

Epilepsiezentrum am Universitätsklinikum Freiburg

Leiter Prof. Dr. Schulze-Bonhage



Phänotyp-Genotyp-Korrelation bei Patienten mit fokalen kortikalen Dysplasien

**Inaugural-Dissertation
von
Christoph Karl Gumbinger**

1. Einleitung

1.1 Tuberöse Hirnsklerose

1.2 FCD

1.3 Fragestellung

2. Patienten und Methoden

3. Ergebnisse

3.1 Phänotypische Ergebnisse

3.2 Genotypische Ergebnisse

4. Diskussion

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IDIOTIE ¹

Par BOURNEVILLE et E. BRISSAUD.

ENCÉPHALITE OU SCLÉROSE TUBÉREUSE DES CIRCONVOLUTIONS CÉRÉBRALES.

SOMMAIRE. — Antécédents héréditaires. — Emotions vives pendant la grossesse. — Convulsions. — Maladie bleue. — Idiotie. — Amélioration de la marche par les exercices. Affaiblissement progressif. — Hémorrhagie sous-méningée et intra-encéphalique; abaissement de la température.

Autopsie: Anomalie artérielle. — Foyer hémorrhagique dans le lobe frontal droit. — Nombreux îlots de sclérose à la surface des circonvolutions cérébrales. — Anomalie du cœur: persistance du trou de Botal; communication interventriculaire et ouverture de l'aorte dans deux ventricules; — rétrécissement considérable de l'infundibulum pulmonaire du ventricule droit.

Bour... (Georges), 4 ans à son entrée à Bicêtre
M. BOURNEVILLE le 26 juin 1879.

Antécédents. (Renseignements fournis par sa mère
vembre). — Père, 30 ans, jardinier; aucun accident

Verhandlungen der Gesellschaft für Geburtshülfe

in

Berlin.

Sitzung vom 25. März 1862.

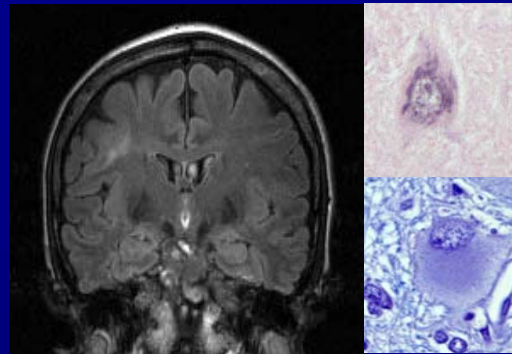
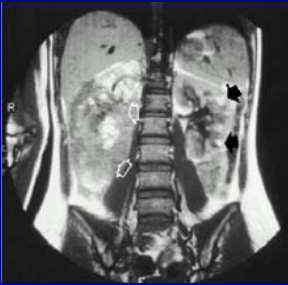
Herr v. *Recklinghausen* legt der Gesellschaft
ein Herz von einem Neugeborenen
vor, welches mehrere theils nach aussen, theils nach
den Höhlen prominirende Tumoren (Myomen) trug;

gestorben, nachdem es einige Athemzüge vollendet hatte; im
Gehirn war ferner noch eine grosse Zahl von Sklerosen vorhanden.

von Recklinghausen F. (1862): Ein Herz von einem Neugeborene welches mehrere theils nach aussen, theils nach den Höhlen prominirende Tumoren (Myomen) trug. Monatschr Geburtsheilkd. 20:1-2

Bourneville DM, Brissaud E. (1881) : Encéphalite ou sclérose tubéreuse des circonvolutions cérébrales. Arch Neurol (Paris) 1:390–410.

Einleitung – TSC



Mutationen im

TSC1-Gen auf Chromosom *9q34*

TSC2-Gen auf Chromosom *16p.13.3*

van Slegtenhorst M., de Hoogt R., Hermans C., Nellist M., Janssen B., Verhoef S. et al. (1997) : Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*. Aug 8; 277(5327):805-8.

European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium (1993) Identification and Characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 75: 1305-15.

