

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin II – Neuropädiatrie und Sozialpädiatrie

(Direktor: Dekan Prof. Dr. med. Ulrich Stephani)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Prospektives Screening von *SLC2A1* bei pädiatrischen
Epilepsie-Patienten zur Ermittlung
von Häufigkeit und phänotypischem Spektrum der
GLUT1-Defizienz**

Inauguraldissertation zur

Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Florans Madjidyar
aus Kabul, Afghanistan

Kiel 2018

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Sarah von Spiczak Brzezinski, Klinik für Neuropädiatrie;
Norddeutsches Epilepsiezentrum für Kinder u. Jugendliche, DRK-Landesverband Schleswig-
Holstein e.V.

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Helmut Laufs, Klinik für Neurologie

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.08.2018

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 5 |
| 1.1 | Vorwort zu Epilepsien: Epidemiologie, Klassifikation, Ätiologie | 5 |
| 1.2 | Genetische Veränderungen als Ursache von Epilepsien bei pädiatrischen Patienten | 6 |
| 1.3 | <i>SLC2A1</i> -Mutationen | 8 |
| 1.4 | Die Rolle von GLUT1 im zentralnervösen Stoffwechsel | 9 |
| 1.5 | Diagnostischer Pfad der GLUT1-Defizienz..... | 11 |
| 1.5.1 | Lumbalpunktion | 11 |
| 1.5.2 | Zerebrale Bildgebung..... | 12 |
| 1.5.3 | Elektroenzephalogramm (EEG)..... | 12 |
| 1.5.4 | Genetische Testung..... | 13 |
| 1.6 | Therapeutisches Konzept der GLUT1-Defizienz | 13 |
| 1.7 | Wissenschaftlicher Zweck und angestrebtes Ziel..... | 15 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 16 |
| 2.1 | Probanden | 16 |
| 2.2 | Prospektive Rekrutierung, Kohorte..... | 16 |
| 2.3 | Populationsbasierte pädiatrische Epilepsie-Kohorte (PopGen) | 16 |
| 2.4 | Fragebogen PopGen..... | 18 |
| 2.5 | Molekularbiologische Methoden | 18 |
| 2.5.1 | Probensammlung und Konservierung..... | 18 |
| 2.5.2 | DNS-Extraktion aus Blut mit dem QIAamp Blood Midi Kit von Qiagen®..... | 19 |
| 2.5.3 | Quantitative und qualitative Bestimmung der DNS..... | 20 |
| 2.5.4 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 20 |
| 2.5.5 | Agarosegel-Zubereitung..... | 22 |
| 2.5.6 | Agarose-Gelelektrophorese | 23 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.5.7 | Aufbereitung für die Sanger-Sequenzierung..... | 23 |
| 2.5.8 | Elektropherogramm..... | 24 |
| 2.6 | Materialien | 24 |
| 2.6.1 | Reagenzien und Analysekits..... | 24 |
| 2.6.2 | Verbrauchsmaterial | 25 |
| 2.6.3 | Primer | 26 |
| 2.6.4 | Technische Hilfsmittel..... | 27 |
| 2.6.5 | Software- und Internet-Ressourcen..... | 27 |
| 3 | ERGEBNISSE | 29 |
| 3.1 | Prospektive Rekrutierung, Kohorte | 29 |
| 3.2 | Populationsbasierte pädiatrische Epilepsie-Kohorte (PopGen) | 30 |
| 3.3 | Sequenzvarianten in <i>SLC2A1</i> und Populationsfrequenzen im Vergleich | 32 |
| 4 | DISKUSSION | 35 |
| 4.1 | Diskussion der Methoden | 35 |
| 4.1.1 | Studiendesign..... | 35 |
| 4.1.2 | Genetische Analyse im Vergleich zur Literatur | 36 |
| 4.2 | Diskussion der Ergebnisse | 37 |
| 4.2.1 | Vergleich der Ergebnisse zur Literatur | 37 |
| 4.2.2 | Bedeutung und Konsequenzen für den Kliniker | 38 |
| 4.2.3 | Ausblick | 40 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 41 |
| 6 | ANHANG..... | 42 |
| 6.1 | PopGen-Fragebogen..... | 42 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 53 |

8 DANKSAGUNG..... 60

1 Einleitung

1.1 Vorwort zu *Epilepsien: Epidemiologie, Klassifikation, Ätiologie*

Epilepsien, Fieberkrämpfe und epileptische Anfälle bei Neugeborenen zählen zu den häufigsten Erkrankungen des zentralen Nervensystems im Kindesalter (1). Die Lebenszeitprävalenz liegt weltweit für afebrile epileptische Anfälle bei bis zu 5% (2). Von einer Epilepsie sind circa 3% aller Menschen in ihrem Leben betroffen (3). Im Kindes- und Jugendalter beträgt die Neuerkrankungsrate an Epilepsien jährlich zwischen 50 bis 100/100.000 (4). Am häufigsten manifestieren sie sich innerhalb des ersten Lebensjahres mit einer Inzidenz von 146/100.00/Jahr (1, 4).

Nach der aktuellen Klassifikation der Internationalen Liga gegen Epilepsie (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy) umfassen die neuen Kriterien zur Diagnose einer Epilepsie eine der folgenden Charakteristika: 1. mindestens zwei unprovokierte¹ Anfälle, die mehr als 24 Stunden auseinanderliegen, 2. ein unprovokierter Anfall mit einem hohen Wiederholungsrisiko innerhalb der nächsten zehn Jahre (ca. 60 %, entspricht dem Risiko in Punkt 1) und 3. die Diagnose eines Epilepsiesyndroms (5). Als zugrundeliegend werden auf zellulärer Ebene Dysfunktionen in Form synchronisierter, hochfrequenter neuronaler Entladungen in verschiedenen Arealen des zentralen Nervensystems angesehen. Je nach Ursprungsort kommt es zu einer erheblichen Variation in der Anfallssemiologie (6).

In der aktuellen Klassifikation der Epilepsien werden Ätiologie, Anfallscharakteristik und Epilepsieform berücksichtigt. Anfälle können einen generalisierten und/oder fokalen Charakter aufweisen. Unter generalisierten Anfällen versteht man nach der aktuellen Klassifikation den Beginn neuronaler Entladungen in einem Areal des Gehirnes mit rascher bilateraler Ausbreitung über beide Hemisphären. Es können sowohl kortikale als auch subkortikale Strukturen betroffen sein. Im Gegensatz dazu beschränken sich fokale Anfälle auf eine Hemisphäre und können ggf. einen Rückschluss auf den Ursprungsort ermöglichen. Entsprechend werden auch die Epilepsien in generalisierte und fokale Formen unterteilt. Die bisherige ätiologische Klassifikation von Epilepsien in idiopathisch, kryptogen und symptomatisch wurde abgelöst durch genetisch,

¹ Mögliche Provokationsfaktoren können u.a. Lichtreize, Alkoholentzug oder Fieber sein.

unbekannt und strukturell/metabolisch². Bei genetischen Epilepsien wurden mono- oder polygenetische Ursachen diagnostiziert oder werden als zugrundeliegend vermutet. Die Terminologie „unbekannt“ impliziert genetische/strukturelle Mechanismen, die bislang aber nicht identifiziert werden konnten (8, 9). Die letzte Einteilung beinhaltet nachweisbare strukturelle Veränderungen oder Erkrankungen des Gehirnes u.a. Enzephalopathien verschiedenster Genese, intrakranielle Tumoren, zerebrovaskuläre Erkrankungen und kongenitale Syndrome. Weitere Ursachen sind Infektionen des zentralen Nervensystems und traumatische Ereignisse (2, 10).

Die Relevanz von Epilepsien beruht neben der hohen Zahl der Betroffenen auch auf der teilweise erheblich eingeschränkten Lebensqualität. In schweren Fällen kann es bei den Betroffenen zu schwerwiegenden kognitiven Einbußen, neuropsychologischen Dysfunktionen und lebenslanger Medikamenteneinnahme kommen. Zudem tritt die Erkrankung bei Kindern und Jugendlichen in einer hoch vulnerablen Phase der Entwicklung auf und greift in die Entstehungs- und Reifungsprozesse der Persönlichkeit ein (11, 12). Darüber hinaus sind auch aus gesundheitsökonomischer Perspektive die Kosten der medizinischen, therapeutischen und rehabilitativen Interventionen für unsere Gesellschaft nicht zu unterschätzen (13).

1.2 Genetische Veränderungen als Ursache von Epilepsien bei pädiatrischen Patienten

Die Befassung des Menschen mit Epilepsien reicht lange bis in die Antike zurück. Während Krankheiten zu jener Zeit als Einfluss übernatürlicher Kräfte betrachtet wurden, sprach Hippokrates als Erster in seiner klassischen Abhandlung „über die Heilige Erkrankung“ über eine Dysfunktion des Gehirns und zog die Möglichkeit genetischer Ursachen in Betracht (14). Die Erforschung der Epilepsien wurde zunächst durch die Klassifikation einzelner Anfallssemiologien und später durch das Aufkommen der molekularen Genetik, intrakranielle Bildgebungsverfahren und statistische Methoden revolutioniert. Ein wichtiger Meilenstein wurde in den 1960ern gesetzt, als William Lennox die Weichen für die Auffassung einer multifaktoriellen Genese stellte (15). In diversen Studien zur Erforschung genetischer Ursachen wurden bei Zwillingen Konkordanzraten mono- und dizygoter Geschwister miteinander

² Erweiterte Konzepte der Internationalen Liga gegen Epilepsie (2017) zur Klassifikation der Ätiologie umfassen folgende Einteilung: genetisch, strukturell, metabolisch, immun, infektiös und unbekannt (7).

verglichen und Familien mit mehreren Betroffenen oder einer Anfallshäufung über Generationen untersucht. Dabei konnte bei gleicher genetischer Veranlagung eine starke klinische Variation und Heterogenität des Phänotyps gezeigt werden (16), was ein Zusammenspiel aus genetischen und umweltbedingten Faktoren vermuten ließ.

Bei schätzungsweise 70-80 % der Epilepsien werden zugrundeliegende Genveränderungen vermutet. Genetisch generalisierten Epilepsien wie der Absence-Epilepsie des Kindes- und Jugendalters (CAE, JAE) und der juvenilen myoklonischen Epilepsie (JME) werden eine komplexe/polygenetische Genetik zugeschrieben. Dagegen geht man bei einigen fokalen Epilepsie-Syndromen wie der autosomal-dominanten nächtlichen Frontallappenepilepsie (ADNFLE) und der autosomal-dominanten Epilepsie mit auditorischen Auren (ADEAF) von einem monogenetischen Pathomechanismus³ aus (17–19). Identifiziert wurden bisher zahlreiche Mutationen, die spannungsgesteuerte Kanäle über Natrium- und Kaliumionen sowie ligandengesteuerte Kanäle mit GABA_A- und nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren beeinflussen (17, 20, 21). Zudem richten neueste Studien den Fokus immer mehr auf diverse zelluläre Pathomechanismen (17).

Die Epilepsiegenetik hat das Verständnis der Epilepsien grundlegend verändert. Es bleiben aber noch viele Fragen offen. So wurde bisher nur ein Bruchteil der verantwortlichen Genveränderungen identifiziert. Da Mutationen in verschiedenen Genen ursächlich für das gleiche Krankheitsbild sein können (genetische Heterogenität) und umgekehrt einzelne Veränderungen zu verschiedenen Krankheitsbildern unterschiedlicher Schweregrade führen können (phänotypische Heterogenität), bleibt die Genotyp-Phänotyp-Korrelation noch unverstanden. Ebenso bedarf es weiterer Forschung bzgl. des möglichen Einflusses und der Relevanz sowohl von häufigen als auch seltenen Sequenzvarianten (16, 20, 22). Diese Komplexität stellt Kliniker vor große Herausforderungen. Diese Annahme soll das Dravet-Syndrom verdeutlichen, das bis dato zu den wichtigsten genetisch bedingten Epilepsie-Syndromen zählt. Zu etwa 80 % finden sich bei Patienten mit dieser Epilepsieform Mutationen im *SCN1A*-Gen, welches eine Natrium-Kanal-Untereinheit kodiert. In 15 % der Fälle sind keine Genveränderungen zu finden, was andere ursächliche Mutationen nahelegt, die den gleichen oder

³ Es ist eine phänotypische Variabilität innerhalb der Familien vorhanden, welche modifizierende Faktoren (genetisch oder Umwelt) als wahrscheinlich erscheinen lässt.

einen ähnlichen Phänotyp verursachen. Gleichzeitig bedeutet aber ein *SCN1A*-positiver Befund nicht, dass der Betroffene das klinische Bild eines Dravet-Syndroms aufweisen muss (23).

1.3 SLC2A1-Mutationen

Mutationen und Deletionen im *SLC2A1*-Gen sind aufgrund des entstehenden zerebralen Glukosemangels Ursache für schwerbehandelbare Enzephalopathien. Das klassische GLUT1-Defizienz-Syndrom wurde erstmalig 1991 von de Vivo et al. beschrieben. Es wurde charakterisiert als eine gegenüber der antikonvulsiven Therapie resistente Epilepsie mit Beginn im Säuglingsalter und früher psychomotorischer Entwicklungsstörung. Zusätzlich wurden komplexe Bewegungsstörungen, Ataxie und Dystonie, muskuläre Hypotonie oder Spastik sowie erworbene Mikrozephalie beobachtet (24). Da verschiedene Anfallstypen auftreten können, kann kein typisches Anfallsmuster beschrieben werden. Bei Säuglingen stehen nach bisherigen Erkenntnissen auffällige Augenbewegungen, zyanotische Anfälle und plötzliche Tonusverluste im Vordergrund; im Kindesalter dominieren myoklonische und generalisierte Anfälle und bei Erwachsenen vor allem Bewegungsstörungen (25, 26).

