., Knoers, N. V., Kremer, H. P., Van De Warrenburg, B. P. & Scheffer, H. (2010). Hereditary spastic paraplegia due to SPAST mutations in 151 Dutch patients: new clinical aspects and 27 novel mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81, 1073-8.
- Delpire, E., Gagnon, K. B., Ledford, J. J. & Wallace, J. M. (2011). Housing and husbandry of *Xenopus laevis* affect the quality of oocytes for heterologous expression studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 50, 46-53.
- Deutsch, C. (2002). Potassium channel ontogeny. *Annu Rev Physiol*, 64, 19-46.
- Diamantis, A., Sidiropoulou, K. & Magiorkinis, E. (2010). Epilepsy during the Middle Ages, the Renaissance and the Enlightenment. *J Neurol*, 257, 691-8.
- 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.
- Dibbens, L. M., Harkin, L. A., Richards, M., Hodgson, B. L., Clarke, A. L., Petrou, S., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F. & Mulley, J. C. (2009). The role of neuronal GABA(A) receptor subunit mutations in idiopathic generalized epilepsies. *Neurosci Lett*, 453, 162-5.
- Ding, L., Feng, H. J., Macdonald, R. L., Botzolakis, E. J., Hu, N. & Gallagher, M. J. (2010). GABA(A) receptor alpha1 subunit mutation A322D associated with autosomal dominant juvenile myoclonic epilepsy reduces the expression and alters the composition of wild type GABA(A) receptors. *J Biol Chem*, 285, 26390-405.
- Duggan, M. J. & Stephenson, F. A. (1990). Biochemical evidence for the existence of gamma-aminobutyrateA receptor iso-oligomers. *J Biol Chem*, 265, 3831-5.
- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, 136, 153-79.

- Endo, S. & Olsen, R. W. (1993). Antibodies specific for alpha-subunit subtypes of GABAA receptors reveal brain regional heterogeneity. *J Neurochem*, 60, 1388-98.
- Escayg, A., Macdonald, B. T., Meisler, M. H., Baulac, S., Huberfeld, G., An-Gourfinkel, I., Brice, A., Leguern, E., Moulard, B., Chaigne, D., Buresi, C. & Malafosse, A. (2000). Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet*, 24, 343-5.
- Falco-Walter, J. J., Scheffer, I. E. & Fisher, R. S. (2018). The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res*, 139, 73-79.
- Farrant, M. & Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*, 6, 215-29.
- Ferando, I. & Mody, I. (2014). Interneuronal GABAA receptors inside and outside of synapses. *Curr Opin Neurobiol*, 26, 57-63.
- Fiest, K. M., Birbeck, G. L., Jacoby, A. & Jette, N. (2014). Stigma in epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 14, 444.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshe, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M. & Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55, 475-82.
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshe, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E. & Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58, 522-530.
- Fisher, R. S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P. & Engel, J., Jr. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46, 470-2.
- Fonknechten, N., Mavel, D., Byrne, P., Davoine, C. S., Cruaud, C., Bonsch, D., Samson, D., Coutinho, P., Hutchinson, M., Mcmonagle, P., Burgunder, J. M., Tartaglione, A., Heinzlef, O., Feki, I., Deufel, T., Parfrey, N., Brice, A., Fontaine, B., Prud'homme, J. F., Weissenbach, J., Durr, A. & Hazan, J. (2000). Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet*, 9, 637-44.
- Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S. (2016). *Pharmakologie und Toxikologie von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*, Berlin Heidelberg, Springer.
- Gallagher, M. J., Ding, L., Maheshwari, A. & Macdonald, R. L. (2007). The GABAA receptor alpha1 subunit epilepsy mutation A322D inhibits transmembrane helix formation and causes proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 12999-3004.

