

DISSERTATION

Biophysikalische und klinische Charakterisierung des PASNA-Tremor-Subtyps einer neuen *de novo* dominanten *CACNA1D*-Variante

Biophysical and clinical characterization of a new *de novo* dominant
CACNA1D variant's PASNA subtype with tremor.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Fabian Dannenberg

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Ute Scholl

Datum der Promotion: 28.02.2025

Inhalt

1	Tabellenverzeichnis	5
2	Abbildungsverzeichnis.....	6
3	Abkürzungsverzeichnis.....	7
4	Zusammenfassung.....	13
5	Abstract	14
6	Einleitung.....	15
6.1	Gegenstand und Kontext	15
6.2	Forschungshypothesen und wissenschaftliche Zielsetzungen	30
7	Methodik	32
7.1	Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	32
7.2	Studienteilnehmer	34
7.3	Genetische Analyse.....	34
7.4	Molekulare Klonierung	35
7.5	Zellkultur und Transfektion	41
7.6	Elektrophysiologische Untersuchungen	41
7.6.1	Berechnung der spannungsabhängigen Aktivierung	44
7.6.2	Berechnung der Inaktivierungskinetik	45
7.6.3	Darstellung des Hintergrund-Ca ²⁺ -Einstroms (<i>window current</i>)	47
7.6.4	Berechnung der Deaktivierungskinetik, die Bestimmung von Nachströmen (<i>tail currents</i>)	49
7.7	Pharmakologische Untersuchungsmethoden	50
7.8	Statistische Untersuchungsmethoden	51
8	Ergebnisse	52
8.1	Klinische Ergebnisse.....	52
8.2	Ein ähnliches klinisches Bild – ein Kind mit der <i>CACNA1D</i> -Variante G1169D im Mosaik	61
8.3	Genetische Untersuchungsergebnisse	63
8.4	Biophysikalische und pharmakologische Charakterisierung von humanen Ca _v 1.3-Ca ²⁺ -Kanälen der G1169D-Variante im Vergleich zum Wildtyp (WT)	64
8.4.1	Ergebnisse aus der Bestimmung der Aktivierungskinetik	64
8.4.2	Ergebnisse aus der Bestimmung der Inaktivierungskinetik und der Inaktivierung im <i>steady state</i>	68

8.4.3	Ergebnisse aus der Bestimmung des konstanten Hintergrund-Ca ²⁺ -Einwärtsstroms (<i>window current</i>)	72
8.4.4	Ergebnisse aus der Bestimmung der Deaktivierungskinetik	73
8.4.5	Sensitivitätstestung von Isradipin	75
8.5	Therapie mit Ca ²⁺ -Kanalantagonisten	77
9	Diskussion	78
9.1	Kurzzusammenfassung der Ergebnisse	78
9.2	Einordnung, Interpretation und Implikationen der elektrophysiologischen Ergebnisse	79
9.2.1	Gain-of-Function	80
9.2.2	Biophysikalischer Vergleich der dominanten <i>de novo</i> CACNA1D-Varianten, Ähnlichkeiten zwischen der G1169D-Variante und der F767S-Variante im Besonderen	82
9.2.3	Topographische und funktionale Aspekte der G1169D-Variante	84
9.2.4	Ca ²⁺ -Überladung (Ca ²⁺ -Overload)	85
9.2.5	Die pathophysiologischen Auswirkungen der G1169D-Variante auf Schrittmacherzellen	86
9.3	Einordnung und Interpretation der klinischen Ergebnisse	87
9.3.1	Übersicht	87
9.3.2	Developmental and epileptic encephalopathy, DEE	89
9.3.3	Tremor oder Myoklonie bei einem Patienten mit DEE	92
9.3.4	Endokrine Dysfunktion	97
9.3.5	Störungen von Hören und Sehen	99
9.3.6	Störungen der Blasenfunktion und Obstipation mit Stuhlentleerungsstörung 100	
9.3.7	Phänotypische Merkmale von Individuen mit <i>de novo</i> dominanten CACNA1D-Varianten Tabellen 5 – 15	101
9.4	Einordnung und Interpretation der biophysikalischen Ergebnisse bezüglich des Effektes von Isradipin auf die Ca _v 1.3-Ca ²⁺ -Kanalfunktion sowie der klinischen Therapieversuche mit Nifedipin	114
9.5	Grenzen dieser Forschungsarbeit und Ausblick	117
10	Schlussfolgerungen	123
11	Literaturverzeichnis	125
12	Eidesstattliche Versicherung	147
13	Lebenslauf	148
14	Danksagung	150
15	Bescheinigung der akkreditierten Statistikerin	152

1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Neurologische Entwicklung und Entwicklungsregression	57
Tabelle 2 Spannungsabhängige Aktivierung.....	68
Tabelle 3 Spannungsabhängige Inaktivierung	70
Tabelle 4 Inaktivierungskinetik.....	72
Tabelle 5 Schwangerschaft und Geburt/ Erkrankungsalter/ Geschlecht.....	101
Tabelle 6 Nervensystem.....	102-103
Tabelle 7 Psychiatrische Beschwerden/ Verhaltensstörungen	104
Tabelle 8 Beeinträchtigungen des Sehens und der Augen	105
Tabelle 9 Beeinträchtigungen des Hörens	106
Tabelle 10 Kardiovaskuläre Symptome	107 -108
Tabelle 11 Endokrine Störungen	109
Tabelle 12 Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes/ Erkrankungen der Nieren und des Urogenitaltraktes	110
Tabelle 13 Erkrankungen des Verdauungstraktes	111
Tabelle 14 Skelettanomalien	112
Tabelle 15 Spezifische Medikationen (bzw. <i>targeted therapies</i>)	113

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung des $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanalproteins	18
Abbildung 2 Gel-Elektrophorese zur Überprüfung der Klonierung 1	39
Abbildung 3 Gel-Elektrophorese zur Überprüfung der Klonierung 2	40
Abbildung 4 Gel-elektrophorese zur Überprüfung des Konstruktes	41
Abbildung 5 Konformationszustände	43
Abbildung 6 Stammbaum	53
Abbildung 7 EEG 1	59
Abbildung 8 EEG 2	59
Abbildung 9 Rhythmische Muskelartefakte im EEG	60
Abbildung 10 Aktivierungs- und Inaktivierungskurven	66
Abbildung 11 Inaktivierung	71
Abbildung 12 Hintergrund- Ca^{2+} -Einstrom	73
Abbildung 13 Deaktivierung	75
Abbildung 14 <i>Tail Currents</i>	76
Abbildung 15 Sensitivität für Isradipin	77

3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(+)/ (-) in Tabelle	Merkmal wahrscheinlich vorliegend/ wahrscheinlich nicht vorliegend
+ Vater	bei Vater der Patientin mit S672L-Variante vorliegend
+/- in Tabelle	Merkmal vorliegend/ nicht vorliegend
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	<i>Mikrometer</i>
¹²³ I	Iod-Isotop mit der Massenzahl 123
¹⁸ F	Fluor-Isotop mit der Massenzahl 18
3'	Ende einer Nukleotidsequenz (mit Hydroxylgruppe)
30j	30-jährige Schwester der 9-jährigen Pat. mit S672L-Variante, auch sie trägt S672L-Variante
5'	Ende einer Nukleotidsequenz (mit Phosphatgruppe)
9j	9-jährige Pat. mit S672L-Variante
A	Adenin
A (Einheit)	Ampere
A769G/T	Austausch von Alanin (A) durch Glycin (G) bzw. Threonin (T) an Position 769
aCGH	array-based comparative genomic hybridization
aEEG	amplitudenintegriertes Elektroenzephalogramm
<i>AgeI</i>	Restriktionsenzyme
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	two-way analysis of variance
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve, Fläche unter der Kurve
Augenbewegst.	Augenbewegungsstörung
AV-Block	atriventrikuläre Leitungsstörung
Beeinträchtigt.	Beeinträchtigung
BERA	brainstem evoked response audiometry
Bewegungsst.	Bewegungsstörung
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
C	Cytosin
c.3506G>A	Austausch von Guanin (G) durch Adenin (A) an Position 3506 der kodierenden (c.) DNA-Sequenz
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CACNA1A	<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 A</i>
CACNA1D	<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 D</i>
CACNA1S	<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 S</i>
Ca _v	<i>calcium voltage-gated channel</i>
Ca _v 1.3	<i>calcium voltage-gated channel 1.3</i>
Cl ⁻	Chlorid
ClinVar	genetische Datenbank
cMRT	kraniale Magnetresonanztomographie

CMV	Cytomegalievirus
CPAP	continuous positive airway pressure
C-Peptid	connecting peptide (im Proinsulinprotein)
C-Peptid	<i>connecting peptide</i> , (Teil des Proinsulinproteins)
c-reflex	pathological long-latency reflex
Cs	Caesium
CsOH	Caesiumhydroxid
D1	Dopamin-Rezeptor vom Typ 1
D2	Dopamin-Rezeptor vom Typ 2
DB-ID	<i>Database Identifier (LOVD)</i>
DEE	developmental and epileptic encephalopathy
DHP	Dihydropyridin
DIII	Protein- <i>Domaine 3</i>
DIV	Protein- <i>Domaine 4</i>
DMEM-Medium	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>DpnI</i>	Name eines Abbau-Enzyms
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
<i>e</i>	Eulersche Zahl
E. coli	Escherichia coli
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
EcoRI	Name eines Restriktionsenzym
EE	<i>epileptic encephalopathies</i>
EEG	Elektroenzephalogramm
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EMG	Elektromyographie
et al.	<i>et alia</i>
ETP	epilepsietypische Potentiale
F767S	Austausch von Phenylalanin (F) durch Serin (S) an Position 767
fathmm-MKL	genetisches Prädiktionsprogramm
FBS	<i>fetale bovine serum</i>
FCMTE	<i>Familial Cortical Myoclonic Tremor and Epilepsy</i>
F-DOPA-PET	Fluorodihydroxyphenylalanin- PET
floppy	floppy infant
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
FP-β-CIT-SPECT	Fluoropropyl-2-β-carboxymethoxy-3β-(4-iodophenyl)nortropane-SPECT
ft3	Trijodthyronin
ft4	Tetraiodthyronin
fw	<i>forward</i>
G	Guanin
G (Variable)	Variable für die Leitfähigkeit in der modifizierten Boltzmann-Gleichung
g	Gramm
G1169D	Austausch von Glycin (G) durch Asparaginsäure (D) an Position 1169
G403D	Austausch von Glycin (G) durch Asparaginsäure (D) an Position 403
G407R	Austausch von Glycin (G) durch Arginin (R) an Position 407
GA	Gestationsalter

GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GERD	Gastroösophageale Refluxkrankheit
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
G_{\max}	G_{\max} entspricht der maximalen Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen bei einem entsprechenden Membranpotential (V).
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gnomAD	Genome Aggregation Database
HELLP	Akronym: <i>hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIH	Hyperinsulinämische Hypoglykämie
<i>HindIII</i>	Restriktionsenzym
HPO	Human Phenotype Ontology
Hum. fr.	Humerusfraktur
Hz	Hertz
I	Stromstärke; entspricht hier meist gemessenen Einwärtsströmen nach Anlegung der Testspannungen
I770M	Austausch von Isoleucin (I) durch Methionin (M) an Position 770
ILAE	International League Against Epilepsy
I_{\max}	der höchste gemessene Strom (I), (maximale Amplitude der Stromkurve)
Indexpat.	Indexpatient*in
$I_{\text{steady state}}$	Anteil des Reststroms während der Inaktivierung aufgrund nicht inaktivierter Kanäle im <i>steady state</i>
IVF	In-Vitro-Fertilisation
I_{window}	<i>window current</i>
JLBA	<i>jerk-locked back-averaging</i>
k_{akt}	Steigungsfaktor der Aktivierungskurve
kb	Kilobasen
KHK	koronare Herzkrankheit
kHz	Kilohertz
k_{inakt}	Steigungsfaktor der Inaktivierungskurve
KLD	Enzym-Mix mit Kinase (K), Ligase (L), <i>DpnI</i> -Enzym (D)
Kongen.	kongenital
L271H	Austausch von Leucin (L) durch Histidin (H) an Position 271
LB	<i>lysogeny broth</i> , Nährmedium
L-Dopa	Levodopa
L-Glutamin	Levo-Glutamin
LGS	Lennox-Gastaut-Syndrom
Lj.	Lebensjahr
LOVD	Leiden Open Variation Database
LRT	genetisches Prädiktionsprogramm
L-Typ	long-lasting
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LZ-EEG	Langzeit-Elektroenzephalographie
m^2	Quadratmeter
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesium
Min	Minute
<i>mini prep</i>	Plasmidpräparation

mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MSN	<i>medium spiny neurons</i>
MUT	Mutation
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
N	Anzahl der unabhängigen Transfektionen
N II	2. Hirnnerv, Nervus opticus
n	Anzahl der Messdurchläufe
N.V.	niederländisch: <i>Naamloze Vennootschap</i>
NA	<i>not applicable</i> , nicht zutreffend
Na ⁺	<i>sodium</i> , Natrium
Na _v	<i>voltage-gated sodium channel</i>
Na _v 1.1-Kanal	<i>voltage-gated sodium channel 1.1</i>
Na _v 1.2-Kanal	<i>voltage-gated sodium channel 1.1</i>
Na _v 1.3-Kanal	<i>voltage-gated sodium channel 1.1</i>
Na _v 1.4-Kanal	<i>voltage-gated sodium channel 1.1</i>
Na _v 1.5-Kanal	<i>voltage-gated sodium channel 1.1</i>
Na _v 1.6-Kanal	<i>voltage-gated sodium channel 1.1</i>
Na _v 1.7-Kanal	<i>voltage-gated sodium channel 1.1</i>
Na _v 1.8-Kanal	<i>voltage-gated sodium channel 1.1</i>
Na _v 1.9-Kanal	<i>voltage-gated sodium channel 1.1</i>
NEBaseChanger	elektronisches Programm für Primerdesign
ng	Nanogramm
NIV	noninvasive positive pressure ventilation
nM	genetische Identifikationsnummer
norm.	normalisiert
<i>NotI</i>	Restriktionsenzymen
OH	Hydroxidgruppe
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
p.(Gly1169Asp)	Austausch von Glycin (Gly) durch Asparaginsäure (Asp) an Position 1169 der Proteinsequenz
P/4-Protokoll	bestimmtes Patch-Clamp-Stimulationsprotokoll
P/Q-Ca ²⁺ -Kanal	Ca _v 2.1; bestimmter spannungsabhängiger Calciumkanal, der u.a. in Purkinje-zellen (P) und „Querkaliberzellen“ (Q) vorkommt
pA	Pikoampere
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PASNA	<i>primary aldosteronism (PA), seizures (S), and neurologic abnormalities (NA)</i>
Pat.	Patient*in
pCMV6-XL6	molekularbiologischer Plasmidvektor
PCR	Polymerase Chain Reaction
periventr.	periventrikulär
PET	Positronenemissionstomographie
pF	Pikofarad

PFO	persistierendes Foramen ovale
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
<i>PmlI</i>	Restriktionsenzym
pmol	Pikomol
PROVEAN	genetisches Prädiktionsprogramm
p-Wert	statistischer <i>probabilitas</i> -(p)-Wert
QTc	frequenzkorrigiertes Intervall zwischen Q-Zacke und T-Welle im EKG
REA	Maßnahmen der Reanimation
rev	reverse
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci
RVH	rechtsventrikuläre Hypertrophie
r-Wert	Reststrom in % bezogen auf den maximalen Einwärtsstrom
s	Sekunde
S.O.C.	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
S5-Helix	Helix von Proteinsegment 5
S672L	Austausch von Serin (S) durch Leucin (L) an Position 672
S6-Helix	Helix von Proteinsegment 6
SANDD	<i>sinoatrial node dysfunction and deafness</i>
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SCN10A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 10</i>
SCN12A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 12</i>
SCN1A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 1</i>
SCN2A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 2</i>
SCN3A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 3</i>
SCN4A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 4</i>
SCN5A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 5</i>
SCN8A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 8</i>
SCN9A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 9</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SIFT	genetisches Prädiktionsprogramm
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
Sprachentw.	Sprachentwicklung
SSEP	somatosensibel evoziertes Potential
SSW	Schwangerschaftswochen
T	Thymin
T1411M	Austausch von Threonin (T) durch Methionin (M) an Position 1411
TOP10	bestimmte Kompetenz von E. coli für Plasmidreplikation
tsA201-Zellen	humane embryologische Nierenzelllinie für heterologes Säugerzell-Expressionssystem
t-Test	<i>hypothesis test statistic</i> , statistischer Wert
U/l	Units pro Liter
UMC	<i>Universitair Medische Centra</i> , Universitätsklinikum Amsterdam
V	Spannung; entspricht hier in der Regel einer Membranspannung
V (Einheit)	Volt
V _{0,5,akt}	Membranspannung bei der 50 % der max. Leitfähigkeit für Ca ²⁺ -Ionen vorliegt (oder die Hälfte der Ca _v 1.3-Ca ²⁺ -Kanäle aktiviert sind)

$V_{0.5,inakt}$	Membranspannung bei der die Fraktionen der inaktivierten und nicht-inaktivierten Kanäle gleich groß sind
V1482L	Austausch von Valin (V) durch Leucin (L) an Position 1482
V259A	Austausch von Leucin (L) durch Histidin (H) an Position 271
V401L	Austausch von Valin (V) durch Leucin (L) an Position 401
V401L	Austausch von Valin (V) durch Leucin (L) an Position 401
Vater	Vater der 9-jährigen Pat. mit S672L-Variante, auch er trägt Variante
VEP	visuell evoziertes Potential
V_{Halt}	Haltepotential
V_{max}	Membranspannung, ab der die Zellen maximal aktiviert werden
V_{Rev}	Umkehrpotential; extrapoliertes Umkehrpotential (auch Nernst-Potential oder Equilibriumspotential)
VSD	ventrikulärer Septumdefekt
W	Woche
WES	Whole Exome Sequencing
WT	Wildtyp
z	Kennzeichnung eines bestimmten statistischen Wertes (Z-Wert)
ZNS	zentrales Nervensystem
$\alpha 1-D$	<i>voltage-gated channel subunit alpha 1 D</i> , porenbildende Untereinheit des $Ca_v1.3-Ca^{2+}$ -Kanals
$\alpha 2\delta 1$	unterstützende Untereinheit des $Ca_v1.3-Ca^{2+}$ -Kanal-Komplexes
$\beta 3$	unterstützende Untereinheit des $Ca_v1.3-Ca^{2+}$ -Kanal-Komplexes
Δ	Delta steht für Differenz zweier Werte
ΔV	Differenz der Membranspannungen
τ_{act}	Aktivierungszeitkonstante
τ_{deact}	Deaktivierungszeitkonstante

4 Zusammenfassung

De novo dominante Gain-of-Function-Mutationen des *CACNA1D*-Gens verursachen komplexe Erkrankungsbilder, die sich teils stark voneinander unterscheiden. Beschrieben sind u.a. Autismus-Spektrum-Erkrankungen, epileptische Anfälle oder andere neurologische Symptome wie eine globale Entwicklungsstörung oder eine generalisierte Muskelhypotonie. Dazu können endokrine Störungen wie ein primärer Hyperaldosteronismus oder hyperinsulinämische Hypoglykämien auftreten. In dieser Arbeit werden zwei Kinder klinisch charakterisiert, einer von ihnen ist ein Junge, der eine bisher nicht beschriebene *de novo* Variante des *CACNA1D*-Gens (c.3506G>A, NM_000720.4; p.Gly1169Asp; G1169D-Variante) aufweist. Als Hauptsymptome zeigt er einen bereits intrauterin aufgetretenen Tremor, eine epileptische Enzephalopathie mit globaler Entwicklungsstörung, eine kongenitale respiratorische Insuffizienz, die von Geburt an für viele Monate eine Atemunterstützung mit CPAP erforderte, eine sensineuronale Taubheit und eine schwere Leitungsstörung der Nervi optici. Nach dem stark verzögerten Erreichen von Entwicklungsmeilensteinen, erkrankte der Junge im Alter von 19 Monaten schwer an einer SARS-CoV-2-Infektion. In der Folge kam es zu einem Entwicklungsregress und im Weiteren zum Stillstand der gesamten Entwicklung. Bezüglich der endokrinen Funktion fielen beim Patienten rezidivierende Hypoglykämien auf, jedoch ohne eine signifikante Insulinerhöhung. Eindeutige Hinweise auf einen primären Hyperaldosteronismus ergaben sich aus den laborchemischen Untersuchungen nicht. Der andere Patient, weist die G1169D-Variante mit einer Allelfrequenz von 17 % a.e. als Mosaik auf; entsprechend milder zeigte sich der klinische Verlauf bisher.

Durch elektrophysiologische Untersuchungen der G1169D-Variante mittels Patch-Clamp-Verfahren in einem heterologen Expressionssystem konnten eindeutige Hinweise für ein verändertes Ca²⁺-Kanal-Gating im Sinne eines Gain-of-Function aufgezeigt werden: Die Messungen ergaben die stärksten bisher beschriebenen Linksverschiebungen der Aktivierungs- und Inaktivierungskurven, sowie eine starke Zunahme des Hintergrund-Ca²⁺-Einstroms und eine deutliche verzögerte Ca²⁺-Kanaldeaktivierung und -Inaktivierung.

Die G1169D-Variante spricht *in vitro* auf den Ca²⁺-Kanal-Antagonisten Isradipin mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Sensitivität an. Isradipin wäre damit eine potenzielle Substanz, die im Rahmen eines zukünftigen individuellen Heilversuches als Off-Label-Therapie Anwendung finden könnte.

5 Abstract

Dominant *de novo* gain of function variants of the *CACNA1D* gene can cause complex clinical syndromes with varying manifestations: from autism-spectrum disorders, epileptic seizures and other neurological symptoms like severe neurodevelopmental disorders and generalized muscular hypotonia to endocrine disorders such as primary aldosteronism or hyperinsulinemic hypoglycemias.

In this dissertation, two children are clinically characterized, one of whom is a 37-month-old boy with a *de novo* variant (c.3506G>A, NM_000720.4; p.Gly1169Asp) of the *CACNA1D* gene. His primary symptoms were a generalized tremor that started during intrauterine development in the third trimester of the pregnancy, alongside a developmental and epileptic encephalopathy, congenital respiratory insufficiency, sensorineural deafness and a severe bilateral impairment of the optic nerve conductance.

Following a marked delay in reaching even the most rudimentary developmental milestones, the boy contracted a life-threatening SARS-CoV-2-infection at the age of 19 months. As a result, there was a developmental regression with a developmental cessation since that age. Despite episodes of hypoglycemia, insulin levels were normal. Aldosterone: renin ratios as a screening parameter for primary aldosteronism were variable and did not provide any definite evidence of primary hyperaldosteronism.

A low G1169D variant allele frequency of 17 % in the second patient is likely due to mosaicism. This child was significantly less affected by similar symptoms.

Patch-clamp electrophysiology of the G1169D variant in a heterologous expression system revealed activity-enhancing gating changes, including the most pronounced shifts of channel activation and inactivation to more hyperpolarized potentials observed until now. Furthermore, biophysical characterization revealed significantly delayed inactivation and deactivation kinetics as well as a strong increase in window currents. Pharmacological testing in the same cell model revealed the G1169D variant's preserved sensitivity to the calcium channel blocker isradipine, implying a potential path for future therapeutic trials.

6 Einleitung

6.1 Gegenstand und Kontext

Durch diese Arbeit werden der biophysikalische und der klinische Phänotyp einer neuen *de novo* dominanten *CACNA1D*-Variante charakterisiert. [1] Das *CACNA1D*-Gen kodiert für die $\alpha 1$ -D-Untereinheit des spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals (*voltage-gated channel subunit alpha 1 D, CACNA1D*). (siehe **Abbildung 1**) [1] Die $\alpha 1$ -D-Untereinheit bildet die Ionenkanalpore der spannungsgesteuerten $\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanäle (*Ca^{2+} voltage-gated 1.3 channel*). [1] Diese neue *CACNA1D*-Variante wurde als potentiell krankheitsauslösend bei dem Indexpatienten und in einem weiteren Fall detektiert. [2-4]

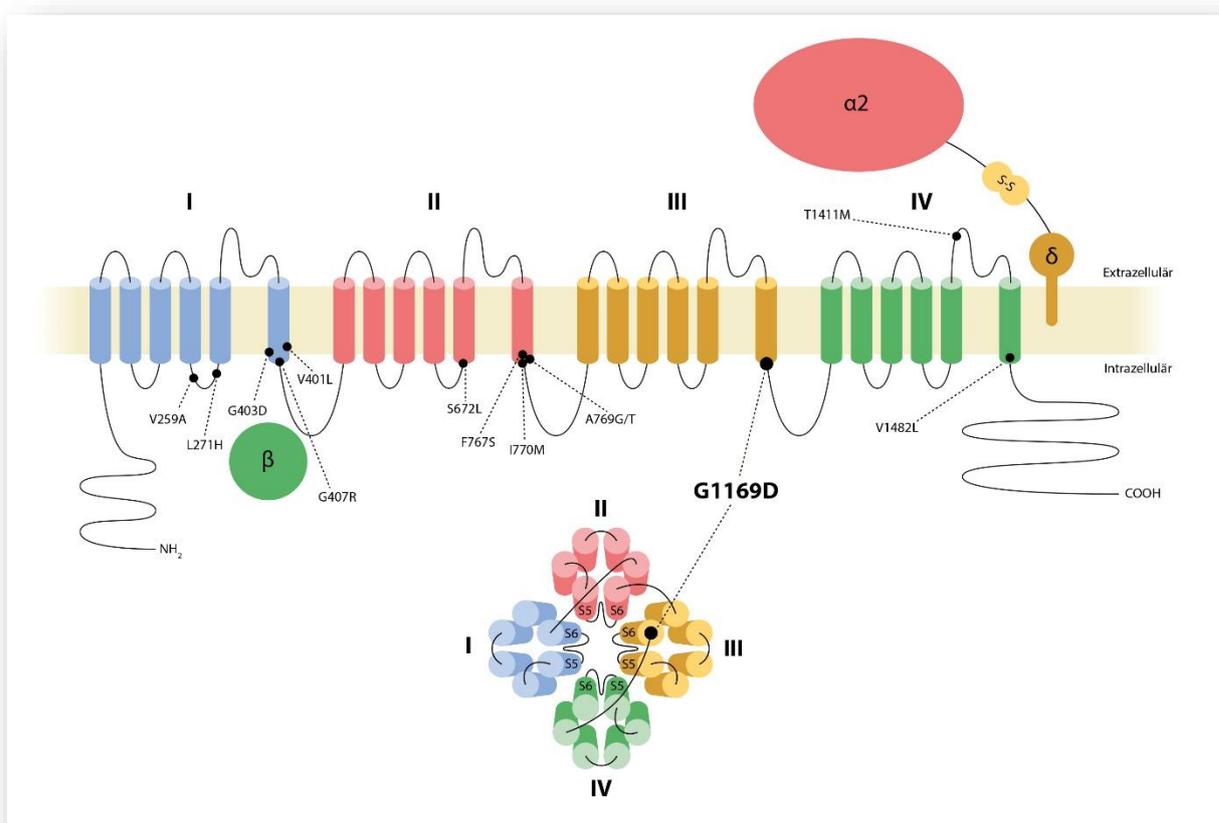


Abbildung 1: Darstellung des $\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanalproteins; oberer Bildteil: Darstellung der $\alpha 1$ -D-Untereinheit des $\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanals mit den weiteren die Kanalfunktion modulierenden Untereinheiten $\beta 3$ und $\alpha 2\delta 1$. Unterer Bildteil: Darstellung der porenbildenden Ca^{2+} -Kanalkonfiguration der $\alpha 1$ -D-Untereinheit. Die Helices S5 und S6

der 4 homologen Strukturdomänen I bis IV (*repeats*) bilden gemeinsam die Wandung der Ionenkanalpore. Eingezeichnet ist die Position der G1169D-Variante (**hervorgehoben**) am Übergang der S6-Helix von *repeat* III und der zytoplasmatischen Schleife, die *repeat* III und *repeat* IV verbindet (DIII-DIV-Linker) In **kleinerer Schrift** wird die Position der weiteren publizierten *de novo* dominanten *CACNA1D*-Varianten angegeben. Abbildung von F. Dannenberg. Bild in Anlehnung an Ortner et al. 2020. [2]

Elektrische Signale, die in Aktionspotentiale umgesetzt werden, sind in der Regel neben Natrium- und Kalium- auch von Ca^{2+} -Strömen abhängig. [5] Da die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration 4 Zehnerpotenzen über der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration liegt, fließen 2-fach positiv geladene Ca^{2+} -Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten vom Extrazellularraum in die Zelle. [6-8] Ca^{2+} -Ströme depolarisieren daher die Zelle, deren Ruhemembranpotential negativ geladen gegenüber dem Umfeld ist. [6]

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird im menschlichen Organismus durch spezifische Transportproteine, Ionenpumpen, ionotrope Rezeptoren, metabotrope Rezeptoren, intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher sowie durch intrazellulärer Signalwege im Zellstoffwechsel mit seinen regulatorischen Proteinen sowie durch Genexpression präzise reguliert und in engen Grenzen gehalten. [9, 10] Ca^{2+} -Ionen können daher als intrazelluläres Botenmolekül (Second-Messenger) wirken und sind einer der zahlenmäßig häufigsten Second-Messenger in menschlichen Zellen. [8-12] Störungen dieser feinabgestimmten Regulation, wie beispielsweise ein zu starker Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration, können zur Störung der Mitochondrien und dadurch zum Zelltod führen. [6, 9, 10, 13] Ca^{2+} -Ionen können allosterisch an unterschiedliche Proteine binden und modulieren dadurch deren Funktion. [8] Bekannt ist die Rolle von Ca^{2+} bei der Kontraktion glatter und quergestreifter Muskulatur. [11] Ca^{2+} ist zentral für die Entstehung und den Ablauf von Aktionspotentialen in erregbaren Zellen. [14, 15] Zahlreiche weitere zelluläre Funktionen wie die Exozytose, auf der die Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen beruht, werden durch Ca^{2+} -Ionen mitbestimmt. [12, 14] Ca^{2+} -Ionen modulieren die Transkription von Genen. [16] Ein feingesteuerte Ca^{2+} -Ionenkonzentration ist wichtig für die Ausreifung der Hirnrinde und die Ausbildung der Synapsen zwischen Neuronen im Allgemeinen und damit Voraussetzung für eine altersentsprechende embryonale, fetale und kindliche Entwicklung. [17] Darüber hinaus sind Veränderungen der Ca^{2+} -Regulation für die Steuerung maligner Zellen in Tumoren relevant. [18] Die Gesamtheit der Steuerungsprozesse durch Ca^{2+} -Ionen wird Ca^{2+} -Signaling genannt. [8, 11] Über Ca^{2+} -Signaling werden diverse Regelkreise des Organismus gesteuert. [8]

Die elektrophysiologischen Auswirkungen von Mutationen in Genen von Ionenkanälen wie dem *CACNA1D*-Gen können mittels der Patch-Clamp-Technik untersucht werden. [19, 20] Mit dieser Technik können Ionenkanäle bezüglich ihrer Kanalkinetik entlang eines definierten Membranabschnittes (*membrane patch*), der mittels einer gläsernen Mikropipette isoliert wird, funktionell untersucht werden. [19, 20] Dafür wird eine 1 bis wenige μm durchmessende Glaspipette an die Zellmembran herangefahren, die Zelle wird mittels eines Unterdruckes angesaugt und ein enger abgedichteter Kontakt (*seal*) zwischen dem Glas der Pipettenspitze und der Zellmembran hergestellt. [19, 20] Für die Experimente wird an der untersuchten Zelle oder einem Membranabschnitt eine definierte Spannung oder ein Strom angelegt (*clamp*). [19-21] In die Glaspipette wird von proximal die Elektrode eingeführt, damit beispielsweise Ströme gemessen werden können. [21] Unterschiedliche Konfigurationen für die Patch-Clamp-Messungen können realisiert werden: Beispielweise kann der Membranabschnitt innerhalb der Pipettenspitze aus der Zelle entnommen werden und isoliert untersucht werden oder die Zellmembran um die Glaspipettenspitze bleibt intakt bei den Messungen. [19, 20] Wenn durch einen Unterdruck die Membran in der Glaspipette eröffnet wird, ist für eine gewisse Zeit die Messung aller exprimierten aktivierbaren Kanäle innerhalb der untersuchten Zelle möglich: Dies ist die Ganzzellenkonfiguration für Patch-Clamp-Untersuchungen. [19, 20]

Mittels Patch-Clamp werden spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (Ca_v) wie die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle seit Jahrzehnten untersucht und in Anhängigkeit von ihrer Aktivierbarkeit und ihrem Inaktivierungsverhalten bei verschiedenen Membranpotentialen eingeteilt. [18]

$\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle werden zur Familie der L-Typ- (*long-lasting*)- Ca^{2+} -Kanalfamilie gezählt. [6, 14] Sie inaktivieren verzögert und sind daher länger geöffnet. [22-24] Zu den L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen gehören auch die $\text{Ca}_v1.1\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle, $\text{Ca}_v1.2\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle, $\text{Ca}_v1.4\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle. [24] L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sind spezifisch durch Substanzen aus der Gruppe der Dihydropyridine (DHP) hemmbar, daher werden sie als Dihydropyridin-(DHP)-Rezeptor- Ca^{2+} -Kanäle bezeichnet. [6, 24, 25]. Diese Ca^{2+} -Kanalfamilie erfüllt zahlreiche Funktionen in unterschiedlichen Geweben und ist u.a. durch ihre zentrale Rolle für die Vasokonstriktion und Blutdruckregulation sowie die Sekretion von Hormonen von großem Interesse für die pharmakologische Forschung. [6, 12, 14, 24, 25] Von den $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen hängt die Entstehung und Ausprägung von Aktionspotentialen in bestimmten Bereichen des ZNS ab. [5, 6, 14] Die $\text{Ca}_v1.1\text{-Ca}_v1.4$ -Kanäle

sowie die $\text{Ca}_v2.1$ - $\text{Ca}_v2.3$ -Kanäle aktivieren bei höheren Membranspannungen. [18] Sie werden daher als bei hohen Spannungen aktivierte Ca^{2+} -Kanäle (*high voltage-activated Ca^{2+} channels*) bezeichnet und den $\text{Ca}_v3.1$ - $\text{Ca}_v3.3$ -Kanäle gegenübergestellt, die bereits bei ca. -20 mV negativeren Membranpotentialen aktivieren; diese werden als bei niedrigen Spannungen aktivierte Ca^{2+} -Kanäle (*low voltage-activated Ca^{2+} channels*) bezeichnet. [24, 26]

Neuronale und neuroendokrine Signale beruhen auf Aktionspotentialen erregbarer Zellen. [5] Der Verlauf von Aktionspotentialen lässt sich in 3 Phasen unterteilen: Die initiale Phase wird durch Natrium- und durch Ca^{2+} -Kanäle bestimmt. [15] Aufgrund ihres verzögerten Inaktivierungsverhalten sind $\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanäle daher gemeinsam mit anderen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen für die durch Ca^{2+} getragene mittlere Plateauphase der Aktionspotentiale verantwortlich, sie bestimmen damit wesentlich über Dauer und Form der Aktionspotentiale. [5] Die dritte Phase, die Repolarisierung, wird u.a. durch Kaliumkanäle getragen. [27] Einzelne Kaliumkanäle werden in ihrer Funktion über Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration durch $\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanäle beeinflusst. [14, 28]