J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1971, 34, 369-387

Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy

D. C. TAYLOR¹ AND M. A. FALCONER

From the Neurosurgical Unit of Guy's, Maudsley, and King's College Hospitals, London

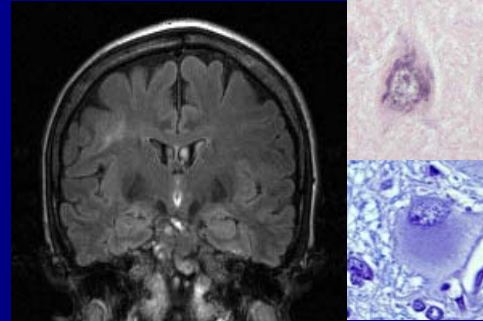
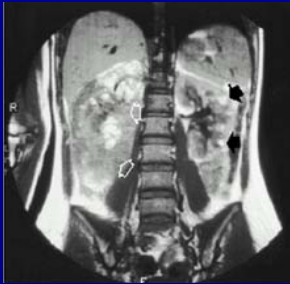
and

C. J. BRUTON AND J. A. N. CORSELLIS

From the Department of Neuropathology, Runwell Hospital, Wickford, Essex

SUMMARY An unusual microscopic abnormality has been identified in the lobectomy specimens removed surgically from the brains of 10 epileptic patients. The abnormality could seldom be identified by palpation or with the naked eye. Histologically, it consisted of congregations of large, bizarre neurones which were littered through all but the first cortical layer. In most, but not in all cases, grotesque cells, probably of glial origin, were also present in the depths of the affected cortex and in the subjacent white matter. This kind of abnormality appears to be a malformation. The picture is reminiscent of tuberous sclerosis but too many distinguishing features, both in the clinical and in the pathological aspects, make this diagnosis untenable. The cases are therefore looked on provisionally (since all but one are still alive) as comprising a distinct form of cortical dysplasia in which localized, exotic populations of nerve cells underlie the electrical and clinical manifestations of certain focal forms of epilepsy.

Einleitung – Hypothese



?

fokale kortikale Dysplasien

Mutationen im

TSC1-Gen auf Chromosom 9q34

TSC2-Gen auf Chromosom 16p.13.3

Einleitung - Fragestellung I

Besteht zwischen tuberöser Hirnsklerose und fokalen kortikalen Dysplasien ein *fließender Übergang* oder handelt es sich um *verschiedene Krankheiten*?

Phänotypische Untersuchungen:


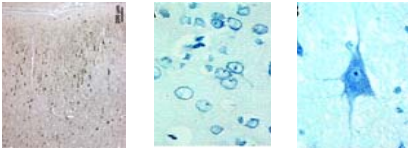
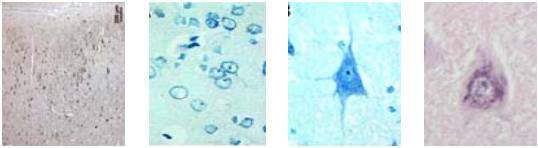
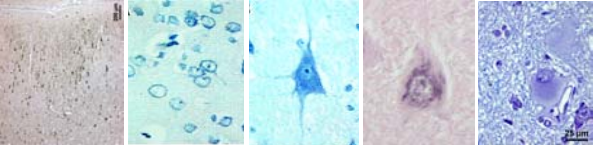
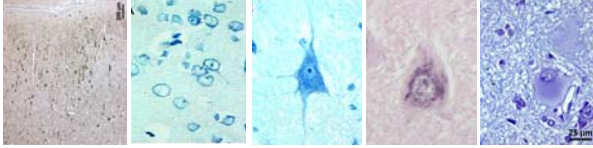
- Gibt es Patienten mit unifokalen FCD, bei denen anhand genauer klinischer Untersuchungen weitere (ggf. sehr diskrete) Stigmata der tuberösen Hirnsklerose nachgewiesen werden können?
- Gibt es Patienten, bei denen eine multifokale FCD vorliegt, ohne dass weitere Hauptkriterien oder Nebenkriterien der tuberösen Hirnsklerose nachweisbar sind?

Genotypische Untersuchungen


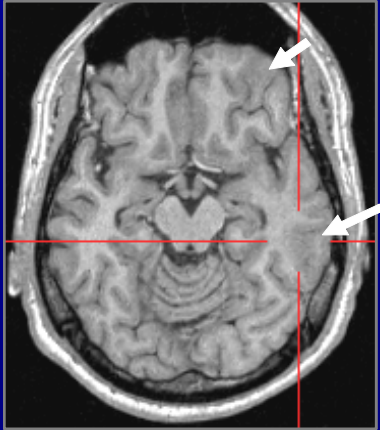
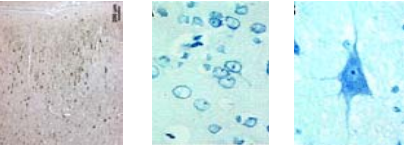
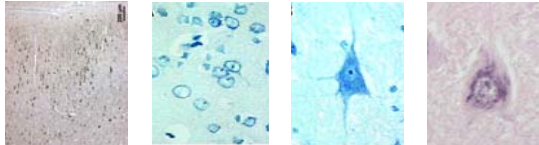
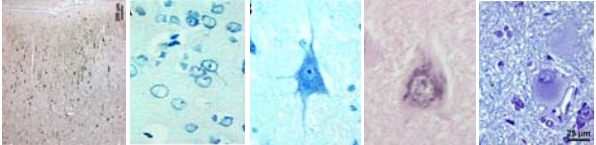
- Findet man auch bei Patienten mit unifokaler oder multifokaler FCD ohne weitere extrazerebrale Stigmata der tuberösen Hirnsklerose Mutationen im TSC1-Gen?
- Finden sich gehäuft andere Auffälligkeiten, z.B. Polymorphismen bei Patienten mit FCD im Vergleich zur Normalbevölkerung, existieren dabei Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen der FCD?
- Liegen Keimbahnmutationen oder somatische Sequenzveränderungen vor, d.h. lassen sich die Mutationen sowohl im Blut als auch in der zerebralen Hamartie oder nur in der zerebralen Hamartie nachweisen?