- Gallagher, M. J., Shen, W., Song, L. & Macdonald, R. L. (2005). Endoplasmic reticulum retention and associated degradation of a GABA_A receptor epilepsy mutation that inserts an aspartate in the M3 transmembrane segment of the alpha1 subunit. *J Biol Chem*, 280, 37995-8004.
- Gallagher, M. J., Song, L., Arain, F. & Macdonald, R. L. (2004). The juvenile myoclonic epilepsy GABA(A) receptor alpha1 subunit mutation A322D produces asymmetrical, subunit position-dependent reduction of heterozygous receptor currents and alpha1 subunit protein expression. *J Neurosci*, 24, 5570-8.
- Gallentine, W. B. & Mikati, M. A. (2012). Genetic generalized epilepsies. *J Clin Neurophysiol*, 29, 408-19.
- Gardiner, M. (2005). Genetics of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, 46 Suppl 9, 15-20.
- Genton, P. & Gelisse, P. (2013). The history of juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Behav*, 28 Suppl 1, S2-7.
- Genton, P., Thomas, P., Kasteleijn-Nolst Trenite, D. G., Medina, M. T. & Salas-Puig, J. (2013). Clinical aspects of juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Behav*, 28 Suppl 1, S8-14.
- Gerlai, R. (2005). Genetic Background. In: *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Gibbs, F. A., Davis, H. & Lennox, W. G. (1935). The electroencephalogram in epilepsy and in conditions of impaired consciousness. *Arch Neurol Psychiat*, 34, 1133-48.
- Guan, B., Chen, X. & Zhang, H. (2013). Two-Electrode Voltage Clamp. In: Gamper, N. (ed.) *Ion Channels: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Guerrini, R. & Buchhalter, J. R. (2014). Epilepsy phenotypes and genotype determinants: Identical twins teach lessons on complexity. *Neurology*, 83, 1038-9.
- Haefely, W. E. (1980). GABA and the anticonvulsant action of benzodiazepines and barbiturates. *Brain Research Bulletin*, 5, 873-878.
- 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. (2002). 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.
- Hauser, W. A., Annegers, J. F. & Rocca, W. A. (1996). Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc*, 71, 576-86.
- Hazan, J., Fonknechten, N., Mavel, D., Paternotte, C., Samson, D., Artiguenave, F., Davoine, C. S., Cruaud, C., Durr, A., Wincker, P., Brottier, P., Cattolico, L., Barbe, V., Burgunder, J. M., Prud'homme, J. F., Brice, A., Fontaine, B., Heilig, B. &

- Weissenbach, J. (1999). Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet*, 23, 296-303.
- Helbig, I. (2015). Genetic Causes of Generalized Epilepsies. *Semin Neurol*, 35, 288-92.
- Helbig, I., Scheffer, I. E., Mulley, J. C. & Berkovic, S. F. (2008). Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet Neurol*, 7, 231-45.
- Helbig, I. & Tayoun, A. A. (2016). Understanding Genotypes and Phenotypes in Epileptic Encephalopathies. *Mol Syndromol*, 7, 172-181.
- Hempelmann, A., Taylor, K. P., Heils, A., Lorenz, S., Prud'homme, J. F., Nabbout, R., Dulac, O., Rudolf, G., Zara, F., Bianchi, A., Robinson, R., Gardiner, R. M., Covanis, A., Lindhout, D., Stephani, U., Elger, C. E., Weber, Y. G., Lerche, H., Nurnberg, P., Kron, K. L., Scheffer, I. E., Mulley, J. C., Berkovic, S. F. & Sander, T. (2006). Exploration of the genetic architecture of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, 47, 1682-90.
- Herdegen, T. & Böhm, R. (2014). *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*, Stuttgart New York, Thieme.
- Hermann, B. & Jacoby, A. (2009). The psychosocial impact of epilepsy in adults. *Epilepsy Behav*, 15 Suppl 1, S11-6.
- Hermey, G., Mahlke, C., Schwake, M. & Sommer, T. 2011. Der Experimentator: Neurowissenschaften Elektronische Ressource. *Experimentator*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Herskowitz, I. (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*, 329, 219-22.
- Hildebrand, M. S., Dahl, H. H., Damiano, J. A., Smith, R. J., Scheffer, I. E. & Berkovic, S. F. (2013). Recent advances in the molecular genetics of epilepsy. *J Med Genet*, 50, 271-9.
- Hirose, S. (2014). Mutant GABA(A) receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. *Prog Brain Res*, 213, 55-85.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. & Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol*, 116, 424-48.
- Hortnagl, H., Tasan, R. O., Wieselthaler, A., Kirchmair, E., Sieghart, W. & Sperk, G. (2013). Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience*, 236, 345-72.
- Howell, K. B., Harvey, A. S. & Archer, J. S. (2016). Epileptic encephalopathy: Use and misuse of a clinically and conceptually important concept. *Epilepsia*, 57, 343-7.
- Ishii, A., Kanaumi, T., Sohda, M., Misumi, Y., Zhang, B., Kakinuma, N., Haga, Y., Watanabe, K., Takeda, S., Okada, M., Ueno, S., Kaneko, S., Takashima, S. & Hirose, S. (2014). Association of nonsense mutation in GABRG2 with abnormal trafficking of GABAA receptors in severe epilepsy. *Epilepsy Res*, 108, 420-32.