$\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanäle setzen sich aus der $\alpha 1$ -D-Untereinheit, der β -Untereinheit sowie der $\alpha\delta 1$ -Untereinheit zusammen. [2, 3, 12] (siehe **Abbildung 1**) Insgesamt sind 10 unterschiedliche Gene bekannt, die für die $\alpha 1$ -Untereinheiten der unterschiedlichen Ca^{2+} -Kanäle kodieren. [3] Obwohl die Bindungsstelle der $\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanäle hochselektiv für Ca^{2+} -Ionen ist, bestehen zahlreiche strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen $\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanälen und Natriumkanälen. [29] Phylogenetisch besteht ein Verwandtschaftsverhältnis zwischen spannungsabhängigen Natriumkanälen und entsprechenden Ca^{2+} -Kanälen. [30] Die Ionenporenbildende $\alpha 1$ -D-Untereinheit weist eine tetramere Proteinstruktur auf. [2, 6, 14] Ihre 4 Strukturdomänen werden als *repeats* (wiederholte homologe Domänen) bezeichnet. [2] (siehe **Abbildung 1**) Diese *repeats* wiederum setzen sich je aus 6 transmembranen Helices zusammen. [2] Homologe $\alpha 1$ Untereinheiten haben eine vergleichbare Funktion bei Natriumkanälen. [29] Neben dieser Funktion ist die $\alpha 1$ -D-Untereinheit mit ihren Helices 4 auch Trägerin der Spannungssensorfunktion der $\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanäle. [2, 3] Für diese Funktion ist hier ein Arginin mit positiver Ladung verantwortlich. [3] Diese Funktionen des spannungsabhängige Kanal-Gatings werden von phylogenetisch hochkonservierten Genregionen kodiert. [29, 30] Mutationen, welche die $\alpha 1$ -Untereinheit der Ca^{2+} -Kanäle betreffen, können aufgrund der

porenbildenden Funktion dieser Untereinheiten häufig Auswirkungen auf die Gating-Eigenschaften haben. [6, 12, 31] Dies gilt auch für die $\alpha 1$ -D-Untereinheit des $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanals im Speziellen. [12, 31]

Unterschiedliche Zellen des Körpers besitzen die Fähigkeit zur Automtizität, d.h. diese Zellen können ohne äußeren Reiz elektrische Erregung in Form von Aktionspotentialen eigenständig generieren und diese dann an Nachbarzellen weitergeben. [32] Dies Zellen wirken damit als Schrittmacherzellen. [32] Bekannt ist die Fähigkeit zur Automtizität von Zellen des Reizleitungssystems des Herzens, insbesondere von Zellen des Sinusknotens und Atrioventrikularknotens. [33] Darüber hinaus weisen auch Netzwerke von Neuronen des ZNS sowie endokriner Zellen der Nebennieren und des Pankreas Schrittmacherfunktion auf. [14, 34]

Grundlage der Automtizität all dieser Zellen ist die Fähigkeit zur spontanen Depolarisation. [33] Für diese Depolarisation sind eine Reihe unterschiedlicher Ionenkanäle in den Schrittmacherzellen zuständig. [33] Diese Ionenkanäle können sowohl in der Zellmembran als auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sein. [33] Ca^{2+} bildet ein zentrales Element im komplexen Uhrwerk, welches Automtizität und Schrittmacherfunktion dieser Zellen steuert. [33] Dieses Uhrwerk wird auch als eine doppelte Uhr bezeichnet. [33]. Ca^{2+} -Kanäle, die in der Zellmembran verankert sind, bilden die Membran-Uhr. [33] Demgegenüber werden die weiteren die Ca^{2+} -Konzentration steuernde Ionenkanäle in der Membran des Ca^{2+} -speichernden endoplasmatischen Retikulums als Ca^{2+} -Uhr bezeichnet. [33] Beide Komponenten sind essenziell für die autonome Erregungsentstehung. [33, 35] $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle werden aufgrund ihres niedrigen Schwellenpotentials von ca. -60 mV durch andere depolarisierende Ströme dieses doppelten Uhrwerkes aktiviert und tragen durch ihre Ca^{2+} - Ströme dann ihrerseits zur autonomen Erregung in Schrittmacherzellen bei. [33, 36]

Führt die Automtizität bzw. die Schrittmacherfunktion im Herzen zur Entstehung des Herzschlages, so ermöglicht die spontane Oszillation endokrinen Zellen in der Bauchspeicheldrüse sowie der Nebenniere, die entsprechenden Hormone teils unabhängig von neuronaler Steuerung freizusetzen. [33, 37] Die spontane Oszillation führt über den Mechanismus der elektro-sekretorischen Kopplung in diesen Zellen u.a. zur Freisetzung von Insulin und Katecholaminen. [14, 34] Ca^{2+} steuert den Transport von mit Hormonen beladenen Vesikeln und die Verschmelzung dieser Vesikel mit der Zellmembran, es steuert den Prozess

der Exozytose von Hormonen. [34, 38] Die spontane Oszillation sowie die Ca^{2+} -abhängigen Vesikelfreisetzung sind auch für die Neurotransmitterfreisetzung relevant. [39, 40]. Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle aus der Familie der $\text{Ca}_v1\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle sind beispielsweise an der Dopaminfreisetzung in der Substantia nigra beteiligt. [28, 41] Sie ermöglichen die Schrittmacherfunktion dopaminfreisetzender Neurone der Substantia nigra, in dem sie unter anderem zur Ca^{2+} -abhängigen spontanen Oszillation und Exozytose beitragen. [28] Darüber hinaus tragen sie zur Funktion anderer erregbarer Zellen des ZNS bei. [14, 23]

$\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle zeichnen sich dadurch aus, dass sie in menschlichen Geweben variabel exprimiert werden, dies betrifft sowohl die Expression der RNA als auch des Kanalproteins. [42, 43] Hohe Konzentrationen dieser Kanäle finden sich im zentralen Nervensystem (ZNS), insbesondere dem Gehirn, zudem im Innenohr, in der Retina, der Bauchspeicheldrüse, der Nebennierenrinde und im Reizleitungssystem des Herzens. [42-46] $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle sind in all diesen Geweben wesentlich für das Ca^{2+} -Signaling. [11, 13]

De novo dominante Mutationen des *CACNA1D*-Gens können Änderungen der biophysikalischen $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanalfunktion und letztlich komplexe Erkrankungsbilder zur Folge haben. [3] Hier liegt ein Zugewinn an Kanalfunktion mit erhöhtem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle vor, der als Gain-of-Function bezeichnet wird. [17]

Diese Gain-of-Function-Mutationen können die besondere Kinetik von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen mit ihrer Aktivierbarkeit bei vergleichsweise negativen Membranpotentialen, ihrer hohen spannungsabhängigen Aktivierbarkeit sowie ihrer verzögerten Inaktivierung dahingehend verändern, dass der Ca^{2+} -Einstrom weiter ansteigt. [14, 47, 48] Mutationen spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle können so zu Veränderungen der Kanalfunktion führen, und Aktivierung oder Inaktivierung können verändert sein. [49] $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle inaktivieren bis zu einem gewissen Grad bereits unter physiologischen Bedingungen unvollständig, Gain-of-Function-Mutationen können diese Inaktivierung zusätzlich vermindern. [50]

Bei den heterozygoten *de novo* dominanten *CACNA1D*-Varianten wurden im Menschen bisher ausschließlich Varianten mit Gain-Of-Function als pathogen beschrieben. [1, 4, 51] Dies wurde durch weitere klinische Fallberichte demonstriert. [2, 52] Die unterschiedlichen *de novo*

dominanten *CACNA1D*-Varianten weisen neben der biophysikalischen eine ausgeprägte klinische Heterogenität auf. [2, 3] (siehe **Tabellen 5-15** in Kapitel 9.3.7).

Einzelne Mutationen des *CACNA1D*-Genes werden mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert. [2, 3] Mutierte $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle mit veränderter Biophysik führen aufgrund ihrer zentralen Rolle in unterschiedlichen komplexen zellulären Signalwegen und physiologischen Regelkreisen zu Störungen mit weitreichenden klinischen Implikationen. [2] Dysfunktionen unterschiedlicher Organsysteme treten auf und können zu entsprechend hochkomplexen Störungsbildern führen. [2, 3] Die *de novo* dominanten *CACNA1D*-Mutationen werden als heterozygote Keimbahnmutationen zusammengefasst und von familiären rezessiven homozygoten Mutationen unterschieden. [31] Bisher wurden ca. 20 Menschen mit verschiedenen pathogenen dominanten *de novo CACNA1D*-Varianten publiziert. [3, 52]. Der Phänotyp dieser dominanten *de novo* Mutationen unterscheidet sich grundsätzlich von den familiären rezessiven Mutationen. [53, 54]

Diese biallelischen *CACNA1D*-Mutationen haben im Gegensatz zu Gain-of-Function-Mutationen einen Funktionsverlust (Loss-of-Function-Mutationen) zur Folge, es kommt es demnach zu einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom in die betroffenen Zellen. [47, 53, 55] Sie führen daher zu anderen Krankheitsbildern und unterscheiden sich damit sind auch klinisch von Gain-of-Function-Mutationen. [55] Loss-of-Function-Mutationen treten in Regel nicht *de novo*, sondern familiär auf. [55] Loss-of-Function-Mutationen können beispielsweise das Syndrom mit Dysfunktion des Sinusknoten und Taubheit (*sinoatrial node dysfunction and deafness; SANDD*) auslösen.[54-56]

Deutlich häufiger als die dominanten *de novo* und die rezessiven familiären Mutationen kommen somatische *CACNA1D*-Mutationen vor. [3, 57-59] Sie werden in 10-30% der aldosteronproduzierenden Adenome und in bis zu 60% der Adenomvorläuferläsionen detektiert. [3, 12, 59] Sie seien hier erwähnt, da diese somatischen Mutationen den dominanten *de novo* Mutationen hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Auswirkungen auf das Kanal-Gating ähneln können, und da diese somatischen Mutationen die gleichen DNA-Basen betreffen können wie Keimbahnmutationen. [12] Diese somatischen Mutationen können einen Gain-of-Function zur Folge haben. [12]

Dominante *de novo CACNA1D*-Varianten führen zu teils klinisch distinkten Syndromen. [1, 4, 31] Zunächst wurden *de novo* dominante *CACNA1D*-Mutationen beschrieben, die u.a. zu

Autismus-Spektrum-Störungen (A749G, G407R) führen können. [60, 61] In der Folge wurden schwere globale Entwicklungsstörungen beschrieben, die mit *den novo* dominanten *CACNA1D*-Mutationen assoziiert sind. [4, 31] (siehe **Tabellen 5-15** in Kapitel 9.3.7) Das *PASNA*-Syndrom umfasst ein Symptomspektrum; führend für das *PASNA*-Syndrom war zunächst ein Phänotyp mit einer Kombination endokriner und neurologischer Störungen. [4] *PASNA* ist hierbei ein Akronym für primären Hyperaldosteronismus (*primary aldosteronism*; **PA**), epileptische Anfälle (*seizures*, **S**) und andere neurologische Auffälligkeiten (*neurologic abnormalities*, **NA**). Bisher wurde das *PASNA*-Syndrom auf *de novo* dominante *CACNA1D*-Mutationen zurückgeführt, die die $\alpha 1$ -D-Untereinheit betreffen. [4, 12, 62, 63] Diese Mutationen sind in der Regel Keimbahnmutationen. [2] Nicht alle namensgebenden Symptome des Akronyms *PASNA*-Syndrom müssen vorliegen, damit ein Variantenphänotyp mit seiner komplexer Symptomausprägung als *PASNA* klassifiziert wird. [2, 4, 12, 62, 63] Ursprünglich war der endokrinologische Phänotyp zentral bei der Klassifizierung des *PASNA*-Syndroms.[2-4] Träger*innen einer Mutation weisen teils transiente endokrine Störungen auf, beispielsweise transiente Hypoglykämien oder transiente Erhöhungen von Aldosteron. [2, 3] Die endokrinen Störungen sind teils von schweren neurologischen Entwicklungsstörungen begleitet. [3] Die Klinik von Menschen mit *CACNA1D*-Mutationen kann Überschneidungen mit der Erkrankung Zerebralparese haben; Autismus-Spektrum-Störungen wurden mit diesen Mutationen korreliert, und selbst psychiatrische Symptome wie Angst und Depression wurden mit *CACNA1D*-Mutationen in Zusammenhang gebracht. [2, 60, 64, 65] Weitere Symptome bei Patient*innen mit *CACNA1D*-Mutationen sind umschriebene Entwicklungsstörungen sowie eine muskuläre Hypotonie, zudem weisen mehrere Mutationsträger*innen Herzfehler auf. [2, 3, 31] (siehe **Tabellen 5-15** in Kapitel 9.3.7)

Es gibt schwere Epilepsiesyndrome in der frühen Kindheit, die durch genetische Mutationen bedingt sind, sie können zu einer Störung sämtlicher Entwicklungsbereiche führen. [17, 66, 67] Einige von ihnen werden zur Gruppe der entwicklungsbedingten und epileptischen Enzephalopathien (*developmental and epileptic encephalopathies*, **DEE**) zusammengefasst. [66, 67] Bei diesen Epilepsien besteht zum Teil zunächst vor dem Auftreten erster epileptischer Anfälle eine Entwicklungsstörung. [66] Die Epilepsie entsteht in diesem Fall sekundär auf dem Boden einer Entwicklungsstörung. [66] Epileptische Enzephalopathien (englisch: epileptic encephalopathies, EE) können jedoch auch während der altersgemäßen

Entwicklung eines Kindes auftreten und sekundär zu einer Entwicklungsstörung führen. [66] Sowohl bei epileptischen Enzephalopathien als auch bei entwicklungsbedingten epileptischen Enzephalopathien kann es während des Krankheitsverlaufes zur Entwicklungsregression kommen. [68] Die Internationale Liga gegen Epilepsie (International League Against Epilepsy, ILAE) unterstreicht mit dem Begriff DEE die Tatsache, dass Entwicklungsstörung und Epilepsie eigenständige pathophysiologische Ursachen im Rahmen der Epilepsieerkrankung haben können. [69] So können Entwicklungsstillstand und –regression auch bei anfallsfreien Kindern auftreten. [69] Neurodegenerative Prozesse können bei besonders schweren erkrankten Kindern nachweisbar sein. [68] Anhand EEG-morphologischer Kriterien werden diese beiden schweren Epilepsiegruppen DEE und EE vom Lennox-Gastaut-Syndrom (LGS) unterschieden. [67] Die pathognomonischen elektrographischen Merkmale für die Diagnose einer Lennox-Gastaut-Syndroms können erst im Verlauf entstehen und ein LGS aus einer frühkindlichen DEE oder EE entstehen. [67] Bei den schweren Formen kindlicher Epilepsie kann davon ausgegangen werden, dass voneinander unabhängige pathologische Vorgänge zu epileptischen Anfällen oder einer Entwicklungsstörung führen können. [69] Durch die wechselseitige Verstärkung von epileptischen Anfällen und der Enzephalopathie kann die Entwicklungsstörung voranschreiten. [69]

Häufig führen monogene *de novo* dominante Mutationen zu diesen genetischen Epilepsien, rezessive Formen werden deutlich seltener nachgewiesen. [66] Über 450 verschiedene dieser monogen genetischen Epilepsien wurden bisher beschrieben. [17] Mutationen, die Ca^{2+} -Kanäle und das Ca^{2+} -Signaling betreffen sind nur ein kleiner Teil von ihnen. [17] Selbst eine medikamentöse Therapie mit mehreren anfallsverhindernden Medikamenten führt bei diesen genetischen Epilepsien häufig nicht zur suffizienten Anfallsreduktion. [68]

Tremor ist eine Bewegungsstörung mit unbeabsichtigten rhythmisch oszillierenden pathologischen Bewegungen der quergestreiften Skelettmuskulatur, er kann generalisiert oder lokal begrenzt auftreten. [70] Tremor ist ein häufiges Symptom in der Erwachsenenneurowissenschaft, welches im Rahmen von neurologischen Erkrankungen vor allem älterer Menschen auftreten kann. [71] Häufige zu unterscheidende Tremorformen in dieser Altersgruppe sind der essentielle Tremor und der Tremor im Rahmen der Parkinsonerkrankung bzw. eines Parkinsonsyndroms. [71, 72] Von diesen häufigen Formen lassen sich seltene Tremorformen abgrenzen, die aus strukturellen Läsionen des Hirnstamms,

Kleinhirns und Mittelhirns resultieren oder unerwünschte Folgen medikamentöser Therapien sein können. [71] Klinisch wird der Tremor in der Erwachsenenneurologie in Aktionstremor, Ruhetremor und Intentionstremor unterschieden. [71] Ein primärer Tremor, der in der Kindheit, insbesondere im Säuglingsalter beginnt, stellt eine Rarität dar. [73] Tremorartige Bewegungsentäußerungen in der Neonatalperiode oder dem Säuglingsalter können hier vor allem sekundär durch Hypoglykämien, Vitamin-B12-Mangel oder neonatale Alkohol- oder Drogenentzugssyndrome ausgelöst werden. [73, 74] Zudem sind unterschiedliche angeborenen tremorartige Bewegungsstörungen beschrieben, die durch metabolische Störungen verursacht werden und entsprechend behandelbar sind. [75] In der Literatur gibt es vereinzelte Fallberichte über andere Bewegungsstörungen bei Kindern, die teilweise schwierig von Tremores unterschieden werden können; sie treten häufig im Säuglings- oder Kleinkindalter auf, sind häufig transienter Natur und in der Regel mit einer normalen kindlichen Entwicklung assoziiert. [75, 76] Zu diesen Störungen gehören Stereotypien, Zittrigkeit (*jitteriness*), frühkindliche Tics, benigne neonatale Einschlafmyoklonien, benigne Myoklonien des Säuglings, physiologische Schlafzuckungen, Schauer-(Shuddering)-Attacken, Spasmus nutans, seltenere Formen wie transiente idiopathische Dystonie, benigner paroxysmaler Torticollis, paroxysmale tonische Augendeviation und transiente infantile Chorea. [75, 77-84] Bestimmte Epilepsien und epileptische Syndrome können zu einer Bewegungsstörung mit einschließenden paroxysmalen Zuckungen führen, diese werden als myoklonische Anfälle bezeichnet. [85, 86] Bei Epilepsien des Kindesalters mit myoklonischen Anfällen, wie bei den unterschiedlichen Formen der progressiven Myoklonusepilepsie, dem Dravet-Syndrom und anderen genetisch verwandten Epilepsiesyndromen, wie auch bei infantilen Spasmen und dem Lennox-Gastaut-Syndrom kommt es zu plötzlichen muskulären Entäußerungen (*jerks*), die in der Regel nicht oszillierend rhythmisch sind. [87-90] Eine Unterform der kindlichen progressiven myoklonischen Epilepsie ist die Unverricht-Lundborg-Erkrankung, hierbei kommt es bezeichnenderweise auch zu einem Tremor. [91] Auch andere Epilepsieformen mit einem Tremor sind beschrieben, beispielhaft sei das familiäre Epilepsiesyndrom mit einem kortikalen myoklonischen Tremor (*Familial Cortical Myoclonic Tremor and Epilepsy, FCMTE*) genannt. [92, 93] Neben diesen Epilepsieformen kann ein Myoklonus auch Folge von anderen Erkrankungen sein, dann werden die Myoklonien als symptomatisch klassifiziert. [94] Die hereditäre Hyperekplexie geht, wie der englische Name „*stiff baby syndrome*“ offenbart, mit einem ausgeprägten muskulären Hypertonus einher. [81,

95] Die Hyperekplexie kann wie das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom ebenfalls zu anhaltenden paroxysmalen Bewegungsstörungen bzw. Myoklonien führen. [95-97]

Bisher ist nur eine weitere Publikation erschienen, die eine generalisierte rhythmisch-oszillierende Bewegungsstörung im Sinne einer tremorartigen Bewegungsstörung bei $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanaldysfunktionen beschreibt. [70, 98] Häufiger wurde vor allem die Rolle von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Pathogenese des Tremors beim Morbus Parkinson untersucht. [28, 99, 100] Die Prävalenz des Morbus Parkinson ist im Vergleich zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen in der Allgemeinbevölkerung hoch, besonders bei Personen über dem 60. Lebensjahr. [101] Der Morbus Parkinson wird als idiopathisches Parkinsonsyndrom von Parkinsonsyndromen mit bestimmter Ätiologie unterschieden, diese anderen Formen werden auch als Parkinsonismus beschrieben. [102, 103] Der Morbus Parkinson ist unter den Parkinsonsyndromen die häufigste Form. [104] Die typische Symptomentrias bei Morbus Parkinson und den Parkinson-Syndromen besteht aus Tremor, Rigor, Akinese bzw. Bradykinese. [104, 105] Steht ein Tremor klinisch im Vordergrund, wird von einem Tremordominanztyp gesprochen, es gibt Fälle in denen ein Ruhetremor initial das einzige Symptom darstellt. [104, 106] Über 75% der Fälle von Morbus Parkinson gelten als sporadische Formen, bei ihnen wurden bisher keine auslösenden Mutationen gefunden. [107] Bei den übrigen Fällen gibt es einen Teil mit krankheitsauslösenden monogenen Mutationen sowie einen Teil mit Mutationen, die ein intermediäres Risiko für eine Erkrankung darstellen. [101, 107] Bisher wurden keine Ca^{2+} - Kanalmutationen als ursächlich für den Morbus Parkinson beschrieben. [107].

$\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle sind in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra exprimiert. [28] Die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle sind wesentlich für die Funktion von Neuronen der Substantia nigra pars compacta. [23] Ihre besondere Elektrophysiologie ist entscheidend für die autonome Schrittmacherfunktion einzelner Neurone der Substantia nigra. [23, 108]

Ein einzelnes dopaminerges Neuron der Substantia nigra kann hunderttausende Synapsen mit striatalen Neuronen bilden. [109, 110] Für die stoffwechselintensive Funktion dieser großen Anzahl von Synapsen sowie für die oben genannte Schrittmacherfunktion ist ein hohes Maß an Energie nötig, welches durch zahlreiche Mitochondrien zur Verfügung gestellt wird; durch die Energiegewinnung der oxydativen Phosphorylierung entstehen neben Energieträgern jedoch auch radikale oxidative Stoffwechselprodukte, die wiederum die Mitochondrien und

damit die Neurone schädigen können. [108, 111] Da auch durch die Dopaminsynthese und den Dopaminabbau zusätzlich oxidative Stoffwechselprodukte entstehen können, sind diese dopaminergen Neurone insgesamt gefährdet. [108] Durch $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle strömt Ca^{2+} in diese Neurone, u.a. um den Stoffwechsel dieser leistungsfähigen Zellen zu regulieren. [101] Der Ca^{2+} -Einstrom birgt jedoch das Risiko für eine Ca^{2+} -Überladung. [10, 101] Ein Zuviel an Ca^{2+} in den Zellen kann jedoch die Mitochondrienfunktion stören und die Freisetzung oxidativer Stoffwechselprodukte erhöhen, und so zum Untergang von Mitochondrien und letztlich zum Zelltod dieser vulnerablen dopaminergen Neurone führen. [101, 108, 112-114]

Jedoch sind $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle auch im Striatum lokalisiert sind. [23, 115, 116] $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle sind damit neben der Substantia nigra in einer weiteren wesentlichen anatomischen Region exprimiert, die für das dopaminerge Mittelhirnsystem und damit die Pathogenese des Morbus Parkinson wichtig ist. [23, 116] Bezeichnenderweise gehen bei der Parkinsonerkrankung neben nigralen dopaminergen Neuronen auch die Dendritenbäume im Striatum zugrunde. [117] Das Striatum ist eine zentrale Struktur der Basalganglien im menschlichen Gehirn. [118] Es ist direkt an der Regulation von Bewegungsabläufen, komplexen Handlungen bis hin zu komplexen Fähigkeiten wie Motivation, Lernprozessen und prozeduralem Gedächtnis beteiligt. [118, 119] Im Striatum bestimmen $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle die Erregbarkeit mittelgroßer Projektionsneurone. [23, 116] Diese Projektionsneurone werden mittelgroße dornentragende Neurone (englisch: *medium spiny neurons*, MSN) genannt. [23, 116] 98 Prozent der striatalen Neurone sind mittelgroße dornentragende Neurone. [23] Im Gegensatz zu den dopaminergen Projektionsneuronen der Substantia nigra sind die mittelgroßen dornentragenden Neurone des Striatums GABA-erg. [120] Sie exprimieren jedoch Dopamin-Rezeptoren vom Typ 1 (D1) und 2 (D2) und sind unter anderem Ziel der Projektionsneurone der Substantia nigra, die mit diesen dornenartigen Dendriten Synapsen bilden. [23, 116, 118]

Das Striatum fungiert als Relaisstation, es integriert die glutamaterge Projektionen aus dem Cortex und Thalamus mit den dopaminergen Projektionen aus der Substantia nigra und entsendet Efferenzen, die zurück zum Thalamus oder Cortex laufen. [116, 120, 121] Klassischerweise werden zwei striatale Regelschleifen unterschieden: der direkten Weg (*direct pathway*) sowie der indirekten Weg (*indirect pathway*), der den direkten Weg in seiner Aktivität moduliert. [116, 120] Das Striatum ist damit maßgeblich an der Exekution komplexer

Bewegungs- und Verhaltensprogramme in Abhängigkeit von Belohnungserwartungen beteiligt [120, 121]

Störungen striataler Neurone spielen daher neben dem Morbus Parkinson eine Rolle bei anderen Bewegungsstörungen wie der Chorea Huntington, aber auch bei psychotischen und depressiven Erkrankungen. [121, 122] Mittelgroße dornentragende Neurone des Nucleus accumbens, einer Kernregion des ventralen Striatums, sind von Bedeutung für die Entstehung von Suchterkrankungen. [121, 123, 124]

Ca_v1.3-Ca²⁺-Kanäle sind mit ihren elektrophysiologischen Eigenschaften von besonderer Bedeutung für die striatalen Projektionsneurone, da sie in den striatalen Dendritenbäumen mit den charakteristischen dornenartigen Synapsenausstülpungen hoch exprimiert sind. [23, 100, 125] Insgesamt stehen Ca_v1.3-Ca²⁺-Kanäle mit ihrem charakteristischen Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten damit im Zentrum der Dopaminregelkreise. [23, 100, 125, 126]

Ein Motorphänotyp mit einer tremorartigen Bewegungsstörung wurde bereits mit einer *CACNA1D*-Mutation assoziiert. [3] Diese Bewegungsstörung ist als Zitter- (*jittering*)-Phänomen beschrieben worden und trat bei der *de novo* dominanten F767S-Variante der α 1-D-Untereinheit des Ca_v1.3-Ca²⁺-Kanals auf. [3]

CACNA1D-Mutationen sind seltene Ursachen eines kongenitalen genetischen Hyperinsulinismus, der zu schweren Hypoglykämien führen kann. [127, 128] Häufigere Ursachen eines kongenitalen Hyperinsulinismus sind Mutationen, die zelluläre oder mitochondriale DNA betreffen, typischerweise sind Kaliumkanäle betroffen oder Enzyme oder Transkriptionsfaktoren. [129, 130] Anders als bei Erwachsenen, bei denen häufig hormonsezernierende Adenome zu Hyperinsulinismus führen, liegen bei angeborenen Formen meist *de novo* Mutationen vor, die zu einer erhöhten Insulinfreisetzung der Inselzellen führen. [129, 130] Bei Patient*innen mit PASNA-Syndrom liegen in der Regel *CACNA1D*-Mutationen mit Gain-of-Function-Mutation vor. [2, 3] Folge hiervon können sowohl schwere Formen eines Hyperinsulinismus als auch transiente Formen eines Hyperinsulinismus sein. [2, 3]

Ein kongenitaler Hyperaldosteronismus kann neben dem Hyperinsulinismus als weitere endokrine Dysfunktion bei *de novo* dominanten *CACNA1D*-Mutationen auftreten. [3, 4, 12]

Dieser Hyperaldosteronismus kann ebenfalls transienter Natur sein. [2, 3] Eine arterielle Hypertonie, eine Hypokaliämie oder Schwäche der Muskulatur können Hinweise auf das Vorliegen eines Hyperaldosteronismus sein. [12, 131, 132] Auch für den kongenitalen Hyperaldosteronismus können unterschiedliche Mutationen verantwortlich sein, die beispielweise Enzyme oder Ionenkanäle betreffen. [12] Bei erwachsenen Patienten sind insbesondere somatische Mutationen klinisch von großer Relevanz, hierbei können hormonproduzierende Tumore unterschiedlicher Station einer Mikroadenom-Adenom-Sequenz vorliegen. [12]

Die Funktion von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen ist für die Detektion und Weiterleitung auditiver Reize von der Cochlea über den Nervus cochlearis bis zum ZNS wichtig. [133, 134] $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle sind in den inneren Haarzellen der Cochlea, den primären Sinneszellen, hoch exprimiert. [54, 135] Eine besonders hohe Dichte von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen weisen die charakteristischen Band-Synapsen (*ribbon synapses*) dieser inneren Haarzellen auf. [45, 136] An diesen Synapsen findet die erste Übertragung des Signals der sensorischen Sinneszellen auf den Nervus cochlearis statt. [135] Der Neurotransmitter der inneren Haarzellen ist Glutamat. [135, 137] Ca^{2+} -Ionen, die durch $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle in die inneren Haarzellen strömen, steuern die Glutamatfreisetzung aus der präsynaptischen Membran der Band-Synapsen und damit eine wesentliche elektrophysiologische Funktion der Cochlea. [45, 54] Die Funktion der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle stabilisiert die Struktur der Band-Synapsen. [138] Beim autosomal rezessiven SANDD-Syndrom ist eine Hörstörung namensgebender Teil des Phänotyp ($D = \text{deafness}$, Taubheit) [56, 139] Bisher wurden eine Taubheit bei keiner Mutation mit Gain-of-Function-Effekt beschrieben. [2, 3]

Sehstörungen wurden bei einzelnen dominanten *de novo* *CACNA1D*-Varianten beschrieben. [2, 3] Für die Funktion der Retina sind $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle relevant. [140, 141] Hinweise für Fehlregulationen von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen zeigten sich in einem Mausmodell für das Usher-Syndrom, einer der häufigsten Ursachen für eine genetische gleichzeitige Blind- und Taubheit bei Menschen. [142] Eine Blindheit wurde bisher weder bei rezessiven noch dominanten *CACNA1D*-Mutationen beschrieben. [2, 3]

L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, wie $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle, lassen sich pharmakologisch beeinflussen. [6, 143] Sie können durch Dihydropyridine inhibiert werden; Dihydropyridine sind eine Gruppe von Ca^{2+} -Kanalantagonisten mit ähnlichen pharmakologischen Eigenschaften, die sich vom heteroaromatischen Pyridin ableiten. [144-146] Isradipin und Nifedipin gehören zu den Dihydropyridinen. [147] Diese beiden Ca^{2+} -Kanalantagonisten können die Bluthirnschranke überwinden.[148, 149] Isradipin hat aufgrund seiner Lipophilie eine besonders gute ZNS-Gängigkeit. [150] Diese beiden Stoffe wirken spezifisch, sie binden und blocken mit hoher Affinität $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle. [3, 31, 151] Die beiden Ca^{2+} -Kanalinhibitoren sind in der Therapie der arteriellen Hypertonie bei erwachsenen Patient*innen etablierte Therapieoptionen. [152] Für die Behandlung von Kindern stellt eine Isradipin- oder Nifedipin-Therapie einen nicht bestimmungsgemäßen Arzneimittelgebrauch, eine Off-Label-Behandlung dar; einige Daten für den Einsatz beider Substanzen als Antihypertensiva in pädiatrischen Kollektiven sind jedoch publiziert. [153-156] Für den Wirkmechanismus ist das Ca^{2+} -Kanal-Gating und das jeweilige Membranpotential relevant. [3] In der Literatur wird von klinischen Effekten von Nifedipin bei der dominanten *de novo* L271H-CACNA1D-Variante berichtet: Hier zeigte sich während eines Behandlungsversuches ein blutdrucksenkender Effekt der Nifedipintherapie, zudem wurde von einer Verbesserung des muskulären Hypotonus berichtet. [52] (siehe **Tabelle 15** in Kapitel 9.3.7)

Im Tiermodell konnte für Isradipin eine schützende Wirkung auf Zellen des dopaminergen Systems im Striatum und der Substantia nigra demonstriert werden. [100, 113, 157, 158] Isradipin wird daher als ein potentieller Kandidat für die Pharmakotherapie des Morbus Parkinson diskutiert. [113, 114, 143, 159, 160] In einem Tiermodell für den Morbus Parkinson, wurde bei Ratten die Dichte der Synapsendornen mittelgroßer Neuronen des Striatums untersucht, nachdem zuvor dopaminerge Projektionsneurone durch ein Neurotoxin zerstört wurden. [161, 162] Hierbei konnte eine transiente Stabilisierung der Dichte dieser Synapsendornen durch Isradipin gezeigt werden. [125, 162] Durch eine klinische Studie bei erwachsenen Patienten, die an Morbus Parkinson litten, ergaben sich Hinweise dafür, dass Isradipin das Fortschreiten der Erkrankung verzögern kann. [114, 160] Auch für andere Krankheitsmodelle wurde postuliert, dass die Beeinflussung der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle eine neuroprotektive Wirkung haben könnte. [113, 163]

Besonders kritischer und genauer Prüfung bedarf die Durchführung einer Off-Label-Behandlung von Kindern, um mögliche Nebenwirkungen so weit wie möglich zu vermeiden. [164-166] Bei einer potentiellen Therapie mit einem Stoff aus der Gruppe der Dihydropyridine sind neben häufigen unerwünschten Nebenwirkungen wie einem raschen Blutdruckabfall, einer konsekutiven Herzfrequenzsteigerung bis hin zu einem Kreislaufkollaps auch allergische Wirkungen und potenzielle Schädigungen der Nieren- und Leberfunktionen möglich. [167-170]

6.2 Forschungshypothesen und wissenschaftliche Zielsetzungen

- 1.) Mit dieser Arbeit wird untersucht, ob die G1169D-Variante einer *CACNA1D*-Mutation zu charakteristischen elektrophysiologischen Veränderungen des *gatings* von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen in einem heterologen Zellexpressionsmodell führt.
- 2.) Es erfolgt eine Prüfung, ob potenzielle Veränderungen des *gatings* bei der G1169D-Variante im Sinne eines Gain-of-Function (Funktionszugewinn) oder Loss-of-Function (Funktionsverlust) interpretiert werden können. [1, 46]
- 3.) Zudem wird untersucht, ob es charakteristische klinische Veränderungen bei zwei Trägern der G1169D-Variante gibt.
- 4.) Diese elektrophysiologischen und klinischen Charakterisierungen werden einander gegenübergestellt und die G1169D-Variante hinsichtlich ihrer potenziellen Pathogenität beurteilt.
- 5.) Hierfür werden die erhobenen biophysikalischen Daten vor dem Hintergrund der Daten anderer publizierter *de novo* dominanter *CACNA1D*-Varianten interpretiert. [2]
- 6.) Im Rahmen der elektrophysiologischen Charakterisierung der Variante wird untersucht, ob die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle der G1169D-Variante durch den Ca^{2+} -Kanalantagonisten Isradipin inhibiert werden können.
- 7.) Es wird zudem untersucht, inwiefern sich die Sensitivität der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle der G1169D-Variante von denen des Wildtyps (WT) unterscheidet.

8.) Anhand dieser Ergebnisse wird der potenzielle Nutzen und das Risiko einer Therapie mit einem Ca^{2+} -Kanalantagonisten wie Isradipin oder Nifedipin für den experimentellen individuellen Therapieversuch geprüft.

7 Methodik

7.1 Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die vorliegende Monographie, selbstständig von mir, Fabian Dannenberg, verfasst, widmet sich den funktionellen (biophysikalischen) und klinischen Konsequenzen einer neu entdeckten Calciumkanal-Variante.