- 1. Einleitung**
 - 1.1 Tuberöse Hirnsklerose**
 - 1.2 FCD**
 - 1.3 Fragestellung**
- 2. Patienten und Methoden**
- 3. Ergebnisse**
 - 3.1 Phänotypische Ergebnisse**
 - 3.2 Genotypische Ergebnisse**
- 4. Diskussion**

Patienten

	nach Palmi	
	Typ 1a: reine Laminierungsstörung	→ 4 Patienten
	Typ 1b: Laminierungsstörung + unreife Neurone Riesenneurone	→ 6 Patienten
	Typ 2a: Laminierungsstörung + dysmorphe Neurone	→ 6 Patienten
	Typ 2b: Laminierungsstörung + dysmorphe Neurone + Balloonzellen	→ 18 Patienten
	TSC	→ 5 Patienten
	Kontrollgruppe	→ 67 Probanden

Patienten

nach Palmini				
	Typ 1a:	→ 4 Patienten		
	Typ 1b:	→ 6 Patienten		1 multifokal
	Typ 2a:	→ 6 Patienten		2 multifokal
	Typ 2b:	→ 18 Patienten		2 multifokal

Patienten und Methoden

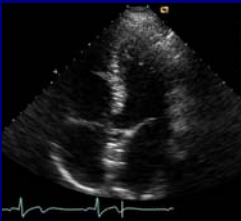
Klinische Untersuchungen auf Stigmata der TSC:



Nierensonographie



Fundoskopie

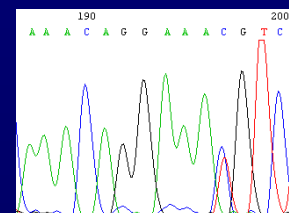
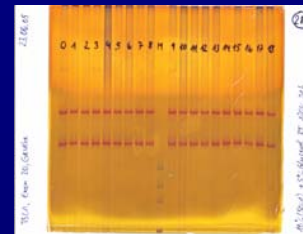
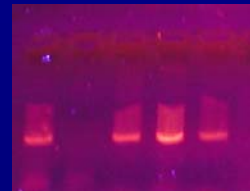
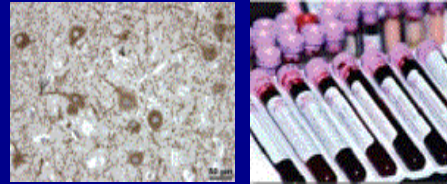


Echokardiographie



Hautinspektion

Genetische Untersuchungen:



DNA- Isolierung



PCRs



Agarose



SSCP



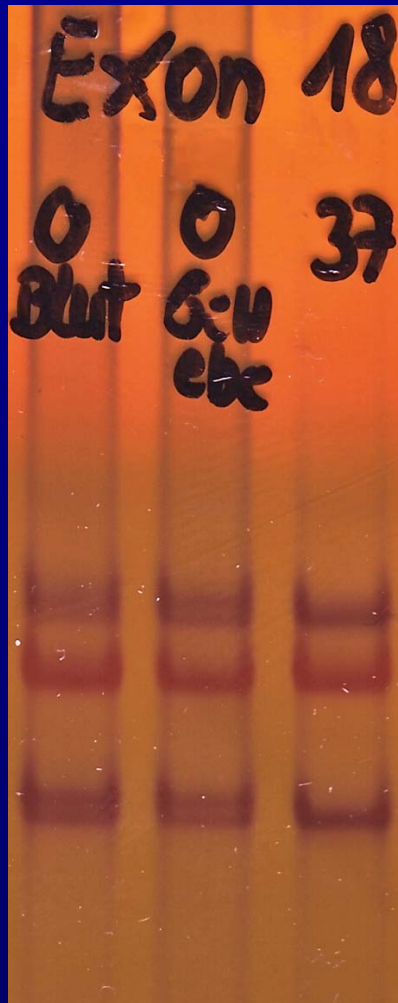
Aufreinigung



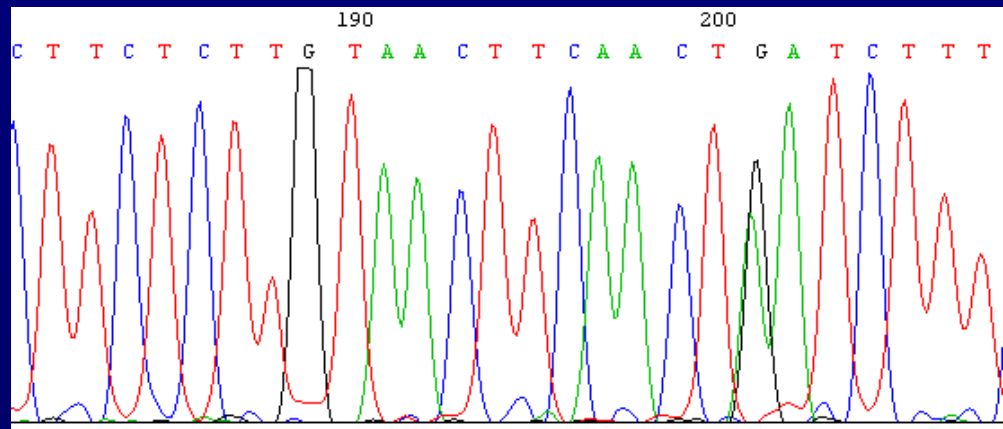
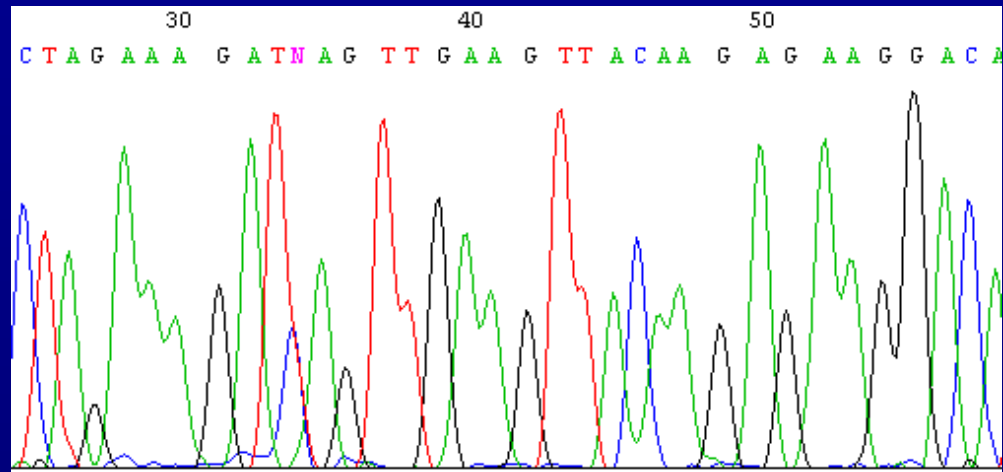
Sequenzierung

SSCP / Sequenzierung

SSCP-Analyse



Sequenzanalyse



Auswertung Sequenzierung

DNA Exon 18

```
>  gi|2599243|gb|AC002096.1|AC002096  Homo sapiens chromosome 9q34, clone 63G10,
      Length=39805                               complete sequence

Score = 484 bits (244), Expect = 7e-134
Identities = 246/247 (99%), Gaps = 0/247 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 16      GGTCTCTGCTAGAAAAGATNAGTTGAAGTTACAAGAGAAGGACATCCAGATGTGGAAGGTT 75
                |||
Sbjct 29431    GGTCTCTGCTAGAAAAGATCAGTTGAAGTTACAAGAGAAGGACATCCAGATGTGGAAGGTT 29372

Query 76      AGTCTGCAGAAAAGAACCAAGCTAGATACAATCAGCTCCAGGAGCAGCGTGACACTATGGTA 135
                |||
Sbjct 29371    AGTCTGCAGAAAAGAACCAAGCTAGATACAATCAGCTCCAGGAGCAGCGTGACACTATGGTA 29312

Query 136     ACCAAGCTCCACAGCCAGATCAGACAGCTGCAGCATGACCGAGAGGAATTCTACAACCAG 195
                |||
Sbjct 29311    ACCAAGCTCCACAGCCAGATCAGACAGCTGCAGCATGACCGAGAGGAATTCTACAACCAG 29252

Query 196     AGCCAGGAATTACAGGTATAAACTGCAGCACCAGGCCAAAGCCAACTGCGAGAATGCCGGA 255
                |||
Sbjct 29251    AGCCAGGAATTACAGGTATAAACTGCAGCACCAGGCCAAAGCCAACTGCGAGAATGCCGGA 29192
```