- Jacob, T. C., Moss, S. J. & Jurd, R. (2008). GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*, 9, 331-43.
- Jallon, P. & Latour, P. (2005). Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, 46 Suppl 9, 10-4.
- Johannesen, K., Marini, C., Pfeffer, S., Moller, R. S., Dorn, T., Niturad, C. E., Gardella, E., Weber, Y., Sondergard, M., Hjalgrim, H., Nikanorova, M., Becker, F., Larsen, L. H., Dahl, H. A., Maier, O., Mei, D., Biskup, S., Klein, K. M., Reif, P. S., Rosenow, F., Elias, A. F., Hudson, C., Helbig, K. L., Schubert-Bast, S., Scordo, M. R., Craiu, D., Djemie, T., Hoffman-Zacharska, D., Caglayan, H., Helbig, I., Serratosa, J., Striano, P., De Jonghe, P., Weckhuysen, S., Suls, A., Muru, K., Talvik, I., Talvik, T., Muhle, H., Borggraefe, I., Rost, I., Guerrini, R., Lerche, H., Lemke, J. R., Rubboli, G. & Maljevic, S. (2016). Phenotypic spectrum of GABRA1: From generalized epilepsies to severe epileptic encephalopathies. *Neurology*, 87, 1140-51.
- Kananura, C., Haug, K., Sander, T., Runge, U., Gu, W., Hallmann, K., Rebstock, J., Heils, A. & Steinlein, O. K. (2002). A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch Neurol*, 59, 1137-41.
- Keramidas, A., Kash, T. L. & Harrison, N. L. (2006). The pre-M1 segment of the alpha1 subunit is a transduction element in the activation of the GABAA receptor. *J Physiol*, 575, 11-22.
- Kodera, H., Ohba, C., Kato, M., Maeda, T., Araki, K., Tajima, D., Matsuo, M., Hino-Fukuyo, N., Kohashi, K., Ishiyama, A., Takeshita, S., Motoi, H., Kitamura, T., Kikuchi, A., Tsurusaki, Y., Nakashima, M., Miyake, N., Sasaki, M., Kure, S., Haginoya, K., Saito, H. & Matsumoto, N. (2016). De novo GABRA1 mutations in Ohtahara and West syndromes. *Epilepsia*, 57, 566-73.
- Kralic, J. E., O'buckley, T. K., Khisti, R. T., Hodge, C. W., Homanics, G. E. & Morrow, A. L. (2002). GABA(A) receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacology*, 43, 685-94.
- Krampf, K., Maljevic, S., Cossette, P., Ziegler, E., Rouleau, G. A., Lerche, H. & Bufler, J. (2005). Molecular analysis of the A322D mutation in the GABA receptor alpha-subunit causing juvenile myoclonic epilepsy. *Eur J Neurosci*, 22, 10-20.
- Krnjevic, K. & Schwartz, S. (1967). The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Exp Brain Res*, 3, 320-36.
- Lachance-Touchette, P., Brown, P., Meloche, C., Kinirons, P., Lapointe, L., Lacasse, H., Lortie, A., Carmant, L., Bedford, F., Bowie, D. & Cossette, P. (2011). Novel alpha1 and gamma2 GABAA receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. *Eur J Neurosci*, 34, 237-49.
- Lema, G. M. & Auerbach, A. (2006). Modes and models of GABA(A) receptor gating. *J Physiol*, 572, 183-200.