Ich weise daraufhin, dass Teile dieser Monographie, insbesondere aus den Kapiteln Einleitung, Methoden, Ergebnisse und Diskussion, einschließlich bestimmter Abbildungen und Tabellen möglicherweise nach der Einreichung und Eröffnung des Promotionsverfahrens, aber noch vor Abschluss des Gutachterprozesses zur Veröffentlichung in einer bisher nicht feststehenden Fachzeitschrift vorgesehen sind. Bei dieser in Vorbereitung begriffenen Originalarbeit werde ich als Erstautor gesetzt, da ich u.a. hauptverantwortlich für den klinischen Teil (Ergebnisse, Datenauswertung) und die Darstellung und Interpretation der elektrophysiologischen Ergebnisse vor dem Hintergrund der klinischen Befunde der Arbeit war, sowie die wesentlichen Anteile des Textes verfasst habe. Für die in Vorbereitung befindliche Publikation werden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten.

Die elektrophysiologischen Ergebnisse aus der Untersuchung der Calciumkanal-Variante können durch die klinische Charakterisierung des Indexpatienten in ihren Konsequenzen besser verstanden werden. Diese Korrelation erfolgte durch mich. Insgesamt bin ich für die Planung, Messung, Darstellung, Auswertung und Interpretation der klinischen Ergebnisse hauptverantwortlich.

Ich war von Anfang an der Entwicklung und Formulierung der Fragestellungen beteiligt. Die Konzeption der Arbeit, einschließlich der elektrophysiologischen Charakterisierung und der Erarbeitung des klinischen Erkrankungsbilds, erfolgte in gemeinsamen (virtuellen) Gruppenarbeiten zwischen meiner Erstbetreuerin Frau Prof. Dr. Ute Scholl, Herrn Prof. Dr. Jörg Striessnig und Frau Dr. Nadine J. Ortner (beide von der Universität Innsbruck), meinem Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. Markus Schülke-Gerstenfeld sowie Herrn Dr. Gabriel Stölting (Labor Prof. Dr. U. Scholl) und mir.

Um zu gewährleisten, dass nur meine eigenen Leistungen für die Bewertung der Dissertation herangezogen werden können, weise ich darauf hin, dass die der Arbeit zugrundeliegenden

elektrophysiologischen Daten nicht von mir selbst erhoben und ausgewertet wurden. Die Elektrophysiologie wurde von Frau Dr. Nadine J. Ortner durchgeführt, einschließlich Mutagenese, Transfektion, Aufbau eines heterologen Zell-Expressionssystems, Zellkultur und Messung der elektrophysiologischen Patch-Clamp-Daten. Diese Daten und Auswertungsergebnisse wurden mir mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Nadine J. Ortner für die Verfassung der Monographie zur Verfügung gestellt.

Diejenigen Ergebnisse, die von Frau Dr. Nadine J. Ortner erhoben wurden, sind in der Arbeit entsprechend gekennzeichnet, sie wurden durch sie in den Ergebnistabellen (Tabelle 2, 3, 4) und den Abbildungen (Abbildungen 10, 11, 12, 13, 14, 15) dargestellt. Diese Tabellen und Abbildung wurden mir ebenfalls sämtlich mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Nadine J. Ortner für die Verfassung der Monographie zur Verfügung gestellt. Da ein erneuter eigener Entwurf dieser Abbildungen und Tabellen durch mich keine originäre Leistung darstellen würde, bearbeitete ich die genannten Tabellen und Abbildungen lediglich für die Monographie. Die Autor*innenschaft ist in den entsprechenden Untertexten der Tabellen und Abbildungen angegeben. Der Text des Ergebnisteils ist selbstständig durch mich verfasst worden.

Frau Prof. Ute Scholl, Herr Prof. Markus Schülke-Gerstenfeld und Herr Dr. Gabriel Stölting ermöglichten mir durch Mitarbeit in ihren Laboren Einblicke in die verwendeten Methoden, insbesondere in Versuchsaufbau und der Durchführung der Patch-Clamp-Untersuchungen sowie in die Auswertung der Messdaten.

So konnte ich in einem ähnlichen Projekt, das eine Natriumvariante untersuchte, selbstständig Patch-Clamp-Messungen zur Gewinnung experimenteller elektrophysiologischer Daten durchführen. Diese durchgeführten elektrophysiologischen Messungen - zwar nicht inhaltlicher Bestandteil dieser Dissertation – ermöglichten mir das Verfassen dieser Monographie. Im Rahmen dieses weiteren Projektes konnte ich neben der Messung der elektrophysiologischen Patch-Clamp-Daten die Arbeitsschritte der Mutagenese, Transfektion, Aufbau eines heterologen Zell-Expressionssystems und Zellkultur sowie der Verwaltung und Auswertung der Patch-Clamp-Daten kennen lernen.

Auch die übrigen Teile der Monographie sind selbstständig durch mich verfasst worden. Neben der kritischen Bewertung und Interpretation der klinischen und elektrophysiologischen Daten bildet die Kontextualisierung der Ergebnisse nach umfangreicher Literaturliteraturarbeit einen wesentlichen Teil dieser Arbeit.

Für die Illustrierung des Ergebnisteils stellte mir Dr. Gabriel Stölting freundlicherweise Abbildungen 2, 3, 4 zur Verfügung. Auch dies ist an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

7.2 Studienteilnehmer

Das schriftliche Einverständnis der sorgeberechtigten Eltern des Patienten wurde eingeholt und liegt vor. Diese Studie wurde im Einklang mit den ethischen Richtlinien gemäß der Deklaration von Helsinki ausgeführt, die von der Generalversammlung des Weltärztebundes beschlossen wurden. [171] Es liegt ein entsprechendes positives Votum der zuständigen Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin vor (Antragsnummer EA2/084/18). Der Indexpatient wurde in den DRK Kliniken Berlin Westend entbunden und dort die ersten 2 Monate regelmäßig betreut. Seit dem 2. Lebensmonat erfolgte eine regelmäßige ambulante Betreuung im Sozialpädiatrischen Zentrum der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Eine ausführliche Familienanamnese wurde durch Befragung der Eltern einschließlich der Großelterngeneration des Kindes durchgeführt.

7.3 Genetische Analyse

Für die genetische Analyse des Indexpatienten mit der *G1169D*-Variante wurden Blutproben vom Patienten und den Eltern gewonnen. Es erfolgte eine DNA-Extraktion, und eine Sequenzierung der gesamten kodierenden Abschnitte des Genoms (*whole exome sequencing*, **WES**) wurde in der Praxis für Humangenetik in Tübingen, Deutschland, als genetische Routinediagnostik durchgeführt.

Es erfolgte eine Datenbankrecherche, um zu evaluieren inwiefern es sich bei der *G1169D*-Variante um eine neue, bisher nicht beschriebene Variante handelt. Hierfür wurde die genetische Datenbank ClinVar durchsucht, eine frei zugängliche Datenbank in der Phänotyp-

Genotyp-Korrelationen von unterschiedlichen genetischen Varianten hinterlegt sind. [172] Zudem wurde als weitere Datenbank gnomAD (*Genome Aggregation Database*), die eine Sammlung von über 125.000 menschlichen Exomsequenzierungsdatensätzen sowie von über 15.000 Sequenzierungsdatensätzen des gesamten menschlichen Genoms (*whole genome sequencing data*) aufweist, nach der *G1169D*-Variante durchsucht. [173] In diesen Datenbanken konnte keine Beschreibung der *G1169D*-Variante gefunden werden. Ein anderer Fall mit dieser Variante konnte jedoch in der weiteren frei zugänglichen Datenbank für genetische Varianten der Universität Leiden (*Leiden Open Variation Database, LOVD*) identifiziert werden (DB-ID *CACNA1D_000160*). [174]

Für die genetische Analyse dieser *G1169D*-Variante aus der LOVD wurden Blutproben vom Patienten und den beiden Eltern gewonnen. Am Amsterdamer UMC Labor für Genom Diagnostik erfolgte eine ausführlich genetische Diagnostik. Auch hier erfolgte eine nach einer DNA- Extraktion die Sequenzierung der gesamten kodierenden Abschnitte des Genoms dieses Patienten. Durch Analyse der Sequenzierungsdaten wurde die *CACNA1D*-Variante (c.3506G>A p.(Gly1169Asp) in NM_000720.3; *G1169D*) mit einer Frequenz des Allels der *G1169D*-Variante von 17% identifiziert. [175]

7.4 Molekulare Klonierung

Die *G1169D*-Variante wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese in die *CACNA1D*-Sequenz auf der Basis eines pCMV6-XL6 Plasmids eingefügt. [176] Das Plasmid mit der Wild-Typ Sequenz stammt von der Firma Origene und enthält das Exon 8B. [4] Für die Mutagenese wurde das Q5-Site-Directed-Mutagenesis-Kits der Firma New England Biolabs GmbH verwendet. [177, 178] Das Primerdesign für die Oligo-Nukleotid-Primer wurde durch das online NEBaseChanger-Tool geplant. [178, 179] Geplant wurde ein Back-to-Back-Primer-System mit einem Forward-Primer mit substituierter Base, Guanin ersetzt durch Adenin (gemäß der *CACNA1D*-Variante (c.3506G>A p.(Gly1169Asp) in NM_000720.3)) sowie einem Reverse-Primer, welcher mit dem 5'-Ende des Forward-Primers abschließt. [176-179] Verwendet wurde der Forward-Primer 1D_ *G1169D fw #2* (5'-ATCTTTGTGGACTTTGTCATCG-3') sowie der

Reverse-Primer 1D_G1169D rev #2 (5'-GTTTCATCATGAAGAAAGCTAC-3'), welche durch die Firma Eurofins Genomics synthetisiert wurden. [177, 180]

Die nicht phosphorylierten Primer und die Template-Plasmide wurde gemeinsam mit der Q5®-*Hot-Start-High-Fidelity-DNA-Polymerase* der Firma New England Biolabs GmbH gemäß der Anleitung des Herstellers angesetzt. [181, 182] Diese High-Fidelity-Polymerase ist gemeinsam mit Nucleotidbausteinen, Mg²⁺-Ionen und einem Puffer im Q5-Master-Mix der Firma New England Biolabs GmbH enthalten. [181, 182] Folgende PCR-Parameter wurden hierfür verwendet: PCR Parameter: 1 x bei 98°C 30 s, 25 x 10 s bei 98°C; 30 s bei 58°C; 5:30 min bei 72°C; 1 x 120 s bei 72°C. [183] Die Berechnung der optimalen *Annealing*-Temperatur erfolgte ebenfalls mit dem *NEBaseChanger*-Tool. [178]

Als nächster Schritt erfolgte die Zirkularisierung des PCR-Produkts sowie der Verdau des ursprünglichen Templates. [178] Dies erfolgte unter Verwendung des *KLD*-Enzym-Mixes der Firma New England Biolabs GmbH. Dieses Mix enthält eine Kinase (K), eine Ligase (L) sowie das Abbau-Enzym *DpnI* (D). [177, 178] Die Phosphorylierung des linearen PCR-Produkts am 5'-Ende erfolgt durch die Kinase, welches die Effizienz des nächsten Schritts, der Ligation, steigert. [178] Bei der Ligation werden die teils komplementären linearen DNA-Stränge zu einer ringförmigen DNA, dem Plasmid, zusammengefügt. [176] *DpnI*-Enzyme dienen dem Verdau der Template-DNA, welche nicht die gewünschte Mutation erhält. [177, 178] Ergebnis dieser Prozesse ist ein zirkuläres Plasmid mit der gewünschten Basensubstitution. [176]

Der Ansatz aus PCR-Produkt und *KLD*-Enzym-Mix wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. [178, 184]

Als nächster Schritt erfolgte die Transformation des erhaltenen Konstruktes sowie des Wild-Typ-Templates auf jeweils 50 µl *TOP10* kompetenter *E. coli*. (Im Labor von Prof. U. Scholl hergestellt.) [176, 182] Hierfür wurden die Bakterien mit 5 µl der *KLD*-Reaktion bzw. 10 ng des Wild-Typ-Templates zunächst 20 Minuten auf Eis gesetzt. Als nächstes erfolgte eine Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 30 s, anschließend erfolgte eine erneute Lagerung der Reagenzien auf Eis für 5 Minuten. [182, 185]

Die Bakterien wurden mit 300 µl S.O.C.-Mediums (*super optimal broth with catabolite repression, S.O.C.*) der Firma Invitrogen inkubiert. [186] Danach wurde die Lösung für 45 Minuten bei 37°C geschüttelt und anschließend zwischen 50 und 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden mit 37° C über die Nacht bebrütet. [182, 187]

Am nächsten Tag wurden 6 Kolonien von der Platte mit dem G1169D-Konstrukt und 2 Kolonien der Wild-Typ Platte mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in 5 ml flüssiges LB-Medium überführt. [182] Diese wurden in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. [182]

Hiervon zeigten lediglich 3 Kulturen mit dem G1169D-Konstrukt und beide Kulturen mit wild-typ Template-Plasmid Wachstum. Für die Gewinnung der jeweiligen Plasmid-DNA (WT oder G1169D-Konstrukt) erfolgte eine Plasmidpräparation (*mini prep*) aus den E. coli-Kulturen mit Hilfe des Qiagen-Mini-Kits der Firma Qiagen N.V. (niederländisch: *Naamloze Vennootschap*) nach Anleitung. [176, 182, 188] Hierdurch wurden Eluatlösungen erhalten, die das gereinigte Plasmid mit Konzentrationen zwischen 150 und 350 ng/μl enthielten. [176, 188]

Zur orientierenden Kontrolle der DNA wurden 3 μl der aufgereinigten Plasmide mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *NotI* geschnitten (1h bei 37°C). [176, 182] Sowohl in den Wild-Typ als auch in den Mutationen wird das gleiche Bandenmuster erwartet (4733 bp, 3837 bp, 1856 bp, 580 bp). [176, 182]

Durch eine Gel-Elektrophorese (1% Agarose) konnte dieses Muster in beiden Wild-Typ Klonen sowie den G1169D Konstrukten Nr. 1 und 3 nachgewiesen werden. [176, 182] (siehe **Abbildung 2**) In dem G1169D-Plasmid Nr. 2 wurde ein anderes Bandenmuster beobachtet, und dieser Klon wurde verworfen. [182]

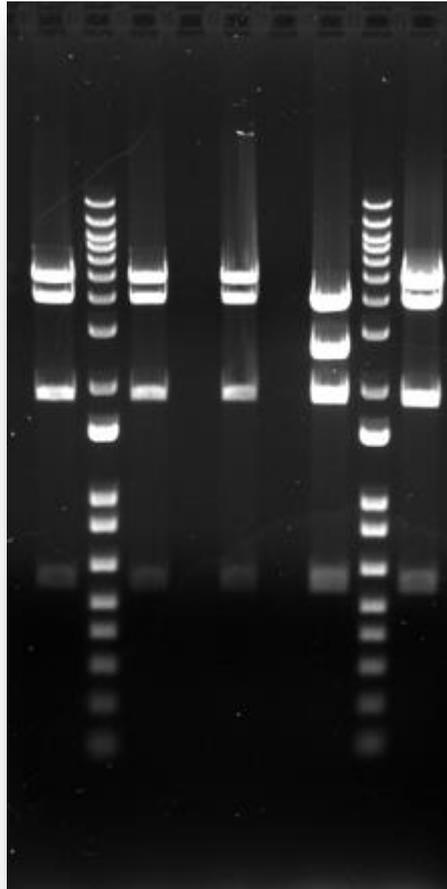


Abbildung 2: Gel-Elektrophorese zur Überprüfung der Klonierung 1: 1% Agarosegel, 100V für 30 Minuten. Von links nach rechts: Wild-Typ-Plasmid-Klon (WT) #1; 1kb Marker; WT #2; leere Spur; G1169D-Plasmid-Klon (Mut) #1; leere Spur; Mut #2; 1kb Marker; Mut #3. Mut #2 zeigt kein charakteristisches Bandenmuster und wurde verworfen. Abbildung von Herrn Dr. G. Stölting.

Mittels Sanger-Sequenzierung erfolgte zunächst eine Überprüfung der Mutagenese in der *CACNA1D*-Sequenz der Ansätze Mut #1 und Mut #3. [183] Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Eurofins Genomics mit dem Primer 5'-ATGTATCTCCGCAAGGGACG-3'. [189] Die Mutation konnte in einem der beiden Plasmide gefunden werden.

Da nicht auszuschließen war, dass in dem PCR-Schritt des Q5-Site-Directed-Mutagenesis-Kits unerwünschte Mutationen auch an anderen Stellen des Plasmids eingefügt wurden, erfolgte anschließend eine Klonierung des sequenzierten Abschnitts in das ursprüngliche WT-Konstrukt. Das G1169D-Konstrukt wurde durch die Restriktionsenzyme *PmlI* und *HindIII* geschnitten, das Fragment mit der Mutation aus einem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Gel-Extraktions-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. [190-192] Anschließend erfolgte eine

Ligation über Nacht. Die durch Ligation erhaltenen Plasmide wurden erneut transformiert, ausplattiert und über Nacht inkubiert. Acht Kolonien wurden erneut in 5 ml LB-Medium transferiert und nach einer Inkubation über Nacht in einer *mini prep* – wie oben beschrieben - aufgereinigt. [176, 182] Zur Überprüfung der Klonierung wurde die aufgereinigte DNA durch das Restriktionsenzym EcoRI geschnitten und mittels Gel-Elektrophorese untersucht. [176, 182] Hierbei wurde bei allen Klonen ein nicht zufriedenstellendes Ergebnis erhalten. (siehe **Abbildung 3**)

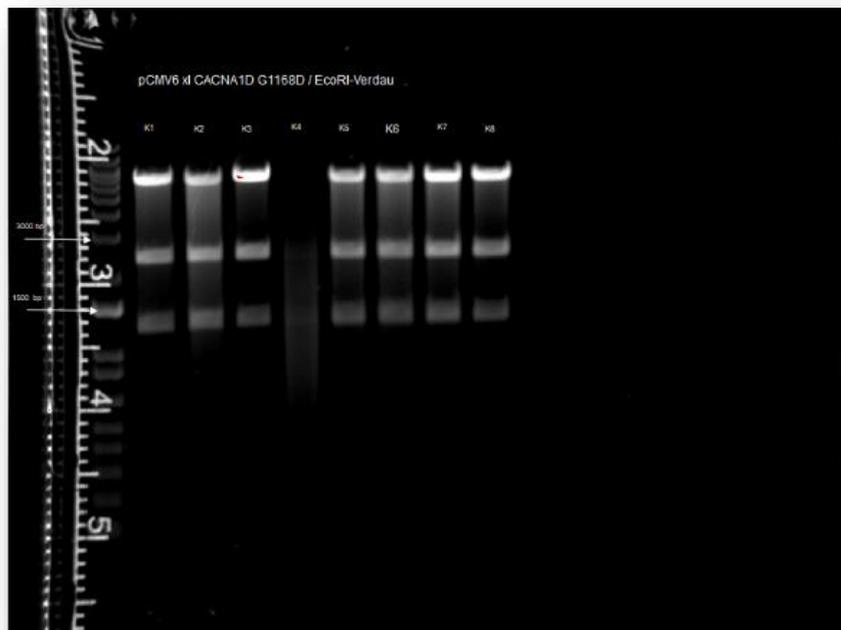


Abbildung 3: Gel-Elektrophorese zur Überprüfung der Klonierung 2: 1% Agarose-Gel, 100 V, 30 min; Aufgetragen sind (von links nach rechts): 1 kb Marker; Klon #1-#8; Die mittlere Bande sollte eine Größe von 3288 bp (andere Banden: 6470 und 1248 bp) aufweisen, war jedoch nur zwischen 2000 und 3000 bp groß. Abbildung von Herrn Dr. G. Stölting.

Nach der Überprüfung der erfolgreichen Einfügung der Mutation mittels Sanger-Sequenzierung konnte ein Klon für die Wiederholung der Klonierung des G1169D-Abschnitts in die WT-DNA verwendet werden. Zur Vermeidung von unerwünschten Rekombinationen und Mutagenesen durch die verwendeten Bakterien wurden die transformierten Bakterien im

Weiteren bei 28°C (statt 37°C) inkubiert. [193] Da das Wachstum hierbei geringer ausfällt, wurden die Bakterien nach der Transformation auf der LB-Agar-Platte für 2 Tage im Inkubator belassen. [193] Hiernach erfolgte die Vorbereitung und Durchführung der *mini prep* wie oben beschrieben (Konzentrationen 300 – 440 ng/μl). [176, 188] Abschließend wurde eine Testrestriktion des Konstruktes pCMV6-XL6 *CACNA1D* G1169D mit EcoRI durchgeführt. [194] Hierbei zeigten sich die erwarteten Bandenmuster in der Gel-Elektrophorese. [176] (siehe **Abbildung 4**)

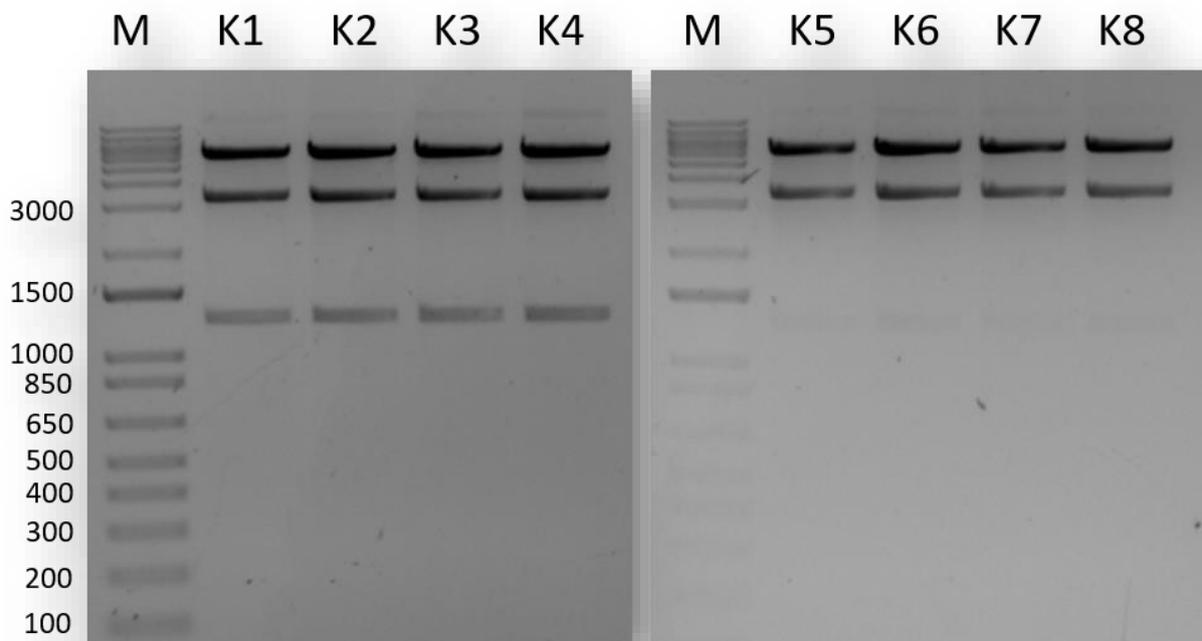


Abbildung 4: Gel-elektrophorese zur Überprüfung des Konstruktes: Agarosegel (1%, 100 V, 30 min) einer Restriktion des Plasmides pCMV6-XL6 *CACNA1D* G1169D mit EcoRI. M: 1 kb Marker, K1-8: DNA Klon Nr. 1 bis 8. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. G. Stölting.

Zur vollständigen Kontrolle erfolgte eine Sanger-Sequenzierung des kompletten offenen Leserasters (*open reading frame*, **ORF**) in zwei WT- und zwei G1169D-Klonen. [195] Die Mutation konnte nur in einem der beiden G1169D-Klone festgestellt werden. Im Weiteren wurde dieser Klon zur Untersuchung der Effekte durch diese Mutation verwendet. Ansonsten konnten in keinem der anderen Klone weitere Mutationen festgestellt werden.

7.5 Zellkultur und Transfektion

TsA201-Zellen (ECACC: 96121229) wurden in *DMEM*-Medium (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* D6546, **DMEM**) der Firma Sigma-Aldrich kultiviert. [182] Das *DMEM*-Medium wurde angereichert mit 10 % fetalem Kälberserum (*fetale bovine serum* 10270-106, **FBS**) der Firma Gibco sowie mit 2 nM L-Glutamin (25030-032) der Firma Gibco, einer Penicillin-Lösung (10 U/ml; Sigma-Aldrich, P3032) und einer Streptomycin-Lösung (10 µg/ml; Sigma-Aldrich, S6501). [3, 182] Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und unter 5-prozentiger Kohlendioxidanreicherung in einem luftfeuchtigkeitskontrollierten Inkubator. [3, 182] Nach Erreichen einer 80-prozentigen Konfluenz der kultivierten Zellen, erfolgte das Zell-Splitting mit 0.05-prozentiger Trypsin-Lösung, um die Zell-Zell-Kontakte zu lösen. [3, 182] Es erfolgten maximal 19 Zellpassagen pro Zellkultur. [3]

Anschließend erfolgte eine transiente Transfektion der tsA201-Zellen mittels Ca²⁺-Phosphat Präzipitation-Methode nach einem festgelegten Protokoll: Transfiziert wurden 3 µg der α1-D-Untereinheit (human, NM_000720; Wildtyp (WT) oder G1169D-Mutante), 2 µg der β3-Untereinheit (Ratte, NM_012828), 2.5 µg der α2δ1-Untereinheit (Kaninchen, NM_001082276). [3, 196] Hinzugenommen als Transfektionsmarker wurden 1.5 µg des grün-fluoreszierenden Proteins eGFP (enhanced green fluorescent protein). [3, 196, 197] Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichtete 35 mm Kulturschalen ausplattiert und bei 30°C und 5-prozentiger Kohlendioxidkonzentration kultiviert. [196] Die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgten in einem definierten Zeitfenster von 48-72 Stunden nach Transfektion. [196]

7.6 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die Ionenströme wurden mittels Patch-Clamp-Verfahren in der Ganzzellenkonfiguration (*whole-cell patch-clamp recordings*) mittels festgelegter automatisierter Messprotokolle gemessen. [3, 196] Zur Anwendung kam ein heterologes Expressionsmodell: Zur Charakterisierung der *de novo* G1169D-Variante, wurden immortalisierte humane Nieren-

Zellen (tsA201-Zellen), die entweder mit dem $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanal des Wildtyps oder mit $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen der G1169D-Variante transfiziert wurden, verwendet. [3, 52] Transfiziert wurden die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanal-Komplexe. [3, 196] Die biophysikalischen Messungen erfolgten in der Regel unter Anlage eines Haltepotentials von -109.3 mV oder -139.3 mV. [3] Hierbei wurden elektrophysiologische Parameter der Öffnungswahrscheinlichkeit (*gating*) der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle wie die spannungsabhängige $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanal-Aktivierung, $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanal-Inaktivierung im dynamischen Fließgleichgewicht (*steady state*) sowie die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanal-Deaktivierung bestimmt. [1, 3, 31, 52, 55] (siehe **Abbildung 5**)

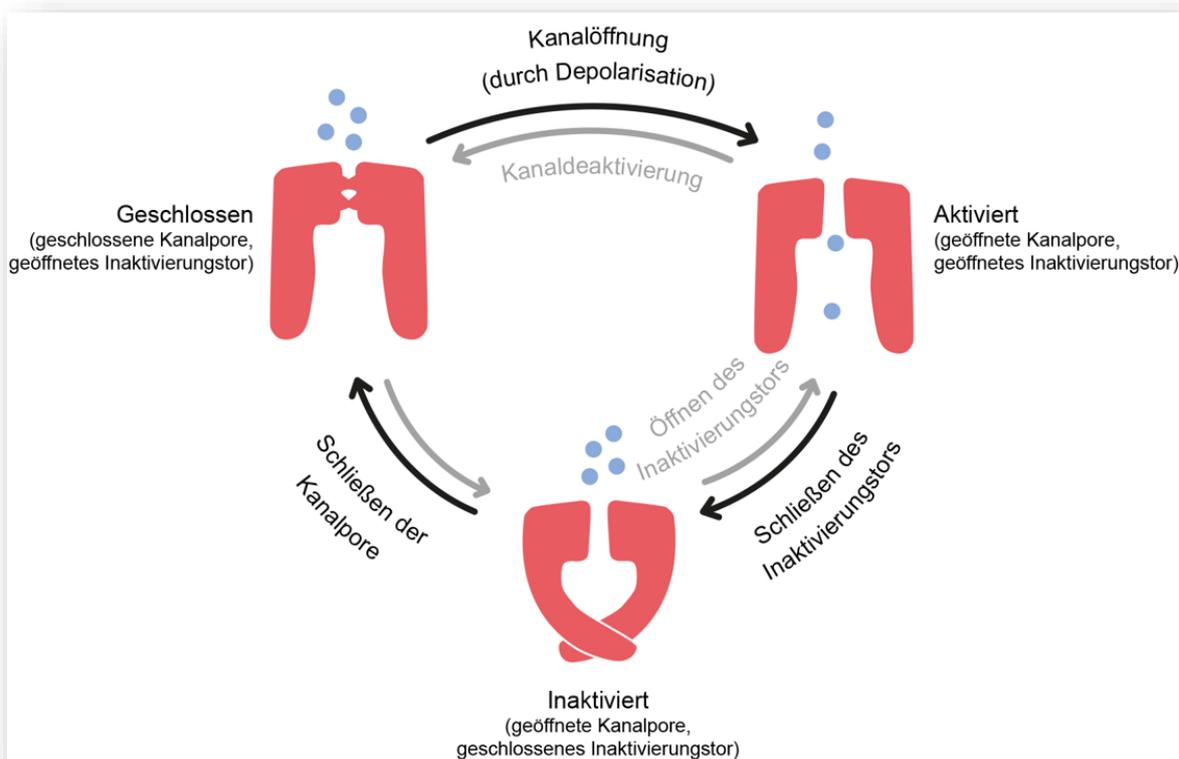


Abbildung 5: Konformationszustände: Dargestellt werden 3 relevante Konformationszustände eines spannungsabhängigen Kationenkanals. Rechte obere Kanalskizze: Darstellung des geöffneten, aktivierten Kanalzustands: Kationen (z.B. Ca^{2+} -Ionen, **blaue Kugeln**) können durch die Ionenkanalpore aus dem Extrazellulärraum in die Zelle strömen. [198] Nach einer gewissen Zeit kommt es durch die Kanalaktivierung zu einer Änderung der Konformation - das Inaktivierungstor (*inactivation gate*) schließt. [198] Dies wird durch die mittlere untenstehende Kanalskizze gezeigt: Der Kanal ist nun inaktiviert, die eigentliche Ionenkanalpore aber

noch geöffnet. [198] In diesem Zustand sistiert der Ca^{2+} -Einwärtsstrom. [198] Bevor der Kanal wieder Ca^{2+} -Ionen leiten kann, erfolgt während der Repolarisierung die 3. Konformationsänderung, dargestellt in der linken oberen Kanalskizze. [198] Nun ist die Kanalpore zwar geschlossen, das „Inaktivierungstor“ jedoch wieder geöffnet; die Wiederherstellung des aktivierbaren Zustandes ist aus der geschlossene Konformation heraus möglich. [198] Dieser Zyklus wird durch die **schwarzen Pfeile** dargestellt. [198] Teilweise sind auch reverse Konformationsänderungen unter physiologischen oder experimentellen Bedingungen möglich (**graue Pfeile**) Modifizierte Abbildung in Anlehnung an Hinard et al. von F. Dannenberg. [198] Beschriftungen der Pfeile teilweise übernommen. [198]

In einem Faraday-Käfig wurde das Mikroskop nebst der motorisierten Pipettenhalterung auf einem vibrationsgeschützten Tisch montiert. [20] Verstärkt wurden die Messströme durch den Patch-Clamp-Verstärker Axopatch 200 A (Axon Instruments). [3, 20] Zudem kann über den Verstärker eine festgelegte Spannung (Kommandospannung) an der jeweils untersuchten tsA201-Zelle angelegt werden, um damit das Membranpotential für eine bestimmte Zeit konstant zu halten. (Dieses Verfahren wird *voltage clamp* genannt und wurde für die entsprechenden Messprotokolle verwendet.) [3, 199] Analog hierzu kann auch ein definierter Strom konstant gehalten werden, um das jeweilige Membranpotential zu messen (*current clamp*), jedoch wurde dieses Verfahren im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet. [199] Die analogen Messungsdaten wurden mittels eines Analog-Digitalwandlers (Digidata 1322A digitizer, Axon Instruments) umgewandelt. [3, 196] Durch Verwendung eines entsprechenden Tiefpassfilters wurden Frequenzen unterhalb 2 bzw. 5 kHz zur weiteren Analyse herausgerechnet. [3, 196] Diese Datenanalysen erfolgten mit den Software-Produkten Clampfit (Axon Instruments) in Version 10.2 und Version 10.7 sowie mit SigmaPlot (Systat Software Inc.) in Version 12.0 und 13.0. [3, 196] Die Badlösung, welche die untersuchten Zellen umgibt, setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 15 mM CaCl_2 , 150 mM Cholin-Cl, 10 mM HEPES und 1 mM MgCl_2 (pH 7.3 mit CsOH). [3, 196] Mittels Mikromanipulator wurde die Glaspipette jeweils an die zu untersuchende Zelle herangefahren. [3, 199] Verwendet wurden Glaspipetten mit einem Widerstand von 1.6 – 5.0 M Ω . [3, 20] Diese Patchpipetten wurden mittels Mikropipetten-Zuggerrät (Puller) (Harvard Apparatus, USA) aus Borosilikatglaskapillaren präpariert (64-0792, Harvard Apparatus). [3, 196] Die zu einer feinen Spitze ausgezogenen Kapillaren wurden dann durch Heranfahren an einen Heizdraht eines MF-830-Microforge-Gerätes (Narishige, Japan) so poliert, dass die Kapillaren eine glattwandige Öffnung von ca. 1 μm aufwiesen. [3, 196] Angefüllt wurde die Glaspipetten mit einer Pufferlösung aus 135 mM CsCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Cs-EGTA sowie 4

mM ATP-Na₂ (pH 7.3 mit CsOH). [3, 196] In dieser Pipettenlösung wird der chloridierte Messdraht getaucht, der die Ströme an den Verstärker weiterleitet. [3, 199] Dann wird die gläsernde Mikropipette auf den Mikromanipulator geschraubt und mit Hilfe des Stereomikroskops senkrecht an die Versuchszelle herangefahren. [3, 199] Der Kontakt zwischen Glaspipette und Zellmembran wurde an Schwankungen des Membranpotentials erkannt. [3, 199] Durch Verwendung eines entsprechenden Unterdrucks wurde die enge Verbindung von Glaspipette und Zellmembran hergestellt, die einen elektrischen Widerstand von mehreren Gigaohm hat. [3, 199] Diese Verbindung wird *giga seal* genannt. [3, 199] Durch erneute vorsichtige Erzeugung eines Unterdruckes zwischen Glaskapillare und Zellmembran wurde zunächst die Plasmamembran leicht in die Öffnung der Glaspipette hineingesaugt und dann durch weiteren Unterdruck eine Perforation in diesem hineingesaugten Teil der Plasmamembran erzeugt. [3, 199] Hierdurch entstand ein Flüssigkeitskontinuum zwischen Zytoplasma der Versuchszelle und Pipettenlösung mit Messdraht. [3, 199] Diese Versuchsanordnung entspricht der Ganzzellenkonfiguration des Patch-Clamp-Verfahrens. [3, 199] Stets erfolgten Spannungskorrekturen aufgrund der entstehenden Flüssigkeitsübergangspotentiale, korrigiert wurde je um 9.3 mV. [3, 196, 200] Die Subtraktion der Leckströme erfolgte je nach entsprechendem Messprotokoll - online (P/4-Protokoll, Aktivierungskurven) oder offline (für die 5-Sekunden-Stimulierungspulse, die Inaktivierungsprotokolle im *steady state* sowie für die pharmakologischen Messungen). [3, 196]

7.6.1 Berechnung der spannungsabhängigen Aktivierung

Für die spannungsabhängige Aktivierung wurden die Ca²⁺-Ionenströme im Ganzzellenmodus der Patch-Clamp-Versuchsanordnung gemessen. [3, 199] Die spannungsabhängige Aktivierung der Ca²⁺-Ströme wurde bestimmt durch Korrelation des maximalen Stromwertes bei -109.3 mV bzw. bei -139.3 mV mit Strommessungen nach gestaffelten Rechteck-Stimulationspulsen (*voltage clamp*), die je eine Dauer von 30 ms hatten. [3] Diese Stimulationspulse erfolgten in 5 mV Schritten (Δ 5 mV). [3]