Mutationen in *SLC2A1* treten häufig als sporadische *de novo*-Ereignisse auf. Es wurden autosomal-dominante und seltener autosomal-rezessive Erbgänge beschrieben (27–29). Anhand von Knockout-Mäusen wurde nachgewiesen, dass homozygote Allele in utero letal sind für die betroffenen Tiere (30). Der GLUT1-Defizienz liegen heterozygote Mutationen zugrunde, auch eine Deletion des kompletten Gens wurde nachgewiesen. Es wurden zahlreiche Mutationstypen beschrieben: Missense- oder Nonsense-Mutationen, Frameshift-Mutationen, Translationen, Insertionen und Spleiß-Mutationen (30–35). Einige der Mutationstypen wie Frameshift-Mutationen oder multiple Deletionen von Exonen wurden mit einer schweren klinischen Präsentation in Zusammenhang gebracht; Missense-Mutationen hingegen mit einer milderen Klinik. Diese äußerte sich u.a. in Form einer milden geistigen Retardierung und dem späteren Auftreten epileptischer Anfälle (34, 36, 37). Daneben wurden in einer Arbeit bei vier Patienten mit der gleichen Missense-Mutation Variationen des Phänotyps beschrieben, sodass andere modifizierende Mechanismen vermutet werden (31, 31).

Das phänotypische Spektrum ist sehr breit gefächert und wurde in den letzten Jahren in verschiedenen Studien kontinuierlich erweitert. Erstmals identifizierte eine Arbeitsgruppe *SLC2A1* als ursächliches Gen für paroxysmal bewegungs-induzierte Dyskinesien (PED). PED werden bei defektem Glukosetransporter durch das bei längerer Aktivität entstehende Energiedefizit verursacht und äußern sich in Form von charakteristischen Bewegungsstörungen nach längerer Bewegung mit einer Dauer von circa 15-60 Minuten, seltener bis zu 120 Minuten (38). Eine weitere Gruppe arbeitete zusätzlich heraus, dass GLUT1-Mutationen PED mit und ohne Epilepsie verursachen können, in der Regel autosomal-dominant vererbt (39, 40). Neben Bewegungsstörungen wurde ein kohlenhydratabhängiger Phänotyp beobachtet: In Situationen des Fastens kam es zu einer deutlichen Verschlechterung der neurologischen Symptomatik mit eindrucksvoller Besserung bei Kohlenhydrateinnahme (41). In einer Kohortenstudie, die Probanden ausschließlich mit frühkindlicher Absence-Epilepsie umfasste (Early-onset Absence Epilepsy, EOAE, Beginn unter vier Jahren), wurden bei 4/34 Probanden (12%) drei Missense-Mutationen und eine Spleiß-Mutation im intronischen Bereich nachgewiesen. Infolgedessen wurde eine *SLC2A1*-Analyse bei dieser Entität empfohlen (42). In einer großen Familienstudie wurden bei verschiedenen Familienmitgliedern über mehrere Generationen unterschiedliche Phänotypen mit einem GLUT1-Defekt in Verbindung gebracht. Unter den Mutationsträgern wiesen 12/15 ein Epilepsie-Syndrom auf und 7/15 PED. Unter den Epilepsien waren genetisch generalisierte Epilepsien mit Absencen beginnend in der frühen Kindheit bis ins Erwachsenenalter, myoklonisch-astatische und fokale Epilepsien zu verzeichnen. Zusätzlich wurden auch in dieser Studie Mutationen bei über 10 % der Patienten mit EOAE diagnostiziert. Somit zeigte sich die GLUT1-Mutation als wichtige monogentische Ursache für genetisch generalisierte Epilepsien und sollte vor allem bei dominanter Vererbung über mehrere Generationen und insbesondere bei gleichzeitigem Auftreten mit PED bedacht werden (43)

1.4 Die Rolle von GLUT1 im zentralnervösen Stoffwechsel

Glukose (GLUT)-Transporter sind Proteine und weisen in den unterschiedlichen Organen, in denen sie vorkommen, nur wenige Sequenzunterschiede auf (24). Diese Carrier sind verantwortlich für den passiven Transport von Glukose über erleichterte Diffusion. Bisher sind 14 unterschiedliche Transporter bekannt. Es wird differenziert zwischen insulinabhängigen und -

unabhängigen Transportern. Letztere, zu denen auch GLUT1 zählt, können eine konstante, von Insulin und der Nahrungsaufnahme unabhängige Energieversorgung des Gehirns gewährleisten (44, 45). Das Glukose-Transporter-Protein 1, bestehend aus über 492 Aminosäuren, ist der am häufigsten vorkommende Typ und in vielen Säugetierzellen verbreitet. Es gewährleistet den basalen Transport von D-Glukose entlang der Blut-Hirn-Schranke (24, 46). GLUT1 wird konstitutiv als membrangebundenes Glykoprotein u. a. in Erythrozyten, in den Hirngefäßen und in Astroglia exprimiert (47, 48). Insbesondere Hirnkapillaren besitzen nicht nur große Mengen an messenger-RNA für GLUT1 (49), sondern auch eine zehnfach höhere Dichte des Transporters als andere Gewebe (50). Der Transporter wird durch das *SLC2A1*-Gen (solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1, *SLC2A1*) kodiert und ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, an der Position 1p35-p31.3, lokalisiert. Das *SLC2A1*-Gen besteht aus zehn Exons, neun intronischen Bereichen und einer Promotor-Region (51). GLUT1 ist ein Protein mit zwölf transmembranösen Domänen. Die Domänen durchspannen in Form von Alpha-Helices die Zellmembran, intrazellulär befinden sich Amino- und Carboxylenden. Die Helices 6/7 werden durch eine große intrazelluläre Schleife voneinander abgegrenzt (52). Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht die Struktur von GLUT1 und wurde vorab veröffentlicht durch Pascual et al.

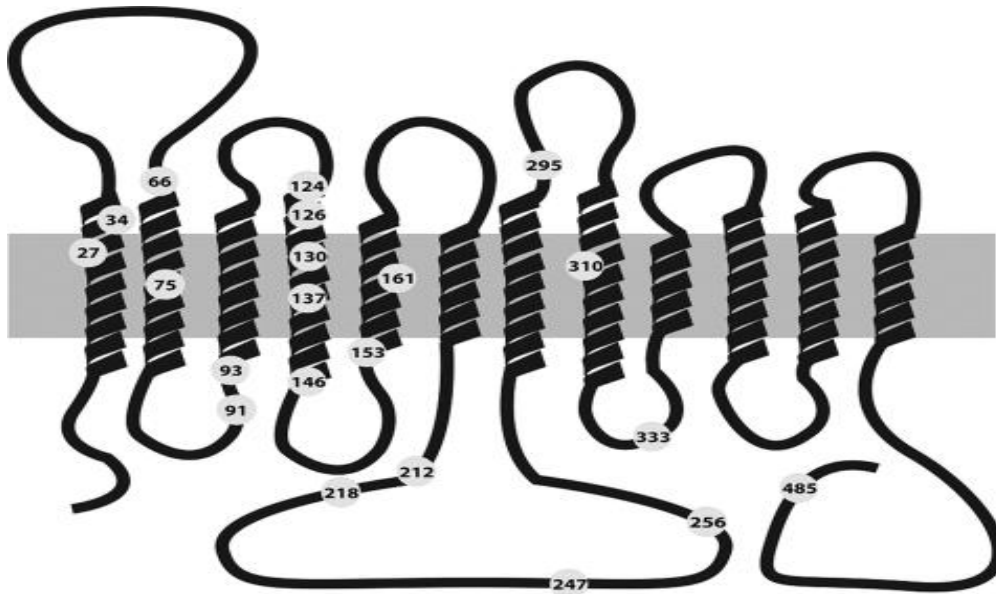


Abbildung 1: Struktur Glukose-Transporter-Protein 1

Das graue Rechteck stellt die Plasmamembran dar, in deren Vordergrund die Helices von GLUT1 mit den zyttoplasmatischen Amino- (links) und Carboxyltermini (rechts) dargestellt sind. Die extrazelluläre Matrix befindet sich oberhalb der Membran. In dieser Abbildung entsprechen die Nummerierungen der Lage von Missense-Mutationen (Quelle: Pascual et al. (53)).

1.5 Diagnostischer Pfad der GLUT1-Defizienz

1.5.1 Lumbalpunktion

Da GLUT1 die einzige Möglichkeit des Glukose-Transportes über die Blut-Hirn-Schranke darstellt, spiegelt sich ein Defekt des Transportes in einer reduzierten intrazerebralen Aufnahme von Glukose im Liquor cerebrospinalis (Hypoglykorrhachie) wider (24, 31, 54). Gemessen werden sowohl die Konzentration der Glukose im Liquor (normal 60-85 mg/dl) als auch das Verhältnis zwischen Liquorglukose und Blutglukose (normal > 0,5).

Um falsch hohen Ergebnissen vorzubeugen, sollte die Punktion nach einer mindestens vierstündigen Fastenzeit vorgenommen werden. Dringend zu empfehlen ist zudem die vorherige Blut-Glukose-Konzentrations-Bestimmung, um einer Stressinduktion zuvorzukommen. Eine verminderte Glukose-Konzentration im Liquor kann u. a. bedingt sein durch eine Subarachnoidalblutung und Meningitiden verschiedener Ätiologie. Bei entsprechenden klinischen Auffälligkeiten und Ausschluss von Differentialdiagnosen sollte eine GLUT1-

Defizienz in Betracht gezogen werden. Somit zählt die Lumbalpunktion zu einem der wichtigsten diagnostischen Mittel (51, 54). Der so gewonnene Liquor sollte neben Glukose auch auf Laktat, Zellzahl und Proteine untersucht werden. Die zwei letztgenannten Parameter sind in der Regel normwertig. Die CSF-Blut-Glukose-Ratio (CSF, cerebrospinal fluid) nimmt diagnostisch einen wesentlich höheren Stellenwert ein als die absolute Glukose-Konzentration. Dabei beträgt im Allgemeinen beim Gesunden die durchschnittliche Ratio $\pm 0,6$. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Betroffene mit einem GLUT1-Defekt im Schnitt eine Ratio von 0,33-0,37 aufwiesen, die sich von 0,19 bis 0,46 erstreckte (25, 31, 54). In einigen Einzelfällen hingegen wurden bei nachgewiesener *SLC2A1*-Mutation deutliche Abweichungen davon gefunden mit einer Ratio von 0,46-0,59 (38, 55). Ein weiterer differentialdiagnostisch wichtiger Parameter im Liquor cerebrospinalis ist die erniedrigte bis normale Laktat-Konzentration von 0,97-1,0 mmol/L (54). Vermehrt wird Laktat hingegen im Rahmen erhöhter anaerober Glykolyse bei Hypoglykorrhachie anderer Ätiologie zur Energiegewinnung produziert (56).

1.5.2 Zerebrale Bildgebung

Die bildgebenden Verfahren im Kontext der GLUT1-Diagnostik haben eine insgesamt nebensächliche Rolle. In der Magnetresonanztomografie (MRT) wurden vereinzelt unspezifische Auffälligkeiten wie die Erweiterung der inneren und äußeren Liquorräume (51), dezente Hirnhypotrophien (57) und eine verzögerte Myelinisierung (24) beschrieben. Bei einigen Patienten wurde in der T2-Wichtung eine Betonung der subkortikalen U-Fasern gefunden, welche Verbindungen benachbarter Areale im Cortex darstellen (58). In der Positronenemissionstomografie (PET) ist bei einigen Betroffenen die kortikale Glukose-Aufnahme vermindert (59); bei Betroffenen mit bewegungsinduzierter Epilepsie ist die Aufnahme von Fluordesoxyglukose u. a. im Putamen erhöht und bilateral im Thalamus reduziert (39).

1.5.3 Elektroenzephalogramm (EEG)

Bei Betroffenen der GLUT1-Defizienz wurde in bisherigen Studien als gemeinsames und häufigstes Merkmal im EEG eine unauffällige interiktale Aktivität beschrieben. Abweichungen

traten bei Säuglingen in Form von fokalen epileptischen Entladungen und Verlangsamung auf; bei Kindern ab dem zweiten Lebensjahr in Form von paroxysmalen generalisierten 2.5-4 Hz Spike- oder Polyspike-Entladungen (31, 60–62). Eine Besonderheit zeigen die Ableitungen bei jenen Betroffenen, die einen kohlenhydratabhängigen Phänotyp aufweisen. Ihr EEG unterscheidet sich in den prä- und postprandialen Aufnahmen in der Hinsicht, dass nach Nahrungsaufnahme die epileptischen Entladungen deutlich rückläufig sind (28, 63).

1.5.4 Genetische Testung

Die molekularbiologische Mutations-Analyse stellt den Goldstandard dar und ist somit der wichtigste diagnostische Schritt, da die Mehrheit der Betroffenen eine pathogene Veränderung im *SLC2A1*-Gen aufweist. Das gängigste Verfahren stellt die direkte Sequenzierung nach der Sanger-Methode dar (32).

1.6 Therapeutisches Konzept der GLUT1-Defizienz

Patienten, bei denen ein GLUT1-Defekt diagnostiziert wurde, steht eine spezifische Behandlungsmöglichkeit, die ketogene Diät, zur Verfügung. Durch die ketogene Diät werden dem zentralen Nervensystem Ketone statt Glukose als Energielieferanten zur Verfügung gestellt. Dabei werden die Ketonkörper β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat in der Leber produziert und können über Monocarboxylat-Transporter die Blut-Hirn-Schranke passieren (64). Die Diät stellt per se kein neues Verfahren dar und hat sich bereits in der Vergangenheit bei schwerbehandelbaren Epilepsien des Kindesalters als wirksam erwiesen. Sie ist hochkalorisch und kohlenhydratarm mit einem festen Verhältnis von Fett zu einem Gemisch aus Proteinen und Kohlenhydraten. Die Diät wurde im frühen 20. Jahrhundert im Rahmen der Erforschung biochemischer Vorgänge des Fastens entdeckt und imitiert jenen Prozess (65). Im Zeitalter der aufkommenden Antikonvulsivatherapie war der Einsatz dieser Therapiemethode rückläufig. Mit der Erstbeschreibung der de Vivo Krankheit und der Erforschung der zugrundeliegenden Pathophysiologie erhielt die ketogene Diät eine essentielle Bedeutung (24).