- Lerche, H., Shah, M., Beck, H., Noebels, J., Johnston, D. & Vincent, A. (2013). Ion channels in genetic and acquired forms of epilepsy. *J Physiol*, 591, 753-64.
- Lerche, H., Weber, Y. G., Jurkat-Rott, K. & Lehmann-Horn, F. (2005). Ion channel defects in idiopathic epilepsies. *Curr Pharm Des*, 11, 2737-52.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L. & Wehling, M. 2016. Pharmakologie und Toxikologie Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen : ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker. 18., vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
- Luscher, B., Fuchs, T. & Kilpatrick, C. L. (2011). GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron*, 70, 385-409.
- Macdonald, R. L., Gallagher, M. J., Feng, H. J. & Kang, J. (2004). GABA(A) receptor epilepsy mutations. *Biochem Pharmacol*, 68, 1497-506.
- Macdonald, R. L., Kang, J. Q. & Gallagher, M. J. (2010). Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J Physiol*, 588, 1861-9.
- Magiorkinis, E., Sidiropoulou, K. & Diamantis, A. (2010). Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy Behav*, 17, 103-8.
- Maljevic, S., Krampfl, K., Cobilanschi, J., Tilgen, N., Beyer, S., Weber, Y. G., Schlesinger, F., Ursu, D., Melzer, W., Cossette, P., Bufler, J., Lerche, H. & Heils, A. (2006). A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann Neurol*, 59, 983-7.
- Marini, C., Scheffer, I. E., Crossland, K. M., Grinton, B. E., Phillips, F. L., McMahon, J. M., Turner, S. J., Dean, J. T., Kivity, S., Mazarib, A., Neufeld, M. Y., Korczyn, A. D., Harkin, L. A., Dibbens, L. M., Wallace, R. H., Mulley, J. C. & Berkovic, S. F. (2004). Genetic architecture of idiopathic generalized epilepsy: clinical genetic analysis of 55 multiplex families. *Epilepsia*, 45, 467-78.
- Marmont, G. (1949). Studies on the axon membrane. I. A new method. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 34, 351-382.
- Mcdermott, C. J., Burness, C. E., Kirby, J., Cox, L. E., Rao, D. G., Hewamadduma, C., Sharrack, B., Hadjivassiliou, M., Chinnery, P. F., Dalton, A., Shaw, P. J., Uk & Irish, H. S. P. C. (2006). Clinical features of hereditary spastic paraplegia due to spastin mutation. *Neurology*, 67, 45-51.
- Mckernan, R. M., Cox, P., Gillard, N. P. & Whiting, P. (1991a). Differential expression of GABAA receptor alpha-subunits in rat brain during development. *FEBS Lett*, 286, 44-6.
- Mckernan, R. M., Quirk, K., Prince, R., Cox, P. A., Gillard, N. P., Ragan, C. I. & Whiting, P. (1991b). GABAA receptor subtypes immunopurified from rat brain with alpha subunit-specific antibodies have unique pharmacological properties. *Neuron*, 7, 667-76.

- Mctague, A., Howell, K. B., Cross, J. H., Kurian, M. A. & Scheffer, I. E. (2016). The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*, 15, 304-16.
- Mehta, A. K. & Ticku, M. K. (1999). An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev*, 29, 196-217.
- Mercado, J. & Czajkowski, C. (2006). Charged residues in the alpha1 and beta2 pre-M1 regions involved in GABAA receptor activation. *J Neurosci*, 26, 2031-40.
- Miller, P. S. & Smart, T. G. (2010). Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 31, 161-74.
- Mülhardt, C. 2013. Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. *Der Experimentator : SpringerLink : Bücher. 7.*, aktualisierte Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Murthy, J. M., Rao, C. M. & Meena, A. K. (1998). Clinical observations of juvenile myoclonic epilepsy in 131 patients: a study in South India. *Seizure*, 7, 43-7.
- Myers, C. T. & Mefford, H. C. (2015). Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Med*, 7, 91.
- Nieh, S. E. & Sherr, E. H. (2014). Epileptic encephalopathies: new genes and new pathways. *Neurotherapeutics*, 11, 796-806.
- Olsen, R. W. & Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev*, 60, 243-60.
- Olsen, R. W., Snowman, A. M., Lee, R., Lomax, P. & Wamsley, J. K. (1984). Role of the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex in seizure disorders. *Ann Neurol*, 16 Suppl, S90-7.
- Osborne, J. P., Lux, A. L., Edwards, S. W., Hancock, E., Johnson, A. L., Kennedy, C. R., Newton, R. W., Verity, C. M. & O'callaghan, F. J. (2010). The underlying etiology of infantile spasms (West syndrome): information from the United Kingdom Infantile Spasms Study (UKISS) on contemporary causes and their classification. *Epilepsia*, 51, 2168-74.
- Ottman, R. (2005). Analysis of genetically complex epilepsies. *Epilepsia*, 46 Suppl 10, 7-14.
- Pingoud, A. & Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 29, 3705-3727.
- Pritchett, D. B., Luddens, H. & Seeburg, P. H. (1989a). Type I and type II GABAA-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science*, 245, 1389-92.
- Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shivers, B. D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. R. & Seeburg, P. H. (1989b). Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*, 338, 582-5.