Die Strom-Spannungskurven (I/V) wurde mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung nach der Form

$$I = G_{max} * (V - V_{Rev}) / (1 + e^{-(V - V_{0.5,akt})/k_{akt}})$$

modelliert. [3, 199] G_{max} entspricht der maximalen Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen bei einem entsprechenden Membranpotential (V). [3, 199] V_{Rev} entspricht dem extrapolierten Umkehrpotential (auch Nernst-Potential oder Equilibriumspotential), $V_{0.5,akt}$ entspricht der Spannung, bei der 50 % der max. Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen vorliegen oder die Hälfte der $Ca_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanäle aktiviert sind. [3, 199] k_{akt} entspricht dem Steigungsfaktor der Aktivierungskurve. [3, 199] Durch diese Kurven konnten Aktivierungsschwelle und Steigung der Kurven errechnet werden. [3, 199]

Die Leitfähigkeit (G) kann aus Strom und Spannung errechnet werden, es gilt:

$$G = (-I * 1000) / (V_{Rev} - V). [3, 199]$$

Aufgrund der Beziehung von Leitfähigkeit und Spannung konnte folgende modifizierte Boltzmann-Gleichung für die Modellierung der Leitfähigkeit angewendet werden:

$$G = G_{max} / (1 + e^{-(V - V_{0.5,akt})/k_{akt}}). [3, 199]$$

Zur Errechnung der Stromdichten erfolgte eine Normierung der maximalen Einwärtsströme bezogen auf die Zellgröße (Membrankapazität, in pF). [3, 199] Hieraus resultiert die Dimension (pA/pF), die unter anderem für die Darstellung weitere Parameter (s.u.) verwendet wurde. [3, 199] Diese Normalisierung dient der besseren Vergleichbarkeit der Stromwerte. [3, 199]

7.6.2 Berechnung der Inaktivierungskinetik

Zunächst wurde die Inaktivierungskinetik außerhalb des *steady states* bestimmt, indem diejenige Spannung, die zur maximalen Stromamplitude des Einwärts- Ca^{2+} -Stromes führte, für

5 Sekunden ausgehend vom Haltepotential an die Messzellen angelegt wurde. [3] Zu den Zeitpunkten 100 ms, 250 ms, 500 ms, 1000 ms oder 5000 ms erfolgte jeweils die Messung der Stromamplitude. [3] Die Stromamplituden zu diesen Zeitpunkten wurden mit der maximalen Stromamplitude des Einwärtsstroms verglichen und in Prozent des Spitzenstromes ausgegeben. [3]

Des Weiteren wurde die Inaktivierungskinetik als Inaktivierung im *steady state* bestimmt. [3, 199] Durch die Messung des Ionenstromes während der Inaktivierung im *steady state*, kann der Anteil der inaktivierten Kanäle bei unterschiedlichen vergebenen Spannungen gemessen werden. [199] Hieraus ergibt sich somit die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung im *steady state*. [3, 199] Diese Bestimmung im *steady state* wurde gewählt, da die Inaktivierung von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen im Vergleich zu anderen Ionenkanälen eher langsamer abläuft und daher Aussagen über den Spitzenstrom weniger relevant sind. [3, 199] Die Bestimmung der Inaktivierungskinetik erfolgte durch Messung der Einwärtsströme ausgehend von Haltemembranpotentialen von -109.3 mV oder -139.3 mV nach Stimulation der Zellen durch unterschiedliche Spannungen (*voltage clamp*). [3] Zunächst wurden die Zellen für 20 ms mit V_{\max} stimuliert, V_{\max} entspricht dabei derjenigen Membranspannung bei der die Zellen maximal aktiviert werden; dann erfolgten 5-sekündige Stimulationspulse mit Konditionierungsspannungen zwischen -100 mV und +20 mV. Diese Konditionierungsspannungen wurden ausgehend vom Haltepotential schrittweise um 10 mV ($\Delta 10$ mV) pro automatisiertem Messdurchgang (*sweep*) gesteigert, mit einer Pause von 30 s zwischen den einzelnen *sweeps*. Nach der Konditionierung erfolgte erneut die Anlage von V_{\max} als Testspannung für 20 ms. [3, 21, 31] I entspricht den Stromamplituden nach Testpulsen nach der Konditionierungsphase; I_{\max} entspricht dem maximal gemessenen Strom, hier entspricht I_{\max} näherungsweise der maximalen Leitfähigkeit der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle bei der initial angelegten Kontrollspannung (V_{\max}). [3]

Die gemessenen Ströme (I) nach Anlegung der Testspannungen wurden auf die Stromamplituden (I_{\max}) nach Anlegung von V_{\max} normalisiert. [199] Es gilt also der Quotient I/I_{\max} . [3] Die Normalisierung bzw. Bildung der Ratio erfolgte, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. [199]

So kann also auf den Anteil inaktivierter Kanäle bei einer bestimmten Spannung rückgeschlossen werden; die Werte des Quotienten I/I_{\max} bewegen sich demzufolge zwischen

0 und 1. [199] Wobei ein Wert der Ratio I/I_{max} nahe 0 eine starke Inaktivierung anzeigt; ein Wert nahe 1 zeigt an, dass kaum inaktivierte $Ca_v1.3-Ca^{2+}$ -Kanäle vorliegen und die Leitfähigkeit für Ca^{2+} entsprechend hoch ist. [199]

Für die Inaktivierungskurve im *steady state* wurde folgende adaptierte Boltzmann-Gleichung für die Modellierung der Rohdaten verwendet, um die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung im *steady state* zu beschreiben:

$$I = (1 - I_{steady\ state}) / (1 + e^{(V - V_{0.5, inakt}) / k_{inakt}}) + I_{steady\ state} \quad [3, 199]$$

Hierbei gelten folgende Definitionen: I : Anteil des Reststroms während der Inaktivierung aufgrund nicht inaktiverter Kanäle im *steady state*, V : Membranspannung, $V_{0.5, inakt}$: diejenige Membranspannung bei der die Fraktionen der inaktivierten und nicht-inaktivierten Kanäle gleich groß sind, k_{inakt} : Steigungsfaktor der Inaktivierungskurve). [3, 199]

Mittels dieser Funktion kann eine typische sigmoidale Kurve für die Inaktivierung im *steady state* errechnet werden. [3, 199]

7.6.3 Darstellung des Hintergrund- Ca^{2+} -Einstroms (*window current*)

Der *window current* (I_{window}) bezeichnet den trotz inaktivierender Ionenkanäle anhaltenden Strom (*current*), der in einem bestimmten Spannungsbereich oder auch Spannungsfenster (*window*) der Zellmembran im *steady state* von Aktivierung und Inaktivierung (siehe Kapitel 2.5.2) gemessen werden kann. [201-204] Dieses Strom resultiert aus der Tatsache, dass in diesem Spannungsbereich eine Fraktion von Ionenkanälen nicht inaktiviert und beispielweise weiterhin Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen. [205]

Da eine direkte Messung der *window currents* kompliziert ist, erfolgt häufig eine indirekte Darstellung: Der *window current* kann näherungsweise durch Übereinanderlegen der Kurven der spannungsabhängigen Aktivierung und Inaktivierung im *steady state* veranschaulicht

werden. [203, 205-207] Hierdurch wird das Spannungsfenster dargestellt, in dem der *window current* gemessen werden kann. [205] Das Spannungsfenster des *window currents* wird u.a. durch die Steigung dieser beiden Kurven definiert. [204, 205] Je stärker Aktivierungskurve und Inaktivierungskurve überlappen, desto höher der angenommene Wert des *window currents*. [205] Der *window current* wird im Fall dieser Arbeit entsprechend durch $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle in aktivierten offenen und inaktivierten Zuständen während des *steady states* bedingt. [3]

Bei den Messversuchen ist der *window current* zum einen proportional zum Anteil der aktivierbaren Kanäle im *steady state* nach Applikation einer Konditionierungsspannung (ΔV) für eine ausreichende Dauer. [205] Zum anderen ist der *window current* proportional zur gemittelten Stromdichte (*current density*) im *steady state* in (pA/pF). [3] Daher kann der *window current* näherungsweise als Produkt des Anteils der Inaktivierung im *steady state* bei einer bestimmten Membranspannung (ΔV) und der Stromdichte bei dieser Membranspannung (ΔV) errechnet werden. [3] Der *window current* ist damit ein Maß für denjenigen Strom während eines experimentellen Spannungspulses, der trotz der spannungsabhängigen Inaktivierung im *steady state* fließt. [201-204]

Die Stromdichte, die üblicherweise als Strom in Ampere (A) pro Fläche in Quadratmeter (m^2) angegeben wird, wurde einer Konvention bei elektrophysiologischen Patch-Clamp-Untersuchungen von Ionenkanälen in Ganzzellenkonfiguration folgend, indirekt auf die Flächeneinheit bzw. Größe der Zelle bezogen: Der Strom in pA wird auf die elektrische Kapazität der Zellmembran in pF bezogen. [3, 208] Denn größere Zellen haben eine größere Membrankapazität und vice versa. [209] Hieraus resultiert die Einheit (pA/pF) für die spezifische Stromdichte in diesem Kontext. [3, 208] Der Strom I_{window} in pA wird in diesem Fall auf die Membrankapazität der Zelle in pF normalisiert, dies erhöht die Vergleichbarkeit der Werte zwischen unterschiedlichen Messzellen oder elektrophysiologischen Versuchen. [3, 209]

7.6.4 Berechnung der Deaktivierungskinetik, die Bestimmung von Nachströmen (*tail currents*)

Die Deaktivierungskinetik wurde durch Messung spezifischer Nachströme oder Spätströme (*tail currents*) bestimmt. [3, 21, 52, 210] Diese *tail currents* wurden visualisiert durch die Auftragung der Inaktivierungskinetik gegen die Zeit. [3] Die *tail currents* entstehen als Nachströme am Ende dieser Kurve, wenn die Fraktion nicht-inaktivierter geöffneter Kanäle nach der Inaktivierungsphase in den geschlossenen Kanalzustand übergehen. [21] Die Deaktivierung wiederum ist Voraussetzung dafür, dass der Kanal wieder aktivierbar und für Ca^{2+} -Ionen geöffnet ist. [21, 198, 210] Die *tail currents* sind zum einen durch die Größe der Fraktion nicht-inaktivierter Kanäle, zum anderen vom Prozess der Kanaldeaktivierung, z.B. der Konformitätsänderung der Kanäle beim Übergang in den geschlossenen Zustand, bestimmt. [21] Mit Hilfe der *tail currents* wurde Informationen über die Kanaldeaktivierung gewonnen, d.h. über den Konformationswechsel in den geschlossenen Kanalzustand. [198]

Die Zellen wurden hierfür zunächst für 30 ms bis zum Umkehrpotential (V_{rev}) depolarisiert. [3, 21, 31] Anschließend erfolgte eine Repolarisierung auf festgelegte Testpotentiale in 10 mV Schritten ($\Delta 10 \text{ mV}$) bis zum Haltepotential (V_{Halt}) von -109.3 mV. [3, 21, 31] Gemessen wurde bei jedem Testpotential der entstehende Strom bei WT und G1169D-Variante, diese Ströme entsprechen den *tail currents*. [3, 31]

Aufgrund der ausgeprägten Verzögerung der Kinetik der *tail currents* bei der G1169D-Variante, erfolgten die Messungen mit verlängerten Repolarisierungspulsen (40 ms) [3, 21] Um eine Vergleichbarkeit der Daten der Messungen der *tail currents* von WT und G1169D-Variante zu erreichen, wurden die gemessenen Stromwerte der *tail currents* auf die Fläche unter der Kurve der maximalen *tail currents* (*area under the curve*, **AUC**) des jeweiligen Messdurchgangs (*sweep*) normalisiert. [3] Experimentelle Messdaten der *tail currents* können in der Regel durch Exponentialfunktionen mit einem Exponenten beschrieben werden. [3, 31, 211] Hierdurch können u.a. Zeitkonstanten wie die Aktivierungszeitkonstante (τ_{act}) oder die Deaktivierungszeitkonstante τ_{deact} errechnet werden. [211] Aufgrund der verzögerten Kinetik der G1169D-Variante war eine Verwendung dieser Zeitkonstanten nicht möglich. [211] Bestimmt wurde zudem die *AUC* unter den Kurven der *tail currents* während der 40 ms dauernden Repolarisationstestpulse. Für den Vergleich dieser *tail currents* erfolgte die

Errechnung des jeweiligen Integrals über die Stimulationsdauer von 40 ms der Stromkurven der *tail currents* von WT und G1169D-Variante; diese Integrale wurden entsprechend auf die Integrale der maximalen Stromkurven bei jedem Testpotential normalisiert. [3]

7.7 Pharmakologische Untersuchungsmethoden

Für die pharmakologischen Untersuchungen erfolgten Messungen an Zellen 3 unterschiedlicher Transfektionsdurchgänge. [31] Die tsA201-Zellen wurden mit 100 ms andauernden Plateaupulsen schrittweise bis zu derjenigen Spannung (V_{\max}) stimuliert, die den maximalen Einwärtsstrom bedingte. [3, 31, 212] Die Stimulationsfrequenz betrug 0.1 Hz, das Haltepotential wurde bei -89.3 mV angelegt. [212] Das Pharmakon Isradipin wurde an die Zellen mittels eines Luftdruck-Perfusions-Systems (BPS-8 Value Control System, ALA Scientific Instruments) gespült. [3, 212] Es wurde eine 15 nM Ca^{2+} -Badlösung verwendet, die je nach Versuch mit oder ohne Isradipin (Sigma Aldrich, D8418) versetzt war. [212] Die Perfusion erfolgte mit einer Rate von ca. 350 $\mu\text{l}/\text{min}$. [3, 212] Isradipin wurde im aprotischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid gelöst und als Stocklösung bei -20 °C gelagert. [31, 213] An jedem Messtag wurden die Isradipin-Stocklösung in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt, in die Badlösung perfundiert, und es erfolgten die Messungen nach obengenannten Messplan, zusätzlich erfolgten analog hierzu Kontrollmessungen mit Badlösung ohne Isradipin unter Verwendung der gleichen Messmaterialien, die später für Isradipin-Versuche verwendet wurden. [31, 212] Bevor das Pharmakon perfundiert wurde, erfolgten mindestens 3 Kontrolldurchgänge (*control sweeps*) mit Badlösung ohne Isradipin. [3, 31, 212] Es wurden 2 Messgruppen gebildet, für die erste erfolgte eine kumulative Perfusion von 30 nM Isradipin, für die zweite von 100 nM Isradipin. [212] Die Werte durch Isradipin- Ca^{2+} -Kanalinhibition wurden um den linearen Stromverlust (*current decay*) korrigiert; um den Wert dieser Störgröße zu ermitteln, wurde der Stromverlust bei nicht-inhibierten Kontrollzellen bestimmt. [3, 31]

7.8 Statistische Untersuchungsmethoden

Eine statistische Untersuchung zur Bestimmung des p-Wertes erfolgte mittels t-Test für normalverteilte ungepaarte Stichproben. [3, 214] Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, erfolgte das statistische Testen mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (*two-way analysis of variance, two-way ANOVA*). [31, 212] Als *post hoc* Test wurde die Šídák-Korrektur verwendet, um für multiples Testen zu adjustieren. [3, 212] Für nicht normal-verteilte Stichproben erfolgte die Bestimmung mittels des Wilcoxon-Rangsummen-Tests. [31] Die Anwendung der Benjamini-Hochberg-Prozedur erfolgte zur Kontrolle der Falscherkennungsrate bei multiplem Testen. [215] Verwendet wurde die Software Prism 9 von GraphPad. [3] Sämtliche Werte wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (standard error of the mean, **SEM**) angegeben. [3, 31] Signifikanzniveaus wurden entsprechend bei 0.05 (*), 0.01 (**), and 0.001 (***) festgelegt. [31]

8 Ergebnisse

8.1 Klinische Ergebnisse

Der Indexpatient, bei dem die G1169D-Variante nachgewiesen wurde, ist ein 3-jähriger Junge. Er wurde gezeugt durch In-Vitro-Fertilisation (IVF) bei mütterlicher Endometriose Grad IV. Die Eltern sind nicht konsanguin. Beide Großelternpaare stammen aus der Türkei und sind ebenfalls nicht konsanguin. Die Familienanamnese ist leer bezüglich anderer neurologischer oder endokrinologischer Erkrankungen bzw. Entwicklungsstörungen. (siehe **Abbildung 6**)

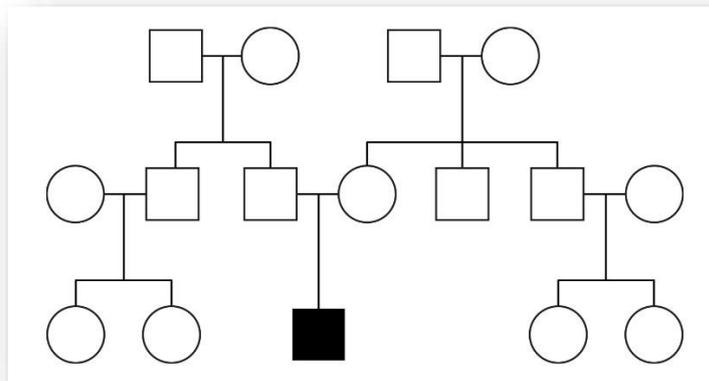


Abbildung 6: Stammbaum: Dargestellt wird der Familienstammbaum bezüglich der Erkrankung des Indexpatienten (schwarzes Quadrat). Keines der in den **Tabellen 5-15** (siehe Kapitel 9.3.7) aufgelisteten Symptome konnte bei anderen Familienmitgliedern anamnestisch detektiert werden. Weibliche Familienmitglieder werden als **Kreise**, männliche als **Quadrate** dargestellt. Abbildung von F. Dannenberg.

Bereits im 2. Trimenon der Schwangerschaft (22 Wochen und 3 Tage) fiel bei dem Kind ein hohes Fruchtgewicht von 631 g (95.2 Perzentile, +1.66 z) geschätzt nach der Hadlock-Methode auf. [216] Zudem zeigte sich zum gleichen Zeitpunkt ein Kopfumfang von 220.9 mm (97.5 Perzentile, +1.84 z) und damit eine Makrozephalie. [217] Die Mutter des Kindes wurde aufgrund einer Schwangerschaftsdepression in den letzten beiden Schwangerschaftsmonaten mit Sertralin behandelt. Im 3. Trimester bemerkte die Mutter erstmals rhythmisch-oszillierende Kindsbewegungen im Sinne eines Tremors, dies konnte durch eine Sonographie bestätigt werden. Das Kind wurde in der 38 + 1 Schwangerschaftswoche termingerecht per

Sectio aus Beckenendlage entbunden. Erhoben wurden Apgar-Werte von 8/8/8 sowie ein Nabelschnur-pH-Wert von 7.21. Bei Geburt fiel das hohe Geburtsgewicht von 4390 g auf (98. Perzentile, +2.04 z). Zudem bestand bereits bei Geburt eine ausgeprägte Makrozephalie mit einem Kopfumfang von 41 cm (> 99. Perzentile, +5.68 z) gemessen am 1. Lebenstag. Bei dem Jungen fielen zudem folgende syndromale Aspekte auf: eine hohe Stirn, tiefsitzende Ohren, eine Mittelgesichtshypoplasie, Mikrostomie, eine Fixation der Hände und Füße in adduzierter Position sowie eine Hypotrophie der distalen Unterschenkel. (siehe **Tabelle 5** in Kapitel 9.3.7) Aufgrund einer postnatalen respiratorischen Insuffizienz wurde der Indexpatient direkt nach der Geburt auf eine Kinderintensivstation verlegt. Eine Röntgendarstellung der Lungen am ersten Lebenstag erbrachte keine pathologischen Befunde. Es wurde eine Atemunterstützung mit kontinuierlichen positiven Beatmungsdrücken (*continuous positive airway pressure*, **CPAP**) initiiert, welche während des Schlafs mittels High-Flow-Nasensonde erfolgte. Ein anhaltender Zwerchfelltremor beeinträchtigte die Atmung insbesondere während der ersten Lebenswochen. Das Kind zeigte zudem einen ausgeprägten Tremor der Zunge, der Gliedmaßen und des Gesichts. Als weitere mögliche Ursachen für die respiratorische Insuffizienz wurden eine globale Muskelhypotonie sowie zentrale Apnoen detektiert. Hierbei kam es während einzelner Apnoeepisoden zu einem Abfall der Sauerstoffsättigung des arteriellen Blutes bis auf eine 70%ige Sauerstoffsättigung. Eine Koffeintherapie führte für die ersten 10 Lebensmonate zur Reduktion der Apnoeepisoden. Die Beatmungstherapie erfolgte intermittierend für die nächsten 24 Monate.

Direkt nach der Geburt wurde eine Fraktur des linken Humerus festgestellt, der klinische Verdacht wurde mittels Sonographie und Röntgendarstellung bestätigt. Hinweise auf eine Knochenerkrankung als Ursache für eine Fraktur bei Entbindung per *Sectio* ergaben sich jedoch nicht.

Das Kind wurde postnatal über eine nasogastrale Sonde ernährt und erhielt anfänglich zusätzlich intravenöse Glukoseinfusionen aufgrund von Schluckbeschwerden und rezidivierenden Hypoglykämien. Kurzzeitig konnte der Junge während des ersten Lebensjahres teilweise mit Fläschchen ernährt werden. In der Folge benötigte der Junge jedoch aufgrund einer anhaltenden Dysphagie mit ausgeprägter Störung der Atem-Schluck-Koordination eine ausschließliche Sondenernährung.

Ultraschalluntersuchungen des intrakraniellen Raumes und des Spinalkanals in der ersten Lebenswoche ergaben unauffällige Befunde. Eine MRT-Darstellung des intrakraniellen

Raumes am 11. Lebenstag erbrachte Hinweise auf kleine akute Subarachnoidalblutungen links occipital und in der linken parafalcinen Region.

Die Ableitung visuell evozierter Potentiale (*visually evoked potentials*, **VEPs**) ergab Hinweise auf eine beidseitige schwere Leitungsstörung der Sehbahnen.

Mittels Hirnstammaudiometrie (*brainstem evoked response audiometry*, **BERA**) konnten bds. Keine Potentiale abgeleitet werden. Auch bei Folgeuntersuchungen konnten keine Potentiale abgeleitet werden, und der Indexpatient erhielt Cochlea-Implantate im Alter von 12 Monaten. Die Messungen der Nervenleitgeschwindigkeiten und von somatosensorisch evozierten Potentialen ergaben keine Hinweise auf Leitungsstörungen.

Durch eine Echokardiographie am 3. Lebenstag wurden bei dem Kind bis auf ein persistierendes Foramen ovale (**PFO**; Durchmesser: 0.4 cm) keine kardialen Auffälligkeiten festgestellt. Dieser unauffällige Befund bestätigte sich im 3. Lebensmonat (PFO-Durchmesser: 0.1 cm; Echo im 11. Lebensmonat: Spontanverschluss des PFOs). Ein EKG in der 1. Lebenswoche ergab Hinweise auf eine grenzwertig hoch-normale QTc-Zeit von 437 ms (normal < 440 ms). Ein EKG über 24 Stunden im 7. Lebensmonat erbrachte keine Hinweise auf eine verlängerte QTc-Zeit oder andere Herzrhythmusstörungen. Während der Neonatalperiode wurde der systolische Blutdruck zwischen der 5. und 10. Perzentile bestimmt. Es traten in den ersten Lebensmonaten keine Elektrolytstörungen auf. Der klinische Verdacht einer abdominalen Lage der Hoden wurde sonographisch bestätigt. Die Abdomensonographie ergab jedoch keine Hinweise auf eine Hyperplasie der Nebennierenrinde oder andere Pathologien. Eine laborchemische Liquoruntersuchung erbrachte eine erhöhte L-Dopa-Konzentration im Liquor (30 nmol/l, normal < 15). Andere Parameter der Routine-Liquordiagnostik, laborchemischer Bluttests, Urinuntersuchungen inklusive erweiterter Diagnostik erbrachten unauffällige Befunde: CMV-Screening, Homocystein-Diagnostik, Profil der Aminosäuren im Plasma, Acyl-Carnitin-Profil, Profil der biogenen Amine, Cathepsin-D-Aktivität, Vitaminbestimmungen (inkl. Holotranscobalamin und Vitamin B12 im Serum als Marker des Vitamin-B12-Status), korrigierte Gesamt-Ca²⁺-Plasmakonzentration, Phosphatplasmakonzentration, Chromosomenanalyse und Mikroarray-basierte komparative genomische Hybridisierung (*array-based comparative genomic hybridization*, **aCGH**) waren insgesamt unauffällig. Zudem wurden die Plasmakonzentrationen von Carnitin, freiem Trijodthyronin (fT3) und freiem Tetrajodthyronin (fT4) innerhalb der altersspezifischen Normen bestimmt.

Der Tremor verstärkte sich insbesondere durch taktile Reize. Daher wurde die Differentialdiagnose Hyperekplexie klinisch abgeklärt: Aufgrund der globalen muskulären Hypotonie, dem Fehlen jeglicher Startle-Reaktion oder nächtlicher Myoklonien wurde eine Hyperekplexie klinisch ausgeschlossen. [95] Ein amplitudenintegriertes EEG (aEEG) wurde in der ersten Lebenswoche abgeleitet, hierbei ergaben sich keine Hinweise auf epileptische Anfallsmuster, ein Burst-Suppressionsmuster oder kortikale Myoklonien. Sowohl im aEEG als auch in weiteren Standard-Video-EEG-Ableitungen mit 21 Elektroden fanden sich zunächst keine Hinweise für EEG-Veränderungen wie epilepsietypische Potentiale, regionale Hirnfunktionsstörungen oder Hinweise auf kortikale Myoklonien oder epileptische Anfälle. In Verlaufs-EEG-Untersuchungen wurde eine Hintergrundaktivität im Deltabereich, zwischen 2-4 Hz detektiert. [218]

Im 3. Lebensmonat berichteten die Eltern des Kindes von einem gehäuften Auftreten von Apnoe-Episoden, die teilweise mit Zyanosen einhergingen. Im EEG zeigte sich hierfür kein eindeutiges Anfallskorrelat. Die Episoden wurden als Atemarreste durch tonische Anfälle gedeutet und eine probatorische antiepileptische Therapie mit Levetiracetam (30 mg/ kg /Tag) wurde zusätzlich zur Koffeintherapie initiiert. Da es zu keiner signifikanten Reduktion der Apnoeepisoden kam, wurde die Therapie nach 8 Wochen wieder beendet.

Für die ersten 2 Lebensjahre des Jungen bestimmten der Tremor, die ausgeprägte globale Entwicklungsstörung, die zahlreichen Apnoe-Episoden, die schwere Beeinträchtigung des Sehens und Hörens sowie die Dysphagie und die globale Muskelhypotonie das klinische Bild. Die Eltern des Kindes berichteten davon, dass der Junge ab dem 6. Lebensmonat trotz schwerer Beeinträchtigung des Sehens Objekten und Gesichtern mit dem Blick folgen konnte. Sie präsentierten zudem Videoaufzeichnungen die dokumentierten, dass das Kind im Kontakt mit den Bezugspersonen lächelte.

Meilenstein der Entwicklung	Normal- population	G1169D- Variante	
	Alter (Monate)	Alter (Monate)	verlorene Fähigkeit (Monat)
Trinken und Schlucken von Flüssigkeit	1	1-2	19
Aufbau erster Interaktionen mit Bezugspersonen	0-1	2-3	19
Erkennung von Gesichtern	1-2	4-6	19
Heben des Kopfes aus Bauchlage	2	nicht erreicht	-
Blick folgt bewegten Objekten	2-3	4-6	19
Willentliches Schließen und Öffnen der Hände	3	nicht erreicht	-
Koordinierte Hand-Mund-Interaktion	1-3	nicht erreicht	-
Drehen von Bauch- in Rückenlage	5-6	nicht erreicht	-
Transferieren von Objekten zwischen Händen	5-6	nicht erreicht	-
Verwendung strukturierter Einzelsilben	5-6	7-8	19
Gestütztes Sitzen	5-6	nicht erreicht	-
Verwendung von Doppelsilben („da-da“, „ba-ba“)	7 - 8	nicht erreicht	-
Freies Sitzen	9-10	nicht erreicht	-
Winken (z.B. beim Verabschieden)	9-10	nicht erreicht	-
Gehaltenes Laufen	11-12	nicht erreicht	-
Äußerung erster Wörter	11-12	nicht erreicht	-
Krabbeln	9-12	nicht erreicht	-
Freies Laufen	13-15	nicht erreicht	-
Verwendung von 2- oder 3-Wort-Sätzen	24	nicht erreicht	-

Tabelle 1: Neurologische Entwicklung und Entwicklungsregression des Patienten mit der G1169G-Variante in den ersten 24 Lebensmonaten im Vergleich zur Normalpopulation. [219, 220] Angegeben ist jeweils das typische Alter für das Erreichen eines Meilensteines der Entwicklung; im Alter von 19 Monaten erkrankte der Indexpatient schwer an einer SARS-CoV-2-Infektion und büßte die genannten Entwicklungsschritte vollständig ein. [219, 220] Tabelle in Anlehnung an Hu et al. und Sheldrick et al. [219, 220] Tabelle von F. Dannenberg.

Im Alter von 19 Lebensmonaten erkrankte der Indexpatient an einer lebensbedrohlichen SARS-CoV-2-Infektion. Das Kind entwickelte eine schwere interstitielle Pneumonie und musste

intensivmedizinisch für 2 Monate betreut werden. Nach einer initialen Phase, während er eine nicht-invasive Atemunterstützung mit positiven Beatmungsdrücken (*noninvasive positive pressure ventilation*, **NIV**) erhielt, musste das Kind für 5 Wochen invasiv über eine Trachealkanüle beatmet werden.

EEG-Ableitungen während des Aufenthaltes auf der Kinderintensivstation ergaben Hinweise auf eine verlangsamte Hintergrundaktivität im niedrigen Delta-Frequenzbereich. Zudem wurden Phasen mit verminderter elektrischer Aktivität (Burst-Suppression-Muster) sowie persistierende steile EEG-Wellen (*sharp waves*) vor allem in den Ableitungen links occipital abgeleitet. (siehe **Abbildung 7** und **8**) In Verlaufs-EEGs konnten zunehmend Sharp-Wave-Konfigurationen mit einer Frequenz von 1-1.5/ s abgeleitet werden. Die Tremorfrequenz betrug weiterhin 10-12 Hz. (siehe **Abbildung 10**)

Daraufhin wurde erneut eine anfallssupprimierende Medikation mit Levetiracetam (30 mg/ kg KG/ Tag) und Clobazam eingeleitet (0.2 mg/ kg KG/ Tag). Da sich während der intensivmedizinischen Behandlung zunehmend eine neurogene Blasenstörung zeigte, wurde eine Medikation mit Oxybutynin (0.07 mg/ kg KG/ Tag) sowie eine regelmäßige Blasenkatheterisierung initiiert. Während dieser Zeit kam es zudem zu einer verminderten Diurese und konsekutiv zu Wassereinlagerungen, sodass eine antidiuretische Therapie mit Torasemid (0.6 mg/ kg KG), Spironolakton (6 mg/ kg KG) und Xipamid (0.8 mg/ kg KG) für mehrere Wochen erfolgte. Zu diesem Zeitpunkt erfolgten eine intraglanduläre Botulinumtoxininjektion in die Glandulae submandibulares zur Therapie der Hypersalivation.



Abbildung 7: EEG 1: Darstellung einer kontinuierlichen generalisierten Funktionsstörung mit diskontinuierlicher Grundaktivität mit generalisierten Episoden von Amplitudensuppression sowie mit *sharp waves* (ETPs) links occipital (**roter Pfeil**). Dargestellt wird ein EEG aufgezeichnet im 19. Lebensmonat des Indexpatienten kurz nach Beginn der schweren SARS-CoV-2-Infektion; bipolare Längsableitung, Patient mit geöffneten Augen. In der Bildmitte ist eine **generalisierte Amplitudensuppression für eine Dauer von > 2 s** in allen Ableitungen gut erkennbar (zwischen den gestrichelten Linien). Abbildung ausgegeben durch EEG-Analyse-Software Polaris.one von Nihon Kohden, bearbeitet von F. Dannenberg.



Abbildung 8: EEG 2: Darstellung einer kontinuierlichen Funktionsstörung mit eingelagerten *sharp waves* (ETPs) links occipital (Ableitung Nummer 4 und 12); *sharp waves* mit einer Frequenz von $1/s$. Standard-EEG aufgezeichnet im 19. Lebensmonat, Patient mit geschlossenen Augen; bipolare Längsableitung. Abbildung ausgegeben durch EEG-Analyse-Software Polaris.one von Nihon Kohden, bearbeitet von F. Dannenberg.



Abbildung 9: Rhythmische Muskelartefakte im EEG: Indirekte Darstellung des Tremors durch Muskelartefakte im EEG. Bipolare Längsableitung im Wachzustand. Dargestellt sind rhythmische Muskelartefakte, die während eines EEGs im 22. Lebensmonat des Indexpatienten aufgezeichnet wurden und dem **hochfrequenten Tremor** (10-12 Hz) entsprechen. Besonders hohe Amplitude finden sich passenderweise bei der links frontalen Ableitungen F7 und der temporalen Ableitung T3. [221] Im EEG-Video ist erkennbar, dass eine Fremdmanipulation am Gesicht des Kindes einige s zuvor den Tremor genau zu diesem Zeitpunkt verstärkte; im EEG-Video zeigte sich entsprechend ein hochfrequentes Zittern des Unterkiefers mit gleicher Frequenz (10-12 Hz). Die dargestellten rhythmischen Muskelartefakte haben keinen direkten Bezug zu der während des EEGs aufgezeichneten **pathologischen verlangsamteten Hintergrundaktivität (Delta-Wellen, 3-4 Hz)**. Abbildung ausgegeben durch EEG-Analyse-Software Polaris.one von Nihon Kohden, bearbeitet von F. Dannenberg.

Nachdem die Beatmung des Jungen deeskaliert werden konnte, wurde er in ein Rehabilitationszentrum verlegt. Die Trachealkanüle wurde *in situ* belassen. In den folgenden Wochen erfolgte eine CPAP-Atemunterstützung vor allem während des Schlafes für durchschnittlich 10 Stunden täglich. Während der 5-monatigen Rehabilitation erfolgte eine schrittweise Entwöhnung bis zur Beendigung der CPAP-Beatmung. Paroxysmale Episoden, die mit Zunahme des Tremors, einer erhöhten Herzfrequenz und Agitiertheit einhergingen wurden zunächst als Weaning-Symptome und auch trotz auffälliger EEG-Befunde

(pathologische Hintergrundaktivität, Burst-Suppression-Muster und persistierende Sharp-Waves) nicht als epileptische Anfälle gewertet. Insgesamt traten diese paroxysmalen Episoden ca. 1-mal/ Woche auf. Die anfallssupprimierende Medikation wurde im Verlauf der Rehabilitation abgesetzt.