Die Diät setzt sich nach dem klassischen von John Hopkins erstellten Protokoll zusammen. Es wird das bereits genannte Verhältnis gewählt mit ergänzender Gabe von Vitaminen und

Elektrolyten. Darüber hinaus wird der Proteinanteil so berechnet, dass für die Kinder keine Gefahr einer Wachstumsretardierung besteht (66). Bei diesem Protokoll finden hauptsächlich langkettige Fettsäuren Anwendung, wobei auch modifizierte Varianten mit mittelkettigen Fettsäuren (57) und eine modifizierte Atkins Diät bei GLUT1-Betroffenen zur Besserung führten. Die Atkins Diät ist bezogen auf die totale Kalorienzufuhr und die Flüssigkeitsaufnahme weniger restriktiv (67), es wird lediglich die Kohlenhydratmenge pro Tag streng limitiert. Sobald der Verdacht auf eine GLUT1-Defizienz besteht, sollte die Therapieeinleitung so früh wie möglich begonnen und bis ins Erwachsenenalter fortgesetzt werden (68). Der Zeitpunkt ist insbesondere vor dem Hintergrund wichtig, dass Kinder im Vergleich zu Erwachsenen effektiver Ketonkörper generieren und diese für die Versorgung des zentralen Nervensystems nutzen können (66).

Unter der ketogenen Diät sind epileptische Anfälle bei *SLC2A1*-Defekten deutlich rückläufig bis hin zur Anfallsfreiheit, sodass Antikonvulsiva entbehrlich sein können. Zudem kann es zur Besserung der Bewegungsstörungen kommen (55). Wahrscheinlich führt eine frühzeitige Behandlung auch zu einem deutlich besseren kognitiven Outcome und selteneren sekundären Folgeschäden. Diese Annahme müsste in weiteren Studien verifiziert werden. Die ketogenen Diäten stellen somit die Erstlinientherapie der GLUT1-Defizienz dar. Sie sollten in der klinischen Anwendung jedoch achtsam genutzt werden. Neben einer insgesamt guten Verträglichkeit sind einige Nebenwirkungen beschrieben worden. Im Rahmen der anfänglichen Hospitalisierung wurden bei den Kindern kurzzeitig und gut therapierbar gastrointestinale Beschwerden, Hypoglykämie und Dehydratation beobachtet (69, 70). Länger anhaltende Probleme könnten am häufigsten Abweichungen im Lipidhaushalt wie Hypercholesterinämie, seltener Nierensteine, rezidivierende Infekte und metabolische Ereignisse wie Hypokalzämie darstellen (69). Sehr seltene gravierende Nebenwirkungen wie kardiologische Komplikationen wurden bisher in Zusammenhang mit der GLUT1-Defizienz nicht beobachtet (25); der einzige beschriebene Todesfall war durch eine hämorrhagische Pankreatitis bedingt (71).

1.7 Wissenschaftlicher Zweck und angestrebtes Ziel

Die Varianz des phänotypischen Spektrums der GLUT1-Defizienz ist breiter gefächert als anfangs gedacht. Zudem konnten Probleme wie die Ermittlung der Prävalenz und damit die tatsächliche Relevanz im klinischen Alltag nicht vollständig gelöst werden. In bisherigen Studien wurde ein stark selektiertes Patientengut untersucht, es wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen, die in Universitätskliniken behandelt wurden. Um Erkenntnisse über die Relevanz von Krankheitsgenen zu gewinnen, bedarf es jedoch bevölkerungsbasierter Studien. Vor diesem Hintergrund wurde in diesem Projekt erstmals im Kontext der GLUT1-Forschung ein populationsbezogenes Patientenkollektiv aus Nord-Schleswig-Holstein untersucht. Die geographische Lage stellt im Sinne einer „Isolation“ durch die Nordsee, Ostsee und die dänische Grenze eine einmalige Chance zur Ermittlung der Prävalenz dar. Zusätzlich führten wir ein Screening bei pädiatrischen Patienten mit neu diagnostizierter Epilepsie oder Bewegungsstörungen durch, die in unserem neuropädiatrischen Zentrum rekrutiert wurden.

Ziele der hier vorgestellten Untersuchung waren

- die Ermittlung der Prävalenz von *SLC2A1*-Mutationen bei pädiatrischen Patienten in einer Population aus einer definierten Region Norddeutschlands,
- die Beschreibung des phänotypischen Spektrums durch das systematische Screening bei Erstvorstellung und durch Untersuchung einer großen Kohorte bestehend aus Patienten mit verschiedenen epileptischen Syndromen sowie
- einen Beitrag zum besseren Verständnis der GLUT1-Defizienz zu leisten und abhängig von Prävalenz und phänotypischem Spektrum die Relevanz einer frühzeitigen oder gar regelhaften GLUT1-Testung zu prüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden

Von allen an unserer Arbeit teilnehmenden Probanden und deren Eltern lag eine Einverständniserklärung vor. Zudem wurde diese Studie der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vorgelegt und von ihr begutachtet (Aktenzeichen A 115/02 und A 116/02).

2.2 Prospektive Rekrutierung, Kohorte

Im Rahmen der prospektiven Studie wurden von Juli 2012 bis März 2013 Patienten mit Epilepsien, Fieberkrämpfen und Bewegungsstörungen ohne Anfälle rekrutiert, die sich neu in unserem neuropädiatrischen Zentrum an der Universitätsklinik Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel oder im Norddeutschen Epilepsiezentrum, Schwentimental-Raisdorf, vorstellten.

Probanden mit strukturell-bedingten Epilepsien wurden aus der Studie ausgeschlossen. Es wurden Kinder und Jugendliche von 0 bis 18 Jahre eingeschlossen. Bei Erstvorstellung und entsprechender Verdachtsdiagnose wurden die Eltern der Patienten über die genetische Untersuchung aufgeklärt. Nach Erhalt der Einverständniserklärung wurde das Probenmaterial über eine venöse Venenpunktion entnommen. Im Rahmen einer regulär notwendigen Blutentnahme in der neuropädiatrischen Sprechstunde wurde ein zusätzliches Röhrchen für die Forschung entnommen, sodass es nicht zu einer zusätzlichen Traumatisierung der Kinder kam.

2.3 Populationsbasierte pädiatrische Epilepsie-Kohorte (PopGen)

Die Rekrutierung der Patientenkohorte im Rahmen von PopGen war zu Beginn dieser Arbeit bereits abgeschlossen und nicht Teil des hier vorgestellten Projektes, sie wird hier lediglich der Vollständigkeit halber dargestellt.

Das PopGen-Projekt (Populationsgenetik) wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzes gefördert. PopGen wurde am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchgeführt vom

Institut für Medizinische Statistik und Informatik und der Mukosaforschungsgruppe an der Klinik für Allgemeine Innere Medizin. Das Projekt umfasste mit Datenerhebung und Probensammlung insgesamt drei Jahre von 2004 bis 2007. Ende 2004 wurden die ersten Patienten angeschrieben, die erste Probe wurde 2005 im Labor erfasst und der letzte Probeneingang war am 24.08.2007. Insgesamt sind 347 Probanden mit Epilepsien und Fieberkrämpfen eingeschlossen worden.

Im Folgenden wird die Rekrutierung beschrieben. Zunächst erfolgten die Ausarbeitung von Fragebögen zur Erhebung einer detaillierten Anamnese (weiter unten im Text beschrieben) und das Anschreiben aller Chefärzte und einiger Ärzte, die schwerpunktmäßig Epilepsiepatienten betreuten. Als nächstes besuchten ärztliche Mitarbeiter aus der Klinik für Neuropädiatrie alle Zentren bzw. Kollegen aus Kiel und nordöstlich des Kanals bis zur dänischen Grenze. Anhand der Einschlusskriterien wurden nur die diagnostisch gesicherten Patienten angeschrieben. Die persönlichen Daten wurden getrennt von den Probanddaten gespeichert und die Proben durch eine fortlaufende Strichkodierung anonymisiert, sodass keine Informationen auf den Spender zurückbezogen werden konnte. Über die Chefärzte erfolgte das Anschreiben der Eltern und nach Eingang der Einverständniserklärung die Versendung der Fragebögen. Das Blut entnahmen die betreuenden Hausärzte über ein mitgesendetes Blutentnahme-Set für 3x10 ml peripher venöses Blut.

Einschlusskriterien

In die Studie aufgenommen wurden alle Patienten unter 18 Jahre mit

- gesicherten Epilepsien, unabhängig von der Genese, unabhängig auch, ob Anfälle auftraten oder eine Anfallsfreiheit bestand oder ob eine Therapie notwendig war oder nicht. Auch strukturelle/metabolische Epilepsien wurden erfasst.
- mindestens zwei unprovzierten Anfällen. Mehrere Anfälle, die innerhalb von 24 Stunden auftraten, wurden als ein einzelner Anfall gewertet.
- Fieberkrämpfen. Diese wurden erfasst, später dann von den Epilepsien unabhängig betrachtet: Fieberkrämpfe mit Epilepsie oder Fieberkrämpfe als einzige epileptische Manifestation.
- Neugeborenenanfällen, definiert als epileptische Anfälle in den ersten 28 Lebenstagen.

Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen aus der Studie wurden Patienten mit

- Synkopen oder synkopenverdächtigen Zuständen.
- anfallsverdächtigen Zuständen.
- ungeklärten Paroxysmen.
- nur einem Anfall.

2.4 Fragebogen PopGen

Der Fragebogen für die PopGen-Kohorte umfasste eine detaillierte Anamnese (siehe Anhang).

Nach Entschlüsselung der Rohdaten wurden zusammenfassend u.a. folgende Bereiche erfragt:

- Nebendiagnosen wie z. Bsp. Herzleiden, Diabetes mellitus oder neurologische/psychiatrische Symptome
- Schwangerschaftsverlauf, Geburtskomplikationen und Entwicklungsstörungen bzgl. Sprache und Psychomotorik
- Ausführliche Familienanamnese bzgl. Epilepsie, Herkunft der Eltern (nördlich des Kanals oder aus Kiel)
- Medikamentöse Einstellung, Auswirkung der Medikamente auf die Lebensqualität
- Alter der Patienten bei der Blutentnahme, Gewicht, Größe, Geschlecht
- Ausführliche Anamnese bzgl. des Anfallbeginns, der Schwere und der Art

2.5 Molekularbiologische Methoden

Unter Punkt 2.6 werden alle Materialien aufgeführt.

2.5.1 Probensammlung und Konservierung

Die Blutproben wurden in 7,5 ml EDTA-Monovetten abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.5.2 DNS-Extraktion aus Blut mit dem QIAamp Blood Midi Kit von Qiagen®

Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll für Vollblut aus dem Handbuch des Herstellers für QIAamp Blood Kits von Qiagen®. Vor Beginn der Extraktion wurden die Blutproben bei Raumtemperatur für ca. 30 min aufgetaut. Anschließend wurden 200 µl Serinprotease in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert, 1–2 ml Blut hinzugefügt und vorsichtig geschwenkt. Die Protease hat die Funktion der Lyse, der Proteinverdauung und der Entfernung von Proteinbindungen zur DNS. Im nächsten Schritt wurden 2,4 ml Lysepuffer (AL-Buffer) hinzugesetzt und das Röhrchen ca. 15x umgeschwenkt, gefolgt von einem kräftigen Schütteln des Ansatzes für 1 min bis eine homogene Lösung entstand. Der Lysepuffer bricht Phospholipid-Membranen der Zelle und der Kernmembranen auf und setzt so DNS frei, außerdem schafft er einen für die DNS optimalen pH-Bereich. Die Lösung wurde danach für 10 Minuten bei 70°C in einem Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Ethanol (96%–100%) wurde erneut 10x geschwenkt und kräftig manuell geschüttelt. Das Ethanol ändert das Löslichkeitsprodukt, sodass die DNS ausfällt und ein Präzipitat entsteht.

Anschließend wurde vorsichtig eine Hälfte der Lösung auf eine QIAamp-Spinsäule eines neuen 15 ml Filterröhrchens mit integrierter Membran überführt und bei 1850 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Salzgehalt und der pH-Wert im Lysat sorgen dafür, dass Proteine und andere die PCR störende Komponenten nicht in die Membran adsorbiert werden. Der Überstand des Zentrifugats wurde verworfen und erneut für 3 min bei 1850 rpm zentrifugiert. Auch diesmal wurde das Filtrat verworfen und die Probe mit 2 ml Waschpuffer 1 (AW1-Buffer) versetzt und für 1 min bei 4500 rpm abzentrifugiert. Dann wurde der Überstand jedoch nicht entfernt, sondern mit 2 ml Waschpuffer 2 (AW2-Buffer) versetzt und bei 4500 rpm für 15 min zentrifugiert. Die Waschpuffer reinigen die auf der Membran haftende DNS von etwaigen Kontaminationen und ermöglichen somit einen hohen Reinheitsgrad. Die QIAamp-Spinsäule wurde in ein neues 15 ml Auffanggefäß platziert und zur Elution wurden 300 µl Elutionspuffer (AE-Buffer) direkt auf die Membran pipettiert. Das Eluat wurde 5 min lang bei Zimmertemperatur inkubiert und bei 4500 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Produkt wurde für ein besseres Ergebnis wie zuvor beschrieben ein zweites Mal abzentrifugiert. Somit konnte die DNS direkt zur Amplifikation eingesetzt oder bei 4 °C gelagert werden. Bei dieser Herangehensweise sind DNS-Fragmente von max. 50kb, im Schnitt 20-30kb, entstanden.