- Rudolph, U. & Mohler, H. (2004). Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 475-98.
- Salinas, S., Carazo-Salas, R. E., Proukakis, C., Schiavo, G. & Warner, T. T. (2007). Spastin and microtubules: Functions in health and disease. *J Neurosci Res*, 85, 2778-82.
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshe, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H. & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58, 512-521.
- Schnizler, K., Kuster, M., Methfessel, C. & Fejtli, M. (2003). The roboocyte: automated cDNA/mRNA injection and subsequent TEVC recording on *Xenopus* oocytes in 96-well microtiter plates. *Receptors Channels*, 9, 41-8.
- Schubert, J., Siekierska, A., Langlois, M., May, P., Huneau, C., Becker, F., Muhle, H., Suls, A., Lemke, J. R., De Kovel, C. G., Thiele, H., Konrad, K., Kawalia, A., Toliat, M. R., Sander, T., Ruschendorf, F., Caliebe, A., Nagel, I., Kohl, B., Kecskes, A., Jacmin, M., Hardies, K., Weckhuysen, S., Riesch, E., Dorn, T., Brilstra, E. H., Baulac, S., Moller, R. S., Hjalgrim, H., Koeleman, B. P., Euro, E. R. E. S. C., Jurkat-Rott, K., Lehman-Horn, F., Roach, J. C., Glusman, G., Hood, L., Galas, D. J., Martin, B., De Witte, P. A., Biskup, S., De Jonghe, P., Helbig, I., Balling, R., Nurnberg, P., Crawford, A. D., Esguerra, C. V., Weber, Y. G. & Lerche, H. (2014). Mutations in STX1B, encoding a presynaptic protein, cause fever-associated epilepsy syndromes. *Nat Genet*, 46, 1327-32.
- Seeburg, P. H., Wisden, W., Verdoorn, T. A., Pritchett, D. B., Werner, P., Herb, A., Luddens, H., Sprengel, R. & Sakmann, B. (1990). The GABAA receptor family: molecular and functional diversity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 55, 29-40.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 59, 223-39.
- Shorvon, S. D. & Schwartzkroin, P. A. (2009). Epilepsia--the centenary issue. *Epilepsia*, 50, 335-6.
- Shorvon, S. D., Weiss, G. & Goodkin, H. P. (2009). Notes on the origins of Epilepsia and the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, 50, 368-76.
- Sidiropoulou, K., Diamantis, A. & Magiorkinis, E. (2010). Hallmarks in 18th- and 19th-century epilepsy research. *Epilepsy Behav*, 18, 151-61.
- Sieghart, W. (1989). Multiplicity of GABAA--benzodiazepine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 10, 407-11.
- Sieghart, W. (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev*, 47, 181-234.

- Sieghart, W., Fuchs, K., Tretter, V., Ebert, V., Jechlinger, M., Hoger, H. & Adamiker, D. (1999). Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int*, 34, 379-85.
- Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., Dupont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., Mcharg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer, A., Anderson, V. E. & Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet*, 18, 25-9.
- Smith, H. O., Danner, D. B. & Deich, R. A. (1981). Genetic transformation. *Annu Rev Biochem*, 50, 41-68.
- Stephenson, F. A. (1988). Understanding the GABAA receptor: a chemically gated ion channel. *Biochem J*, 249, 21-32.
- Tan, N. C., Mulley, J. C. & Scheffer, I. E. (2006). Genetic dissection of the common epilepsies. *Curr Opin Neurol*, 19, 157-63.
- Tanaka, M., Olsen, R. W., Medina, M. T., Schwartz, E., Alonso, M. E., Duron, R. M., Castro-Ortega, R., Martinez-Juarez, I. E., Pascual-Castroviejo, I., Machado-Salas, J., Silva, R., Bailey, J. N., Bai, D., Ochoa, A., Jara-Prado, A., Pineda, G., Macdonald, R. L. & Delgado-Escueta, A. V. (2008). Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet*, 82, 1249-61.
- Terhag, J., Cavara, N. A. & Hollmann, M. (2010). Cave Canalem: how endogenous ion channels may interfere with heterologous expression in *Xenopus* oocytes. *Methods*, 51, 66-74.
- Treiman, D. M. (2001). GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia*, 42 Suppl 3, 8-12.
- Tretter, V., Ehya, N., Fuchs, K. & Sieghart, W. (1997). Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J Neurosci*, 17, 2728-37.
- Wagner, C. A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F. & Broer, S. (2000). The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem*, 10, 1-12.
- Walker, M. C. & Kullmann, D. M. (2012). Tonic GABAA Receptor-Mediated Signaling in Epilepsy. In: Th, Noebels, J. L., Avoli, M., Rogawski, M. A., Olsen, R. W. & Delgado-Escueta, A. V. (eds.) *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Bethesda (MD).
- Wallace, R. H., Marini, C., Petrou, S., Harkin, L. A., Bowser, D. N., Panchal, R. G., Williams, D. A., Sutherland, G. R., Mulley, J. C., Scheffer, I. E. & Berkovic, S. F. (2001). Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet*, 28, 49-52.
- Weber, W. M. (1999). Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: recent developments. *J Membr Biol*, 170, 1-12.