Allerdings berichteten die Eltern des Kindes nach der Rehabilitation von einer Zunahme der Frequenz dieser paroxysmalen Episoden. Diese Episoden folgten nun einer festgelegten Sequenz: Initial kam es zu einem anhaltenden Öffnen der Augen und einer Blickdeviation nach rechts sowie zu einer flachen Atmung und einer Zunahme der Herzfrequenz. Darauf folgten wiederholt tonische Extension der Beine und Arme für die Dauer einer Sekunde auf. Die Sequenzen endeten typischerweise mit einem stoßhaften Atmen und wiederholtem Niesen. Nach diesen Sequenzen war der Junge für 30- bis 60-Minuten unruhig. Da diese Episoden im weiteren Verlauf zunahm, erfolgte eine erneute EEG-Diagnostik, inklusive eines LZ-EEGs über 24 Stunden. Hierbei wurde eine Zunahme der Burst-Suppression-Muster sowie der multifokalen *sharp waves* im Sinne epilepsietypischer Potentiale (ETPs) detektiert. (siehe **Abbildungen 7** und **8**) Die Diagnose einer genetischen Epilepsie wurde vergeben. Aufgrund der zusätzlich vorliegenden globalen Entwicklungsstörung und des ausgeprägten elektroklinischen Befundes wurde zudem eine epileptische Enzephalopathie mit globaler neurologischer Entwicklungsstörung (DEE; siehe **Kapitel 1.1**) diagnostiziert. [69, 222] Eine anfallssupprimierende Medikation mit Levetiracetam (30 mg/ kg KG/ Tag), Clobazam (1mg/ kg KG/ Tag) und Perampanel (2,6 mg/ kg KG/ Tag) wurde erneut initiiert, hierunter kam es zu einer deutlichen Reduktion der Anfallsfrequenz.

Die Plasmakonzentrationen von Renin, Aldosteron und der Aldosteron-Renin-Quotient wurden im Alter von 7 Monaten und 26 Monaten innerhalb der altersspezifischen Normen bestimmt.

Allerdings wurde im 24. Lebensmonat eine niedrige Reninplasmakonzentration (3.54 ng/l, normal 6.30 - 149.00) während der oben genannten dreifachen diuretischen Therapie (Torasemid, Spironolakton, Xipamid) bestimmt. Die Aldosteronkonzentration hierbei lag im Normbereich (255 ng/l, normal 52-290). Der Aldosteron-Renin-Quotient dieser Werte ergab einen erhöhten Wert (72.0, normal < 20.0): ein potentieller Hinweis auf einen primären Hyperaldosteronismus. Während des ersten und zweiten Lebensjahres zeigten sich die systolischen und diastolischen Blutwerte innerhalb der altersspezifischen Normen. Und obwohl der Indexpatient unter rezidivierenden Episoden von Hypoglykämien während seines

ersten Lebensjahrs litt, zeigten sich die Plasmainsulinkonzentration, Plasma-C-Peptid und Urin-C-Peptid-Konzentration zu keinem Zeitpunkt erhöht, jedoch erfolgten die Bestimmungen nicht während der initialen hypoglykämischen Phasen.

Bei der Verlaufsuntersuchung im Alter von 37 Monaten litt der Indexpatient weiterhin unter der schweren globalen Entwicklungsstörung, weiterhin traten täglich 1-3 epileptische Anfälle auf. Die Eltern des Kindes berichteten davon, dass das Kind die während der schweren SARS-CoV-2-Infektion verlorenen Fähigkeiten zur Interaktion nicht wiedergewonnen habe, und seither ein vollständiger Entwicklungsstillstand bestünde. In der klinischen Untersuchung konnte das Kind weder Objekte oder Gesichter fixieren, ebenso zeigte es kein soziales Lächeln. (siehe **Tabelle 1**)

8.2 Ein ähnliches klinisches Bild – ein Kind mit der *CACNA1D*-Variante G1169D im Mosaik

Im Rahmen der Recherche zu dieser Studie wurde eine identische Variante in der frei zugänglichen Datenbank für genetische Varianten der Universität Leiden (**LOVD**) identifiziert: Bei dem betroffenen Kind wurde die G1169D-Variante mit einer Allelfrequenz von 17% detektiert. Es erfolgte eine Kontaktaufnahme mit den Wissenschaftler*innen der Fakultät für Humangenetik des Universitätsklinikums von Amsterdam (Amsterdam Universitair Medische Centra), die diese Variante detektierten und in der LOVD publizierten. Die klinischen Daten der Kollegen*innen aus Amsterdam bezüglich dieser Variante lassen sich wie folgt zusammenfassen: Dieser zweite Patient mit der G1169D-Variante mit einer Allelfrequenz von 17 % war zu diesem Zeitpunkt ein 10 Monate alter Junge, der erste Sohn seiner gesunden und nicht konsanguinen weißen niederländischen Eltern. Die Mutter erhielt aufgrund einer schwangerschaftsinduzierten Hypertonie eine Methyldopa-Therapie während der Schwangerschaft. Hinweise auf einen Gestationsdiabetes ergaben sich nicht. Sonographisch bestand der Verdacht auf eine fetale Makrosomie. Die Entbindung erfolgte durch Notfall- Sectio mit 34 + 3 Schwangerschaftswochen aufgrund einer verminderten Herzfrequenzvariabilität in der Kardiotokographie, verminderter Kindsbewegungen sowie

aufgrund eines retrograden Blutflusses der Umbilikalarterien. Der Apgar-Wert nach der 1. Minute betrug 9 Punkte und nach der 5. Minute konnten 10 Punkte vergeben werden. Postnatal zeigten sich eine Makrosomie, das Geburtsgewicht betrug 3865 g (> 99. Perzentile, +3.22 z), sowie eine Makrozephalie, der Kopfumfang betrug 36 cm (> 99. Perzentile, +2.38 z). Postnatal wurde das Kind auf die neonatologische Intensivstation der Universitätsklinik von Amsterdam (Amsterdam Universitair Medische Centra, **UMC**) verlegt. Hier erfolgte eine kontinuierliche Glukoseinfusion aufgrund einer kongenitalen hyperinsulinämischen Hypoglykämie (Plasmainsulin-Konzentration 224 pmol/l, normal 12-96 pmol/l). Echokardiographisch wurde eine linksventrikulär akzentuierte biventrikuläre Hypertrophie des Herzens diagnostiziert. Von erhöhten arteriellen Drücken wurde nicht berichtet. Zudem wurde eine pulmonale Hypertonie detektiert. Abdomensonographisch wurde eine Hepatomegalie festgestellt. Bereits während der Verlegung auf die neonatologische Intensivstation sowie im weiteren Verlauf fiel ein Tremor auch während euglykämischer Stoffwechsellagen auf. Hinweise auf epileptische Anfälle ergaben sich nicht. Eine postnatale kraniale MRT (cMRT) ergab Hinweise auf eine Hirnreifungsstörung mit verminderter kortikaler Gyrierung, in der cMRT-Verlaufskontrolle zeigte sich jedoch eine altersentsprechende Gyrierung, allerdings zeigten sich Hinweise auf eine intraventrikuläre Hämorrhagie Grad 2 sowie auf Läsionen der weißen Substanz, die als Folge der Frühgeburtlichkeit gewertet wurden. Bis auf retroaurikuläre Falten zeigten sich keine Dysmorphiezeichen. Das Kind wurde während der ersten Wochen durch kontinuierliche Ernährungstherapie und zusätzliche Glukoseinfusionen versorgt. Initial erfolgte eine Diazoxidtherapie der Hypoglykämien sowie eine Hydrochlorothiazidtherapie der pulmonalen Hypertonie. Die Diazoxidtherapie wurde aufgrund fehlender Wirkung beendet, bei anhaltender pulmonaler Hypertonie wurde die Therapie mit Lanreotid und Octreotid ersetzt. Es erfolgte eine umfassende genetische Diagnostik: Im Amsterdamer UMC Labor für Genom Diagnostik wurde unter anderem eine Exomsequenzierung veranlasst. Hierbei wurde die *CACNA1D*-Variante (c.3506G>A p.(Gly1169Asp) in NM_000720.3; G1169D) mit einer Allelfrequenz der Variante von 17% detektiert. Eine Segregationsanalyse der Eltern wurde durchgeführt: Bei beiden Eltern konnte die *G1169D*-Variante nicht detektiert werden. Die Variante wurde daher als am ehesten postzygotisch entstandene *de novo* Variante gewertet. Aufgrund der geringen Allelfrequenz von 17 % wurde ein genetisches Mosaik als wahrscheinlich angenommen. Aufgrund der publizierten *CACNA1D*-Varianten, bei denen ein primärer Hyperaldosteronismus beschrieben

wurde, erfolgten im Alter von 2 Monaten Bestimmungen der Plasmaaldosteronkonzentration, der Plasmareninkonzentration sowie des Aldosteron-Renin-Quotienten: Diese Werte zeigten sich insgesamt unauffällig. Mit 2 Monaten konnte das Kind in die Häuslichkeit entlassen werden. Im Alter von 10 Monaten erfolgten Lanreotid-Injektionen 1-mal pro Monat und eine Sondierung der Nahrung, hierdurch konnten relevante Hypoglykämien vermieden werden. Bei dem Kind bestanden zu diesem Zeitpunkt eine milde motorische Entwicklungsstörung sowie eine muskuläre Rumpfhypotonie.

8.3 Genetische Untersuchungsergebnisse

Indexpatient (Kind mit G1169D-Variante): Eine Sequenzierung der kodierenden Abschnitte des Genoms (*whole exome sequencing*, **WES**) des Kindes ergab eine Variante des *CACNA1D*-Gens (c.3506G>A, NM_000720.4; p.Gly1169Asp, *G1169D*). (siehe **Abbildung 1**) Beim Indexpatienten wurde in 37% der ausgelesenen Einzelsequenzierungsreaktionen (*reads*) die *G1169D*-Variante detektiert. Diese Variante konnte bei den Eltern nicht gefunden werden. Die *G1169D*-Variante ist nicht in den genetischen Datenbanken ClinVar oder gnomAD auffindbar, allerdings wurde eine weitere Variante in der Leiden Open Variation Database (LOVD) identifiziert (DB-ID *CACNA1D_000160*). (siehe **nächster Absatz**). Die Mutation des Indexpatienten betrifft einen evolutionär hochkonservierten Glycin-Rest der $\alpha 1$ -D-Untereinheit des $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanals. (siehe **Abbildung 1**) Dieser Glycin-Rest ist direkt am Übergang der transmembranösen Helix 6 von *repeat* III und dem zytoplasmatischen Verbindungsglied (Linker) zu *repeat* IV positioniert. (siehe **Abbildung 1**) Durch die Mutation kommt es bei der *G1169D*-Variante zu einem Austausch der ungeladenen Aminosäure Glycin durch die negativ geladene Aminosäure Asparaginsäure. Von Prädiktionsprogrammen für die Pathogenität einer genetischen Variante wie Mutation Taster, fathmm, Mutation Assesor, SIFT, fathmm-MKL coding, LRT und PROVEAN wurde die *G1169D*-Variante als pathologisch gewertet. Beim Indexpatienten wurden keine weiteren genetischen Varianten gefunden, die ursächlich für den distinkten Phänotyp sein könnten.

Kind mit G1169D-Variante im Mosaik: Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits gezeigt, wurde bei diesem Kind die *CACNA1D*-Variante mit einer geringeren Allelfrequenz als beim Indexpatienten Allelfrequenz (17% versus 37% beim Indexpatienten) in der LOVD publiziert (DB-ID *CACNA1D_000160*). Daher wird bei diesem Kind a.e. vom Vorliegen der G1169D-Variante im Mosaik ausgegangen. In Absprache mit den Kollegen*innen der Fakultät für Humangenetik der Universitätsklinik von Amsterdam, die diese Variante detektierten und in der LOVD publizierten, erfolgte eine Reevaluation der Pathogenität der LOVD-G1169D-Variante. Der Phänotyp dieses Kindes zeichnet sich durch postnatalen Tremor auch im euglykämischen Zustand, Makrozephalie, Makrosomie, postnatale Hypoglykämien, pulmonale Hypertonie, biventrikuläre Hypertrophie und eine motorische Entwicklungsstörung aus. Im Vergleich zum Kind mit der G1169D-Variante zeigte sich ein weniger schwerer Erkrankungsverlauf.

8.4 Biophysikalische und pharmakologische Charakterisierung von humanen $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen der G1169D-Variante im Vergleich zum Wildtyp (WT)

8.4.1 Ergebnisse aus der Bestimmung der Aktivierungskinetik

Die Untersuchung der gemessenen und normalisierten Einwärts- Ca^{2+} -Ströme in mit WT oder G1169D-Variante transfizierten tsA201-Zellen ergab bei allen angelegten Testspannungen (ΔV) ausgehend von einem Membranhaltpotential von -109.3 mV signifikante Unterschiede ($p < 0.001$). [3, 31] (siehe **Abbildung 11**) Die Messdaten der Einwärtsströme über der angelegten Spannung wurden zusätzlich zur Normalisierung (G/G_{max}) mit der Boltzmann-Funktion modelliert, hieraus resultiert die in **Abbildung 10** gezeigte sigmoidale Aktivierungskurve. [3, 31] Die Aktivierungskurve der G1169D-Variante ist im Vergleich zum WT um ca. 35 mV nach links - zu negativeren Membranpotentialen - verschoben. [3, 31] (siehe **Abbildung 10**) Im Vergleich zum WT liegt bei der G1169D-Variante eine Aktivierung im hyperpolarisierten Bereich vor; $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle der G1169D-Variante aktivieren damit bei elektrischen

Potentialen nahe des Ruhemembranpotentials vieler Neurone und aktivierbarer Zellen. [223]
 Beim WT hingegen öffnen die Kanäle erst nach deutlich stärkerer Depolarisation.

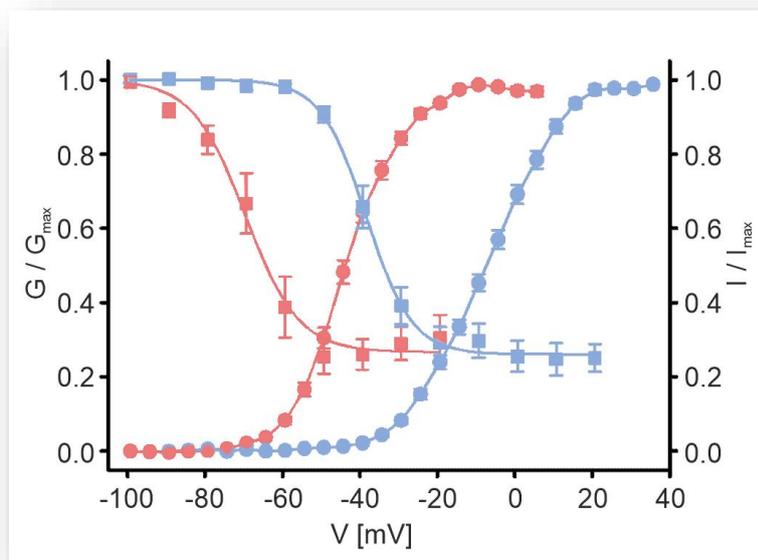


Abbildung 10: Aktivierungs- und Inaktivierungskurven: Darstellung der spannungsabhängigen Aktivierung der $\text{Ca}_v1.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanäle von WT und G1169D-Variante: Die Aktivierung ist das Verhältnis aus der Leitfähigkeit G - normalisiert auf G_{max} (G/G_{max}) - und den jeweiligen Testspannungen (ΔV). [3, 31] Die Werte wurden mittels Patch-Clamp-Technik in der Ganzzellen-Konfiguration bestimmt. Die sigmoidalen Aktivierungskurven von G1169D-Variante (**rote Kreise**) sowie des WT (**blaue Kreise**) wurden mittels modifizierter Boltzmann-Gleichung modelliert. [3, 31] Bei der G1169D-Variante kommt es zu einer Linksverschiebung der Kurve der spannungsabhängigen Aktivierung um ca. 35 mV hin zu negativeren Membranpotentialen. Sämtliche Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Aktivierungskurve der G1169D-Variante hat zudem einen steileren Verlauf als beim WT. [3, 31]

Für die Beschreibung der sigmoidalen Kurven der Inaktivierung im steady state der G1169D-Variante (**rote Quadrate**) im Vergleich zum WT (**blaue Quadrate**) siehe Abschnitt 8.4.2. [3, 31] Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Ortner, modifiziert durch F. Dannenberg.

Die stärkere Aktivierbarkeit bei der G1169D-Variante zeigt sich auch im numerischen Vergleich der Parameter $V_{0.5,akt}$ und k_{akt} . [3, 31] Bei der G1169D-Variante kommt es zur halbmaximalen Aktivierung bereits bei -43.6 ± 0.9 mV ($V_{0.5,akt}$) im Vergleich zum WT bei dem erst bei einem positiveren Potential von -7.0 ± 1.0 mV eine halbmaximale Aktivierung bestimmt werden kann ($V_{0.5,akt}$). [3, 31] Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0.001$). Der Steigungsfaktor der Aktivierungskurve (k_{akt}) konnte mit 9.4 ± 0.2 beim WT und 6.6 ± 0.2 bei der G1169D-Variante errechnet werden. [3, 31] Auch dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0.001$). Da k_{akt} im Nenner des Exponenten der Boltzmann-Gleichung steht, bedeutet der signifikant kleinere Wert bei der G1169D-Variante damit eine Zunahme der Steigung der Aktivierungskurve. [3, 31] (siehe **Abbildung 10**) Auch die Bestimmung der Spannung, bei der 5% des maximalen Einwärtsstroms gemessen wurde, unterscheidet sich signifikant zwischen der G1169D-Variante und dem WT ($p < 0.001$). Dieser Punkt der Strom-Spannungskurve wurde als Aktivierungsschwelle (*activation threshold*) definiert, er liegt bei der G1169D-Variante bei -66.9 ± 0.9 mV und beim WT bei -42.8 ± 0.8 mV. [3, 31]

Wird die Aktivierungskinetik ausgehend von einem Haltepotential von -139 mV bestimmt, zeigen sich ebenfalls signifikante Änderungen ($p < 0.001$) der Aktivierungsparameter $V_{0.5,akt}$ und k_{akt} sowie der Aktivierungsschwelle. [3, 31] Die Kinetikparameter der G1169D-Variante bei einem Haltepotential von -139.3 mV sind dabei im Sinne einer Zunahme der Kanalaktivierung verändert, analog zu den Parametern der G1169D-Variante bei dem Haltepotential von -109.3 mV. [3, 31] (siehe **Tabelle 2** und **Abbildung 10**)

Folgende Ergebnisse wurden durch die Analyse der Beziehung von Stromdichte zu unterschiedlichen angelegten Membranspannungen (ΔV) erhoben: Es zeigte sich ausgehend von einem Haltepotential von -139.3 mV ein signifikanter Unterschied der Stromdichte in $\mu A/pF$ zwischen G1169D-Variante und WT ($p=0.0395$). [3, 31] Die Stromdichte wurde bei der G1169D-Variante mit -31.2 ± 5.5 $\mu A/pF$ mehr als doppelt so hoch als beim WT (-14.9 ± 2.4 $\mu A/pF$) bestimmt. [3, 31] Auch beim Haltepotential von -109.3 mV zeigte sich diese Tendenz zu einer höheren Stromdichte bei der G1169D-Variante im Vergleich zum WT; dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0.2407$). [3, 31] (siehe **Tabelle 2**) Eine höhere Stromdichte kann entweder durch eine größere Anzahl aktivierter Kanäle oder durch einen höheren Einwärtsstrom pro $Ca_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanal bedingt sein. [3, 31] Die Stromdichte ist bei der

G1169D-Variante besonders hoch, wenn ein Haltemembranpotential in der Nähe des Ruhemembranpotential von aktivierbaren Zellen gewählt wird. (siehe **Tabelle 2**)

Konstrukt	$V_{0.5,akt}$ [mV]	k_{akt} [mV]	Aktivierungsschwelle [mV]	Stromdichte [pA/pF]	n / N
Haltepotential -109.3 mV					
Ca _v 1.3 WT	-7.0 ± 1.0	9.4 ± 0.2	-42.8 ± 0.9	-13.8 ± 2.5	21 / 4
Ca _v 1.3 G1169D	-43.6 ± 0.9	6.6 ± 0.2	-66.9 ± 0.8	-19.4 ± 4.1	19 / 4
p-Wert	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p=0.2407	
Haltepotential -139.3 mV					
Ca _v 1.3 WT	-7.4 ± 1.1	9.4 ± 0.2	-43.8 ± 1.1	-14.9 ± 2.4	17 / 3
Ca _v 1.3 G1169D	-46.1 ± 0.7	7.1 ± 0.2	-71.1 ± 0.7	-31.2 ± 5.5	31 / 3
p-Wert	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p=0.0395	

Tabelle 2: Spannungsabhängige Aktivierung: Parameter der spannungsabhängigen Aktivierung der Ca_v1.3 Ca²⁺-Kanäle von WT und G1169D-Variante; sämtliche Parameter wurden mittels Patch-Clamp-Technik in der Ganzzellen-Konfiguration bestimmt. [3, 31] Hierzu erfolgte eine transiente Transfektion von tsA201-Zellen mit der α 1-D-Untereinheit der G1169D-Variante bzw. des WT sowie den akzessorischen Untereinheiten β 3 und α 2 δ 1. (Verwendet wurde eine 15 mM Ca²⁺-Lösung mit Ca²⁺ als Ladungsträger). [3, 31] Sämtliche Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Die Bestimmung der p-Werte erfolgte mittels t-Test für normalverteilte ungepaarte Stichproben. $V_{0.5,akt}$: Testspannung bei der es zu einer 50%igen Aktivierung kommt; k_{akt} : Steigungskonstante der durch modifizierte Boltzmann-Gleichung modellierten Aktivierungskurve; Aktivierungsschwelle: Testspannung bei der es zu einem 5%igen Einwärtsstrom in Bezug auf den maximalen Einwärtsstrom kommt; Stromdichte: maximaler Einwärtsstrom, der auf die Zellkapazität normalisiert wurde (pF); n: Anzahl der Messdurchläufe; N: Anzahl der unabhängigen Transfektionen. [3, 31] Tabelle mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Ortner, modifiziert durch F. Dannenberg.

8.4.2 Ergebnisse aus der Bestimmung der Inaktivierungskinetik und der Inaktivierung im *steady state*

Für die Messung der Inaktivierungskinetik, insbesondere der Inaktivierung im *steady state* wurden die normalisierten Einwärts- Ca^{2+} -Ströme in mit WT oder mit der G1169D-Variante transfizierten tsA201-Zellen gemessen. [3, 31] Diese gemessenen spannungsabhängigen Einwärtsströme entsprachen hierbei dem Ionenfluss durch die nicht-inaktivierten $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle trotz lang andauernder Konditionierungsspannungen (ΔV). [3, 31] Die im Folgenden verwendeten Werte entsprechen Mittelwerten \pm SEM.

Die Bestimmung der Inaktivierung im *steady state* erfolgt nach einem Konditionierungsimpuls einer Dauer von 5000 ms. [3, 31] (siehe **Abbildung 10**) Die Messdaten der Einwärtsströme über der angelegten Spannung wurden nach Normalisierung (I/I_{max}) mittels modifizierter Boltzmann-Funktion modelliert: Aus der Modellierung resultiert die in **Abbildung 10** gezeigte sigmoidale Kurve der Inaktivierung im *steady state*, welche im Fall der G1169D-Variante (**rote Quadrate**) im Vergleich zum WT (**blaue Quadrate**) um ca. 35 mV nach links – hin zu negativeren Membranpotentialen – verschoben ist. [3, 31] (siehe **Abbildung 10**)

Im Vergleich zum WT beginnt bei der G1169D-Variante die Inaktivierung bei deutlich negativeren Membranpotentialen. Dies wird auch ersichtlich, wenn bei G1169D-Variante und beim WT die Parameter $V_{0.5, \text{inakt}}$ (Testspannung bei der eine 50%ige Inaktivierung im *steady state* vorliegt) miteinander verglichen werden. [3, 31] Bei einem Haltepotential von -109.3 mV ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0.001$). [3, 31] (siehe **Tabelle 3**) Bei einem Haltemembranpotential von -139.3 mV liegt bei der G1169D-Variante ein beinahe doppelt so niedriger $V_{0.5, \text{inakt}}$ -Wert vor, auch hier besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0.001$). [3, 31] (siehe **Tabelle 3**)

Beim Vergleich von Steigungsfaktoren der Inaktivierungskurve im *steady state* (k_{inakt}) von G1169D-Variante (7.2 ± 0.5 mV) und WT (5.7 ± 0.5 mV) bei einem Haltepotential von -139.3 mV zeigte sich eine nicht signifikante ($p < 0.0568$) Tendenz hin zu geringeren Werten von k_{inakt} bei WT und damit einer stärkeren Steigung der Inaktivierungskurve beim WT. [3, 31] (siehe **Abbildung 10** und **Tabelle 3**)

Die sigmoidale Inaktivierungskurve im *steady state* konvergiert sowohl bei der G1169D-Variante als auch beim WT zu einem Plateau: signifikante Unterschiede ergeben sich hierbei weder bei einem Haltepotential von -109.3 mV noch bei einem von -139.3 mV. [3, 31] (siehe **Tabelle 3** und **Abbildung 10**)

Konstrukt	$V_{0.5, \text{inakt}}$ [mV]	k_{inakt} [mV]	Plateau [%]	n / N
Haltepotential -109.3 mV				
Ca _v 1.3 WT	-38.1 ± 1.9	5.4 ± 0.5	26.1 ± 3.8	6 / 2
Ca _v 1.3 G1169D	-68.7 ± 2.3	5.9 ± 0.4	26.7 ± 4.4	6 / 2
p-Werte	p<0.001	p=0.4735	p=0.9210	
Haltepotential -139.3 mV				
Ca _v 1.3 WT	-35.7 ± 0.9	5.7 ± 0.5	35.3 ± 3.9	7 / 2
Ca _v 1.3 G1169D	-71.8 ± 1.8	7.2 ± 0.5	30.5 ± 6.9	8 / 2
p-Werte	p<0.001	p=0.0568	p=0.5663	

Tabelle 3: Spannungsabhängige Inaktivierung: Parameter der spannungsabhängigen Inaktivierung der Ca_v1.3 Ca²⁺-Kanäle von WT und G1169D-Variante; sämtliche Parameter wurden mittels Patch-Clamp-Technik in der Ganzzellen-Konfiguration bestimmt. [3, 31] Hierzu erfolgte eine transiente Transfektion von tsA201-Zellen mit der α 1-D-Untereinheit der G1169D-Variante (Ca_v1.3 G1169D) bzw. des WT (Ca_v1.3 WT) sowie den akzessorischen Untereinheiten β 3 and α 2 δ 1. (Verwendet wurde eine 15 mM Ca²⁺-Lösung mit Ca²⁺ als Ladungsträger). [3, 31] Sämtliche Werte sind als Mittelwerte + SEM angegeben. Die Bestimmung der p-Werte erfolgte mittels t-Test für normalverteilte ungepaarte Stichproben. $V_{0.5, \text{inakt}}$: Testspannung bei der eine 50%ige Inaktivierung im *steady state* vorliegt; k_{akt} : Steigungskonstante, der durch modifizierte Boltzmann-Gleichung modellierten Inaktivierungskurve; Plateau: Fraktion des nicht-inaktivierenden Stroms; n: Anzahl der Messdurchläufe; N: Anzahl der unabhängigen Transfektionen. [3, 31] Tabelle mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Ortner, modifiziert durch F. Dannenberg.

Bei der Bestimmung der Inaktivierung nach der Zeit wurden die tsA201-Zellen ohne Vorstimulus für 5 s mit V_{max} stimuliert. [3, 31] (siehe **Abbildung 11**)

Die Messungen der Stromamplituden erfolgten ausgehend von einem Membranhaltpotential von -109.3 mV bzw. von -139.3 mV zu definierten Zeitpunkten (100 ms, 250 ms, 500 ms, 1000 ms oder 5000 ms). [3] Beim Vergleich dieser Stromamplituden, angegeben in Prozent des Spitzenstromes, von G1169D-Variante und WT ergaben sich zu allen Messzeitpunkten signifikante Werte. [3] (siehe **Tabelle 4**)

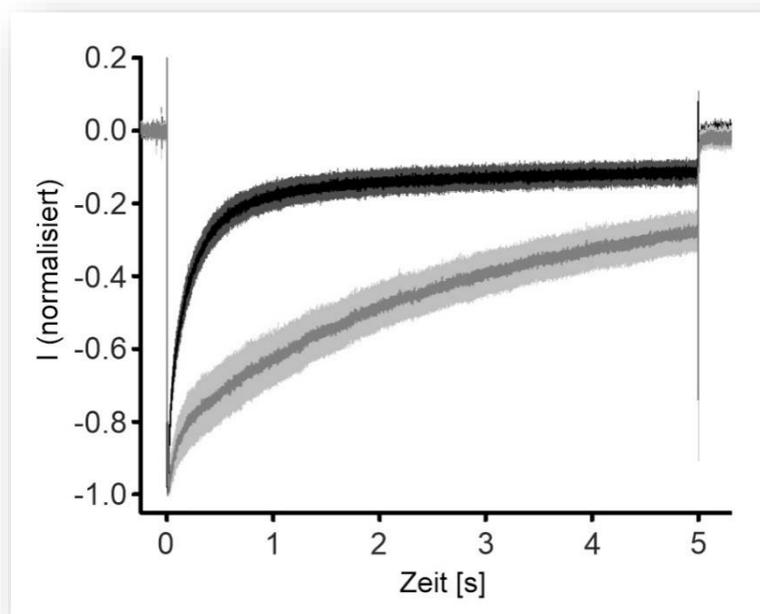


Abbildung 11: Inaktivierung: Inaktivierung der $Ca_v1.3$ Ca^{2+} -Kanäle von WT und G1169D-Variante; dargestellt wird der normalisierte Einstrom (I/I_{max}) während eines 5 Sekunden andauernden Depolarisationspulses mit V_{max} , WT (**schwarz**) und G1169D-Variante (**hellgrau**). [3] Einer Konvention folgend wird I/I_{max} mit einem negativen Vorzeichen angegeben, es handelt sich um einen Einstrom. [3] Beim Wildtyp nähert sich der Wert von I über die Zeit exponentiell, bereits nach den ersten 1000 ms, asymptotisch einem Plateau bei unter 20% von I_{max} an. Bei der G1169D-Variante kommt es zu einem deutlich geringeren Abfall von I/I_{max} . [3] Die Kurve nimmt im Gegensatz zur Kurve beim WT zwischen 1000 ms und 4000 ms nicht exponentiell, sondern näherungsweise linear

ab; bei der letzten Messung nach 5000 ms ist I weiterhin deutlich über 20 % von I_{max} . [3] Nach der Messzeit bzw. Stimulationszeit von 5 Sekunden erfolgt abschließend ein weiterer Stimulationspuls mit V_{max} , damit endet die Stimulation der Zellen. [3] Am Ende der Kurve erscheinen die Nachströme bis zum Erreichen der Nulllinie nach Beendigung der Stimulation. [3] Diese Nachströme entsprechen den *tail currents* und werden weiter unten genauer spezifiziert; ebenso werden die Unterschiede der *tail currents* zwischen WT und G1169D-Variante untersucht. [3] (siehe Absatz 3.5.1.) Angegeben werden gemittelte Stromverlaufskurven (*current traces*). Sämtliche Werte werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Ortner, modifiziert durch F. Dannenberg.

Konstrukt	r100 [%]	r250 [%]	r500 [%]	r1000 [%]	r5000 [%]	n / N
Haltepotential -109.3 mV						
Ca _v 1.3 WT	57.5 \pm 3.4	38.4 \pm 3.6	25.5 \pm 3.3	17.9 \pm 2.8	11.2 \pm 2.2	13/ 4
Ca _v 1.3 G1169D	85.9 \pm 5.3	78.4 \pm 6.7	72.3 \pm 6.9	62.8 \pm 6.3	27.6 \pm 4.2	11/ 2
p-Wert	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p=0.005	
Haltepotential -139.3 mV						
Ca _v 1.3 WT	62.9 \pm 3.5	43.3 \pm 3.6	30.1 \pm 3.5	22.1 \pm 3.7	16.0 \pm 3.9	8/ 2
Ca _v 1.3 G1169D	93.3 \pm 2.6	85.9 \pm 4.0	79.3 \pm 4.7	71.4 \pm 5.2	43.8 \pm 5.4	15/ 2
p-Wert	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p=0.003	

Tabelle 4: Inaktivierungskinetik während eines 5-sekündigen Depolarisierungspulses mit V_{max} : Bezüglich der Messtechnik, der Transfektion, der Ladungsträger gilt das gleiche wie bei **Tabelle 2** und **3**. Ca_v1.3 G1169D: Ca_v1.3 Ca²⁺-Kanäle der G1169D-Variante; Ca_v1.3 WT: Ca_v1.3 Ca²⁺-Kanäle des WT. Die r-Werte geben den Reststrom in Prozent bezogen auf den maximalen Einwärtsstrom zu den definierten Zeitpunkten 100 ms, 250 ms, 500 ms, 1000 ms und 5000 ms an; n: Anzahl der Messdurchläufe; N: Anzahl der unabhängigen Transfektionen. [3] Sämtliche Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Bestimmung der p-Werte erfolgte mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test aufgrund nicht normalverteilter Stichproben, die Anwendung der Benjamini-Hochberg-Prozedur erfolgte zur Kontrolle der Falscherkennungsrate bei multiplem Testen. [3] Tabelle mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Ortner, modifiziert durch F. Dannenberg.

8.4.3 Ergebnisse aus der Bestimmung des konstanten Hintergrund- Ca^{2+} -Einwärtsstroms (*window current*)

Die Unterschiede zwischen G1169D-Variante und WT lassen sich auch durch Bestimmung des konstanten Hintergrund- Ca^{2+} -Einwärtsstroms (*window current*) veranschaulichen. [3, 31, 205, 207] (Siehe **Abbildung 12**)

Die Veränderungen der Inaktivierung im *steady state* sowie der Stromdichte führen bei der G1169D-Variante im Vergleich zum WT zu einem signifikant erhöhten Hintergrund- Ca^{2+} -Einwärtsstrom ($p < 0.001$). Dieser Einwärtsstrom beginnt bei der G1169D-Variante bereits bei ca. 20 mV negativeren Membranpotentialen. [3]

Statistisches Testen erfolgte mittels *two-way ANOVA*. [3] Als *post hoc* Test wurde die Šídák-Korrektur verwendet, um für multiples Testen zu adjustieren. [3, 125]

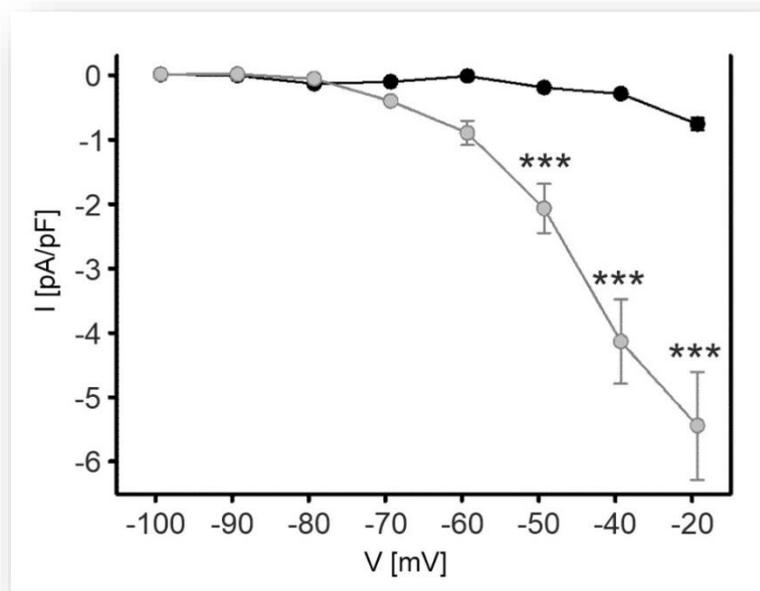


Abbildung 12: Hintergrund- Ca^{2+} -Einstrom: Darstellung des spannungsabhängigen Hintergrund- Ca^{2+} -Einstroms (*window current*) der $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} -Kanäle von WT und G1169D-Variante. Angegeben wird der *window current* I (Einwärtsstrom während der Bestimmung der Inaktivierung *steady state*; siehe **Abschnitt 8.4.2**) mit den Dimensionen (pA/pF) pro veränderter Membranspannung (ΔV). [3, 31] Der *window current* der G1169D-Variante

(**hellgrau**) unterscheidet sich signifikant ($p < 0.001$ für ***) vom WT (**schwarz**); ab einer Membranspannung von -70 mV führt die zunehmende Depolarisierung bei der G1169D-Variante im Vergleich zum WT zu signifikant höheren Absolutwerten des *window currents* I (bei -20 mV > 5-fach höhere Absolutwerte von I bei der G1169D-Variante). [3, 31] Beim WT kommt es insgesamt, auch bei stärkerer Depolarisierung, zu geringen Absolutwerten des *window currents*. [3, 31] Die Werte wurden mittels Patch-Clamp-Technik in der Ganzzellen-Konfiguration bestimmt. Die Werte resultieren aus 6 Messdurchläufen und wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Ortner, modifiziert durch F. Dannenberg.