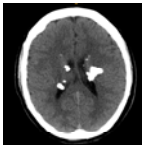
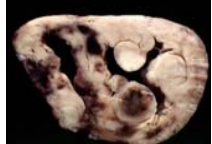


mRNA

```
2350  cgttttaagaggcagcagcatgccctccggaacaggcggctcctc
      R F K R Q Q H A L R N R R L L
2395  cgcaaggtgatcaaagcagcagctctggaggaacataatgctgcc
      R K V I K A A A L E E H N A A
2440  atgaaagatcagttgaagttacaagagaaggacatccagatgtgg
      M K D Q L K L Q E K D I Q M W
2485  aaggtagtctgcagaaagaacaagctagatacaatcagctccag
      K V S L Q K E Q A R Y N Q L Q
2530  gagcagcgtgacactatggtaaccaagctccacagccagatcaga
      E Q R D T M V T K L H S Q I R
2575  cagctgcagcatgaccgagaggaattctacaaccagagccaggaa
      Q L Q H D R E E F Y N Q S Q E
```

Mutation **CAG** → **TAG** (mRNA → UAG)
Q → **STOP** (Q = GLN)

- 1. Einleitung**
 - 1.1 Tuberöse Hirnsklerose**
 - 1.2 FCD**
 - 1.3 Fragestellung**
- 2. Patienten und Methoden**
- 3. Ergebnisse**
 - 3.1 Phänotypische Ergebnisse**
 - 3.2 Genotypische Ergebnisse**
- 4. Diskussion**

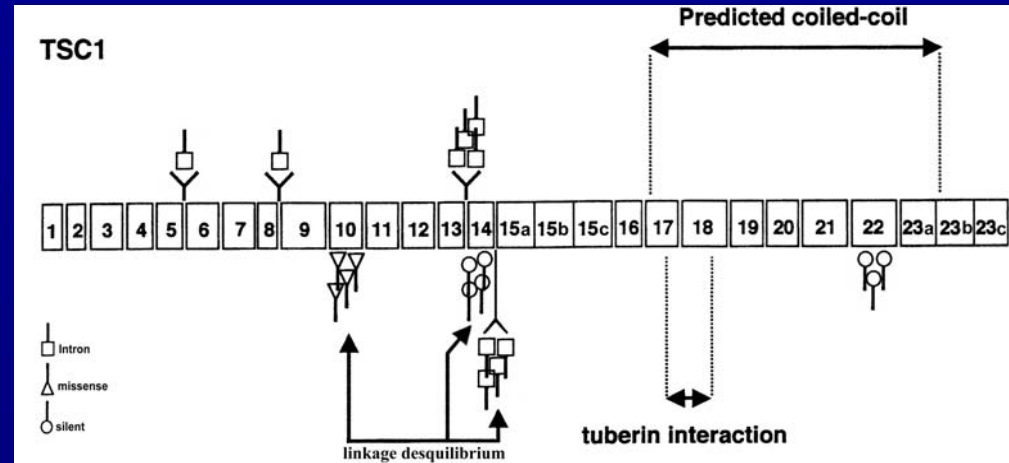
Ergebnisse - Phänotyp

Ort der Manifestation		Patienten mit FCD	Patienten mit TSC
dermal		0 / 34	5 / 5
subependymal		0 / 34	5 / 5
cardial		0 / 34	1 / 5
renal		0 / 34	1 / 5
retinal		0 / 34	2 / 5