- Weber, Y. G. & Lerche, H. (2008). Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Dev Med Child Neurol*, 50, 648-54.
- Weckhuysen, S. & Korff, C. M. (2014). Epilepsy: old syndromes, new genes. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 14, 447.
- Wei, F., Yan, L. M., Su, T., He, N., Lin, Z. J., Wang, J., Shi, Y. W., Yi, Y. H. & Liao, W. P. (2017). Ion Channel Genes and Epilepsy: Functional Alteration, Pathogenic Potential, and Mechanism of Epilepsy. *Neurosci Bull*, 33, 455-477.
- Wei, S. H. & Lee, W. T. (2015). Comorbidity of childhood epilepsy. *J Formos Med Assoc*, 114, 1031-8.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. & Bauer, J. C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, 151, 119-123.
- Wolf, P., Yacubian, E. M., Avanzini, G., Sander, T., Schmitz, B., Wandschneider, B. & Koepp, M. (2015). Juvenile myoclonic epilepsy: A system disorder of the brain. *Epilepsy Res*, 114, 2-12.
- Zampighi, G. A., Kreman, M., Boorer, K. J., Loo, D. D., Bezanilla, F., Chandy, G., Hall, J. E. & Wright, E. M. (1995). A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol*, 148, 65-78.

7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie unter Betreuung meines Doktorvaters Prof. Dr. Holger Lerche und PostDoc Frau Dr. Snezana Maljevic durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Snezana Maljevic, Prof. Lerche und der internationalen Kooperationspartner.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Heidi Löffler und Frau Nicole Jezutkovic von mir eigenständig durchgeführt.

Unterstützend führte Frau Nicole Jezutkovic die Methoden „Linearisierung der cDNS durch enzymatischen Restriktionsverdau“, „cRNS-Synthese durch in-vitro-Transkription“ sowie die „Vorbereitung der *Xenopus laevis* Oozyten“ zeitweise durch.

Die statistische Auswertung erfolgte selbständig nach Anleitung durch Frau Dr. Snezana Maljevic durch mich.

Die Abbildungen 15, 19, 20, 21, 30 und 31 aus dem Ergebnisteil dieser Arbeit stammen aus dem bereits veröffentlichten Fachartikel „Phenotypic spectrum of *GABRA1* - From generalized epilepsies to severe epileptic encephalopathies“, (Johannesen et al., 2016) bei dem ich Ko-Erstautorin bin. Diese Abbildungen wurden von mir selbständig erstellt.

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

Stuttgart, den 19.04.19

Stephanie Siona Pfeffer

8 VERÖFFENTLICHUNG

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

Johannesen, K.* , Marini, C.* , **Pfeffer, S.*** , Moller, R. S., Dorn, T., Niturad, C. E., Gardella, E., Weber, Y., Sondergard, M., Hjalgrim, H., Nikanorova, M., Becker, F., Larsen, L. H., Dahl, H. A., Maier, O., Mei, D., Biskup, S., Klein, K. M., Reif, P. S., Rosenow, F., Elias, A. F., Hudson, C., Helbig, K. L., Schubert-Bast, S., Scordo, M. R., Craiu, D., Djemie, T., Hoffman-Zacharska, D., Caglayan, H., Helbig, I., Serratos, J., Striano, P., De Jonghe, P., Weckhuysen, S., Suls, A., Muru, K., Talvik, I., Talvik, T., Muhle, H., Borggraefe, I., Rost, I., Guerrini, R., Lerche, H., Lemke, J. R., Rubboli, G. & Maljevic, S. (2016). Phenotypic spectrum of GABRA1: From generalized epilepsies to severe epileptic encephalopathies. *Neurology*, 87, 1140-51.

*These authors contributed equally to this work.