8.4.4 Ergebnisse aus der Bestimmung der Deaktivierungskinetik

Die Deaktivierung ist die Rückkehr der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanal-Konfiguration zum geschlossenen Zustand während der Repolarisierung. [3, 31] (siehe **Abbildung 5**) Wie bereits oben in **Abbildung 11** gezeigt, wurden durch Strommessungen mittels Patch-Clamp-Verfahren am Ende einer Reihe von Stimulationspulsen (20 ms V_{max} als Kontrollpuls, 5000 ms (ΔV) als Konditionierungspuls, 20 ms V_{max} als Testpuls, siehe **Abschnitt 8.4.2**) charakteristische Nachströme (*tail currents*) erzeugt und gemessen. [3, 31] Diese Ströme wurden während der Repolarisation der Zellen analysiert. [3, 31]

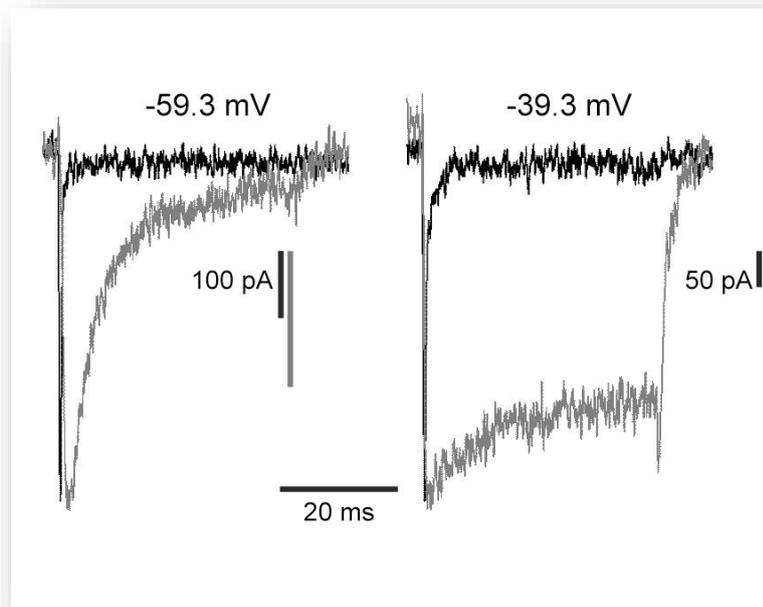


Abbildung 13: Deaktivierung: Bei der G1169D-Variante (**hellgrau**) zeigt sich eine **signifikante Verzögerung der Deaktivierung**: Dargestellt wird die Deaktivierung der Ca_v1.3 Ca²⁺-Kanäle von WT und G1169D-Variante mittels der Messergebnisse charakteristischer Nachströme (*tail currents*) in pA. [3, 31] Untersucht wurden mit WT- und G1169D-Konstrukt transfizierte tsA201-Zellen. Die dargestellten *tail currents* traten während der 40 ms andauernden Repolarisation auf; die Repolarisation erfolgte ausgehend vom Umkehrpotential (V_{rev}) auf ein Testpotential. [3, 31] Einer Konvention folgend werden die *tail currents* als Einwärtsströme mit einem negativen Vorzeichen versehen und entsprechend mit Richtung nach unten im nicht dargestellten Koordinatensystem angegeben. [3, 31] Beispielhaft werden jeweils Einzelaufzeichnungen (current traces) von *tail currents* nach Repolarisation auf ein Testpotential von -59.3 mV bzw. bei -39.3 mV jeweils für die G1169D-Variante (**hellgrau**) und den WT (**schwarz**) gezeigt. [3, 31] Erkennbar ist die deutlich größere AUC der Stromkurve der G1169D-Variante im Vergleich zum WT. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Ortner, modifiziert durch F. Dannenberg.

Die **Abbildung 14** zeigt die *AUCs* der *tail currents* als Säulendiagrammdarstellung für sämtliche Repolarisationspotentiale (Testpotentiale, ΔV) bei der G1169D-Variante (**hellgrau**) und dem WT (**schwarz**). [3] Statistisches Testen erfolgte mittels *two-way ANOVA*. [3] Als *post hoc* Test wurde die Šídák-Korrektur verwendet, um für multiples Testen zu adjustieren. [3] Gezeigt wird, dass bei der G1169D-Variante während der Repolarisierung bis zu einem Potential von -69.3 mV eine signifikant verzögerte Deaktivierung vorliegt. (siehe **Abbildung 15**)

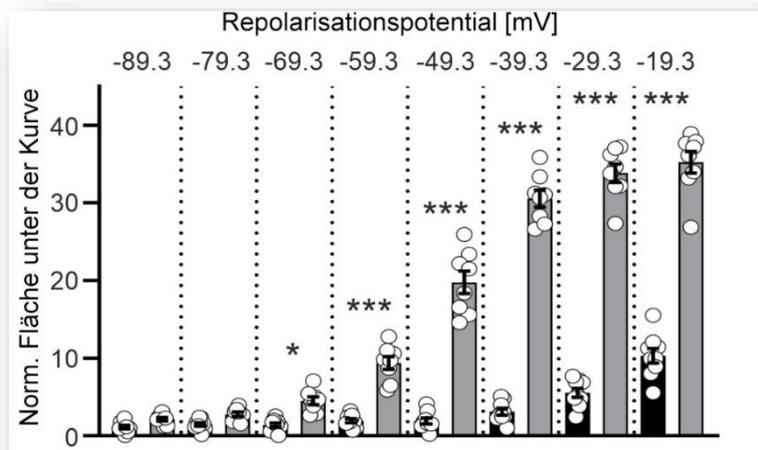


Abbildung 14: Tail Currents: Dargestellt werden die Unterschiede in der Deaktivierung der $\text{Ca}_v1.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanäle bei WT (**schwarz**) und G1169D-Variante (**hellgrau**) anhand der normalisierten Flächen unter den Kurven der *tail currents* (AUCs) während 40 ms andauernder Repolarisationspulse auf die jeweils angegebene Repolarisationsspannung (Testspannung, ΔV). [3, 31] Die Repolarisation erfolgte ausgehend vom Umkehrpotential (V_{rev}) auf (ΔV). [3, 31] Die Flächen der G1169D-Variante (**hellgrau**) sind signifikant größer als beim WT (**schwarz**) gezeigt: $p < 0.001$ (***) bei -19,3 mV, -29.3 mV, -39.3 mV, -49.3 mV und -59.3 mV; $p < 0.05$ (*) bei -69.3 mV. AUCs der G1169D-Variante fallen mit zunehmender Repolarisation rasch ab, sie unterscheiden sich ab einem Repolarisationspotential von -79.3 mV nicht mehr signifikant vom WT. Bezüglich der verwendeten Zellen, Transfektion und Versuchsverfahren gilt das Gleiche wie in vorangegangenen Abbildungen. Sämtliche Werte werden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Ortner, modifiziert durch F. Dannenberg.

8.4.5 Sensitivitätstestung von Isradipin

Getestet wurde die Sensitivität der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle von G1169D-Variante und WT für Isradipin, einen Vertreter aus der Gruppe der DHP- Ca^{2+} -Antagonisten. Die transfizierten tsA201-Zellen wurden mit kumulativen Mengen von 30 nM bzw. and 100 nM Isradipin

umspült. Die Stimulation der Zellen erfolgte je für 100 ms mit V_{\max} ausgehend von einem Haltepotential von -89.3 mV mit einer Frequenz von 0.1 Hz. Die Messung der Ströme in dieser Anordnung erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede der Stromkurven von G1169D-Variante und WT. (siehe **Abbildung 15**, linke Bildseite) Es zeigte sich lediglich eine nicht signifikante Tendenz in Richtung einer stärkeren Hemmung der $Ca_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanäle der G1169D-Variante durch Isradipin. (siehe **Abbildung 15**, rechte Bildseite) Statistisches Testen erfolgte mittels *two-way ANOVA*.

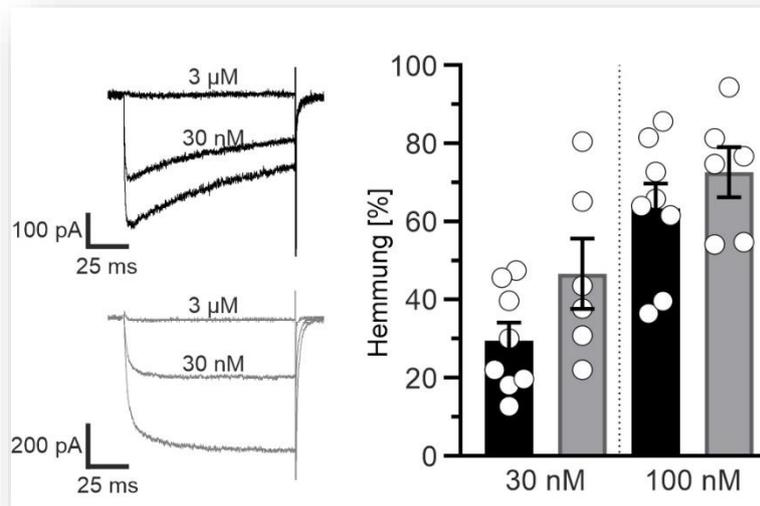


Abbildung 15: Sensitivität für Isradipin: Dargestellt wird die Sensitivität für Isradipin bei der G1169D-Variante (**hellgrau**) und beim WT (**schwarz**). In der linken Bildhälfte sind Einzelstromkurven (*current traces*) während einer 100 ms dauernden Stimulation mit V_{\max} dargestellt, die Ströme in *pA* stellen Einwärtsströme dar. [3] Die unterschiedlichen Stromkurven repräsentieren Messströme bei unterschiedlichen Isradipin-Konzentrationen: Der oberste *current trace* zeigt keinen relevanten Stromfluss (vollständige Blockierung), weder bei WT (**schwarz, obere linke Bildhälfte**) noch bei G1169D-Variante (**hellgrau, untere linke Bildhälfte**); die Isradipin-Konzentration weist mit $3 \mu\text{M}$ das 100-fache der Konzentration während der Messung der dargestellten mittleren Stromkurve (30 nM) auf. [3] Die beiden untersten Kurven zeigen den Kontrollstrom während V_{\max} ohne Isradipin. In der rechten Bildhälfte zeigen die linken Säulen die Hemmung durch eine 30 nM Isradipin-Konzentration bezogen auf den maximalen Strom ohne Isradipinexposition an; die rechten Säulen zeigen bei einer höheren Isradipin-Konzentration (100 nM) die entsprechend stärkere die Hemmung an. [3] Weder bei einer 30 nM Isradipin-Konzentration noch bei einer 100 nM Isradipin-Konzentration ergeben sich zwischen G1169D-Variante (**hellgrau**) und WT (**schwarz**) signifikante Unterschiede. Sämtliche Werte der rechten Bildhälfte werden als

Mittelwerte \pm SEM angegeben. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Ortner, modifiziert durch F. Dannenberg.

8.5 Therapie mit Ca^{2+} -Kanalantagonisten

Ein individueller Heilversuch mit Nifedipin wurde aufgrund der bekannten pharmakologischen Effekte von Nifedipin und der publizierten Effekte von Nifedipin bei der L271H-Variante beim Indexpatienten initiiert. [52, 127] Der erste individuelle Heilversuch des Patienten mit der G1169D-Variante mit Nifedipin startete in seinem 4. Lebensmonat (initiale Dosis betrug 0.5 mg/ kg KG/ Tag, schrittweise Erhöhung auf 3 mg/ kg KG/ Tag in 2 Einzeldosen pro Tag innerhalb von 5 Tagen). Die Therapie musste jedoch aufgrund einer ausgeprägten arteriellen Hypotonie mit einer reflektorischen Tachykardie nach 2 Wochen beendet werden.

Ein zweiter Behandlungsversuch beim gleichen Patienten mit Nifedipin in kontinuierlicher Gabe per nasogastraler Sonde wurde im 22. Lebensmonat des Indexpatienten initiiert. Die Startdosis betrug 0.015 mg/ kg KG/ Tag. Dieses Mal musste der individuelle Heilversuch bereits nach 2 Tagen beendet werden, da es gleichzeitig zu einem starken Anstieg der Leberenzyme kam. Die Transaminasen stiegen auch nach dem sofortigen Ende der Nifedipintherapie noch weiter an: ein 46-fachen Anstieg der Alanin-Aminotransferase wurde am 5. Tag nach Beendigung der Nifedipin-Therapie festgestellt. 2 Monate nach der Therapie konnten sämtliche Leberwerte wieder innerhalb der altersentsprechenden Referenzbereiche gemessen werden. Plasmakonzentrationen der Glutamatdehydrogenase, eines Markers für hepatischen Zellzerfall, und von Bilirubin waren allzeit normwertig.

Retrospektiv, durch erneute Analyse älterer Laborproben und Einholung von Vorbefunden ließ sich bestätigen, dass bereits bei Beginn des Heilversuches die Transaminasen deutlich erhöht gewesen waren und daher die erhöhten Leberwerte weniger wahrscheinlich auf die Nifedipintherapie zurückzuführen waren.

9 Diskussion

9.1 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse

Die klinischen und biophysikalischen Studienergebnisse sprechen für eine Pathogenität der G1169D-Variante im Vergleich zur WT-Variante. [52]

Vor dem Hintergrund der biophysikalischen Ergebnisse aus den Patch-Clamp-Untersuchungen von G1169D-Variante und WT lässt sich das klinische Bild zweier Kinder, die diese Variante als sehr wahrscheinlich als Keimbahnmutation aufweisen, genauer verstehen. [52, 224]

Die Ergebnisse aus den Aktivierungs-, Inaktivierungs- und Deaktivierungsbestimmungen geben Hinweise auf einen Gain-of-Function-Effekt der G1169D-Variante mit ausgeprägten Veränderungen des *gatings* der entsprechenden $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle. Die biophysikalischen Veränderungen der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanal-Aktivierung und -inaktivierung sind die stärksten, die bisher bei einer durch Keimbahnmutation hervorgerufenen dominanten *de novo CACNA1D*-Variante beschrieben wurden. [2, 3, 52] Die Untersuchungsergebnisse unterstützen damit die primären Forschungshypothesen (Gain-of-Function, Korrelation Phänotyp/ Genotyp, Pathogenität der Variante). (siehe **Abschnitt 6.2**) Die besonders stark ausgeprägten Veränderungen des *gatings* der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle der G1169D-Variante stehen mit der Schwere der Erkrankung des Indexpatienten mit Motorphänotyp in Beziehung und könnten eine Erklärung dafür sein, dass das Kind mit der LOVD-G1169D-Variante im Mosaik ein ähnliches aber schwächer ausgeprägtes Krankheitsbild aufweist. [2-4, 52] Auf Grundlage der Korrelation von Genotyp und Phänotyp sowie aus den pharmakologischen Untersuchungen im Zellexperiment erfolgten die individuellen Heilversuche mit Nifedipin bzw. wird der zukünftige individuelle Heilversuch mit Isradipin geplant. [52]

Der Phänotyp dieser neuen *CACNA1D*-Variante zeichnet sich durch den andauernden hochfrequenten Tremor, die epileptische Enzephalopathie mit schwerer globaler Entwicklungsstörung (DEE; siehe **Abschnitt 8.1**) sowie der Taubheit und beinahe Blindheit aus. [2, 3, 52] Bezeichnenderweise ist der Tremor bei der G1169D-Variante so stark ausgeprägt, dass die mit den Indexpatienten schwangere Mutter den Tremor des Kindes bereits während der Schwangerschaft spürte. Für den Indexpatienten mit der G1169D-Variante wird eine sensineuronale Taubheit trotz dem Vorliegen einer dominanten *de novo CACNA1D*-Mutation

beschrieben. [52] Im Rahmen der DEE leidet der Indexpatient an täglichen tonischen, teils zyanotischen, epileptischen Anfällen.

Für das Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik konnten im Gegensatz zum Indexpatienten aber passend zur Differentialdiagnose PASNA-Syndrom eindeutige Hinweise auf transiente hyperinsulinämische Hypoglykämien erbracht werden. [52] Aufgrund phänotypischer Übereinstimmungen zwischen dem Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik und dem Indexpatienten ohne Mosaik sowie der Ergebnisse der biophysikalischen Untersuchungen dieser Studie (siehe **entsprechende Abschnitte vom Kapitel 8**) wurde die G1169D-Variante im Falle des Kindes mit Mosaik von den Kollegen*innen in Amsterdam als wahrscheinlich pathogen gewertet (Klasse 4 des *American College of Medical Genetics and Genomics*). [225]

9.2 Einordnung, Interpretation und Implikationen der elektrophysiologischen Ergebnisse

Bisher wurden dominante heterozygote *de novo* *CACNA1D*-Varianten ausschließlich als pathogen gewertet, wenn klare Hinweise auf einen Gain-of-Function-Effekt vorlagen. [2, 51, 52] Die elektrophysiologischen distinkten Merkmale der G1169D-Variante sprechen für einen solchen Gain-of-Function-Effekt der G1169D-Variante auf die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle: Nicht nur die gemessenen Veränderungen der Aktivierung, sondern auch die Veränderungen der Inaktivierung und Deaktivierung der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle deuten auf einen starken Gain-of-Function-Effekt der G1169D-Variante hin. [2, 3, 31] (siehe **Abbildungen 10-14**)

9.2.1 Gain-of-Function

Während die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle beim WT bei Membranpotentialen zwischen -30 bis -40 mV aktivieren, öffnen die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle der G1169D-Variante bereits bei Potentialen zwischen -60 und -70 mV. [226, 227] (siehe **Abbildung 10**) So kommt es bei der G1169D-Variante unter bestimmten Voraussetzungen kontinuierlich ab einem Membranpotential von -70 mV zu einer Öffnung bzw. einer Aktivierbarkeit von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen. [3]

Eine Linksverschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve wurde auch für andere dominante *de novo* *CACNA1D*-Varianten beschrieben. [205] Durch das Ausmaß der Linksverschiebung um 35 mV kommt dem biophysikalischen Phänotyp der G1169D-Variante damit in der Gruppe der *CACNA1D*-Varianten eine biophysikalisch herausgestellte Position zu. [3] Die stärkere Aktivierbarkeit ist neben dieser Linksverschiebung durch die stärkere Steigung der Kurve der spannungsabhängigen Aktivierung dargestellt, d.h. im Verhältnis zum WT beginnen die Kanäle nicht nur bei negativeren Spannungen zu aktivieren, sondern die Fraktion der aktivierten Kanäle steigt auch schneller an. [21]

Im Gegensatz hierzu könnte die ebenfalls um 35 mV hin zu negativeren Potentialen verschobene Kurve der spannungsabhängigen Inaktivierung im *steady state* eher als ein Loss-of-Function Effekt der G1169D-Variante gedeutet werden. [3] Eine Linksverschiebung dieser Kurve impliziert, dass im Vergleich zum WT bereits früher, d.h. bei negativeren Membranpotentialen, die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle inaktivieren. [228, 229] (siehe **Abbildung 10**) Hieraus würde bei isolierter Betrachtung eine verminderte Ca^{2+} -Leitfähigkeit folgen. [205] Erst bei Betrachtung der Inaktivierung bezogen auf die Zeit sowie einer Betrachtung der Inaktivierung im Kontext mit der Aktivierung (*window currents*) relativiert sich dieser Effekt auf das *gating*. [3]

Zwar kommt es bei der G1169D-Variante zu einer Linksverschiebung der spannungsabhängigen Inaktivierungskurve, jedoch zeigt die Analyse der Inaktivierungskinetik, dass die Inaktivierung bezogen auf die Zeit bei der G1169D-Variante deutlich verzögert ist. [3] (siehe **Abbildung 11**) Insgesamt erhöht sich damit die Wahrscheinlichkeit für aktivierte bzw. aktivierbare $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle bei der G1169D-Variante. [3] Diese Verzögerung der Inaktivierung ist ein weiteres Indiz für einen Gain-of-Function-Effekt. [3]

Wenn die Verschiebung der Inaktivierung im *steady state* gemeinsam mit der gleichsinnig verschobenen Aktivierung betrachtet wird, verdeutlicht sich, dass es als Netto-Effekt zu einer Steigerung der Leitfähigkeit der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle kommt. [3, 31] Diese gemeinsame Betrachtung der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik im *steady state* wird durch die grafische Darstellung des Hintergrund- Ca^{2+} -Einwärtsstroms (*window current*) veranschaulicht. [3, 31, 226] Graphisch können *window currents* als Überlappung der beiden Graphen der Kanalaktivierung und der Kanalaktivierung im *steady state* verstanden werden; somit kann die Darstellung in **Abbildung 12** als ein Derivat der Kurven aus **Abbildung 10** gelesen werden. [3, 31, 203] In dem definierten Spannungsfenster sind sowohl das Aktivierungstor als auch das Inaktivierungstor der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle weiterhin für Ca^{2+} -Ionen geöffnet. [230, 231]

Window currents entsprechen den Ca^{2+} -Strömen, die während eines bestimmten Spannungsfensters als Hintergrund- Ca^{2+} -Einwärtsstrom kontinuierlich in die Zelle fließen. [226] Dieses Spannungsfenster der *window currents* ist bei der G1169D-Variante signifikant erweitert, und die Ströme innerhalb dieses Spannungsfensters sind signifikant stärker. [226] (siehe **Abbildung 12**) Die *window currents* sind demnach die depolarisierenden Nettoströme in pA während der Plateauphase des Aktionspotentials und setzen sich aus oszillierenden Einzelströmen zusammen. [203] Normalisiert wurden diese Ströme auf die elektrische Zellkapazität in pF; *window currents* gemäß ihrer Darstellung in **Abbildung 12** entsprechen damit Stromdichtekurven. [3, 21]

Zuletzt liefert die Analyse der Deaktivierungskinetik ebenfalls Hinweise auf einen Gain-of-Function-Effekt der G1169D-Variante: Hierfür wurden Nachströme (*tail currents*) gemessen, diese *tail currents* entsprechen den Nachströmen während der Repolarisation, die solange fließen bis die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle geschlossen sind. [3, 21] Der Verlauf der Tail-Current-Stromkurven kann u.a. die Exozytose transmitterfreisetzender und endokrin-aktiver Zellen beeinflussen. (siehe **Abschnitt 8.4.4**) [232-236]

Wie in **Abbildung 13** dargestellt, haben diese Nachströme bei der G1169D-Variante einen deutlich verlängerten Stromkurvenverlauf als beim WT. [3, 21] Mit zunehmender Depolarisation nehmen die *tail currents* bei der G1169D-Variante im Vergleich zum WT überproportional zu. [3] Bereits ab einem Membranpotential von ca. -70 mV unterscheiden sich die AUCs der *tail currents* signifikant von denen des WT. [3]

In Zusammenschau legen die elektrophysiologischen Daten zumindest einen *in vitro* Gain-of-Function-Effekt der G1169D-Variante gemäß der Forschungshypothese nahe.

9.2.2 Biophysikalischer Vergleich der dominanten *de novo* CACNA1D-Varianten, Ähnlichkeiten zwischen der G1169D-Variante und der F767S-Variante im Besonderen

Hofer et al. unterscheiden in ihrer Publikation von 2020 eine erste Gruppe von CACNA1D-Varianten, die durch Gain-of-Function allein durch eine reduzierte Inaktivierungskinetik charakterisiert wurde, von einer zweiten Gruppe mit einer Linksverschiebung des gesamten *gatings* (Aktivierung und Inaktivierung im *steady state*). [31, 60, 61, 237] Die G1169D-Variante weist eine kombinierte Veränderung des *gatings* auf und kann daher eindeutig der zweiten Gruppe zugeordnet werden. [4, 31, 60, 61, 237-240]

Von allen bisher biophysikalisch charakterisierten und publizierten CACNA1D-Varianten hat die G1169D-Variante die größten elektrophysiologischen Gemeinsamkeiten mit der F767S-Variante aus der Publikation von Török et al. von 2022. [3] (Zu den klinischen Gemeinsamkeiten beider Varianten, insbesondere dem gemeinsamen Motorphänotyp siehe **Kapitel 4.3**)

Die F767S-Variante führt zu einer ebenfalls ausgeprägten Linksverschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve um 28 mV; diese ist jedoch weniger stark ausgeprägt als die entsprechende Linksverschiebung um 35 mV der G1169D-Variante. [3] (siehe **Abbildung 10**) Die Veränderung der Aktivierung der G1169D-Variante ist die bisher stärkste publizierte Veränderung der Aktivierung von Ca_v1.3-Ca²⁺-Kanälen, gleich an zweiter Stelle folgt die F767S-Variante. [3] Die anderen publizierten *de novo* CACNA1D-Varianten aktivieren erst bei deutlich positiveren Membranpotentialen. [3]

Ähnliches gilt für die Ergebnisse aus der Bestimmung der Inaktivierung im *steady state*: Auch hier weist die F767S-Variante eine Verschiebung der Inaktivierungskurve um 17-23 mV auf. [3] Eine gleichsinnige aber stärkere Verschiebung um 35 mV tritt wie oben gezeigt (siehe

Kapitel 3.3.2) bei der G1169D-Variante auf. [3] Auch in diesem Fall übertrifft damit die G1169D-Variante mit ihrer Linksverschiebung der Inaktivierung im *steady state* die Effekte der F767S-Variante und anderer dominanter *de novo* Varianten. [3] Im Vergleich zwischen G1169D-Variante und F767S-Variante sind zudem die Stromkurvenverläufe der *window currents* von Interesse, die ausgeprägten biophysikalischen Effekte der beiden Varianten auf den Hintergrund-Ca²⁺-Einwärtsstrom können durch die *window currents* veranschaulicht werden. [3] Bei beiden Varianten kommt es zu einer signifikanten Zunahme der *window currents*. [3] Damit kommt es bei der G1169D-Variante und die F767S-Variante zu einer deutlichen Zunahme des intrazellulären Ca²⁺-Angebotes bis hin zur potenziellen Ca²⁺-Überladung der Zellen. (siehe unten **Kapitel 4.2.4**) [3, 241] Bei Membranpotentialen von -40 mV kommt es bei der F767S-Variante zu einem kontinuierlichen Hintergrundeinstrom. [3] Bei der G1169D-Variante beginnt dieser kontinuierliche Ca²⁺-Einstrom bereits bei einem Membranpotential zwischen -70 und -60 mV: Während der Plateauphase der Aktionspotentiale kommt es damit bei beiden Varianten im Vergleich zum WT sowie der anderen charakterisierten *de novo* dominanten Varianten zu einem deutlich erhöhten Ca²⁺-Einstrom, wobei dies bei der G1169D-Variante noch einmal deutlich stärker ausgeprägt ist. [2, 3, 228-231]

Bei einer weiteren *de novo* dominanten *CACNA1D*-Variante, der V401L-Variante, die ebenfalls mit einem schwerbetroffenen Phänotyp korreliert wird, ist ebenfalls eine gleichsinnige Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung gemessen worden. [3] (siehe **Abbildung 1** und **Tabellen 5-15** in Kapitel 9.3.7) Jedoch inaktivieren bei der V401L-Variante die Kanäle rasch, und die Stromdichte in pA/pF nimmt entsprechend schnell ab. [3] Beide Varianten mit Motorphänotyp unterscheiden sich also vor allem neben der starken Linksverschiebung der Aktivierung durch den konstanten Hintergrund-Ca²⁺-Einwärtsstrom während eines breiten Spannungsfensters und der verzögerten Inaktivierungskinetik von der V401L-Variante. [3]

Bei F767S-Variante und G1169D-Variante kommt es zudem zu einer deutlichen Verzögerung der Kanaldeaktivierung. [3] Die Kanaldeaktivierung ist bei beiden Varianten während der Repolarisierungsphase spannungsabhängig verzögert. (siehe **Abbildungen 13** und **14**). Diese Veränderungen der Deaktivierung beider Varianten lassen sich ebenfalls gut im Sinne des Gain-of-Function-Effektes interpretieren [3]

9.2.3 Topographische und funktionale Aspekte der G1169D-Variante

Für das Verständnis des Einflusses der G1169D-Variante auf die biophysikalischen Eigenschaften der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle ist die Kenntnis der räumlichen Proteinstruktur des $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanals hilfreich. [2] (siehe **Abbildung 1**)

Die Ionenkanalpore der $\alpha 1$ -D-Untereinheit wird aus den homologen Helices 5 und 6 aller 4 *repeats* gebildet, die G1169D-Variante, die das Ende von Helix 6 von *repeat* III verändert, führt damit zu einer direkten Strukturänderung der intrazellulären Öffnung der Ionenkanalpore. [2, 52]

Die beiden Indexpatienten der vorliegenden Publikation sind nach aktuellem Wissensstand die ersten Fälle bei denen eine *de novo* dominante Keimbahnmutation zu einer Veränderung in *repeat* III führt. [2, 3, 52] Für andere *de novo* dominante Varianten sind an homologen Positionen von *repeat* I und II mehrere pathogene Mutationen publiziert. [2, 3, 31] Diese Varianten die *repeat* I und II betreffen, führen zu Veränderungen hochkonservierter Aminosäuren der Ionenkanalpore oder benachbarter Strukturen der $\alpha 1$ -D-Untereinheit. [2, 3, 31]

Somit ist die durch die G1169D-Variante veränderte Region, trotz ihrer erstmals beschriebenen Positionen in *repeat* III, aufgrund dieser topographischen Homologie gut vereinbar mit den bisher publizierten pathogenen Varianten. [3, 136, 139]

Wie in **Abbildung 1** ersichtlich, befindet sich die G1169D-Variante zwischen der transmembranösen S6-Helix und der regulatorischen zytoplasmatischen Schleife die *repeat* III mit *repeat* IV verbindet (DIII-DIV-Linker-Region). [139] Diese regulatorische zytoplasmatische Schleife beeinflusst das *gating* der Kanalpore, welche von aus den S5- und S6-Helices gebildet wird. [136, 139] Es ist möglich, dass der Austausch der unpolaren Aminosäure Glycin durch die bei physiologischen pH-Werten negativ geladenen Aminosäure Asparaginsäure einen Effekt auf die regulatorische Funktion dieser Schleife haben könnte. [136, 139]

Zwar gibt es bisher keine publizierten pathogenen dominanten Keimbahnmutationen in direkter Umgebung zur G1169D-Variante. [3] Jedoch impliziert das gehäufte Auftreten von somatischen Varianten von aldosteronproduzierenden Tumoren in direkter räumlicher Nähe zu der G1169D-Variante die Wertung der betroffenen Region von *repeat* III am Ende der S6-Helix als potenzielle vulnerable Region (Hot-Spot-Region) für pathogene Mutationen. [2, 242] (siehe **Abbildung 1**)

Die durch die G1169D-Mutation veränderte Aminosäure Glycin (G) an Position 1169 ist eine phylogenetisch hoch konservierte Aminosäure. [2, 243] Auch die direkte Umgebung dieser Position ist teilweise hochkonserviert. [243] Die Aminosäure Glycin findet sich interessanterweise selbst bei spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen (Na_v). [243, 244] Hier findet sich der Glycin-Rest ebenfalls an homologer Stelle zwischen S6-Domäne und DIII-DIV-Linker-Region bei folgenden spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen (Na_v): Na_v1.1-Kanal (*SCN1A*-Gen), Na_v1.2-Kanal (*SCN2A*-Gen), Na_v1.3-Kanal (*SCN3A*-Gen), Na_v1.4-Kanal (*SCN4A*-Gen), Na_v1.5-Kanal (*SCN5A*-Gen), Na_v1.6-Kanal (*SCN8A*-Gen), Na_v1.7-Kanal (*SCN9A*-Gen), Na_v1.8-Kanal (*SCN10A*-Gen) und Na_v1.9-Kanal (*SCN12A*-Gen). [243, 244] Der Glycin-Rest findet sich ebenfalls an homologer Stelle im Bereich des Übergangs von S6-Helix und DIII-DIV-Linker-Region bei den folgenden spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen: Ca_v1.1-Ca²⁺-Kanal (*CACNA1S*-Gen), Ca_v1.2-Ca²⁺-Kanal (*CACNA1C*-Gen). [243] Zudem finden sich homologe Glycin-Reste der S6-Helix beim Ca_v3.1-Ca²⁺-Kanal (*CACNA1G*-Gen) und beim Ca_v3.2-Ca²⁺-Kanal (*CACNA1H*-Gen), hier jedoch etwas proximaler gelegen. [243] Die Konserviertheit des Glycin-Restes selbst in unterschiedlichen spannungsabhängigen selektiven Kationenkanälen unterstreicht die topologische und funktionale Relevanz dieser Region und liefert ein weiteres Argument für eine Korrelation von Phänotyp und Genotyp und damit für die Pathogenität der Variante. [52]

9.2.4 Ca²⁺-Überladung (Ca²⁺-Overload)

Die ausgeprägten Veränderungen des *gatings* führen zu einer starken Zunahme des Hintergrund- Ca²⁺-Einstroms (*window currents*) in die Zellen. [2, 3, 31] Verstärkt wird dies durch Aktivierung der Kanäle im Bereich des Ruhemembranpotentials sowie durch die deutlich verzögerte Kanaldeaktivierung. [2, 3] Es kommt zu einem beinahe kontinuierlichen Ca²⁺-Einstrom und damit einer starken Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration; physiologische Phasen von minimalem Ca²⁺-Einstrom, die für die Regulation diverser Zellfunktion zentral sind, werden maximal verkürzt. [2, 3] Da Ca²⁺ in dauerhaft erhöhter intrazellulärer Konzentration nicht mehr die Funktion als zentraler Informationsträger bzw.

second messenger erfüllen kann, resultiert hieraus eine Beeinträchtigung vielzähliger Zellfunktionen und großer Teile des Zellstoffwechsels. [11, 12]

Dieser Zustand einer zellulären Dysfunktion aufgrund eines Überangebotes an intrazellulärem Ca^{2+} , wird Ca^{2+} -Überladung (Ca^{2+} -Overload) genannt. [2, 3, 245] Vor diesem Hintergrund kann der komplexe Phänotyp der G1169D-Variante besser verstanden werden. [65] Diese erhöhte Ca^{2+} -Verfügbarkeit kann potenzielle zytotoxische und gewebeschädigende Effekte verursachen. [3, 246] Des Weiteren gibt es Untersuchungen, die die Auswirkungen einer gestörten bzw. erhöhten Ca^{2+} -Konzentration auf die Gentranskription untersucht haben. [16] $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle steuern in Neuronen nicht nur die zelluläre Erregbarkeit, sie strukturieren über das Zytoskelett auch die Morphologie z.B. von dendritischen Konfigurationen, so könnten die Veränderungen des *gatings* nicht nur die Struktur und Funktion einzelner Zellen, sondern ganzer Zellnetzwerke bedingen. [11, 12] Alle diese Folgen einer gestörten Ca^{2+} - Signalübertragung sind potenzielle Ursachen für den Phänotyp des Indexpatienten. [52] Nur zukünftige Untersuchungen können die exzitatorischen, morphologischen, exozytotischen, zytotoxischen, transkriptionischen Dysfunktionen hinreichend erarbeiten, die den Symptomen der beiden Kinder mit der G1169D-Variante potentiell zugrunde liegen. [2, 3, 16, 52]

9.2.5 Die pathophysiologischen Auswirkungen der G1169D-Variante auf Schrittmacherzellen

Die oszillierenden Membranpotentiale von Schrittmacherzellen, welche zentrale Rollen in neuronalen und endokrinen Funktionskreisen spielen, werden häufig durch $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen bestimmt; $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle sind in bestimmten Schrittmacherzellen besonders stark exprimiert, diese Schrittmacherzellen steuern wichtige Funktionen im zentralen Nervensystem und in endokrinen Geweben. [245, 247] $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle und andere L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle werden beispielsweise als wesentliche Voraussetzung für die Funktion dopaminergischer Schrittmacherneurone im ZNS angesehen. [248-251]

Das veränderte *gating* der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle der G1169D-Variante könnte durch Störungen dieser Schrittmacherzellen daher zu weitreichenden neurologischen und endokrinen Störungen führen. [136] Störungen der Ca^{2+} -Kanal-Funktion haben insbesondere

Auswirkungen auf Schrittmacherzellen, da deren Funktionsweisen besonders feinjustierte Spannungsverhältnisse und eine genaue Orchestrierung der zeitlichen Stromverläufe zugrunde liegen; diese Zellen weisen damit eine erhöhte Empfindlichkeit für Störungen auf. [245] In Schrittmacherzellen ist die Ca^{2+} -Leitfähigkeit stark an die besondere Spannungskinetik dieser Zellen gebunden. [100] Veränderungen des *gatings* der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle in Schrittmacherzellen können damit ausgesprochenen Effekte auf die Membranpotentiale und Ströme in diesen Zellen haben, sowie deren Entladungsrhythmen haben und die allgemeine Schrittmacherfunktion beeinträchtigen. [100] Kleinere Änderungen der Spannungen oder der Ca^{2+} -Kanalkinetik führen bereits zu relevanten Änderungen der globalen Schrittmacheraktivität und der Regulierung des Rhythmus von Salvenentladungen (*bursts*). [100] Die Aktivierbarkeit der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle fällt beim WT in den Bereich zwischen -50 bis -70 mV, hier sind WT- $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle noch geschlossen. [2, 3] Die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle der G1169D-Variante hingegen sind in diesem Spannungsbereich bereits zu einem relevanten Prozentsatz aktivierbar bzw. geöffnet; dies kann eine nahezu kontinuierliche Aktivität von Schrittmacherzellen zur Folge haben. [252] Diese gesteigerte Aktivierbarkeit von Schrittmacherzellen in den entsprechenden Geweben wiederum kann zu Störungen der Insulinregulation, der Aldosteronregulation oder der Dopaminregulation führen. [2, 3, 100] Die starke Zunahme des Hintergrund- Ca^{2+} -Einstroms durch die G1169D-Variante kann diese Effekte weiter verstärken. [3]

9.3 Einordnung und Interpretation der klinischen Ergebnisse

9.3.1 Übersicht

Das Kind mit der G1169D-Variante und das Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik sind die ersten beiden publizierten Fälle, bei denen eine *de novo* dominante Variante von *repeat III* (siehe **Abbildung 1**) zu einem PASNA-Syndrom mit schwerer neurologischer Entwicklungsstörung, medikamentenresistenter Epilepsie und Beeinträchtigungen multipler physiologischer Funktions- und Regelkreise führt. [2, 3]

Beim Indexpatienten mit der G1169D-Variante liegt die Allelfrequenz bei 37 %, damit ist das Vorliegen eines Mosaiks weniger wahrscheinlich. [253] Die Allelfrequenz liegt jedoch nicht bei 50%, wie das theoretisch für eine heterozygote Variante zu erwarten wäre, denkbar wäre, dass eine geringere Abdeckung der Variante vorliegt. [254]

Beim Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik konnte in 17% der ausgelesenen Einzelsequenzierungsreaktionen (*reads*) die G1169D-Variante detektiert werden, d.h. die Allelfrequenz der pathogenen Variante betrug 17 %.