2.5.3 Quantitative und qualitative Bestimmung der DNS

2.5.3.1 Quantitative Messung

Verwendet wurden die Arbeitslösungen von Qubit® Standards und Qubit® dsDNS BR AssayKit. Für jede DNS-Probe wurde jeweils ein Standard benötigt. Der Mastermix (MM) wurde wie folgt zusammengesetzt:

- 199 µl Puffer x Probenanzahl
- 1 µl Farbreagenz x Probenanzahl

190 µl Mastermix wurden mit je 10 µl Standard („Qubit® dsDNS BR Std# 1 und Std#2) versetzt. Für die Proben wurden 198 µl MM und 2 µl der DNS verwendet. Die Konzentrationsmessungen erfolgen über den Qubit® 2.0 Fluorometer.

2.5.3.2 Qualitative Bestimmung mittels Spektralphotometrie

Die Basen der DNS können UV-Licht absorbieren, sodass bei Wellenlängen von 260 nm bis 280 nm über die Messung der Konzentration der Reinheitsgrad der Probe bestimmt werden kann. Liegt der Quotient beider Wellenlängen zwischen 1.8 und 2.0, so kann man von einer RNS- und proteinfreien Lösung und einer guten Qualität sprechen. Dabei wurden jeweils 18 µl destilliertes Wasser zu 2 µl DNS gegeben und in Quarzküvetten vermessen. Die Messergebnisse der Proben in dieser Arbeit lagen zwischen 1,9 und 2,0 und somit im o.g. gewünschten Bereich. Sie waren damit geeignet für eine experimentelle Analyse.

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) beschreibt eine in vitro Amplifikation von spezifischen DNS-Fragmenten. Die DNS-Polymerase synthetisiert einen neuen DNS-Strang an einer Matrize und benötigt hierfür zur Initiation freie Hydroxygruppen, die in Form von sequenzspezifischen Primern hinzugegeben werden. Das Standard-Programm verläuft zyklisch in drei Phasen bestehend aus einem Denaturierungs-, Annealing-, und Elongationsschritt. Für das *SLC2A1*-Gen wurden alle zehn Exons amplifiziert und sequenziert. Die Reaktion fand in einem Volumen von 50 µl statt. Folgender Reaktionsansatz wurde jeweils pipettiert:

Reaktionsansatz Polymerase-Kettenreaktion

| Komponenten | Volumen/Reaktion [μ l] |
|---|-----------------------------|
| AmpliTa ^q Gold [®] 360 Master Mix | 25 μ l |
| GC Enhancer (nur Ex1) | 5 μ l |
| 5´- Primer [3.5 μ M] | 5 μ l |
| 3´- Primer [3.5 μ M] | 5 μ l |
| DNA [50 ng/ μ l] | 4 μ l |
| Nukleasefreies H ₂ O | 11 μ l |
| Volumen Total | 50 μ l |

Tabelle 1: Rekrutierte Kohorte, Proben, Pipettierschema

Für die Sequenzierung der PopGen-Kohorte verwendeten wir aufgrund ausreichender Qualität und Beurteilbarkeit hauptsächlich die Vorwärts-Primer; nur für die Exons 5_6 und 7_8 die Rückwärts-Primer. Entsprechend halbierten wir den Master Mix. Die Primer wurden vor Einsatz in großen Ansätzen vorbereitet und auf mögliche Kontaminationen überprüft. Die PopGen-Proben wurden auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l in 100 μ l Volumen eingestellt. Anders als bei den rekrutierten Patienten wurden zur Arbeitserleichterung die PopGen-Proben im ersten Schritt getrocknet. Dabei wurden jeweils 2 μ l DNS auf eine Sequenzierplatte pipettiert und für 1 h 40 min bei 37° Celsius inkubiert. Anschließend wurde der Mastermix für jedes Exon auf die getrocknete DNS mit Multipipetten hinzugefügt. Folgender Reaktionsansatz wurde jeweils pipettiert:

Reaktionsansatz Polymerase-Kettenreaktion

| Komponenten | Volumen/Reaktion [μl] |
|---|------------------------------------|
| AmpliTa _q Gold® 360 Master Mix | 12,5 μl |
| GC Enhancer (nur Ex1) | 2,5 μl |
| 5´- Primer [3.5 μM] | 2,5 μl |
| 3´- Primer [3.5 μM] | 2,5 μl |
| DNA [50 ng/ μl] | 2 μl |
| Nukleasefreies H ₂ O | 5,5 μl |
| Volumen Total | 25 μl |

Tabelle 2: PopGen-Kohorte, Proben, Pipettierschema

Nach initialer Aktivierung der Reaktion bei 95°C für 10 min wurden 35 Zyklen des folgenden Reaktionsschemas durchlaufen:

| | | |
|---------------|---------|--------|
| Denaturierung | 95 °C | 30 sek |
| Annealing | 57.3 °C | 45 sek |
| Elongation | 72 °C | 60 sek |

Für die Exons 1 und 3 wurden eine Annealing-Temperatur von 62,4°C und 37 Zyklen angewandt. Als abschließender Schritt der PCR-Reaktion erfolgte ein Elongationsschritt für 7 min bei 72°C. Die Proben wurden anschließend abgekühlt und bei 4 °C gelagert. Für langfristige Aufbewahrung wurden die PCR-Produkte bei -20 °C eingefroren. Die so gewonnenen DNS-Fragmente konnten anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert werden.

2.5.5 Agarosegel-Zubereitung

Es wurden 1,5 % Gele hergestellt: 6 g Biozym® LE Agarosepulver wurden mit 400 ml TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben vermischt und für vier Minuten in einer dafür speziell

geeigneten Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt. Als nächstes wurden unter Einhaltung von Vorsichtsmaßnahmen 40 µl Ethidiumbromid hinzugeführt und die Lösung für 20 min abgekühlt. Das Ethidiumbromid ermöglicht mit seiner Ringstruktur und der Komplexbildung mit der DNS das Fluoreszieren und damit das Sichtbarwerden der Banden unter UV-Licht. Die abgekühlte Flüssigkeit wurde anschließend in eine Gelapparatur mit Kammern gegossen und konnte nach ca. 40 min Polymerisationszeit genutzt werden.

2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele üben aufgrund ihrer unterschiedlichen Porengröße einen Siebeffekt aus, sodass DNS-Fragmente im elektrischen Feld voneinander getrennt werden. 2 µl des PCR-Produkts wurden mit 1 µl (10x konzentriertem) blauem Ladepuffer versetzt. Das Glycerin im Puffer dient dazu, dass die DNS in der Geltasche verbleibt und das Bromphenolblau sorgt für die farbliche Kennzeichnung. 2,5 µl eines DNS-Markers (GeneRuler 1kb Plus DNS Ladder, 0,5 µg/µl, 50 µg) wurden zur Abschätzung der jeweiligen DNS-Fragmente als Längenstandard in die erste Geltasche pipettiert, in die darauffolgenden Geltaschen Probenmengen von jeweils 3 µl. Die Proben wanderten im elektrischen Feld für ca. 30-45 Minuten im Agarosegel bei einer Spannung von 180V. Nach entsprechender Laufzeit konnten die jeweiligen DNS-Banden mithilfe eines Skalpell herausgeschnitten und anschließend mit dem Dokumentationssystem Alphamager® fotografiert werden.

2.5.7 Aufbereitung für die Sanger-Sequenzierung

Für die Aufbereitung wurden 96-well PCR-Platten genutzt. Zwei Ansätze wurden pipettiert: In einer 25 µl PCR-Produkt und in der zweiten jeweils 5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Für die PopGen-Proben erfolgte dieser Schritt den einzelnen Exons entsprechend. Die Sequenzierung nach der Sanger-Methode erfolgte im Institut für Klinisch Molekulare Biologie in Kiel (IKMB Kiel).

Als Synonym für die Sanger-Methode wird der Begriff Kettenabbruchmethode verwendet. Bei dieser Methode kommen modifizierte Nukleotide zum Einsatz, die die polymerasekatalysierte Kettenverlängerung gezielt abbrechen. DNS-Fragmente können anhand einer Kapillare getrennt

und die Sequenzen über vier basenspezifische Farben identifiziert werden. Nach einer definierten Anzahl von Zyklen erhält man zahlreiche DNS-Fragmente mit unterschiedlicher Länge und farblich markierten Enden.

2.5.8 Elektropherogramm

Nach der Sanger-Sequenzierung müssen die Produkte aufgereinigt und elektrokinetisch in die Kapillaren eines 96-Kapillar-Sequenzierers injiziert werden. Damit hat man ein Elektropherogramm erstellt, welches das Erkennen der DNS-Basenpaare anhand vier verschiedener, basenspezifischer Farbstoffe ermöglicht. Die elektronischen Sequenzen können in ein etabliertes Sequenzierungs-Programm geladen werden, in unserem Fall Seqman II (Seqman 5.00, 1989-2001, DNASTAR Inc.), jeweils mit Vorwärts- und Rückwärts-Sequenz und den dazugehörigen Referenz-Primern. Das Programm zeigt sowohl die DNS-Basenabfolge als auch die farbstoffmarkierte Sequenz, sodass jede Base mit der Referenz verglichen werden kann.

In dieser Studie wurden gezielt Polymorphismen bzw. Mutationen nur im exonischen Bereich beachtet. Im Rahmen der Auswertung sollten idealerweise die einzelnen Peaks sauber nebeneinander verlaufen. Bei Überlappungen konnte entweder ein Polymorphismus, eine Mutation oder eine schlechte Qualität der Grund sein. Bei mangelhafter Qualität wurde die jeweilige Probe erneut sequenziert. Zur weiteren Analyse eines möglichen Basenaustausches wurden die Daten in den UCSC Genome Bioinformatics Browser eingegeben.

2.6 Materialien

2.6.1 Reagenzien und Analysekits

| Chemikalien, Analysekits | Bezugsquelle |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| QIAamp DNA Blood Midi Kit, Nr. 51185 | Qiagen®, Hilden, Deutschland |
| Ethanol 96%-100% | ROTH®, Karlsruhe, Deutschland |

| Chemikalien, Analysekits | Bezugsquelle |
|---|--|
| Qubit® dsDNA BR Assay Kit, Nr. Q32850 | Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA |
| Applied Biosystems™ AmpliTaq Gold® 360 Master Mix | ThermoFisher Scientific, Waltham, USA |
| Oligonukleotidprimer | Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland |
| ROTISOLV® HPLC Gradient Grade | ROTH®, Karlsruhe, Deutschland |
| Rotiphorese® 10x TBE-Puffer | ROTH®, Karlsruhe, Deutschland |
| Biozym® LE Agarosepulver | Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| GeneRuler 1kb Plus DNS Ladder | ThermoFisher Scientific, Waltham, USA |
| Ethidiumbromid | ROTH®, Karlsruhe, Deutschland |
| Rezept DNS-Probenauftragspuffer (10 x): 10 x TAE; 50 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau TAE (pH 7,8): 40 mM Tris; 2 mM EDTA; 20 mM NaAc; 29,6 mM Essigsäure | Eigene Herstellung |

Tabelle 3: Übersicht der Reagenzien, Analysekits und der jeweiligen Bezugsquellen

2.6.2 Verbrauchsmaterial

| Verbrauchsmaterial | Bezugsquelle |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| PCR-Platten, 96er, randlos | Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland |
| Pipetten 0,1 – 1000 µl | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen 0,1 – 1000 µl | Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland |
| Röhre 5 ml | Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland |
| Multiply Strip 0,2 ml Kette | Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland |

| Verbrauchsmaterial | Bezugsquelle |
|---------------------|-----------------------------------|
| Reagiergefäß 0,5 ml | Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland |

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

2.6.3 Primer

| Oligonukleotid | Sequenz |
|----------------|-------------------------------------|
| GLUT1_Ex1F | 5´- GTC GGA GTC AGA GTC GCA GT -3´ |
| GLUT1_Ex1R | 5´- GCT AGA TCC GAA GCC CAT C -3´ |
| GLUT1_Ex2F | 5´- TCC TGG GAG AAA GAC TGG TG -3´ |
| GLUT1_Ex2R | 5´- CAG AAA ACT GGC TGG AGA GG -3´ |
| GLUT1_Ex3F | 5´- CTC TTA GGG AGG GGT GCA AG -3´ |
| GLUT1_Ex3R | 5´- AAG TCT CCC CTA CCT CCC AC -3´ |
| GLUT1_Ex4F | 5´- GTG GGA GGT AGG GGA GAC TT -3´ |
| GLUT1_Ex4R | 5´- GTT GTC CTC TGC AAG GCT GT -3´ |
| GLUT1_Ex5_6F | 5´- CAC AAA GTA GGG AAG GCC AC -3´ |
| GLUT1_Ex5_6R | 5´- GGC AGA GGC GTA TCT GTT G -3´ |
| GLUT1_Ex7_8F | 5´- TTC TTT ACT CAT CCT GGG TCC -3´ |
| GLUT1_Ex7_8R | 5´- GGC TGA GAC AGG CAT TTT G -3´ |
| GLUT1_Ex9F | 5´- TCT GCT CTG GCC TCT GTA GCT -3´ |
| GLUT1_Ex9R | 5´- TTC CTC CTC AGC ATG ATT CC -3´ |
| GLUT1_Ex10F | 5´- CTT TTC AGC TCA AAG GCC C -3´ |
| GLUT1_Ex10R | 5´- GGTTTGGAAGTCTCATCCAGC -3´ |

Tabelle 5: Übersicht der GLUT1-Primer mit Sequenz

2.6.4 Technische Hilfsmittel

| Apparat | Bezugsquelle |
|---------------------------------|--|
| Inkubator | BINDER, Tuttlingen, Deutschland |
| Zentrifuge | ThermoFisher Scientific, Waltham, USA |
| Qubit® 2.0 Fluorometer | Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA |
| Spektralphotometer Helios Omega | ThermoFisher Scientific, Waltham, USA |
| Flex Cycler | Analytik Jena, Deutschland |
| VTX-3000L Mixer Uzusio | LMS®, Tokyo, Japan |
| Waage S-403 | DENVER Summit, Deutschland |
| Mikrowelle | SEVERIN, Sundern, Deutschland |
| Alphalmgaer® EC | Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Netzgerät (Elektrophorese) | VWR, Darmstadt, Deutschland |
| Mikrozentrifuge 5410 | Eppendorf®, Hamburg, Deutschland |
| Gelkammer | Biotech service blu, Kassel, Deutschland |

Tabelle 6: Technische Hilfsmittel

2.6.5 Software- und Internet-Ressourcen

Die Pherogrammauswertung erfolgte mit DNASTAR-SeqMan II (Seqman 5.00, 1989-2001, DNASTAR Inc.).