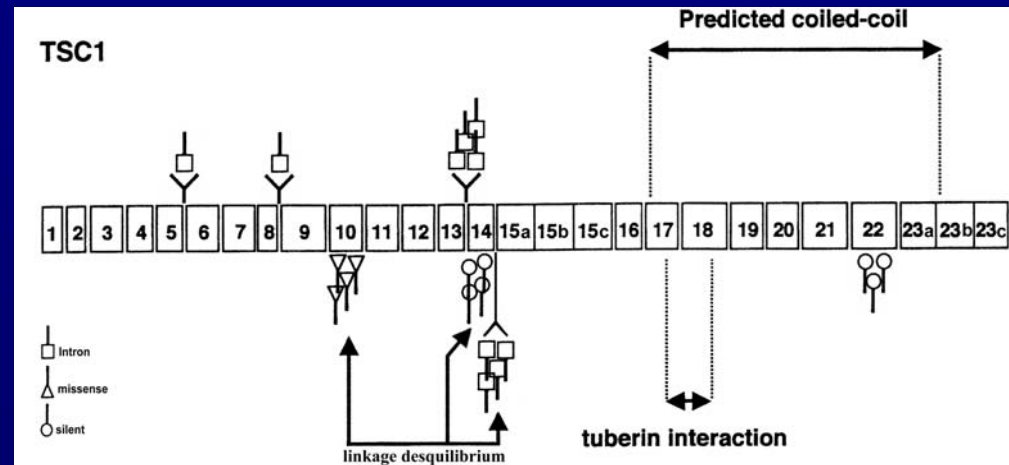
Ergebnisse - Genotyp

Überblick über die Sequenzvariationen:

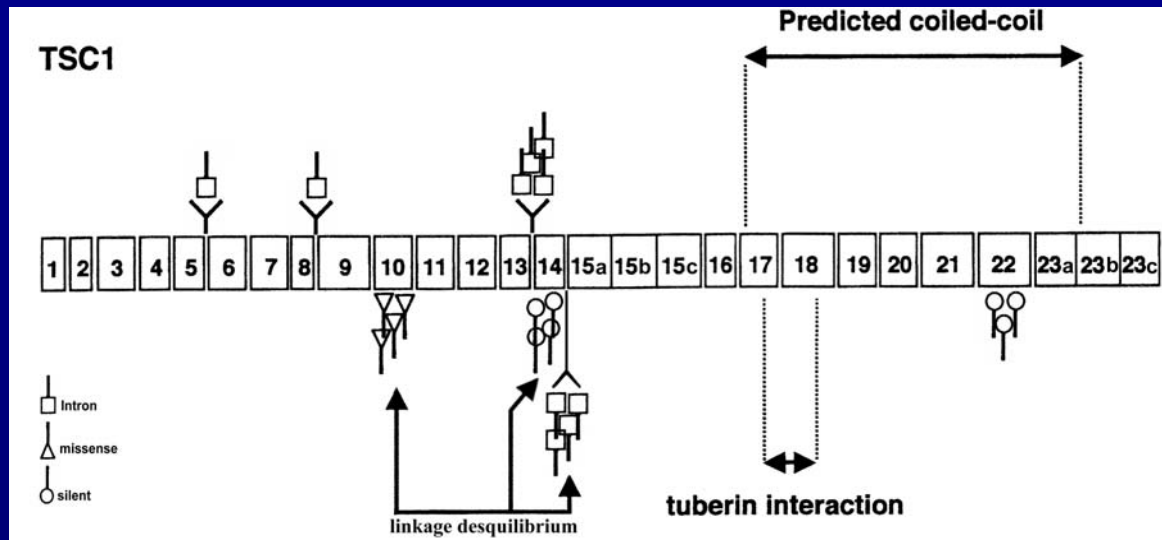
Gewebe:



Blut:



Überblick über die Sequenzvariationen:



Ergebnisse - Genotyp

Spezifikation der Veränderungen:

locus of DNA-alteration	Nucleotide change	type of alteration	effect	FCD 2b n=18 n (%)	FCD 2a n=6 n (%)	FCD 1b n=6 n (%)	FCD1a n=4 n (%)	TSC n=37 n (%)	Kontroll- len
e.10 c.1199	T→C	missense	Met→Thr	2 (11.1%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	-	11 (29.7%)	15.0% ¹ 21.7% ²
e.14 c.1569	A→G	silent	-	2 (11.1%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	-	11 (29.7%)	40.3% ⁴
e.22 c.3063	C→T	silent	-	2 (11.1%)	1 (16.7%)	-	-	5 (13.5%)	10.3% ³ 6-25% ⁵
IVS 5-35	G→A	noncoding	-	-	1 (16.7%)	-	-	-	n.a.
IVS 8-51	T→C	noncoding	-	1 (5.6%)	-	-	-	-	n.a.
IVS 13-51	C→G	noncoding	-	2 (11.1%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	-	6 (16.2%)	18.3% ² 15.2% ³
IVS 14-35	C→T	noncoding	-	2 (11.1%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	-	11(29.7%)	15.5% ²

Ergebnisse - Genotyp

Spezifikation der Veränderungen:

Ort d. DNA-Veränderung	Häufigkeit Kontrollgruppe	Vergleich Kontrollgruppe-FCD 2b ²	Vergleich Kontrollgruppe - FCD andere als 2b ²	Vergleich Kontrollgruppe - mit allen FCD ³
e.10 c.1199	15.0%, 21.7% ²	p=0.33	p=0.74	p=0.358
e.14 c.1569	40.3%	p=0.024 ¹	p=0.04 ¹	p=0.006 ¹
e.22 c.3063	10.3%, 6-25%	p=1.00	p=1.00	p=0.899
IVS 13-51	18.3%, 15.2%	p=0.72	p=0.72	p=0.59
IVS 14-35	15.5%	p=1.00	p=1.00	p=0.85

¹häufiger bei gesunden Kontrollpersonen, ² Chi-Quadrat Test, ³ Fisher-Exact Test

Phänotypische Ergebnisse:

- Bei keinem der 29 Patienten mit einer unifokalen FCD konnten für Tuberöse Sklerose typische extracerebrale Manifestation nachgewiesen werden.
- Auch fanden sich bei den 5 Patienten mit mehreren unabhängigen dysplastischen Arealen keine Stigmata der tuberösen Sklerose.
- Bei allen 5 TSC-Patienten konnten extracerebrale Manifestationen der Krankheit nachgewiesen werden.

Genotypische Ergebnisse:

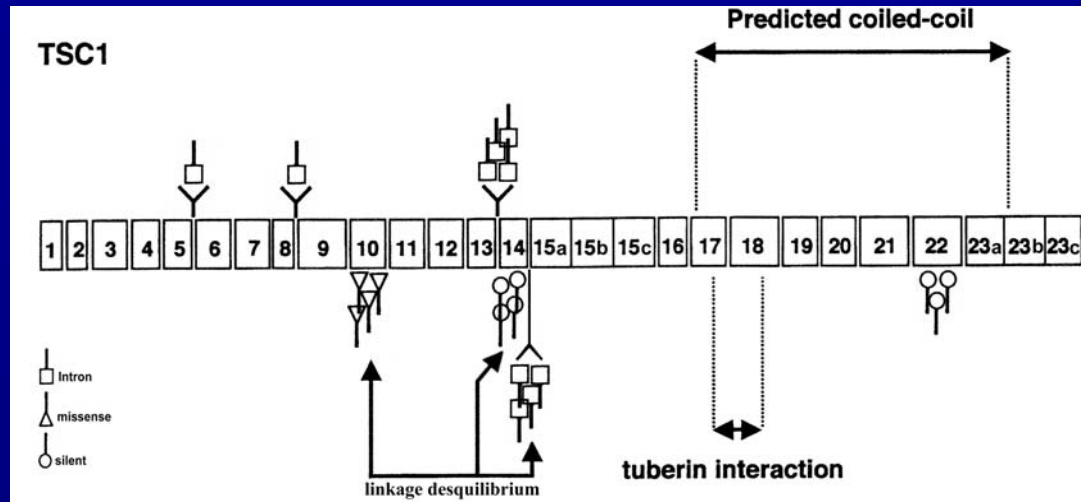
- Alle Sequenzveränderungen sind sowohl im Blut als auch im Gewebe nachweisbar (keine somatische Mutationen)
- Bei FCD Patienten fanden sich keine bei TSC Patienten als krankheitsverursachend eingestufte Veränderungen
- Ein verlinkter Polymorphismus konnte im Exon 10, Exon 14 und Intron 14 nachgewiesen werden. Weitere Polymorphismen fanden sich im Intron 13 und Exon 22. Sie konnten in allen Patientengruppen und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.
- Die Polymorphismen kommen bei FCD-Patienten nicht häufiger als bei Gesunden vor.

→ Insgesamt verweisen die Ergebnisse nicht auf eine kausale Rolle von Mutationen oder Polymorphismen im TSC1-Gen bei der Ausbildung der FCD, auch nicht bei Patienten mit multifokalen Läsionen