Dies wurde als Hinweis auf das Vorliegen eines Mosaiks gewertet, a.e. als Folge einer postzygotisch aufgetretenen sporadischen *de novo* Mutation. [253, 255] Für das Vorliegen eines Mosaiks beim Kind mit der G1169D-Variante spricht, dass die neurologische Symptomatik insgesamt weniger stark ausgeprägt als beim Indexpatienten: Im Alter von 10 Monaten lagen lediglich eine milde motorische Entwicklungsstörung sowie eine hypotone Rumpfmuskulatur vor; weder ein ausgeprägter Tremor noch eine epileptische Enzephalopathie wurden beschrieben. [256] Jedoch wurde bei diesem Kind formal kein Mosaik gezeigt und auch eine potentiell variable Verteilung in unterschiedlichen Geweben wurde nicht untersucht. [89, 256]

Bisher wurde in der Literatur das PASNA-Syndrom mit heterozygoten *de novo* dominanten Varianten des *CACNA1D*-Gens mit Gain-of-Function in Verbindung gebracht. [2, 3, 12] Auffällig ist die augenscheinliche Varianz der klinischen Bilder von Patient*innen mit *de novo* *CACNA1D*-Varianten. [2, 3, 12] Die Symptome reichen von Autismus-Spektrum-Erkrankungen ohne endokrinologische Symptome hin zu Manifestationen bei denen ein primärer Hyperaldosteronismus mit konsekutiver arterieller Hypertonie und/ oder ein kongenitaler Hyperinsulinismus mit konsekutiven Hypoglykämien im Vordergrund stehen. [2, 3, 12, 65] (siehe **Tabellen 5-15** in Kapitel 9.3.7)

Die Ergebnisse aus den genetischen Untersuchungen des Indexpatienten und des Kindes mit der G1169D -Variante im Mosaik, lassen eine Einordnung zumindest als inkomplettes PASNA-Syndrom zu. [2-4, 31, 51, 52, 257]

Der Indexpatient mit der G1169D-Variante und der Patient mit G1169D-Variante im Mosaik weisen zahlreiche Überschneidungen mit den klinischen Bildern anderer *de novo* dominanter *CACNA1D*-Varianten auf. Siehe hierzu die Phänotyptabellen in Kapitel 9.3.7 (**Tabellen 5-15**). [2-4, 31, 51, 52, 257] Übereinstimmungen liegen bei neurologischen, endokrinologischen und sensorischen Symptomen vor. [2-4, 31, 51, 52, 257]

Aus den **Tabellen 5-15** in Kapitel 9.3.7 wird ersichtlich, dass der Indexpatient mit der G1169D-Variante, der Patient mit der G1169D-Variante im Mosaik sowie das Kind mit der F767S-Variante das Phänotypspektrum der bisher publizierten Menschen mit dominanten *de novo* *CACNA1D*-Varianten insbesondere um einen Motorphänotyp mit Tremor bzw. *jittering* erweitern [2-4, 31, 51, 52, 257] Erstmals wird eine Taubheit bei einem Kind mit einer heterozygoten dominanten *de novo* *CACNA1D*-Variante beschrieben. [2-4, 31, 51, 52, 257]

9.3.2 Developmental and epileptic encephalopathy, DEE

Der Indexpatient mit der G1169D-Variante leidet sowohl an einer medikamentenresistenten Epilepsie mit epileptischer Enzephalopathie als auch an einer auffälligen tremorartigen hyperkinetischen Bewegungsstörung. [2-4, 31, 51, 52]

Erst im 2. Lebensjahr wurde dem Indexpatienten die Diagnose einer genetischen Epilepsie mit schwerer Entwicklungsstörung und epileptischen Enzephalopathie (*Developmental and epileptic encephalopathy, DEE*) gegeben. [89, 258-260] Zu diesem Zeitpunkt wurden beim Indexpatienten die tonischen Anfälle, die einer stereotypen Sequenz folgten, eindeutig diagnostiziert. (siehe **Abschnitt 8.1**) Gleichzeitig zeigten sich auch erstmals eindeutig reproduzierbare pathologische EEG-Befunde wie eine pathologisch verlangsamte Hintergrundaktivität im Deltarhythmus, Burst-Suppression-Muster und persistierende ETPs. (siehe **Abbildungen 7** und **8**) [89, 258-262] In den ersten beiden Lebensmonaten abgeleitete EEGs hatten zwar bereits eine Hintergrundaktivität im Deltabereich ergeben, diese Hintergrundaktivität wurde zunächst als alterstypisch und die EEGs nicht als eindeutig pathologisch gewertet. [218]

Mit Diagnosestellung einer DEE wurde zu diesem Zeitpunkt die anfallssupprimierende Therapie mit Levetiracetam und Clobazam eingeleitet. [263]

Bereits im Alter von 3 Monaten war eine erste anfallssupprimierende Therapie mit Levetiracetam für 8 Wochen erfolgt, da zu diesem Zeitpunkt die Apnoeepisoden als mögliches Äquivalent tonischer Anfälle gewertet wurden. [264-266] Das rasche Ende der Medikation erfolgte, da diese keinen Effekt auf Frequenz der Apnoeepisoden hatte und die Apnoe bei wiederholt unauffälligen EEGs als am ehesten nicht epileptogen gewertet wurde; auch die oszillierende rhythmische biphasische Bewegungsstörung wurde zu dem Zeitpunkt nicht als epileptogen im Sinne myoklonischer Anfälle gewertet, sondern als Tremor. [266-268] (siehe **Abschnitt 9.3.3**).

Auch bei anderen Formen von DEEs, wie beispielsweise dem Dravet-Syndrom im Unterschied zu frühkindlichen Formen der SCN1A-DEE und weiteren kindlichen Epilepsiesyndromen wie dem Doose-Syndrom zeigen die betroffenen Kinder einen ähnlichen Erkrankungsverlauf und –beginn wie der Indexpatient. [89, 258-260] Bei diesen Syndromen kommt es häufig erst im 2. Lebensjahr zu ersten Anfällen und der Diagnosestellung. [89] Die Burst-Suppression-EEG-Muster, ETPs und pathologische EEG-Hintergrundaktivität, die beim Indexpatienten abgeleitet wurden, können häufig bei Kindern mit Dravet-Syndrom und verwandten SCN1A-DEEs oder anderen DEEs detektiert werden. [89, 260] Allerdings traten beim Indexpatienten keine der für das Dravet-Syndrom oder für die frühkindlichen SCN1A-DEEs typischen fieberassoziierten epileptischen Anfälle auf. [89, 260] Bisher sind auch keine anderen Calciumkanalmutationen beschrieben, die zu einem Dravet-Syndrom führen; dieses wird zum überwiegenden Anteil durch Mutationen des SCN1A-Gens ausgelöst. [89] Für das Dravet-Syndrom wurde neben der genetischen Epilepsie, der epileptischen Enzephalopathie mit Entwicklungsstörung ein charakteristischer Motorphänotyp beschrieben. [89] Neben einer Spastizität, führt eine Ataxie zu Störungen der Bewegungen und es kommt teilweise zu einem auffällig gebückten Gangbild (*crouch gait*) bei Patienten mit Dravet-Syndrom. [89, 269] Beim Doose-Syndrom kommt es zu Myoklonien, die ebenfalls als Störung der Bewegung aufgefasst werden können. [270] Atonische Anfälle, wie sie typisch für das Doose-Syndrom sind, konnten aufgrund der schweren motorischen Entwicklungsstörung beim Indexpatienten nicht sicher ausgeschlossen werden; eindeutige klinische Hinweise darauf ergaben sich jedoch nicht. [89, 97, 270]

Eine rhythmisch oszillierende biphasische Bewegungsstörung, die neonatal bzw. intrauterin aufgetreten ist und beim Indexpatienten als Tremor klassifiziert wurde, konnte bisher

weder mit dem Dravet-Syndrom noch dem Doose-Syndrom noch anderen Formen der DEE in Zusammenhang gebracht werden. [67, 69, 89, 97, 260, 271] Im Verlauf der Erkrankung, insbesondere nach der SARS-CoV-2-Infektion im 19. Lebensmonat, nahmen arrhythmische einschließende Muskelzuckungen zu, diese wurden als kortikale oder subkortikale Myoklonien gewertet, die der rhythmisch oszillierenden biphasischen Bewegungsstörung aufgelagert waren. [85] Daraufhin wurde die anfallssupprimierende Medikation um die Substanz Perampanel erweitert, da diese Substanz einen potentiellen supprimierenden Effekt auf myoklonische Anfälle hat. [272] Hierunter kam es zunächst zu einer leichten Abnahme der Anfallsfrequenz, die rhythmisch oszillierende biphasische Bewegungsstörung blieb von der Perampanelmedikation unbeeinflusst. [72] (Zur Diskussion und Bewertung der Bewegungsstörung siehe den folgenden **Abschnitt 9.3.3**)

Sollte retrospektiv die neonatale bzw. intrauterine Bewegungsstörung nicht als Tremor, sondern als epileptische kortikale Myoklonien gewertet werden, würde sich die genetische Epilepsie des Indexpatienten mit der G1169D-Variante jedoch von der DEE-Untergruppe *early infantile developmental and epileptic encephalopathies (EIDEEs)* unterscheiden. [258, 259] Zwar leiden Kinder mit der Diagnose EIDEE häufig an myoklonischen Anfällen, Burst-Suppression-Muster zeigten sich beim Indexpatienten jedoch erst deutlich später, nämlich erst kurz vor dem 2. Geburtstag, als bei Patienten mit EIDEE. [258, 259] Bei diesen Patienten treten Suppressionsphasen typischerweise bereits in den ersten Lebensmonaten auf. [258, 259]

Im Verlauf nahm beim Indexpatienten mit der G1169D-Variante die Frequenz der tonischen Anfälle mit stereotyper Sequenz zu; mittels Video-EEG-Ableitungen konnte gezeigt werden, dass kurz vor solchen Anfällen eine Zunahme der Frequenz von Burst-Suppression-Phasen sowie eine Zunahme der Dauer dieser Suppressionsphasen beobachtet werden konnte. [261, 262] Unmittelbar vor den Anfällen kam es teilweise zu 7-8 Sekunden andauernden Suppressionsphasen im EEG. [261, 262, 273]

Seit der SARS-CoV-2-Infektion zeigten sich diese Suppressionsphasen bzw. Burst-Suppression-Phasen zunehmend. (siehe **Abbildung 7**) [261, 262] In diesem Zeitraum fiel auch zunehmend eine deutliche Störung des Bewusstseins bzw. der Wachheit des Patienten auf. [273] Wache Phasen mit geöffneten traten zunehmend seltener auf, und im Verlauf öffnete der Indexpatient für kurze Phasen von einigen Minuten innerhalb eines Tages die Augen. [274]

Die schwere Entwicklungsstörung zeigte sich seit der SARS-CoV-2-Infektion und im weiteren Verlauf der Erkrankung ebenfalls immer stärker. Nach der schweren SARS-CoV-2-Infektion konnten keine Entwicklungsschritte mehr beobachten werden. (siehe **Tabelle 1**) [219, 220] Zunehmenden Entwicklungsstörungen mit Entwicklungsstillstand sind auch unabhängig von SARS-CoV-2-Infektionen bei anderen DEEs beschrieben. [89, 258-260] Die zunehmende Entwicklungsstörung, der Verlust von Fähigkeiten sowie der Entwicklungsstillstand des Indexpatienten können damit auch eine Folge der genetisch bedingten epileptischen Enzephalopathie sein. [89, 258-260]

Medikamentenresistente epileptische Enzephalopathien entwickeln sich teilweise im Verlauf in ein Lennox-Gastaut-Syndrom. [88, 263, 275] Das epileptische Syndrom des Indexpatienten erfüllt die Kriterien des Lennox-Gastaut-Syndroms nicht: Dem typischen Auftreten von unterschiedlichen Anfallstypen beim Lennox-Gastaut-Syndrom stehen die tonischen Anfälle mit stereotyper Sequenz des Indexpatienten mit der G1169D-Variante gegenüber. [88, 263, 275] Auch die typischen EEG-Auffälligkeiten von Kindern mit Lennox-Gastaut-Syndroms wie langsame Spike-Wave-Komplexe mit einer Frequenz unter 2.5 Hz, paroxysmale Episoden einer schnellen Aktivität im Schlaf (10 -20 Hz) ließen sich bisher nicht reproduzierbar in EEGs des Indexpatienten ableiten, hier dominieren die Burst-Suppression-Phasen bzw. Suppressionsphasen sowie die oben genannten ETPs. (siehe **Abbildung 7**) [88, 263, 275]

9.3.3 Tremor oder Myklonie bei einem Patienten mit DEE

Beim klinischen Vergleich der betroffenen Kinder mit G1169D-Variante, der G1169D-Variante im Mosaik und der F767S-Variante zeigte sich in allen 3 Fällen ein Motorphänotyp mit generalisierter hochfrequenter rhythmisch oszillierender Bewegungsstörung am ehesten im Sinne eines Tremors oder *jitterings*; der Motorphänotyp hat klinisch auch Ähnlichkeiten zu Myklonien. [3, 85, 267] Die auffällige hyperkinetische Bewegungsstörung des Indexpatienten mit der G1169D-Variante wurde aufgrund der neben der oszillierenden Rhythmicität auftretenden biphasischen Bewegungsausschläge am ehesten als Tremor gewertet; diese Eigenschaften sind in der Literatur wesentliche Charakteristika von Tremores. [267, 276]

Hervorzuheben ist, dass beim Kind mit der G1169D-Variante bereits im 3. Trimenon intrauterin diese Bewegungsstörung auffiel; der Motorphänotyp bestimmte bei diesem Kind das klinische Bild also von Anfang an in besonderem Maße. [3] Zunächst wurde die Bewegungsstörung des Fetus auf die Sertralintherapie zurückgeführt, welche die Mutter während des 3. Trimenons wegen einer Schwangerschaftsdepression erhielt. [277] Jedoch zeigten sich postnatal keine relevanten Sertralin-Plasmaspiegel, die Sertralintherapie war bereits vor Geburt des Kindes beendet worden.

Da diese Bewegungsstörung direkt nach der Geburt das klinische Bild bestimmte, erhielt der Indexpatient noch in den ersten Lebenstagen die Diagnose eines Tremors.

Die tremorartige Bewegungsstörung des Indexpatienten zeigte sich postnatal so stark ausgeprägt, dass die vorliegende Atemstörung mit dysfunktionalem Atemmuster von den neonatologischen Behandler*innen auf einen Tremor des Zwerchfells zurückgeführt wurde. [268] Auch die Dysphagie könnte durch einen Tremor des weichen Gaumens bzw. der Schluckmuskulatur bedingt sein, allerdings wären auch Myoklonien mit einem gleichen Effekt denkbar. [267] Das Kind wurde noch mit 37 Lebensmonaten ausschließlich über eine nasogastrale Sonde ernährt. Die Schluckstörung wurde bereits im ersten Lebensmonat offenbar, jedoch konnte dem Kind für eine gewisse Zeit lang ein Teil der Muttermilch bzw. Flüssignahrung mittels eines Fläschchens gegeben werden; die Dysphagie verstärkte sich insbesondere nach der SARS-CoV-2-Infektion mit 19 Monaten so sehr, dass keine orale Ernährung mehr möglich war. Neben einem Tremor könnte die Dysphagie durch eine mutationsbedingte Störung des dopaminergen Systems sowie der striatalen Regelkreise der Schluckmotorik bzw. der Atem-Saug-Schluckkoordination bedingt sein; solche Störungen können beispielsweise beim Morbus Parkinson oder bei Dystonien unabhängig von einem Tremor auftreten. [278-280] Allerdings kommt auch die epileptische Enzephalopathie im Rahmen der DEE des Kindes mit der G1169D-Variante als eine weitere zentralnervöse Ursache der Schluckstörung in Frage. [281, 282]

Die Tatsache, dass neben dem Indexpatienten auch das Kind mit dem G1169D-Variante im Mosaik unter einer, wenn auch weniger stark ausgeprägten, hyperkinetischen tremorartigen Bewegungsstörung litt, spricht für eine genetische Ursache der Bewegungsstörung. Dies wird weiter durch die biophysikalische Charakterisierung der F767S-Variante durch Torök et al. gestützt: denn diese Variante mit großer biophysikalischen Ähnlichkeit weist einen ähnlichen

motorischen Phänotyp auf. [3] (siehe **Kapitel 4.2**) Der auffällige motorische Phänotyp des Kindes mit der F767S-Variante wurde zwar nicht als Tremor klassifiziert, jedoch als *jittering* und damit ebenfalls als eine Bewegungsstörung mit rhythmisch oszillierender Erscheinung. [3] Beim Indexpatienten mit G1169D-Variante fielen interessanterweise erhöhte L-Dopa Werte im Liquor bei einer Messung im 1. Lebensmonat auf. [100, 117] L-Dopa-Bestimmungen im Liquor beim Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik oder dem Kind mit der F767S-Variante könnten für die Prüfung der Hypothese einer dopaminergen Dysfunktion von Interesse sein, eine entsprechende Diagnostik ist jedoch bisher nicht erfolgt. [100, 117]

Potenziell könnte die durch mutierte $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle gestörte Schrittmacherfunktion mesenzephaler dopaminergen Neuronen zu einem Tremor des Kindes mit der G1169D-Variante führen. [245] (siehe **Kapitel 4.2.5**) Diese Neurone sind durch eine feinregulierte Oszillation des Membranpotentials gekennzeichnet, die Funktion wird durch $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen ermöglicht. [151, 214, 283]

In der Literatur beschrieben sind Tremores bei Patienten, die Träger pathogener CACNA1C-Mutationen sind. [284-286] Im Gegensatz zum CACNA1D-Gen kodiert das das CACNA1C-Gen für $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle, diese teilen sich jedoch einige biophysikalischen Eigenschaften und Funktionen mit $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen. $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle sind ebenfalls im dopaminergen System exprimiert. [99, 287, 288]

Zur Zuordnung der Bewegungsentäußerungen des Indexpatienten ist eine Differenzierung eines Tremors von Myoklonien, die u.a. epileptisch bedingt sein können, nötig. [86, 267, 289, 290]

Wiederholte EEG-Ableitungen in den ersten 2 Lebensmonaten ergaben zunächst keine eindeutigen Hinweise auf epilepsietypische Potentiale wie Spike-Wave- oder Poly-Spike-Wave-Konfigurationen, eine regionale Hirnfunktionsstörung und insbesondere keine Hinweise auf kortikale Myoklonien oder epileptische Anfälle simultan zum Tremor. [3, 85, 266, 267] Auch während Episoden mit verstärktem Tremor ergab sich kein eindeutiges elektroenzephalographisches Korrelat. [3, 85, 266, 267] Daher wurde während der ersten 2 Lebensmonate eine epileptische Genese des Tremors im Sinne kortikaler Myoklonien oder epileptischer Anfälle für weniger wahrscheinlich gehalten. [3, 85, 266, 267]

Im Verlauf wiesen EEG-Ableitungen des Indexpatienten epilepsietypische Potentiale (ETP) im Sinne von *sharp waves* auf. (siehe **Abbildung 7** und **8**) Diese *sharp waves* traten mit einer Frequenz von 1 – 1.5 Hz auf und damit deutlich langsamer als die Frequenz des Tremors, die

8-12 Hz betrug. (siehe **Abbildung 9**) Insgesamt konnte kein reproduzierbares klinisches Korrelat der *sharp waves* im Video-EEG z.B. im Sinne simultaner Bewegungen bzw. Myoklonien detektiert werden, die rhythmisch oszillierenden Ausschläge des Tremors traten unabhängig von der EEG-Aktivität auf. [266, 291] Dies spricht eher gegen kortikale Myoklonien als Ursache der Bewegungsstörung, da bei diesen häufig eine zeitliche Korrelation von gesteigerter EEG-Aktivität und plötzlicher pathologischer Bewegung möglich ist. [272, 292, 293] Allerdings wurde keine weiterführende Diagnostik wie zusätzliche EMG-Untersuchungen oder die Technik des *jerk-locked back-averaging* durchgeführt. (siehe **Abschnitt 9.5**) [85, 293-295]

In der Literatur sind Tremor-Myoklonie-Mischformen beschrieben, welche ebenfalls rhythmisch auftreten: Beispielhaft sei hier der rhythmische kortikale Tremor genannt, der einen Spezialfall des kortikalen Myoklonus darstellt. [289, 293] Dieser kortikale Tremor wird teilweise durch Berührungen oder sensorische Reize intensiviert, analog der Bewegungsstörung des Indexpatienten, welche ebenfalls auf diese Weise verstärkt werden konnte. [289] Auch progressive myoklonische Epilepsien wie beispielsweise die Unverricht-Lundborg-Erkrankung, können neben Myoklonien zu einem Tremor führen. [91] Typischerweise wird diese Erkrankung jedoch erst zwischen dem 6 und 16. Lebensjahr diagnostiziert, unter dem 6. Lebensjahr kommt es typischerweise nicht zu schweren Entwicklungsstörungen wie beim Indexpatienten. [91] Neben dieser Form sind weitere Unterformen progressiver myoklonischer Epilepsien bekannt, die zu tremorartigen hochfrequenten rhythmischen Myoklonien führen, beispielweise kommt es bei der durch *SCARB2*-Mutation bedingten progressiven Myoklonusepilepsie zu kortikalen Myoklonien mit einer Frequenz von über 12 Hz. [87, 293] Bisher wurde keine Epilepsie mit vorherrschenden myoklonischen Anfällen bei *CACNA1D*-Mutationen beschrieben, auch bezüglich anderer Calciumkanäle gibt es hierzu kaum publizierte Fälle. [2-4, 31, 51, 52, 257] Ein einzelner Fall eines Patienten mit *CACNA1A*-Mutation und einer frühkindlichen epileptischen Enzephalopathie mit hochfrequenten myoklonischen Anfällen ist publiziert, bei diesem Patienten mit *CACNA1A*-Mutation zeigte sich zusätzlich zu den Myoklonien klinisch wie beim Indexpatienten mit der G1169D-Variante ein Krankheitsbild mit Ähnlichkeit zu einer Hyperekplexie; die Myoklonien dieses Patienten mit *CACNA1A*-Mutation konnten jedoch im EEG eindeutig mit kortikalen Anfallszeichen korreliert werden. [266] Solch hochfrequente Myoklonien, wie sie auch bei anderen Formen der progressiven myoklonischen Epilepsie

aufzutreten können, sind klinisch nicht eindeutig von der Bewegungsstörung des Indexpatienten, die klinisch als Tremor klassifiziert wurde, zu unterscheiden. [87, 267, 276, 293]

Subkortikale Strukturen wie Striatum, Substantia nigra oder Kleinhirn können an der Entstehung eines kortikalen Tremors beteiligt sein und u.a. dessen Rhythmizität mitverursachen. [289] Damit wäre ein kortikaler Tremor auch aufgrund eines gestörten *gatings* von mutierten $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen in subkortikalen Strukturen vorstellbar. [289] Bisher gibt es jedoch keine Publikation, die elektrophysiologische Veränderungen der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle als Ursache von kortikalen Tremores untersucht hat. [86, 289, 290]

Im weiteren Verlauf, insbesondere nach der schweren SARS-CoV-2-Infektion am Ende des 2. Lebensjahres, traten beim Indexpatienten vermehrt arrhythmische monophasische Zuckungen (*jerks*) auf, die auf die rhythmische Tremoraktivität aufgelagert waren. Diese zusätzlichen arrhythmischen *jerks* könnten epileptischer Genese sein und im Rahmen der DEE auftreten, sie konnten durch die erfolgten EEG-Ableitungen jedoch nicht näher zugeordnet werden, eine weitere Diagnostik mit EMG-Ableitungen oder einem *jerk-locked back-averaging* erfolgte nicht. (siehe **Abschnitt 9.5**) [85, 293-295]

Das *CACNA1D*-Gen wird auch im Kleinhirn exprimiert, *CACNA1D*-Mutationen könnten so ebenfalls zerebelläre Funktionskreise schädigen. [98] Störungen des Kleinhirns können zu Tremor führen. [296] Für andere Ca^{2+} -Kanalerkrankungen ist entsprechend auch ein Motorphänotyp mit Tremor beschrieben. [284, 297] So sind für pathologische Varianten von $\text{Ca}_v2.1\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen, die zur Familie der P/Q- Ca^{2+} -Kanäle gehören und hauptsächlich im Kleinhirn exprimiert werden, Phänotypen mit Tremores beschrieben. [284-286, 297] Mittels weiterführender funktioneller Bildgebung wie der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRT), der Positronenemissionstomographie (PET) (z.B. [^{18}F]F-DOPA-PET) oder der Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) (z.B. [^{123}I]FP- β -CIT-SPECT), könnte beim Indexpatienten mit der G1169D-Variante eine Differenzierung bezüglich eines zerebellären Tremors oder eines Tremors durch Schädigung der Basalganglien erfolgen. [298]

Aufgrund der hohen Frequenz der motorischen Entäußerungen von bis zu 8-12 Hz ist eine Unterscheidung nicht nur von Myoklonien, sondern auch von muskulären Faszikulationen nötig, die ebenfalls spontan auftreten. [299] Faszikulationen könnten primär vom Muskel

ausgehen oder ein sekundäres Denervierungsphänomen sein und durch eine Motoneuronerkrankung bedingt sein. [299] In der Literatur wird von der Expression von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen in Motoneuronen berichtet, aber bisher wurde keine Kanaldysfunktion in diesem Zusammenhang untersucht. [300] Gegen eine Wertung als Faszikulation spricht jedoch die Rhythmisität sowie die Tatsache, dass beim Indexpatienten der Tremor u.a. alle Extremitäten und den Kopf betrifft, er kein lokales Phänomen ist und zu ausgeprägten sichtbaren Bewegungen (Kopfnicken, Zittern der Arme, etc.) beim Indexpatienten führt. [291] Ein Elektromyographie zur weiteren Differenzierung ist wie bereits berichtet aufgrund der Invasivität der Untersuchungsmethode nicht erfolgt (siehe **Abschnitt 9.5**). [291]

9.3.4 Endokrine Dysfunktion

Wie oben gezeigt könnten neben dem motorischen Phänotyp mit Tremor und neben der schweren Epilepsie auch endokrine Störungen auf die biophysikalischen Merkmale der G1169D-Variante und auf das veränderte *gating* dieser Variante zurückgeführt werden. [2-4] Neben den schweren neurologischen Störungen des Indexpatienten wie Tremor und DEE lassen sich weitere klinischen Symptome auf die bioelektrischen Veränderungen des *gatings* der G1169D-Variante zurückführen. [3, 4, 12]

In zahlreichen Geweben werden elektrische Informationen durch $\text{Ca}_v1.3\text{ Ca}^{2+}$ -Kanäle in Ca^{2+} -Ströme und Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentrationen übersetzt, hierdurch kann Ca^{2+} als *second messenger* unterschiedliche Zellaktivitäten steuern. [6, 11, 16]

Sekretorische endokrine Zellen aktivieren unter physiologischen Bedingungen bei einem Membranpotential im Bereich zwischen -40 bis -60 mV, so kommt es ab diesem Potential zum typischen oszillierenden Aktivierungsprofil. [247, 301] Im Gegensatz hierzu liegt jedoch bei der G1169D-Variante in dem Bereich zwischen -60 bis -70 mV eine nahezu kontinuierliche Aktivierung bzw. ein konstanter Ca^{2+} -Einstrom vor: Die Aktivierungsschwelle wurde mit $-66.9\text{ mV} \pm 0.8$ bzw. $-71.1\text{ mV} \pm 0.7$ in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Haltepotential deutlich negativer als beim WT bestimmt, und bereits ab einem Membranpotential von -70 mV beginnt der Hintergrund- Ca^{2+} -Einstroms (*window current*) bei der G1169D-Variante im

Gegensatz zum WT. (siehe **Abbildung 12**) Es ist anzunehmen, dass die dadurch verstärkten Stromflüsse und die starke Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen zu Dysfunktionen der sekretorischen Zellen führen. [3, 247] So könnte die veränderte Biophysik in den Inselzellen des Pankreas zu Hyperinsulinismus und in den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde zum Hyperaldosteronismus führen. [3, 4, 52, 247]

Jedoch lässt sich aus den experimentell detektierten Veränderungen des *gatings* im Sinne eines Gain-of-Function nicht automatisch auf eine Funktionsstörung eines bestimmten endokrinen Gewebes, welches $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} -Kanäle exprimiert, schließen:

Zusammenfassend ergab die endokrinologische Diagnostik für den Indexpatienten mit der G1169D-Variante keine eindeutig pathologischen laborchemischen Befunde: weder aus der Bestimmung der Plasma-Aldosteronkonzentration oder der Plasma-Reninkonzentration noch aus der Bestimmung der C-Peptid-Werte im Plasma bzw. im 24-Stunden-Sammelurin noch aus der Bestimmung der Insulin- und Glukosebestimmungen im Plasma. [2-4]

Allenfalls traten beim Indexpatienten transiente Hypoglykämien ohne laborchemische Hinweise auf einen Hyperinsulinismus auf; in der Literatur sind Patient*innen mit der Diagnose PASNA-Syndrom publiziert, die ausschließlich unter transienten Formen von Hyperinsulinismus oder Hyperaldosteronismus litten. [2, 3]

Auch ein Blick auf die Phänotyptabellen (siehe **Tabellen 5-15** in Kapitel 9.3.7) zeigt, dass endokrine Störungen nur bei einigen der beschriebenen Varianten mit Gain-of-Function diagnostiziert wurden. [2-4, 31, 51, 52, 257] Ortner et al. haben 2020 daraufhin gewiesen, dass für die Diagnose des PASNA-Syndroms endokrine Dysfunktionen als fakultative Diagnosekriterien gelten, obwohl eine endokrine Störung für das PASNA-Syndrom namensgebend ist. [2]

Für den Indexpatienten mit der G1169D-Variante wurde daher die Diagnose eines inkompletten PASNA-Syndroms vergeben. [3, 4, 31, 52]

Das zusätzliche Auftreten transienter Hypoglykämien beim Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik und beim Kind mit der biophysikalisch ähnlichen F767S-Variante sprechen für ein genetisches Risiko für das Auftreten von Hypoglykämien bei Personen, die eine dieser beiden Varianten mit starkem Gain-of-Function-Effekt aufweisen. [3]

Auch wenn im weiteren Verlauf beim Kind mit der G1169D-Variante zunächst keine manifesten Zeichen einer primären endokrinen Dysfunktion vorlagen, sind endokrinologische Kontrolluntersuchungen in regelmäßigen Abständen bei dieser und *CACNA1D*-Varianten mit

vergleichbarem bioelektrischen Profil sinnvoll. [3, 52] Vor allem da Hyperinsulinismus oder Hyperaldosteronismus intermittierend auftreten können. [2, 3] Als ein weiteres Symptom beider Kinder könnte das Auftreten einer postnatalen Makrosomie auf einen zumindest teilweise gestörten intrauterinen Insulin- und Glukosestoffwechsel hinweisen. [302, 303] Eine ausgewiesene neonatale Makrosomie bestand sowohl beim Indexpatienten mit der G1169D-Variante (> 98. Perzentile, +2.04 z) als auch beim Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik (> 99. Perzentile, +3.22 z). Insulin hat wachstumshormonähnliche Effekte, und ein erhöhter Insulinspiegel ist eine bekannte Ursache neonataler und intrauteriner Makrosomien. [304] Eine ätiopathogenetische Zuordnung der Makrosomie beider Kinder ist anhand der erhobenen Daten jedoch nicht möglich, da weitere Ursachen der Makrosomie denkbar sind. [304, 305]

9.3.5 Störungen von Hören und Sehen

Der hier publizierte Fall des Kindes mit der G1169D-Variante ist die erste Beschreibung einer sensineuronalen Taubheit bei einer *de novo* dominante Mutation im *CACNA1D*-Gen. [2, 3] Bisher wurden Hörstörungen bei heterozygoten rezessiven Loss-of-Function-Mutationen beschrieben, beispielsweise beim *SANDD*-Syndrom (siehe **Kapitel 4.3.4**). [2, 3, 133, 134] Dies ist klinisch von besonderer Bedeutung, da beim Indexpatienten auch eine beinahe Blindheit vorliegt. Vor dem Hintergrund dieser schweren kombinierten sensorischen Einschränkung entschieden sich die Eltern für eine Versorgung des Kindes mit beidseitigen Cochlea-Implantaten.