Außerdem fanden folgende Internet-Ressourcen Verwendung:

UCSC Genome Bioinformatics: <https://genome.ucsc.edu/>

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

International League Against Epilepsy: <http://www.ilae.org/>

Zur Überprüfung der Pathogenität identifizierter Sequenzvarianten:

PolyPhen2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

SIFT: <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>

wANNOVAR: <http://wannovar.wglab.org/>

Zur Ermittlung der Populationsfrequenzen:

<http://www.1000genomes.org/announcements/phase-3-variant-set-additional-allele-frequencies-functional-annotation-and-other-data/>

<http://exac.broadinstitute.org/>

Nomenklatur der Sequenzvarianten : <http://www.hgvs.org/mutnomen/>

Software zur Bildgebung der DNS-Banden am PC: Alpha Innotech, USA

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Prävalenz und das phänotypische Spektrum von *SLC2A1* bei pädiatrischen Patienten mit verschiedenen Epilepsie-Syndromen. Es wurden prospektiv Patienten mit neu diagnostizierter Epilepsie/Bewegungsstörung in unserem neuropädiatrischen Zentrum rekrutiert. Zusätzlich wurde mit PopGen eine populationsbasierte Epilepsie-Kohorte aus einer definierten Region Norddeutschlands untersucht. Insgesamt wurden 262 Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei allen DNS-Proben wurden die kodierenden Bereiche von *SLC2A1* untersucht.

3.1 Prospektive Rekrutierung, Kohorte

Insgesamt wurden 57 Patienten rekrutiert. Die diagnostizierten Epilepsien waren breit gefächert. Darunter befanden sich genetisch generalisierte Epilepsien (GGE), idiopathisch fokale Epilepsien, Neugeborenen-Anfälle, fieberassoziierte Epilepsie-Syndrome und Bewegungsstörungen ohne Epilepsie.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der Phänotypen der rekrutierten Kohorte.

| Rekrutierte Patienten (n=57) | Summe |
|---|-------|
| Genetisch generalisierte Epilepsien (n = 28) | |
| Myoklonisch-astatische Epilepsie | 5 |
| Genetisch gen. Epilepsie mit GTCS | 5 |
| Absence Epilepsie | 14 |
| Juvenile myoklonische Epilepsie | 1 |
| Jeavons-Syndrom | 2 |
| Unklassifizierte genetisch gen. Epilepsien | 3 |
| Idiopathisch fokale Epilepsien (n = 3) | |
| Gutartige Epilepsie im Kindesalter mit zentrotemporalen | 1 |

| | |
|---|---|
| Spikes (BECTS) | |
| Panayiotopolous Syndrom | 2 |
| Epileptische Enzephalopathien (n= 10) | |
| West-Syndrom | 2 |
| Dravet-Syndrom | 3 |
| Maligne migrierende Partialepilepsie des Kindes (MMPSI) | 2 |
| Lennox-Gastaut-Syndrom | 1 |
| Sonstige epileptische Enzephalopathien | 2 |
| Sonstige Epilepsien (n = 4) | |
| Fokale Epilepsien unbekannter Ursache | 2 |
| Unklassifizierte Epilepsien (n=6) | |
| Fieberassoziierte Anfälle und epileptische Syndrome (n = 4) | |
| Fieberkrämpfe allein | 2 |
| Fieberkrämpfe plus: epileptische Anfälle mit Fieber, ab dem 6. Lebensjahr | 2 |
| Paroxysmal bewegungs-induzierte Dyskinesie (n=3) | |

Tabelle 7: Rekrutierte Kohorte (n=57), Übersicht der Phänotypen. Rekrutierung im neuropädiatrischen Zentrum an der Universitätsklinik Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel und im Norddeutschen Epilepsiezentrum, Schwentinental-Raisdorf.

3.2 Populationsbasierte pädiatrische Epilepsie-Kohorte (PopGen)

Von insgesamt 347 Proben analysierten wir 205, sie wurden zufällig ausgewählt. Die Proben wiesen, wie unter Punkt 2.5.3.2 beschrieben, eine gute Qualität auf mit einem Quotienten zwischen 1.8 und 2.0.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der Phänotypen der PopGen-Kohorte.

| PopGen-Kohorte (n=205) | Summe |
|--|-------|
| Genetisch generalisierte Epilepsien (GGE, n= 56) | |
| Myoklonisch astatische Epilepsie | 2 |
| Absence Epilepsie | 25 |
| GGE mit gen. tonisch-klonischen Anfällen und Absencen | 1 |
| GGE mit generalisiert tonisch-klonischen Anfällen | 14 |
| Juvenile myoklonische Epilepsie | 1 |
| Unklassifizierte GGE | 13 |
| Idiopathisch fokale Epilepsien (n= 9) | |
| Gutartige Epilepsie im Kindesalter mit zentrotemporalen Spikes (BECTS) | 9 |
| Sonstige Epilepsien (n= 49) | |
| Strukturell-bedingte fokale Epilepsie | 18 |
| Fokale Epilepsie unbekannter Ursache | 14 |
| West-Syndrom | 4 |
| Anfälle in der Neugeborenenperiode | 4 |
| Unklassifizierte einzelne Anfälle | 9 |
| Fieberassoziierte Epilepsiesyndrome (n= 91) | |
| Fieberkrämpfe | 88 |

Tabelle 8: Pädiatrische Epilepsie-Kohorte PopGen (n=205), Übersicht der Phänotypen. Datenerhebung durch: Prof. Dr. Ulrich Stephani, PD Dr. Hiltrud Muhle und Dr. Philipp Ostertag aus der Klinik für Neuropädiatrie; Prof. Dr. Michael Krawczak aus dem Institut für Medizinische Informatik und Statistik; Prof. Dr. Stefan Schreiber aus der Ersten Medizinischen Klinik, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel; Prof. Dr. Wolfgang Lieb aus dem Institut für Epidemiologie, Biobank popgen, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

3.3 Sequenzvarianten in SLC2A1 und Populationsfrequenzen im Vergleich

Die Analyse mittels Sanger-Sequenzierung konnte in der hier untersuchten Population keine *SLC2A1*-Mutationen identifizieren. Es wurden insgesamt neun verschiedene synonyme Sequenzvarianten in *SLC2A1* nachgewiesen. Als Sequenzvarianten werden Variationen der DNS-Sequenz an bestimmten Positionen des Genoms bezeichnet. Die am häufigsten vorkommende Form stellen die Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) dar, die durch eine Populationsfrequenz von über einem Prozent definiert sind. Bei diesem Polymorphismustyp kommt es zu einem Austausch einzelner Nukleotide (Basenpaare) (72). Die Überprüfung der Pathogenität der identifizierten Varianten erfolgte mithilfe der Programme PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2), wANNOVAR (web ANNOVAR) und SIFT (Scale-Invariant Feature Transform) wie unter Punkt 2.6.5 angegeben. Nach Überprüfung erwiesen sich diese als bereits bekannt und synonym, d. h. dass die Proteinfunktion von GLUT1 durch den einzelnen Basenaustausch unbeeinträchtigt blieb.

Zum Vergleich mit den Daten aus dieser Studie erfolgte eine Datenbankabfrage zu Frequenzen verschiedener Kohorten anhand der Gen-Datenbanken 1000genomes und dem Exome Aggregation Consortium Browser (ExAC Browser). Dabei handelt es sich um Zusammenstellungen verschiedener Kohorten, die in unterschiedlichen Projekten rekrutiert wurden. Die Zahl der Epilepsiepatienten ist dabei unbekannt. Die ExAC Kohorten umfassen folgende Populationen: Afrikaner, Afroamerikaner, Lateinamerikaner, Ostasiaten, Finnen, nichtfinnische Europäer, Südasiaten und andere (die nicht unter die genannten fallen). Die 1000genomes Daten stammen von Afrikanern, Amerikanern unterschiedlicher Abstammung, Ostasiaten, Europäern und Südasiaten.

Tabelle 9 zeigt eine Übersicht der Sequenzvarianten entsprechend internationaler Nomenklaturen, die der Datenbank UCSC Genome Bioinformatics entnommen wurden, und im Vergleich die Populationsfrequenzen verschiedener Kohorten.

Alle neun Polymorphismen sind mit ihrer jeweiligen Position auf Chromosom 1, ihrer Funktion (synonym) und einer SNP-Nummer (rs-Nummer) dargestellt. Der Einzelnukleotidaustausch wird anhand der Referenz- (REF) und der Alternativbase (ALT) verdeutlicht und weist unterschiedliche Frequenzen in unserer Population auf. Jedem Polymorphismus entspricht eine kodierende DNS-Sequenz (HGVS-Kodierung) und eine daraus resultierende Proteinsequenz

(HGVS-Protein). Im Folgenden wird ein Polymorphismus beispielhaft beschrieben: Mit 100/262 (38,2%) war der Polymorphismus c.45C>T mit einem Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin an Position c.45 am häufigsten in unserer Kohorte vertreten. Dieser Austausch war bereits unter der rs-Nummer rs1385129 bekannt und führte unverändert zur Kodierung der Aminosäure Alanin (p.Ala15=). Zum Vergleich ergab die Datenbankabfrage eine Frequenz von 0.2446 bei ExAC_ALL und 0.2404 bei 1000genomes:phase_3_ALL.

| #CHROM | POS | REF | ALT | Funktion GVS | HGVS Kodierung | HGVS Protein | rs-Nummer | Frequenz | ExAC_ALL | 1000genomes:phase_3_ALL |
|--------|----------|-----|-----|--------------|----------------|--------------|-------------|------------------|----------|-------------------------|
| 1 | 43392754 | G | A | Synonym | c.1437C>T | p.Pro479= | rs146879902 | 1/262 (0,382 %) | 0.0005 | 0.0006 |
| 1 | 43394612 | T | C | Synonym | c.1065A>G | p.Leu355= | rs2228490 | 1/262 (0,382 %) | 0.0163 | 0.0543 |
| 1 | 43394968 | C | T | Synonym | c.885G>A | p.Thr295= | rs144685583 | 1/262 (0,382 %) | 0.00010 | 0.0006 |
| 1 | 43395267 | G | A | Synonym | c.864C>T | p.Asn288= | rs150384629 | 1/262 (0,382 %) | 0.0002 | 0.0004 |
| 1 | 43395309 | G | A | Synonym | c.822C>T | p.Ile274= | rs368242382 | 2/262 (0,763 %) | 0.00002 | 0 |
| 1 | 43395635 | C | T | Synonym | c.588G>A | p.Pro196= | rs2229682 | 93/262 (35,5 %) | 0.1823 | 0.1196 |
| 1 | 43396414 | G | A | Synonym | c.399C>T | p.Cys133= | rs11537641 | 92/262 (35,1 %) | 0.1902 | 0.1414 |
| 1 | 43408966 | G | A | Synonym | c.45C>T | p.Ala15= | rs1385129 | 100/262 (38,2 %) | 0.2446 | 0.2404 |
| 1 | 43408984 | C | T | Synonym | c.27G>A | p.Thr9= | rs34025424 | 1/262 (0,382 %) | 0.0018 | 0.0006 |

Tabelle 9: Übersicht der Sequenzvarianten mit Frequenz; #CHROM= Chromosom, POS= Position auf dem Chromosom, REF= Referenzbase, ALT= alternative DNS-Base, FunktionGVS= Funktion der Sequenzvarianten, HGVS-Kodierung= kodierende DNS-Sequenz, HGVS-Protein= Proteinsequenz, rs-Nummer= dbSNP Identifikation für den Referenz-SNP; die hier dargestellten Daten sind bereits beschrieben und wurden der Datenbank UCSC Genome Bioinformatics entnommen. Häufigkeiten der Sequenzvarianten in *SLC2A1*; die Daten sind den Gen-Datenbanken 1000genomes (1000genomes:phase_3_ALL) und dem Exome Aggregation Consortium Browser entnommen (ExAC_ALL), rs-Nummer= dbSNP Identifikation für den Referenz-SNP.

4 Diskussion

In der hier vorgestellten prospektiven Arbeit sollten die Häufigkeit und das phänotypische Spektrum von GLUT1-Defekten bei pädiatrischen Patienten mit verschiedenen Epilepsie-Syndromen ermittelt werden. Hierfür wurden zum einen Patienten mit Epilepsien und Bewegungsstörungen, die sich neu in unserem neuropädiatrischen Zentrum vorstellten, rekrutiert und zum anderen wurde eine populationsbasierte Kinder-Epilepsie-Kohorte aus einer definierten Region Norddeutschlands untersucht. Im Verlauf wurden insgesamt 262 Patienten mit verschiedenen epileptischen Syndromen in diese Arbeit eingeschlossen. In der untersuchten Patientengruppe wurden alle kodierenden Abschnitte des *SLC2A1*-Gens nach der Sanger-Methode sequenziert. Die Analyse ergab neun synonyme Sequenzvarianten, es wurden keine Mutationen identifiziert.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Studiendesign

Die Repräsentativität dieser Studie wurde gestützt durch die Nutzung einer populationsbasierten Kohorte, die durch vorab genau definierte Ein- und Ausschlusskriterien (unter Punkt 2.3 beschrieben) und durch den Einsatz eines klar strukturierten Fragebogens (siehe Anhang) rekrutiert wurde. Zudem wurden Patienten in die Arbeit eingeschlossen, die sich neu innerhalb eines definierten Zeitraumes in unserem spezialisierten Zentrum vorstellten. Die vorliegende Studie weist aber auch Limitationen auf, die im Folgenden beschrieben werden sollen. Systematische Bias können bei den rekrutierten Patienten Selektionsfehler darstellen, die unter anderem die Kontaktaufnahme mit den Probanden betrifft oder die Teilnahmeverweigerung mit Verlust von Studienteilnehmern. Sechs Patienten sind aus der Studie ausgeschieden, weil sich die initiale Verdachtsdiagnose einer Epilepsie, eines Fieberkrampfes oder einer Bewegungsstörung nicht bestätigte, was zu einer Verzerrung der Studienergebnisse führen könnte. Außerdem kann das Ergebnis der aus dem spezialisierten Zentrum rekrutierten Probanden ggf. nicht auf die Grundgesamtheit einer Population geschlossen werden. Darüber hinaus ist in dieser Arbeit die Kohorte möglicherweise nicht groß genug, sodass eine größere Kohorte ggf. ein anderes Ergebnis liefern würde und Schlussfolgerungen auf die gegebene Evidenz beschränkt sein könnten.