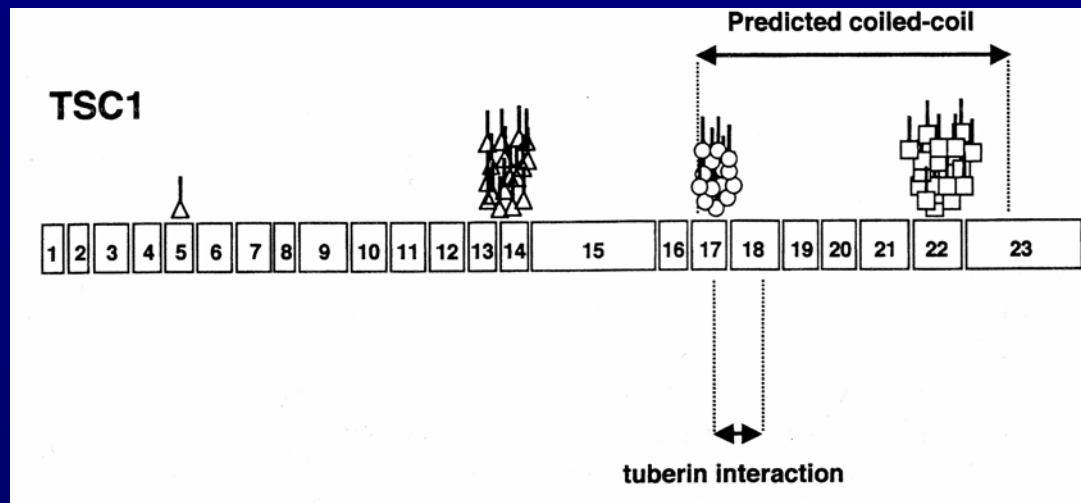
- 1. Einleitung**
 - 1.1 Tuberöse Hirnsklerose**
 - 1.2 FCD**
 - 1.3 Fragestellung**
- 2. Patienten und Methoden**
- 3. Ergebnisse**
 - 3.1 Phänotypische Ergebnisse**
 - 3.2 Genotypische Ergebnisse**
- 4. Diskussion**

Ergebnisse - Genotyp

Überblick über die Sequenzvariationen (eigene Ergebnisse)



Sequenzvariationen von Becker et al. ¹



¹Becker AJ., Urbach H., Scheffler B., et al. (2002): Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type: mutational analysis of the TSC1 gene indicates a pathogenic relationship to tuberous sclerosis. Ann Neurol 52:29-37

Zusammenfassung:

- die postulierte (Becker et al.)¹ herausragende Rolle des TSC1-Gens bei der Ausbildung einer FCD vom Taylortyp kann in unserem Patientenkollektiv nicht nachvollzogen werden
- Neuere Ergebnisse von Untersuchungen der intrazellulären insulinabhängigen Signaltransduktion (Miyata et al.)², insbesondere der mTor Kaskade (Baybis et al.)³, zeigen Unterschiede in der Aktivierung zwischen TSC- und FCD-Patienten die spricht, auch in der Zusammenschau mit weiteren Merkmalen, wie die nicht vorhandene Vererbbarkeit, für die Hypothese zweier verschiedener Erkrankungen

¹Becker AJ., Urbach H., Scheffler B., et al. (2002): Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type: mutational analysis of the TSC1 gene indicates a pathogenic relationship to tuberous sclerosis. *Ann Neurol* 52:29–37

²Miyata H., Chiang ACY., Vinter HV. (2004): Insulin signaling pathways in cortical dysplasia and TSC-tubers: tissue microarray analysis. *Ann Neurol* 56: 510-519

³Baybis M., Yu J., Lee A., Golden JA., Weiner H., McKhann II G., Aronica E, Crino PB (2004): mTOR Cascade Activation Distinguishes Tubers from Focal Cortical Dysplasia. *Ann Neurol* 56:478–487

Veröffentlichungen:

Posterpreis, „33. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Neuropädiatrie“

Gumbinger C, Rohsbach C, Schulze-Bonhage A, Korinthenberg R, Häffner M, Fauser S:
Phenotype-genotype analyses in patients with focal cortical dysplasias

Abstract in *Neuropediatrics*, 2007; 37: 383

Posterpreis der ILAE, „5th Joint Meeting of the German, Austrian, and Swiss Sections of the International League Against Epilepsy“

Gumbinger C, Rohsbach C, Schulze-Bonhage A, Korinthenberg R, Häffner M, Fauser S:
Phenotype-genotype analyses in patients with focal cortical dysplasias

Abstract in *Epilepsia* 2007; 48 (s3): 135

Originalarbeit

Focal cortical dysplasia: no evidence for a pathogenetic role of the TSC genes.

Gumbinger C, Rohsbach CB, Schulze-Bonhage A, Korinthenberg R, Häffner M, Fauser S

(Aktuell in Überarbeitung bei: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, IPF 4.47)

Fragen

?

DANKESCHÖN

Patienten , sowie den Kontrollpersonen

Prof. Dr. Schulze-Bonhage

Prof. Dr. Korinthenberg

Dr. Susanne Fauser

Team der Station Wartenberg

Monika Häffner, Dr. Karsten Häffner

Constantin Rohsbach

AG Experimentelle Epilepsieforschung

PD Dr. B. Janssen, Dr. C. Sutter

Neuropathologie

Dr. Margarete Mattern

Meinen Eltern und meiner Schwester