4.1.2 Genetische Analyse im Vergleich zur Literatur

Die molekularbiologischen Verfahren (DNS-Extraktion, PCR) erfolgten einheitlich nach einem etablierten Protokoll bei guter Qualität der Proben (siehe unter Punkt 2.5.3.2). Genetisch treten bei der GLUT1-Defizienz wie unter Punkt 1.3. beschrieben verschiedene Mutationen, u.a. Deletionen und Spleiß-Mutationen, auf (31–34). Eine komplette diagnostische Testung sollte neben den kodierenden Bereichen auch eine Analyse der Spleißstellen und der Promotorregion umfassen. Da durch die Sanger-Sequenzierung Deletionen und Duplikationen nicht detektiert werden, kann deren Nachweis beispielsweise mittels multiplexer ligationsabhängiger Sondenamplifikation (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MPLA) erfolgen (73). In dieser Arbeit wurden alle kodierenden Bereiche ohne die Promotorregion oder Introns untersucht. Zudem wurde keine MPLA durchgeführt. Somit könnten genetische Veränderungen, die über die kodierenden Sequenzen hinausgehen, mit der angewandten Methode nicht erfasst worden sein.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass ca. 70-80% der Betroffenen *SLC2A1*-Mutationen aufweisen (74). Bei circa 10% der Patienten, die sich mit einem klinischen Bild einer GLUT1-Defizienz präsentieren, kann trotz umfangreicher Diagnostik inklusive einer Sequenzierung aller Exome des genetischen Materials (whole-exome sequencing, WES) keine Genveränderung festgestellt werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine nicht vernachlässigbare Anzahl an *SLC2A1*-Mutationen nicht erfasst wird und auch in dieser Arbeit ggf. nicht gefunden wurde. In diesem Zusammenhang spielen Varianten in den Introns eine zunehmend wichtigere Rolle. Eine Arbeitsgruppe untersuchte diesbezüglich die klinische Relevanz einer vollständigen Genomsequenzierung (whole-genome sequencing, WGS) und identifizierte eine pathogene *de novo* Variante im intronischen Bereich von *SLC2A1* bei vorheriger negativer Testung mittels Gensequenzierung und WES. Somit sollte eine komplette genetische Analyse von *SLC2A1* neben den bereits genannten Genregionen auch die Introns umfassen (75).

4.2 *Diskussion der Ergebnisse*

4.2.1 *Vergleich der Ergebnisse zur Literatur*

Das klinische Bild der GLUT1-Defizienz ist gemischt. Erstmals beschrieben de Vivo et al. 1991 zwei Patienten mit dem klassischen Phänotyp des Syndroms (24). In den letzten Jahren ist es gelungen, das Wissen über das phänotypische Spektrum kontinuierlich zu erweitern und verschiedene Syndrome mit variablen neurologischen Symptomen zu beschreiben: Genetisch generalisierte Epilepsien und Bewegungsstörungen wie die paroxysmal bewegungs-induzierte Dyskinesie mit/ohne Epilepsie (41).

Die hier präsentierte Untersuchung wie auch andere aktuelle Studien zeigen bei häufigen Epilepsien deutlich seltener *SLC2A1*-Mutationen als in früheren Arbeiten vermutet (74, 76). In der Literatur wurden bis dato nicht mehr als 300 Patienten beschrieben (74). Relevante Zahlen zur Prävalenz von *SLC2A1*-Mutationen existieren dabei nur bei einigen wenigen Epilepsie-Syndromen. 2006 wurde in der Gesamtbevölkerung in Queensland, Australien, die Inzidenz der GLUT1-Defizienz mit ca. 1:90 000 geschätzt. Die Studie von Coman et al. umfasste acht Patienten, die über 15 Jahre rekrutiert wurden, und in der Mehrheit einen Symptomkomplex aus Ataxie, Entwicklungsverzögerung und schwerem Anfallsleiden mit generalisierten Anfällen und Pharmakoresistenz aufwiesen (77). In einer retrospektiven norwegischen Studie von Ramm-Pettersen et al., in der zwischen 2006-2011 zehn Patienten mit GLUT1-Defizienz-Syndrom rekrutiert wurden, wurde im März 2012 eine Punktprävalenz von 2,6:1 000 000 geschätzt. Eingeschlossen in diese Arbeit wurden Patienten mit mehrheitlich klassischem Phänotyp: Es wurden verschiedene therapieresistente Anfallstypen, vordergründig Absence Anfälle, beobachtet, teils auch zusätzlich mit paroxysmal bewegungs-induzierter Dyskinesie (PED) (78). 2015 untersuchte eine Arbeitsgruppe in Dänemark um Larsen et al. eine große Kohorte, bei der *SLC2A1*-Mutationen bei 5/50 (10%) Patienten mit frühkindlicher und/oder therapierefraktärer Absence-Epilepsie (u.a. aus Deutschland, Italien, Rumänien und aus dem Vereinigten Königreich) und bei 1/37 (2,7%) Patienten aus Dänemark mit anderen Epilepsien, Intelligenzminderung und/oder Bewegungsstörungen nachgewiesen wurden. Bei 150 Patienten, ebenfalls aus Dänemark, mit myoklonisch-astatischer Epilepsie (MAE) ohne über das Syndrom hinausgehende Symptome wurde kein Mutationsträger identifiziert. Die Inzidenz von *SLC2A1*-Mutationen in der dänischen Population wurde ähnlich wie in Queensland mit circa 1:83 000 geschätzt (76). Für die teils verschiedenen Zahlen können mehrere Faktoren verantwortlich sein.

Einen großen Einfluss auf das Ergebnis können die unterschiedlich großen Patientenfallzahlen in den beschriebenen Studien haben. Zudem stammen die Patienten aus verschiedenen geographischen Gebieten, sodass eine unterschiedliche genetische Herkunft besteht und unterschiedliche Umweltfaktoren eine Rolle spielen könnten.

Mutationen in *SLC2A1* werden aktuellen Daten zufolge bei bis zu 1% der genetisch generalisierten Epilepsien, darunter als monogenetische Ursache bei 10%-12% der frühkindlichen Absence-Epilepsien, und bei 5% der myoklonisch-astatischen Epilepsie, vermutet. Die MAE ist dabei häufig mit zusätzlichen Symptomen wie (u.a.) psychomotorische Retardierung, PED, Ataxie oder dysarthrischer Sprache assoziiert (73, 76). Der Zusammenhang zwischen *SLC2A1*-Mutationen und MAE konnte in anderen Arbeiten bisher nicht hergestellt werden. In der dänischen Studie von Larsen et al. wie auch in der hier untersuchten Kohorte wiesen die Patienten mit MAE die o.g. „Plus“-Symptome nicht auf (37, 76). Diese Daten suggerieren, dass *SLC2A1*-Mutationen in diesen Populationen nicht mit dem Auftreten der MAE assoziiert sind. Auch bei Patienten mit anderen genetisch generalisierten Epilepsien konnten in unserer Arbeit keine Mutationsträger identifiziert werden. Die Kohorte in dieser Studie umfasste im Vergleich mit der dänischen Studie eine insgesamt kleine Fallzahl der bisher mit *SLC2A1*-Mutationen assoziierten Syndrome: Sieben Patienten mit MAE und 39 mit Absence Epilepsie, sodass wie bereits benannt die Kohorte möglicherweise nicht groß genug war.

Zusammenfassend konnten in der hier vorliegenden Arbeit bei Patienten mit häufigen genetisch generalisierten Epilepsien und seltenen Epilepsie-Syndromen keine Mutationsträger identifiziert und somit das phänotypische Spektrum nicht erweitert werden. Unsere Ergebnisse belegen, dass die GLUT1-Defizienz selten ist bei pädiatrischen Patienten mit verschiedenen Epilepsie-Syndromen in der hier untersuchten Population.

4.2.2 Bedeutung und Konsequenzen für den Kliniker

Das breite phänotypische Spektrum der GLUT1-Defizienz stellt den Kliniker weiterhin vor große Herausforderungen. Bei spezifischer Therapieoption ist die Diagnosestellung von essentieller Bedeutung. Im Folgenden soll anhand der Literatur die Frage beantwortet werden, wann eine Analyse im Klinikalltag sinnvoll ist.

Zu empfehlen ist eine *SLC2A1*-Analyse bei frühkindlicher Absence-Epilepsie (EOAE), insbesondere wenn zusätzlich tonisch-klonische und myoklonische Anfälle auftreten. Dieser Zusammenhang wurde durch mehrere Studien bestätigt (42, 79, 80). Eine Untersuchung bei klassischen genetisch generalisierten Epilepsien wie der Absence-Epilepsie des Kindesalters (CAE), juvenilen Absence-Epilepsie (JAE) und der juvenilen myoklonischen Epilepsie (JME) sollte nach aktueller Literatur nur dann erfolgen, wenn die Patienten über das Syndrom hinaus zusätzlich Bewegungsstörungen und/oder eine Entwicklungsverzögerung aufweisen bei schwer behandelbaren bis therapieresistenten Anfällen. Paroxysmale durch Fasten ausgelöste Phänomene und Anfälle, die sich vor Mahlzeiten häufen, erhärten den Verdacht zusätzlich (81). PED stellen erwiesenermaßen die charakteristischste Form der Bewegungsstörungen im Kontext der GLUT1-Defizienz dar und sollten entsprechende Diagnostik zur Folge haben. Daneben ist als atypische Manifestation eine Untersuchung auch bei paroxysmal kinesigener (paroxysmal kinesigenic dyskinesia, PKD) und paroxysmal nicht-kinesigener Dyskinesie (paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia, PNKD) zu erwägen (74). Trotz teils kontrovers diskutierter Studienergebnisse sollte die Indikation zur GLUT1-Diagnostik auch bei der myoklonisch-astatischen Epilepsie gestellt werden, vor allem bei Co-Manifestation mit PED. Darüber hinaus sollte eine Anfallshäufung mit/ohne Bewegungsstörung innerhalb einer Familie und vor allem bei Verdacht auf einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus den Verdacht auf eine GLUT1-Defizienz lenken (76, 81).

Die aktuelle Literatur betont zudem die diagnostische Relevanz charakteristischer paroxysmaler Augen-Kopf-Bewegungen, die im Säuglings- und frühem Kindesalter auftreten können, als eines der ersten Symptome (82). Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die klinische Entwicklung des Syndroms mit zunehmendem Alter dar und sollte im Kontext der Diagnosestellung beachtet werden. Mehrere Arbeiten belegen, dass in der Adoleszenz zwar weniger epileptische Anfälle auftreten, hingegen paroxysmal bewegungs-induzierte Phänomene in den Vordergrund treten und es zur Progredienz von Ataxie und Spastik kommt (36, 37, 83).

Unsere Ergebnisse belegen, dass die GLUT1-Defizienz selten ist bei verschiedenen Epilepsien. Ein regelhaftes Screening im Klinikalltag ist anhand unserer Studienergebnisse nicht zu empfehlen. Eine Testung auf *SLC2A1*-Mutationen sollte nur bei starkem klinischem Verdacht und wie bereits oben beschrieben nur bei Epilepsie-Syndromen erfolgen wie beispielsweise bei

der myoklonisch-astatischen Epilepsie oder der frühkindlichen Absence-Epilepsie, die über die jeweils typischen Charakteristika der Epilepsieformen hinaus zusätzliche Symptome aufweisen.

4.2.3 Ausblick

Das phänotypische Spektrum der GLUT1-Defizienz wurde seit der Erstbeschreibung kontinuierlich erweitert. Das Spektrum reicht von Patienten mit schwerbehandelbarer therapieresistenter Enzephalopathie bis hin zu Patienten ohne epileptische Anfälle. Trotz der Identifikation zahlreicher Mutationen bleibt die Genotyp-Phänotyp-Korrelation weiterhin unverstanden, da verschiedene Mutationstypen zu einem unterschiedlich schwer ausgeprägten klinischen Bild führen können: In einigen Studien wurden Missense-Mutationen mit einer milden und Frameshift-Mutationen mit einer schweren Klinik assoziiert. Bei gleicher Missense-Mutation war jedoch eine phänotypische Heterogenität zu verzeichnen, sodass den Phänotyp-modifizierende Faktoren auch unbekannt waren. Neben klassischen Syndromen wurden atypische Manifestationen beschrieben. Insbesondere *SLC2A1*-negative-Patienten und solche mit hoher intrafamiliärer Variabilität stellen nach wie vor eine große Herausforderung für den Kliniker dar.

Die GLUT1-Defizienz ist selten. Da mit den ketogenen Diäten eine spezifische Therapiemöglichkeit gegeben ist, bedarf es zusätzlicher Studien mit Untersuchung weiterer Populationen zur Ermittlung der genauen Prävalenz und Inzidenz und der Rekrutierung größerer Kohorten zur Erweiterung bzw. Bestätigung des phänotypischen Spektrums. Es gibt mehrere Ansätze einer klinischen Klassifikation der GLUT1-Defizienz u.a. anhand der Restaktivität des Transporters oder in einen klassischen/atypischen Phänotyp. Insbesondere die atypischen Manifestationen sind klinisch schwer zu fassen. Es bedarf somit noch der Etablierung einer international einvernehmlichen Klassifikation beispielsweise in Form eines internationalen Registers mit klar definierter Empfehlung zur Mutationsanalyse, um die Diagnosestellung im Klinikalltag zu erleichtern. Im Zeitalter der nächsten Generation der DNS-Sequenzierungstechnologie (Exom- und Genomsequenzierung) kann sich im Verlauf die Empfehlung zur *SLC2A1*-Analyse ändern. Dabei wird in der täglichen Routine eine sehr hohe Sequenzierkapazität ermöglicht als Alternative zur klassischen Sanger-Sequenzierung mit der Konsequenz einer vereinfachten Handhabung, der Erzeugung großer Datenmengen und einer höheren diagnostischen Sensitivität.

5 Zusammenfassung

Weltweit sind 3% aller Menschen von einer Epilepsie betroffen. Sie stellen im Kindesalter eine der häufigsten ZNS-Erkrankungen dar. Eine seltene epileptische Enzephalopathie stellt die GLUT1-Defizienz dar. Mutationen des Gens *SLC2A1*, das den Glukose-Transporter 1 (GLUT1) der Blut-Hirn-Schranke kodiert, liegen diesem Syndrom zugrunde. Folge der Veränderungen ist eine zerebrale Glukosedefizienz.

Die Kenntnis über das phänotypische Spektrum der GLUT1-Defizienz erweitert sich kontinuierlich. Neben der genannten epileptischen Enzephalopathie mit Bewegungsstörung und mentaler Retardierung als klassischem Phänotyp der GLUT1-Defizienz, wurden Mutationen auch bei Patienten mit paroxysmaler bewegungs-induzierter Dyskinesie und Anfällen sowie verschiedenen Formen von Absence-Epilepsien beobachtet. Die frühe Identifikation von Mutationen im *SLC2A1*-Gen ist von großer Bedeutung, da durch die ketogenen Diäten eine spezifische Therapie mit Anfallsfreiheit und Linderung der Bewegungsstörungen zur Verfügung steht.

In dieser Studie verfolgten wir das Ziel, die Prävalenz und das phänotypische Spektrum von *SLC2A1*-Mutationen zu ermitteln. Dazu untersuchten wir zwei Kohorten: 1. pädiatrische Patienten mit neu diagnostizierter Epilepsie oder Bewegungsstörungen, die in unserem neuropädiatrischen Zentrum rekrutiert wurden und 2. eine populationsbasierte Kohorte aus einer definierten Region Norddeutschlands (Kiel und nordöstlich des Kanals bis zur dänischen Grenze). Das phänotypische Spektrum der untersuchten Kohorten umfasste u.a. genetisch generalisierte Epilepsien wie MAE (myoklonisch-astatische Epilepsie) und EOAE (frühkindliche Absence Epilepsie), idiopathisch fokale Epilepsien, fieber-assoziierte Anfälle, andere epileptische Syndrome und PED (paroxysmale bewegungs-induzierte Dyskinesie).

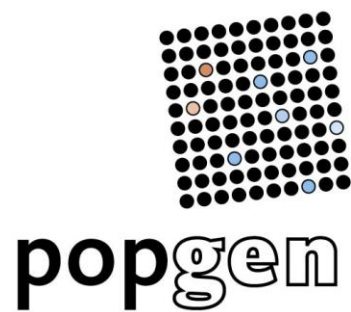
Die kodierenden Regionen von GLUT1 wurden bei insgesamt 262 Patienten nach der Sanger-Methode sequenziert. Dabei wurden neun synonyme Sequenzvarianten nachgewiesen. Es wurden keine Mutationen identifiziert.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Mutationen im *SLC2A1*-Gen bei pädiatrischen Patienten mit verschiedenen epileptischen Syndromen insgesamt selten sind. Ein regelhaftes Screening für das GLUT1-Defizienz-Syndrom ist somit ohne starke klinische Hinweise wie eine zusätzliche Bewegungsstörung oder eine Anfallshäufung bei Nüchternheit nicht zu empfehlen.

6 Anhang

6.1 *PopGen-Fragebogen*

Fragebogen zur Schleswig-Holsteinischen Studie „Gesundheit für Generationen“





GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

BARCODE

Herzlich willkommen! Wir freuen uns darüber, dass Sie an unserer Studie teilnehmen. Zu Beginn haben wir einige allgemeine Fragen zu Ihrer Person und Ihrer Herkunft, bzw. der Herkunft Ihrer Eltern:

(Sollten Sie als Eltern diesen Fragebogen für Ihr Kind ausfüllen, so achten Sie bitte darauf, dass **alle Fragen sich auf Ihr Kind beziehen.**)

| | | | | |
|----|-------------------|--|---|---|
| 1) | Heutiges Datum | <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |
| | | Tag | Monat | Jahr |
| 2) | Geschlecht | <input type="checkbox"/> männlich | | |
| | | <input type="checkbox"/> weiblich | | |
| 3) | Geburtsdatum | <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |
| | | Tag | Monat | Jahr |
| 4) | Gewicht (kg): | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | | |
| | Körpergröße (cm): | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | | |

5) Sind Sie in Deutschland geboren?

- ja
- nein

Wenn ja, sind Sie nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren?

- ja
- nein

Sind Sie in Kiel geboren?

- ja
- nein

Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land sind Sie dann geboren?

Land: _____

6) Wo sind Sie aufgewachsen?

- ländliche Gegend (Dorf)
- Stadt

Wo leben Sie heute?

- ländliche Gegend (Dorf)
- Stadt

7) Ist Ihr Vater in Deutschland geboren?

- ja
- nein

Wenn ja, ist Ihr Vater nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren?

- ja
- nein

Ist Ihr Vater in Kiel geboren?

- ja
- nein

Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihr Vater dann geboren?

Land: _____

8) Ist Ihre Mutter in Deutschland geboren?

- ja
- nein

Wenn ja, ist Ihre Mutter nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren?

- ja
- nein

Ist Ihre Mutter in Kiel geboren?

- ja
- nein

Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihre Mutter dann geboren?

Land: _____

Ergänzende Fragen zur Familie

| |
|---|
| 9) Hat der Vater oder dessen Angehörige Epilepsie? <input type="checkbox"/> Ja, Vater; wenn ja welche Form: _____ <input type="checkbox"/> Angehörige des Vaters: _____ <input type="checkbox"/> Nein |
| 13) Hat die Mutter oder dessen Angehörige Epilepsie? <input type="checkbox"/> Ja, Mutter; wenn ja welche Form: _____ <input type="checkbox"/> Angehörige der Mutter: _____ <input type="checkbox"/> Nein |

*(Sollten Sie als Eltern diesen Fragebogen für Ihr Kind ausfüllen, so achten Sie bitte darauf, dass **alle Fragen sich auf Ihr Kind beziehen.**)*

Die folgenden Fragen beschäftigen sich speziell mit dem Anfallsleiden des Patienten.

| |
|--|
| 17) War Ihre Schwangerschaft normal? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ich weiß nicht |
| 18) War die Geburt normal? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ich weiß nicht |
| 19) War die Entwicklung normal? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> zunächst ja, dann nicht <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ich weiß nicht |

20) Gab es im Neugeborenenalter epileptische Anfälle?

- ja
- nein
- ich weiß nicht

21) Gab es Fieberkrämpfe?

- ja
- nein
- ich weiß nicht

22) Gab es „große Anfälle“ (Grand mal - Anfälle, generalisierte tonisch – klonische Anfälle)?

- ja
- nein
- ich weiß nicht

23) Gab es „kleine Anfälle“ (Petit mal – Anfälle, Absencen, myoklonische Anfälle, plötzliche Stürze)?

- ja
- nein
- ich weiß nicht

Da möglicherweise Zusammenhänge zwischen verschiedenen Erkrankungen bestehen, werden Sie im Folgenden zu unterschiedlichen Krankheiten befragt.

24) Ist neben dem Anfallsleiden noch eine andere Krankheit vorhanden?

- ja
- ich weiß nicht
- nein

11) Haben Sie eine schwere Erkrankung?

Zuckerkrankheit (Diabetes)

Herzerkrankung

Wenn ja, welche Erkrankung: _____

Nierenerkrankung

Wenn ja, welche Erkrankung: _____

Lungenerkrankung

Wenn ja, welche Erkrankung: _____

Krebserkrankung

Wenn ja, welche Erkrankung: _____

Nervenkrankheit

Wenn ja, welche Erkrankung: _____

Magendarmkrankung (auch Leber, Gallenblase und Bauchspeicheldrüse)

Wenn ja, welche Erkrankung: _____

Andere Erkrankung: _____

In den nächsten zwei Fragen geht es um Ihre Berufstätigkeit.

41) Waren Sie jemals erwerbstätig?

ja

nein

42) Sind Sie aufgrund Ihrer Krankheit nicht mehr erwerbstätig?

- ja
- nein

Wenn ja, seit wann (Jahr):

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| | | | | |
|--|--|--|--|--|

43) Was ist Ihre jetzige Hauptbeschäftigung?

- Kindergarten
- Schule, Schulform: _____
- Ausbildung/Lehre
- Erwerbstätig
- Hausfrau / Hausmann
- Nichts zutreffend

Nun möchten wir noch einiges wissen zu Ihrer Familie und zu Erkrankungen, die in Ihrer Familie aufgetreten sind.

Kinder des Patienten

53) Wie viele Kinder haben Sie?

Anzahl:

| | |
|--|--|
| | |
|--|--|

- habe keine

54) Sind Kinder an Epilepsie erkrankt?

- ja wenn ja, Anzahl:
- nein

| | |
|--|--|
| | |
|--|--|

Herzlichen Dank für Ihre Mitwirkung!

Jetzt haben wir noch drei abschließende Fragen an Sie:

Nach Eingang dieses Fragebogens und Ihrer Blutprobe wird jede Verbindung zu Ihrem Namen und Ihrer Adresse aus unseren Unterlagen gelöscht. Deshalb können wir Ihnen leider keine persönlichen Untersuchungsergebnisse mitteilen.

*Aufgrund vieler Rückfragen von Patienten führen wir jedoch eine separate Adressendatei für die Zusendung **allgemeiner** Informationen zum Fortgang des Projektes.*

Möchten Sie weiter über die allgemeinen Ergebnisse der Studie auf dem Laufenden gehalten werden? Wenn ja, werden wir Ihren Namen und Adresse aufbewahren, um Sie über die neuesten Fortschritte zu informieren. Diese Daten werden natürlich getrennt von Ihren persönlichen Daten auf dem Fragebogen gespeichert.

- ja, ich möchte weiter informiert werden
- nein, bitte löschen Sie meinen Namen und meine Adresse nach Eingang sofort.

In Zukunft werden Folgestudien zu der jetzigen Untersuchung durchgeführt. Wir würden uns freuen, wenn auch Sie wieder daran teilnehmen.

Wären Sie bereit, an einer Folgestudie teilzunehmen?

- ja
- nein

*Haben Sie Verwandte, Freunde oder Bekannte, die schon über 90 Jahre alt sind **oder** an einer der folgenden Krankheiten leiden: Koronare Herzerkrankungen, Entzündliche*

Darmerkrankungen, Gallensteine, Epilepsie, Parodontitis?

Ist jemand davon bereit, auch an dieser medizinischen Studie mitzuwirken? Wenn ja, teilen Sie uns bitte ihre/seine Adresse mit.

Name:

Vorname:

Straße:

PLZ, Ort:

7 Literaturverzeichnis

1. Freitag CM, May TW, Pfäfflin M, König S, Rating D. Incidence of Epilepsies and Epileptic Syndromes in Children and Adolescents: A Population-Based Prospective Study in Germany. *Epilepsia* 2001; 42(8):979–85.
2. Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 2003; 16(2):165–70.
3. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* 1993; 34(3):453–68.
4. Hauser WA. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia* 1994; 35 Suppl 2:6.
5. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55(4):475–82.
6. Fölsch UR, Kochsiek K, Schmidt RF. *Pathophysiologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
7. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58.
8. Malkan A, Beran RG. An appraisal of the new operational definition of epilepsy--then and now. *Epilepsy Behav* 2014; 41:217–20.
9. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010; 51(4):676–85.
10. Ochoa-Gomez L, Lopez-Pison J, Fuertes-Rodrigo C, Fernando-Martinez R, Samper-Villagrasa P, Monge-Galindo L et al. Descriptive study of symptomatic epilepsy by age of onset in patients with a 3-year follow-up at the Neuropaediatric Department of a reference centre. *Neurologia* 2016.
11. Iqbal M, Amirsalari S, Radfar S, Haidari MR. Effects of parental gender and level of education on the quality of life and general health of pediatric patients with epilepsy: An outpatient cross-sectional survey. *Epilepsy Behav* 2016; 60:118–23.

12. Sillanpaa M, Helen Cross J. The psychosocial impact of epilepsy in childhood. *Epilepsy Behav* 2009; 15 Suppl 1:S5-10.
13. Jennum P, Christensen J, Ibsen R, Kjellberg J. Long-term socioeconomic consequences and health care costs of childhood and adolescent-onset epilepsy. *Epilepsia* 2016; 57(7):1078–85.
14. Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. *Epilepsy & Behavior* 2010; 17(1):103–8.
15. Shorvon SD. The causes of epilepsy: Changing concepts of etiology of epilepsy over the past 150 years. *Epilepsia* 2011; 52(6):1033–44.
16. Helbig I, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. Navigating the channels and beyond: Unravelling the genetics of the epilepsies. *The Lancet Neurology* 2008; 7(3):231–45.
17. Myers CT, Mefford HC. Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Med* 2015; 7:91.
18. Helbig I. Genetic Causes of Generalized Epilepsies. *Semin Neurol* 2015; 35(3):288–92.
19. Boillot M, Baulac S. Genetic models of focal epilepsies. *J Neurosci Methods* 2016; 260:132–43.
20. Poduri A, Sheidley BR, Shostak S, Ottman R. Genetic testing in the epilepsies-developments and dilemmas. *Nat Rev Neurol* 2014; 10(5):293–9.
21. Berkovic SF, Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S. Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci* 2006; 29(7):391–7.
22. Dibbens LM, Heron SE, Mulley JC. A polygenic heterogeneity model for common epilepsies with complex genetics. *Genes Brain Behav* 2007; 6(7):593–7.
23. Sisodiya SM. Genetic screening and diagnosis in epilepsy? *Curr Opin Neurol* 2015; 28(2):136–42.
24. Vivo DC de, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI. Defective Glucose Transport across the Blood-Brain Barrier as a Cause of Persistent Hypoglycorrhachia, Seizures, and Developmental Delay. *N Engl J Med* 1991; 325(10):703–9.
25. Klepper J, Voit T. Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain-- a review. *Eur J Pediatr* 2002; 161(6):295–304.

26. Gras D, Roze E, Caillet S, Meneret A, Doummar D, Billette de Villemeur T et al. GLUT1 deficiency syndrome: an update. *Rev Neurol (Paris)* 2014; 170(2):91–9.
27. Klepper J, Willemsen M, Verrips A, Guertsen E, Herrmann R, Kutzick C et al. Autosomal dominant transmission of GLUT1 deficiency. *Hum Mol Genet* 2001; 10(1):63–8.
28. Brockmann K, Wang D, Korenke CG, Moers A von, Ho YY, Pascual JM et al. Autosomal dominant glut-1 deficiency syndrome and familial epilepsy. *Ann Neurol* 2001; 50(4):476–85.
29. Klepper J, Scheffer H, Elsaid MF, Kamsteeg E-J, Leferink M, Ben-Omran T. Autosomal recessive inheritance of GLUT1 deficiency syndrome. *Neuropediatrics* 2009; 40(5):207–10.
30. Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Mao X, Cheng J et al. A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum Mol Genet* 2006; 15(7):1169–79.
31. Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Jhung S, Sun RP et al. Glut-1 deficiency syndrome: clinical, genetic, and therapeutic aspects. *Ann Neurol* 2005; 57(1):111–8.
32. Wang D, Kranz-Eble P, Vivo DC de. Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut-1 deficiency syndrome. *Hum Mutat* 2000; 16(3):224–31.
33. Lange P, Gertsen E, Monden I, Klepper J, Keller K. Functional consequences of an in vivo mutation in exon 10 of the human GLUT1 gene. *FEBS Lett* 2003; 555(2):274–8.
34. Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Leferink M, Hofste T, van Engelen BG et al. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain* 2010; 133(Pt 3):655–70.
35. Ohtsuki S, Kikkawa T, Hori S, Terasaki T. Modulation and compensation of the mRNA expression of energy related transporters in the brain of glucose transporter 1-deficient mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(8):1587–91.
36. Sen S, Keough K, Gibson J. Clinical reasoning: novel GLUT1-DS mutation: refractory seizures and ataxia. *Neurology* 2015; 84(15):e111-4.
37. Hully M, Vuillaumier-Barrot S, Le Bizec C, Boddaert N, Kaminska A, Lascelles K et al. From splitting GLUT1 deficiency syndromes to overlapping phenotypes. *Eur J Med Genet* 2015; 58(9):443–54.

38. Weber YG, Storch A, Wuttke TV, Brockmann K, Kempfle J, Maljevic S et al. GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *J. Clin. Invest.* 2008.
39. Suls A, Dedeken P, Goffin K, van Esch H, Dupont P, Cassiman D et al. Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain* 2008; 131(7):1831–44.
40. Klepper J, Leiendecker B, Eltze C, Heussinger N. Paroxysmal Nonepileptic Events in Glut1 Deficiency. *Mov Disord Clin Pract* 2016; 3(6):607–10.
41. Brockmann K. The expanding phenotype of GLUT1-deficiency syndrome. *Brain Dev* 2009; 31(7):545–52.
42. Suls A, Mullen SA, Weber YG, Verhaert K, Ceulemans B, Guerrini R et al. Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Ann Neurol.* 2009; 66(3):415–9.
43. Mullen SA, Suls A, Jonghe P de, Berkovic SF, Scheffer IE. Absence epilepsies with widely variable onset are a key feature of familial GLUT1 deficiency. *Neurology* 2010; 75(5):432–40.
44. Pape H-C, Klinker R, Brenner B. *Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Georg Thieme; 2014.
45. Magier Z, Jarzyna R. The role of glucose transporters in human metabolic regulation. *Postepy Biochem* 2013; 59(1):70–82.
46. Guo X, Geng M, Du G. Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier. *Biochem Genet* 2005; 43(3-4):175–87.
47. Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 1994; 8(13):1003–11.
48. Kumagai AK, Dwyer KJ, Pardridge WM. Differential glycosylation of the GLUT1 glucose transporter in brain capillaries and choroid plexus. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1193(1):24–30.
49. Flier JS, Mueckler M, McCall AL, Lodish HF. Distribution of glucose transporter messenger RNA transcripts in tissues of rat and man. *J. Clin. Invest.* 1987; 79(2):657–61.

50. Dick APK, Harik SI. Distribution of the Glucose Transporter in the Mammalian Brain. *Journal of Neurochemistry* 1986; 46(5):1406–11.
51. Klepper J, Leidecker B. GLUT1 deficiency syndrome--2007 update. *Dev Med Child Neurol* 2007; 49(9):707–16.
52. Mueckler M, Caruso C, Baldwin S, Panico M, Blench I, Morris H et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 1985; 229(4717):941–5.
53. Pascual JM, Wang D, Yang R, Shi L, Yang H, Vivo DC de. Structural signatures and membrane helix 4 in GLUT1: inferences from human blood-brain glucose transport mutants. *J Biol Chem* 2008; 283(24):16732–42.
54. Vivo DC de, Leary L, Wang D. Glucose transporter 1 deficiency syndrome and other glycolytic defects. *J Child Neurol* 2002; 17 Suppl 3:3S15-23; discussion 3S24-5.
55. Friedman, JR, Thiele EA, Wang D, Levine KB, Cloherty EK, Pfeifer HH et al. Atypical GLUT1 deficiency with prominent movement disorder responsive to ketogenic diet. *Mov Disord* 2006; 21(2):241–5.
56. Verrotti A, D'Egidio C, Agostinelli S, Gobbi G. Glut1 deficiency: When to suspect and how to diagnose? *European Journal of Paediatric Neurology* 2012; 16(1):3–9.
57. Ito Y, Gertsen E, Oguni H, Nakayama T, Matsuo M, Funatsuka M et al. Clinical presentation, EEG studies, and novel mutations in two cases of GLUT1 deficiency syndrome in Japan. *Brain Dev* 2005; 27(4):311–7.
58. Klepper J, Engelbrecht V, Scheffer H, van der Knaap MS, Fiedler A. GLUT1 deficiency with delayed myelination responding to ketogenic diet. *Pediatr Neurol* 2007; 37(2):130–3.
59. Pascual JM, van Heertum RL, Wang D, Engelstad K, Vivo DC de. Imaging the metabolic footprint of Glut1 deficiency on the brain. *Ann Neurol* 2002; 52(4):458–64.
60. Leary LD, Wang D, Nordli, JR, Engelstad K, Vivo DC de. Seizure characterization and electroencephalographic features in Glut-1 deficiency syndrome. *Epilepsia* 2003; 44(5):701–7.
61. Roulet-Perez E, Ballhausen D, Bonafe L, Cronel-Ohayon S, Maeder-Ingvar M. Glut-1 deficiency syndrome masquerading as idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 2008; 49(11):1955–8.

62. Boles RG, Seashore, Mitchell WG, Kollros PR, Mofidi S, Novotny EJ. Glucose transporter type 1 deficiency: a study of two cases with video-EEG. *Eur J Pediatr* 1999; 158(12):978–83.
63. Moers A von, Brockmann K, Wang D, Korenke CG, Huppke P, Vivo DC de et al. EEG features of glut-1 deficiency syndrome. *Epilepsia* 2002; 43(8):941–5.
64. Clanton RM, Wu G, Akabani G, Aramayo R. Control of seizures by ketogenic diet-induced modulation of metabolic pathways. *Amino Acids* 2016.
65. Freeman JM, Kossoff EH, Hartman AL. The ketogenic diet: one decade later. *Pediatrics* 2007; 119(3):535–43.
66. Wheless JW. The ketogenic diet: Fa(c)t or fiction. *J Child Neurol* 1995; 10(6):419–23.
67. Ito S, Oguni H, Ito Y, Ishigaki K, Ohinata J, Osawa M. Modified Atkins diet therapy for a case with glucose transporter type 1 deficiency syndrome. *Brain Dev* 2008; 30(3):226–8.
68. Klepper J, Leiendecker B, Bredahl R, Athanassopoulos S, Heinen F, Gertsen E et al. Introduction of a ketogenic diet in young infants. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25(6):449–60.
69. Ballaban-Gil K, Callahan C, O'Dell C, Pappo M, Moshe S, Shinnar S. Complications of the ketogenic diet. *Epilepsia* 1998; 39(7):744–8.
70. Kang HC, Chung DE, Kim DW, Kim HD. Early- and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45(9):1116–23.
71. Stewart WA, Gordon K, Camfield P. Acute pancreatitis causing death in a child on the ketogenic diet. *J Child Neurol* 2001; 16(9):682.
72. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001; 27(3):234–6.
73. Gras D, Roze E, Caillet S, Meneret A, Doummar D, Billette de Villemeur T et al. GLUT1 deficiency syndrome: an update. *Rev Neurol (Paris)* 2014; 170(2):91–9.
74. Giorgis V de, Varesio C, Baldassari C, Piazza E, Olivotto S, Macasaet J et al. Atypical Manifestations in Glut1 Deficiency Syndrome. *J Child Neurol* 2016; 31(9):1174–80.
75. Willemsen MA, Vissers LE, Verbeek MM, van Bon BW, Geuer S, Gilissen C et al. Upstream SLC2A1 translation initiation causes GLUT1 deficiency syndrome. *Eur J Hum Genet* 2017; 25(6):771–4.

76. Larsen J, Johannesen KM, Ek J, Tang S, Marini C, Blichfeldt S et al. The role of SLC2A1 mutations in myoclonic astatic epilepsy and absence epilepsy, and the estimated frequency of GLUT1 deficiency syndrome. *Epilepsia* 2015; 56(12):e203-8.
77. Coman DJ, Sinclair KG, Burke CJ, Appleton DB, Pelekanos JT, O'Neil CM et al. Seizures, ataxia, developmental delay and the general paediatrician: glucose transporter 1 deficiency syndrome. *J Paediatr Child Health* 2006; 42(5):263–7.
78. Ramm-Petersen A, Nakken KO, Skogseid IM, Randby H, Skei EB, Bindoff LA et al. Good outcome in patients with early dietary treatment of GLUT-1 deficiency syndrome: results from a retrospective Norwegian study. *Dev Med Child Neurol* 2013; 55(5):440–7.
79. Arsov T, Mullen SA, Damiano JA, Lawrence KM, Huh LL, Nolan M et al. Early onset absence epilepsy: 1 in 10 cases is caused by GLUT1 deficiency. *Epilepsia* 2012; 53(12):e204-7.
80. Muhle H, Helbig I, Frøslev TG, Suls A, Spiczak S von, Klitten LL et al. The role of SLC2A1 in early onset and childhood absence epilepsies. *Epilepsy Res* 2013; 105(1-2):229–33.
81. Lebon S, Suarez P, Alija S, Korff CM, Fluss J, Mercati D et al. When should clinicians search for GLUT1 deficiency syndrome in childhood generalized epilepsies? *Eur J Paediatr Neurol* 2015; 19(2):170–5.
82. Pearson TS, Pons R, Engelstad K, Kane SA, Goldberg ME, Vivo DC de. Paroxysmal eye-head movements in Glut1 deficiency syndrome. *Neurology* 2017; 88(17):1666–73.
83. Juozapaite S, Praninskiene R, Burnyte B, Ambrozaityte L, Skerliene B. Novel mutation in a patient with late onset GLUT1 deficiency syndrome. *Brain and Development* 2017; 39(4):352–5.

8 Danksagung

Ich danke Dekan Prof. Dr. med. Ulrich Stephani für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Unterstützung während dieser Arbeit.

Frau Dr. med. Johanna A. Jähn danke ich für die Unterstützung und hervorragende Einarbeitung vor allem in der Anfangszeit dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. med. Ingo Helbig danke ich für die ausgezeichnete, freundliche und kompetente Betreuung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Ich danke herzlich allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Kiel, insbesondere Kerstin Wulbrandt, Manuela Pendziwiat und Herrn Prof. Dr. Dr. med. Gregor Kuhlenbäumer für die Anleitung und Hilfe während der praktisch experimentellen Arbeiten.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank allen, die an der Rekrutierung der PopGen-Kohorte und an der Bereitstellung der Proben und Daten mitgewirkt haben: Frau Priv.-Doz. Dr. med. Hiltrud Muhle und Herrn Dr. med. Philipp Ostertag von der Klinik für Neuropädiatrie des Universitätsklinikums Kiel, den Mitarbeitern vom Institut für Epidemiologie, Biobank popgen, an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; dort insbesondere Herrn Dr. med. Gunnar Jacobs, Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Lieb und Herrn Lukas Tittmann.

Nicht zuletzt danke ich allen teilnehmenden Probanden, die ihre Daten der wissenschaftlichen Forschung zur Verfügung gestellt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. med. Sarah von Spiczak, deren wertvolle Hilfe in praktischen wie theoretischen Fragen durch kritische Betrachtungen und Durchsicht dieser Arbeit erst zum Abschluss verholfen hat.

Ganz herzlich möchte ich meiner Mutter Lida Schmidt und meinen Geschwistern Jawid und Jasmin Madjidyar, die mir meinen bisherigen Lebensweg erst ermöglicht haben, für die langjährige Motivation danken.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Christian Pfeiffer für die unermüdliche und liebevolle Unterstützung danken. Du standest in schwierigen Momenten stets an meiner Seite. Ohne Dich wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.