Wie in **Kapitel 1.1** beschrieben, könnte das veränderte *gating* durch die hohe $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} -Kanal-Dichte in den inneren Haarzellen der Cochlea mit ihren glutamatergen Band-Synapsen zu Störungen der Signalweiterleitung zwischen Haarzellen und Nervus cochlearis führen. [45, 133, 134, 136] der Ca^{2+} -Einstrom in die inneren Haarzellen erfolgt zu wesentlichen Teilen über $\text{Ca}_v1.3$ - Ca^{2+} -Kanäle. [306] Für die inneren Haarzellen spielt die Inaktivierungskinetik dieser Kanäle daher eine wichtige Rolle. [306] Diese Inaktivierungskinetik ist bei der G1169D-Variante stark verzögert, und bei den entsprechenden Zellen ist von einer erhöhten Fraktion

aktivierbarer Kanäle auszugehen. (siehe **Kapitel 3.3.2 bis 3.3.4**) Die S6-Helix von Domäne III der $\alpha 1$ -D-Untereinheit (siehe **Abbildung 1**), deren intrazelluläres Ende die negativ geladene Asparaginsäure bei der G1169D-Variante aufweist, bildet neben den homologen S6-Helices der anderen 3 Domänen eine entscheidende Struktur für das *gating* der inneren Haarzellen. [306] Aufgrund der experimentellen elektrophysiologischen Ergebnisse und der durch die G1169D-Variante veränderten Struktur der Domäne III ist anzunehmen, dass die Taubheit des Indexpatienten auf seine *CACNA1D*-Mutation zurückgeführt werden kann.

Auch für die Funktion der Retina sind ähnliche Mechanismen bezüglich der dort exprimierten $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle denkbar. [140, 141] Zudem wurde gezeigt, dass ein vermehrter Ca^{2+} -Einstrom zu einem Untergang retinaler Photorezeptoren führen könnte. [141] Die Ca^{2+} -Überladung retinaler Zellen beim Indexpatienten mit der G1169-Variante könnte eine weitere Erklärung für die schwere Sehstörung dieses Kindes sein.

9.3.6 Störungen der Blasenfunktion und Obstipation mit Stuhlentleerungsstörung

Das Kind mit der G1169D-Variante verfügt seit dem 19. Lebensmonat über keine Spontanmiktion mehr. Es benötigt aufgrund einer dysregulierten Blasendetrusoraktivität die tägliche anticholinerge Therapie mit Oxybutynin ((0.07 mg/ kg KG/ Tag) und wird alle 3-4 Stunden katheterisiert. [307] Eine mögliche Ursache dieser schweren neurogenen Blasenstörung des Indexpatienten könnte die Störung nigrostriataler Regelkreise sein, die wie oben gezeigt, den ausgeprägten Tremor bedingen könnte. [308] (siehe **Kapitel 4.3.2**) Bezeichnenderweise kann es beim Morbus Parkinson zu ähnlichen Blasenstörungen mit a.e. zentraler Genese kommen, u.a. aufgrund einer Störung nigrostriataler Regelkreise. [308] Ebenfalls könnte der Stuhlentleerungsstörung eine ähnliche Pathophysiologie wie der Parkinsonerkrankung zugrunde liegen. [308] Für den Morbus Parkinson wird zum einen eine Funktionsstörung dopaminerger Neurone der enterischen Nervenplexus als Ursache für die Obstipation und verlängerten Passagezeiten postuliert sowie eine zentralbedingte Störung der Sphinkterenkontraktion. [308]

9.3.7 Phänotypische Merkmale von Individuen mit *de novo* dominanten *CACNA1D*-Varianten Tabellen 5 – 15

Merkmal	HPO	Varianten																	
		<u>V259A</u> [2, 31]	<u>L271H</u> [60]	<u>V401L</u> [2]	<u>G403D</u> [2, 31]	<u>G403D</u> [2, 31]	<u>G407R</u> [2]	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 1)	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 2)	<u>S672L</u> [257] Familiäre Form	<u>F767S</u> [3]	<u>A769G</u> [2, 31]	<u>A769T</u> [2]	<u>A769T</u> [2, 52]	<u>I770M</u> [2, 4, 31]	<u>G1169D</u> Indexpat.	<u>G1169D</u> Pat. mit Mosaik	<u>T1411M</u> [2]	<u>V1482</u> [2]
Geschlecht		m	f	m	f	f	m	m	m			f	f		f	m			
Alter bei Symptombeginn		Kleinkind	kongen.	Kleinkind	1 Monat	kongen.	15 Jahre	13 Jahre	13 Jahre	4. Lj. bei 9j	Kongen.	8 Jahre	1 Jahr		kongen.	kongen.	kongen.		
Geburtskomplikationen	0001787	-	P-HELLP	-			-	floppy	floppy			floppy	-		REA	Hum. fr.			
Frühgeburt	0001622		32.W		36.W					- 9j						-	34.W		
Sectio	0011410		+		+					- 9j		+			+	+			
Auffällige Gesichtsform	0000271	+	+					+	+	- 9j						+			
Groß für GA (SSW)	0001520				+	+				- 9j					+	+			
Neonatale Atemstörung	0002093										+					+			

Tabelle 5: Schwangerschaft und Geburt/ Erkrankungsalter/ Geschlecht: Darstellung der phänotypischen Merkmale der Varianten hinsichtlich von Schwangerschaft und Geburt/ Erkrankungsalter/ Geschlecht. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F. Dannenberg

Merkmal	HPO	Varianten																
		<u>V259A</u> [2. 31]	<u>L271H</u> [60]	<u>V401L</u> [2]	<u>G403D</u> [2. 31]	<u>G403D</u> [2. 31]	<u>G407R</u> [2]	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 1)	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 2)	<u>S672L</u> [257] Familiäre Form	<u>F767S</u> [3]	<u>A769G</u> [2. 31]	<u>A769T</u> [2]	<u>A769T</u> [2. 52]	<u>I770M</u> [2. 4. 31]	<u>G1169D</u> Indexpat.	<u>G1169D</u> Pat. mit Mosaik	<u>T1411M</u> [2]
Entwicklungs- verzögerung	001275 8	+	+	+			-	+	+	+ 9/ 30/ Vater	+	-	+		+	+		
Verzögerte Sprachentw.	000075 0									+9j						+		
Makrocephalie	000025 6															+	+	
Mikrocephalie	000025 2			+				+	+									
Plagiocephalie	000135 7							+	+									
cMRT Auffälligkeiten	041026 3	+		-	+					- Vater					-	+	+	
Cerebrale Atrophie	000205 9															[+]		
Periventr. Zysten	000710 9				+											+		
Periventr. Leukomalazie	000697 0				[+]											[+]		
Intrazerebrale Blutungen	000217 0																	
Ventrikulo- megalie	000211 9				+											+		
Anomalien Hirnwindung	000253 6															-	+	
Muskuläre Hypotonie	000125 2	+	+	+		+	-	+	+			-	+			+		
Tremor	000133 7		+													+	-	
Epilepsie	000125 0	+	-	+	+	+	-	+	-	+ Vater		-	-	+	+	+	-	+

Spastische Lähmung	010002 1				+		-	-	-			-	-		+	+			
Spastik	000125 7			+	+	+		-	-			-	-		+	+			
Ungeschicktheit	000231 2											+				+			
Athetose	000126 6														+				
Andere Bewegungsst.	000125 7										+ jittering				+	(+)	+		

Tabelle 6: Nervensystem: Darstellung der pathologischen neurologischen bzw. neuropädiatrischen Phänotypmerkmale der Varianten. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F. Dannenberg.

Merkmal	HPO	Varianten																	
		V259A [2.31]	L271H [60]	V401L [2]	G403D [2.31]	G403D [2.31]	G407R [2]	S672L [2] (Zwilling 1)	S672L [2] (Zwilling 2)	S672L [257] Familiäre Form	F767S [3]	A769G [2.31]	A769T [2]	A769T [2.52]	I770M [2.4.31]	G1169D <u>Indexpat.</u>	G1169D <u>Pat. mit Mosaik</u>	T1411M [2]	V1482 [2]
ASD	00007 29			+		(+)	+	+	+	+9j		+	+	+				+	+
Intellektuelle Beeinträchtigung	01005 43	+		+		+	-	+	+	+ 9j/ 30j/ Vater		+	+		+	+			
Schlafstörung	00023 60									+9j/ 30j/ Vater		+	+		+	+			
Auto- aggression	01007 16			+			-	+	+	+9j		-	+			NA			
Angststörung	00007 39						+									NA			
Depression	00007 16						+			+ Vater						NA			
Demenz	00007 26									(+) Vater									
Psychose	00007 09									+ 30j									
Bipolare Störung	00073 02									+ 30j									
Impulsivität/ Aggressivität	01007 10									+9j/ 30j									
Störung der Aufmerksamkeit	00070 18									+9j									

Tabelle 7: Psychiatrische Beschwerden/ Verhaltensstörungen: Darstellung der psychiatrischen Beschwerden bzw. der Verhaltensstörungen der Varianten. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F. Dannenberg.

Merkmal	HPO	Varianten																	
		<u>V259A</u> [2.31]	<u>L271H</u> [60]	<u>V401L</u> [2]	<u>G403D</u> [2.31]	<u>G403D</u> [2.31]	<u>G407R</u> [2]	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 1)	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 2)	<u>S672L</u> [257] Familiäre Form	<u>F767S</u> [3]	<u>A769G</u> [2.31]	<u>A769T</u> [2]	<u>A769T</u> [2.52]	<u>I770M</u> [2.4.31]	<u>G1169D</u> Indexpat.	<u>G1169D</u> Pat. mit Mosaik	<u>T1411M</u> [2]	<u>V1482</u> [2]
Neuropathie N.II	00011 38															+			
Seh- beeinträchtigung	00005 05				+	+										+			
Kortikale Erblindung	01007 04				+	-													
Störung der Augenmotilität	00077 72				+											+			
Augenbewegst.	00004 96				+														
Nystagmus	00006 39				+														
Hypermetropie	00005 40					+													

Tabelle 8: Beeinträchtigungen des Sehens und der Augen: Darstellung der pathologischen (neuro-)ophthalmologischen Phänotypmerkmale der Varianten. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F. Dannenberg.

Merkmal	HPO	Varianten																	
		<u>V259A</u> [2.31]	<u>L271H</u> [60]	<u>V401L</u> [2]	<u>G403D</u> [2.31]	<u>G403D</u> [2.31]	<u>G407R</u> [2]	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 1)	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 2)	<u>S672L</u> [257] Familiäre Form	<u>F767S</u> [3]	<u>A769G</u> [2.31]	<u>A769T</u> [2]	<u>A769T</u> [2.52]	<u>I770M</u> [2.4.31]	<u>G1169D</u> Indexpat.	<u>G1169D</u> Pat. mit Mosaik	<u>T1411M</u> [2]	<u>V1482</u> [2]
Sensorineurale Taubheit	00004 07									- 9j						+	-		
Cochlea Implantate																+	-		
Hörschädigung	00003 65									- 9j						+	-		

Tabelle 9: Beeinträchtigungen des Hörens: Darstellung der Beeinträchtigungen des Hörens der Varianten. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F. Dannenberg.

Tabelle 10: Kardiovaskuläre Symptome: Darstellung der pathologischen kardiovaskulären Phänotypmerkmale der Varianten. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F. Dannenberg.

Merkmal	HPO	Varianten																	
		<u>V259A</u> [2, 31]	<u>L271H</u> [60]	<u>V401L</u> [2]	<u>G403D</u> [2, 31]	<u>G403D</u> [2, 31]	<u>G407R</u> [2]	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 1)	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 2)	<u>S672L</u> [257] Familiäre Form	<u>F767S</u> [3]	<u>A769G</u> [2, 31]	<u>A769T</u> [2]	<u>A769T</u> [2, 52]	<u>I770M</u> [2, 4, 31]	<u>G1169D</u> Indexpat.	<u>G1169D</u> Pat. mit Mosaik	<u>T1411M</u> [2]	<u>V1482</u> [2]
PHA	00117 36	+	+	-	+	-	-	-	-			-		+	+	-			
Erhöhter Aldosteron-Renin-Quotient	00008 47	(+)	(+)		+	-					+					+			
Hypoglykämien	00019 88				+	+					+					+			
HIH	00008 25		+	-		+	-	-	-			-				-	+		
Hirsutismus	00010 07																		
Erniedrigtes Renin	00400 84										+								
Diabetes Typ-2	00059 78									+ Vater									

Tabelle 11: Endokrine Störungen: Darstellung der pathologischen endokrinen Phänotypmerkmale der Varianten. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F. Dannenberg.

Merkmal	HPO	Varianten																	
		<u>V259A</u> [2, 31]	<u>L271H</u> [60]	<u>V401L</u> [2]	<u>G403D</u> [2, 31]	<u>G403D</u> [2, 31]	<u>G407R</u> [2]	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 1)	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 2)	<u>S672L</u> [257] Familiäre Form	<u>F767S</u> [3]	<u>A769G</u> [2, 31]	<u>A769T</u> [2]	<u>A769T</u> [2, 52]	<u>I770M</u> [2, 4, 31]	<u>G1169D</u> Indexpat.	<u>G1169D</u> Pat. mit Mosaik	<u>T1411M</u> [2]	<u>V1482</u> [2]
Polyurie	0000103															+			
Nephrogene Ödeme	0007430															+			
Hypokaliämie	0002900				+														
Hyponatriämie	0002902															+			
Neurogene Blase	0000011															+			
Enuresis nocturna	0010677													+	NA				
Nierenstein	0000787				+														
Maldescensus testes	0000028							+	-							+			

Tabelle 12: Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes/ Erkrankungen der Nieren und des Urogenitaltraktes: Darstellung der entsprechenden Phänotypmerkmale der Varianten. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F. Dannenberg.

Merkmal	HPO	Varianten																	
		<u>V259A</u> [2.31]	<u>L271H</u> [60]	<u>V401L</u> [2]	<u>G403D</u> [2.31]	<u>G403D</u> [2.31]	<u>G407R</u> [2]	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 1)	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 2)	<u>S672L</u> [257] Familiäre Form	<u>F767S</u> [3]	<u>A769G</u> [2.31]	<u>A769T</u> [2]	<u>A769T</u> [2.52]	<u>I770M</u> [2.4.31]	<u>G1169D</u> Indexpat.	<u>G1169D</u> Pat. mit Mosaik	<u>T1411M</u> [2]	<u>V1482</u> [2]
Gedeihstörung	00015 08				+	+													
Hepatomegalie	00022 40																+		
Erhöhte Leberenzyme	00029 10															+			
Dysphagie	00020 15				+											+			
GERD	00020 20				+					+		+							
Polydipsie	00019 59														+				
Nabelhernie	00015 37					+													

Tabelle 13: Erkrankungen des Verdauungstraktes: Darstellung der entsprechenden pathologischen Phänotypmerkmale der Varianten. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F. Dannenberg.

Merkmal	HPO	Varianten																	
		<u>V259A</u> [2, 31]	<u>L271H</u> [60]	<u>V401L</u> [2]	<u>G403D</u> [2, 31]	<u>G403D</u> [2, 31]	<u>G407R</u> [2]	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 1)	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 2)	<u>S672L</u> [257] Familiäre Form	<u>F767S</u> [3]	<u>A769G</u> [2, 31]	<u>A769T</u> [2]	<u>A769T</u> [2, 52]	<u>I770M</u> [2, 4, 31]	<u>G1169D</u> Indexpat.	<u>G1169D</u> Pat. mit Mosaik	<u>T1411M</u> [2]	<u>V1482</u> [2]
Pathologische Frakturen	00027 56														+ Mangel Vitamin D	+			
Kielbrust	00007 68																		

Tabelle 14: Skelettanomalien: Darstellung der entsprechenden pathologischen Phänotypmerkmale der Varianten. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51, 52, 257] Tabelle von F.

Dannenberg.

Medikation	DR	Varianten																	
		<u>V259A</u> [2.31]	<u>L271H</u> [60]	<u>V401L</u> [2]	<u>G403D</u> [2.31]	<u>G403D</u> [2.31]	<u>G407R</u> [2]	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 1)	<u>S672L</u> [2] (Zwilling 2)	<u>S672L</u> [257] Familiäre Form	<u>F767S</u> [3]	<u>A769G</u> [2.31]	<u>A769T</u> [2]	<u>A769T</u> [2.52]	<u>I770M</u> [2.4.31]	<u>G1169D</u> Indexpat.	<u>G1169D</u> Pat. mit Mosaik	<u>T1411M</u> [2]	<u>V1482</u> [2]
<i>Isradipin</i>	+												+ Keine Wirkung						
<i>Nifedipin</i>	+		+												+				
<i>Amlodipin</i>	+				+ RR														
<i>Diazoxid</i>						+ (für HH)													
<i>Hydrokortison</i>						+ (für HH)													

Tabelle 15: Spezifische Medikationen (bzw. *targeted therapies*): Darstellung der entsprechenden medikamentösen Behandlungsversuche. Daten entnommen aus: [2-4, 31, 51,

52, 257] Tabelle von F. Dannenberg.

9.4 Einordnung und Interpretation der biophysikalischen Ergebnisse bezüglich des Effektes von Isradipin auf die $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanalfunktion sowie der klinischen Therapieversuche mit Nifedipin

Die Gruppe der Ca^{2+} -Kanalantagonisten insgesamt entfaltet ihre Wirkung u.a. über Bindung an L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. [227, 309, 310] In den biophysikalischen Untersuchungen wurde die Substanz Isradipin als eines Vertreters der DHP- Ca^{2+} -Kanalantagonisten verwendet, da Isradipin eine Substanz ist, die im Vergleich zu anderen Wirkstoffen dieser Gruppe eine suffiziente ZNS-Gängigkeit aufweist. [149] Dies ist von Bedeutung, da die zentralnervösen Störungen das klinische Bild von Patient*innen mit *CACNA1D*-Mutationen bestimmen. [2, 3] Obwohl die antihypertensive Wirkung von Isradipin auf der postulierten Inhibition von $\text{Ca}_v1.2\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen der glatten Muskulatur von Arterien beruht, besitzt Isradipin eine vergleichbare Affinität für $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle. [214]

Alternativ verfügt Nifedipin über eine ähnliche ZNS-Gängigkeit. [148, 149] Andere DHP- Ca^{2+} -Kanalantagonisten, wie das in der Therapie der arteriellen Hypertonie im Kindesalter etablierte Amlodipin, haben hingegen eine deutlich schlechtere lokale Bioverfügbarkeit im ZNS. [311] Ca^{2+} -Kanalantagonisten anderer pharmakologischer Gruppen wie Verapamil (pharmakologische Untergruppe der Phenylalkylamine) oder Flunarizin (Gruppe der Diphenylmethylpiperazin-Derivate), die in der Neuropädiatrie und der Kinderkardiologie ebenfalls für Kinder etabliert sind, haben wiederum eine deutlich eingeschränkte Wirksamkeit bezüglich der Hemmung von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen. [312, 313] Aufgrund der besseren Verfügbarkeit klinischer Daten für Nifedipin in pädiatrischen Kollektiven wurde daher zunächst diese Substanz für die ersten beiden individuellen Heilversuche gewählt. [153] Aufgrund der hohen Bioverfügbarkeit im ZNS, und zahlreicher publizierter experimenteller Daten für diese Substanz wurde Isradipin als Vertreter der DHP- Ca^{2+} -Kanalantagonisten für die pharmakologischen Untersuchungen im Zellmodell gewählt. [3, 31, 148, 149]

Die Inhibition von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen durch DHP- Ca^{2+} -Kanalantagonisten ist von der jeweiligen Konfiguration des Kanals anhängig, daher können die biophysikalischen Veränderungen des *gatings* potenziell einen Einfluss auf die Sensitivität der G1169D-Variante für Isradipin haben. [3]

Die Ergebnisse der Patch-Clamp-Untersuchungen dieser Arbeit weisen auf eine erhaltene Sensitivität der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen der G1169D-Variante hin. (siehe **Abbildung 15**).

Die Sensitivität der F767S-Variante und anderer *de novo* dominanter Varianten für Isradipin ist spannungsabhängig, Isradipin und andere DHP- Ca^{2+} -Kanalantagonisten haben eine höhere Affinität zu inaktivierten Kanalkonformationen. [3] Die Kanäle der F767S-Variante beispielsweise haben im Vergleich zum WT eine 2-6-fach erhöhte Sensitivität für Isradipin. [3] Im Gegensatz hierzu unterscheidet sich die Sensitivität der G1169D-Variante nicht signifikant im Vergleich zum WT. [3] Trotz der starken elektrophysiologischen Ähnlichkeiten des *gatings* der G1169D-Variante und der F767S-Variante unterscheiden sich die beiden Varianten hinsichtlich ihrer Sensitivität für Isradipin. [3]

Auch andere *de novo* dominante Varianten haben teilweise eine höhere Sensitivität für Isradipin als die G1169D-Variante. [2, 3] Ortner et al. haben dies für die S652L-Variante und die V401L-Variante gezeigt. [2, 3]

Aufgrund der erhaltenen Sensitivität ist Isradipin eine potenzielle Therapieoption für den Indexpatienten mit der G1169D-Variante, insbesondere nach den frustranen und frühzeitig beendeten individuellen Heilversuchen mit Nifedipin. Eine gezielte Isradipintherapie im Rahmen eines individuellen Heilversuches wäre vor dem Hintergrund der deutlich höheren Sensitivität auch für das Kind mit der F767S-Variante denkbar. [3, 244]

Trotz der biophysikalischen Messung im Zellmodell bei denen zur Kanalhemmung Isradipin zur Verwendung kam, wurden beim Indexpatienten mit der G1169D-Variante zunächst zwei unabhängige Therapieversuche mit Nifedipin durchgeführt. [244] Dies erfolgte nach ausführliche Abwägung der Nebenwirkungsprofile beider Substanzen; für Nifedipin liegt zwar ebenfalls für Kinder unter 18 Jahren keine Zulassung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte vor, jedoch ist Nifedipin seit Jahrzehnten als antihypertensive Therapieoption bei Kindern und insbesondere bei nierentransplantierten Kindern etabliert. [153, 314]

Beide Präparate weisen ähnliche unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf. Jedoch bestehen Unterschiede in der Pharmakokinetik: Nifedipin kann aufgrund einer rascheren Anflutung eher zu kurzen sehr ausgeprägte Blutdrucksenkungen führen. [169] Dies könnte beim ersten Heilversuch mit Nifedipin eine Rolle gespielt haben: Da es nach rascher Aufdosierung von Nifedipin beim Indexpatienten mit der G1169D-Variante zu einer symptomatischen arteriellen

Hypotonie mit ausgeprägter Reflextachykardie kam, musste der Heilversuch beendet werden. [169] Daher erhielt der Indexpatient beim zweiten gezielten Therapieversuch mit Nifedipin eine geringere Dosierung, die deutlich langsamer aufdosiert werden sollte. Zudem erfolgte eine kontinuierliche Verabreichung der Nifedipindosis über eine nasogastrale Sonde mit Hilfe einer Perfusorspritze mit festgelegter Rate. Jedoch kam es während dieser Therapie zu einer unklaren sehr deutlichen Leberwerterhöhung mit maximalen Werten der AST = 706 U/l (< 71 U/l) und ALT = 1887 U/l (< 41 U/l). Daher musste der zweite individuelle Heilversuch mit Nifedipin bereits nach 3 Tagen beendet werden. In der Folge kam es zu einem allmählichen Abfall der erhöhten Werte, erst nach einigen Monaten zeigten sich diese wieder innerhalb der Referenzwerte. Der Gerinnungswert Quick zeigte sich nur leicht reduziert. Die GLDH sowie die Bilirubin-Werte wurden zu jeder Zeit normwertig bestimmt.

Es erfolgte eine ausführliche Abklärung der Leberwerterhöhungen. Jedoch konnten weder eine virale noch eine toxische Genese nachgewiesen werden. [315, 316]

Zunächst wurden drei konkurrierende Ätiologien der Transaminasenerhöhung diskutiert: Die Transaminasenerhöhung könnte Ausdruck einer postinfektiösen Genese nach abgeklungenen SARS-CoV-2-Infektion gewesen sein. Alternativ könnte es postinterventionell nach wochenlanger intensivmedizinischen Therapie dazu gekommen sein. Potenziell könnte auch eine akute Hepatitis unklarer Ätiologie (non A bis E) bei Kindern, welche seit Frühjahr 2022 weltweit gehäuft auftrat, zu den Leberwerterhöhungen geführt haben. [315-317] Da für alle 3 Möglichkeiten keine eindeutigen Biomarker zur Verfügung standen, war eine endgültige Zuordnung nicht möglich. [315-317] Nach Ende des zweiten Heilversuches erfolgte eine erneute Prüfung entsprechender Vorbefunde und eine Reanalyse älterer Blutproben: Bei dieser erneuten Analyse zeigte sich, dass bereits bei Beginn des Heilversuches die Transaminasen erhöht gewesen waren. Die Transaminasen stiegen dann unter der Nifedipin-Gabe weiter an. Letztendlich wurden die erhöhten Leberwerte aus diesem Grund nicht auf die Nifedipintherapie zurückgeführt. In der Rückschau hätte der individuelle Heilversuch zu einem anderen Zeitpunkt durchgeführt werden sollen.

Vor einem zukünftigen individuellen Heilversuch mit Isradipin sind vor diesem Hintergrund die potenziellen Risiken genau zu prüfen. Isradipin stammt aus der gleichen Wirkstoffgruppe wie Nifedipin (Gruppe der DHP-Ca²⁺-Kanalantagonisten). [46, 148, 149] Auch wenn ein ursächlicher Zusammenhang von Nifedipintherapie und Transaminasenanstieg beim

Indexpatient aus den im vorangegangenen Abschnitt genannten Gründen wenig wahrscheinlich ist, können Leberzellschädigungen bis hin zum Leberversagen und zur Transplantationspflichtigkeit sehr seltene unerwünschte Arzneiwirkungen von Isradipin sein. [318] Zudem ist zu bedenken, dass Transaminasenerhöhungen ohne begleitende Leberpathologie eine häufige Nebenwirkung der Isradipin-Therapie darstellen, Transaminasenerhöhungen traten beispielweise in einer Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit von Isradipin bei ca. 10 % der behandelten Patienten auf, waren jedoch meist transient.[318, 319] So könnte eine zukünftiger individueller Heilversuch ausschließlich unter einer regelmäßigen und engmaschigen Kontrolle der laborchemischen Leberwerte sowie ggf. weiterer diagnostischer Mittel wie Leberultraschall erfolgen. Ein verbleibendes Risiko bliebe bestehen.

Für die Evaluation des Risikoprofils einer solchen Therapie wäre es daher sehr hilfreich, wenn Isradipin bei anderen *de novo* dominanten *CACNA1D*-Varianten therapeutisch eingesetzt würde. Die Arbeitsgruppe von Török et al. hat auf den potenziellen Nutzen einer zukünftigen Isradipintherapie im Rahmen eines individuellen Heilversuches aufgrund der gesteigerten Sensitivität für das Kind mit der F767S-Variante hingewiesen. [3]

9.5 Grenzen dieser Forschungsarbeit und Ausblick

Inwiefern die Position der G1169D-Variante am Ende der S6-Helix von *repeat III* und am Beginn der DIII-DIV-Linker-Region zur Pathogenität dieser Variante beiträgt, wird durch diese Arbeit nicht aufgeklärt. Die Korrelation von Topographie und der starken Ausprägung des Phänotyps könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen werden. [2, 3] Ein weitergehender Vergleich topographischer und biophysikalischen Merkmale der G1169D-Variante mit weiteren *de novo* dominanten *CACNA1D*-Varianten wird ebenfalls von dieser Arbeit nicht geleistet. Die Implikationen des Austausches der unpolaren nicht geladenen Aminosäure Glycin durch die negativ geladenen polare Aminosäure Asparaginsäure in Position 1169 der $\alpha 1$ -D-Untereinheit könnten zukünftig durch eine genauere Differenzierung und Darstellung der direkten strukturellen und bioelektrischen Umgebung der G1169D-Variante

erfolgen; auf diese Weise könnten Rückschlüsse auf intramolekulare elektrochemische Auswirkungen der G1169D-Variante herausgearbeitet werden. [3, 320] Potentielle Auswirkungen der Variante auf das *gating* und die Wahrscheinlichkeit von Kanalkonformationen während bestimmter Membranspannungen könnten untersucht werden. [3] Zukünftig könnten die Daten aus einer solchen Strukturanalyse und aus elektrophysiologischen Untersuchungen mit einer kryoelektronenmikroskopischen Darstellung des $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanals korreliert werden, um so eine genauere Vorstellung von den Effekten der G116D-Variante zu gewinnen. [3]

Zukünftige Untersuchungen von Keimbahnmutationen, die *repeat III* betreffen, und ähnliche biophysikalische Eigenschaften wie die G1169D-Variante haben könnten, werden zeigen, ob auch diese Varianten mit dem PASNA-Phänotyp korreliert werden können. [2, 4]

Auch die Kartierung somatischer *CACNA1D*-Mutationen des $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanalproteins inkl. der Mikroumgebung der G1169D-Variante wird stetig fortgesetzt. [3, 52] Biophysikalische Charakterisierungen all dieser Varianten werden für die Pathogenitätsbewertung und die Phänotyp-Genotyp-Korrelation von *CACNA1D*-Keimbahnmutationen insgesamt interessant sein. [3] Anhand zukünftiger Phänotypbeschreibungen neuer *de novo* dominanter *CACNA1D*-Varianten könnten die potentiellen neurologischen und endokrinen Auswirkungen weiter differenziert werden. [3, 4, 31, 52]

Beim Indexpatienten und dem Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik könnten regelmäßige Bestimmungen des arteriellen Blutdrucks, der Aldosteronwerte und C-Peptid-Werte im Plasma und 24-Stunden-Sammelurin sowie Insulin- und Glucosebestimmungen im Plasma erfolgen, um Episoden endokriner Dysfunktion rechtzeitig zu detektieren.

Bisher ist keine Veröffentlichung einer korrespondierenden somatischen Mutation an Position G1169 bekannt, in der unmittelbaren Proteinumgebung der Variante sind jedoch somatische Mutationen beschrieben. [2] Daher lässt sich die Klinik des Indexpatienten nicht mit Auswirkungen somatischer Mutationen korrelieren. [2] Künftig könnte die Detektion einer somatischen Mutation an Position G1169 beispielsweise bei aldosteronproduzierenden Adenomen weitere Hinweise auf die endokrine Dysfunktion der G1169D-Variante geben.

Zukünftige Charakterisierungen von somatischen Mutationen und Keimbahnmutationen in direkter Umgebung der G1169D-Variante werden gemeinsam dabei behilflich sein, den klinischen und biophysikalischen Phänotyp der G1169D-Variante genauer einzuordnen. [2, 3]

Weitere Studien sind nötig, um die große Vielfalt an klinischen Symptomen der *de novo* *CACNA1D*-Varianten mit den elektrophysiologischen Befunden dieser Varianten zu korrelieren. [2, 3, 52]

In unterschiedlichen Geweben liegen verschiedene Splice-Varianten von $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen vor, die unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften haben können [3] Török et al. haben darauf hingewiesen, dass alternatives *splicing* auch für die Funktion der anderen Untereinheiten des $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanals relevant ist; bestimmten Verteilungsmuster dieser Splice-Varianten in verschiedenen Geweben sind beschrieben. [3] So kann eine *CACNA1D*-Variante aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzungen von Splice-Varianten der Untereinheiten zu einem unterschiedlichen *gating* in verschiedenen Geweben führen. [3] Dieses komplexe Interaktionsmuster wurde bei der Korrelation von Genotyp und Phänotyp im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt. [3, 52]

Um den Tremor der G1169D-Variante weiter aufzuklären, wären Knock-in-Mausmodelle als nächster Schritt für die Untersuchung des charakteristischen Motorphänotyps einsetzbar; es könnte untersucht werden, ob ein Tremor bzw. ein *jittering* in einem solchen Mausmodell auftreten. [3, 52]

Die Abgrenzung eines Tremors von Myoklonien erfolgte im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich klinisch sowie durch Analyse von Video-EEGs (siehe **Abbildungen 7 bis 9**). [85, 87] Die in der Erwachsenenneurowissenschaft etablierten Messmethoden wie die Mehrkanal-EEG-EMG-Korrelation, die Mittelung des EEGs in Relation zu im EMG aufgezeichneten Myoklonien (*jerk-locked back-averaging*, **JLBA**), die Bestimmung pathologischer kortikaler Reflexe mit hoher Latenz (*pathological long-latency reflexes*, **c-reflex**) bei der Ableitung somatosensibler evozierter Potentiale (**SSEPs**), die Evaluation der SSEP-Amplituden sowie eine Tremoranalyse mittels Akzelerometrie standen hierfür nicht zur Verfügung. [321-323]

Sollten zukünftige Studien die Klassifizierung der Bewegungsstörung als Tremor bestätigen, könnte die Rolle der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle bei der Tremorentstehung weiter aufgeklärt werden. Eventuell könnte die G1169D-Variante damit sogar von allgemeinem Interesse für die Tremor- und Parkinsonforschung sein. [52, 100] Bisher sind keine erweiterten bildgebenden Diagnostikmethoden aus der Parkinsondiagnostik wie die funktionelle Magnetresonanztomographie (**fMRT**), die Positronenemissionstomographie (**PET**) oder die Single-Photon-Emissionscomputertomographie (**SPECT**) erfolgt. [298] Auch erfolgte bisher

keine elektronische Analysen von Bewegungsprofilen. [324] Diese Methoden könnten für die weitere klinische Charakterisierung von Patient*innen mit G1169D-Variante oder anderen ähnlichen *CACNA1D*-Varianten von Bedeutung sein. [325]

Für den Indexpatienten stand insgesamt keine EMG zur Verfügung, um kortikale Myoklonien von einem Tremor zu unterscheiden; auch erfolgte keine Nadelelektroden-EMG um Hinweise auf myopathische Veränderungen oder muskuläre Faszikulationen zu gewinnen. [87, 326] Bei Kindern werden Nadelelektroden-EMG Untersuchungen aufgrund der untersuchungsbedingten Schmerzen vermieden. [327]

Zusammengefasst ist damit eine endgültige Abgrenzung der als Tremor klassifizierten Bewegungsstörung, sowohl von Myoklonien als auch von muskulären Faszikulationen und anderen Bewegungsstörungen nur eingeschränkt möglich. [322] Auch eine durch die G1169D-Variante verursachte Dysfunktion der Motoneurone wird im Rahmen dieser Untersuchung nicht genauer geprüft. [299, 300]

Eine genauere Zuordnung und Differenzierung des Motorphänotyps kann erst im weiteren klinischen Verlauf und durch biophysikalische Untersuchungen und klinische Charakterisierungen neuer *de novo* dominanter *CACNA1D*-Phänotypen erfolgen. [52]

Durch die zunehmende Verwendung von Next-Generation-Sequencing-Methoden könnten zukünftig sporadische *de novo* dominanten *CACNA1D*-Varianten vermehrt detektiert werden. [328] So wird sich mit der Zeit das Bild über die Funktion und Störungen des $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanals weiter differenzieren. [3]

Wie oben gezeigt, ist bisher bei keiner anderen *de novo* dominanten *CACNA1D*-Variante eine Hörstörung beschrieben worden. Im weiteren Verlauf könnten Hörtestungen auch beim Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik und dem Kind mit der biophysikalisch verwandten F767S-Variante durchgeführt werden, so könnte untersucht werden, ob auch bei diesen beiden Kindern mit dominanten *de novo* Mutationen Hörstörungen auftreten. [2, 3, 52]

In dieser Studie erfolgte eine biophysikalische Evaluation von Isradipin als Vertreter der Wirkstoffgruppe der Ca^{2+} -Kanalantagonisten. Hierbei zeigte sich eine lediglich nicht signifikante Tendenz zu einer erhöhten Sensitivität der G1169D-Variante für Isradipin. Weitere alternative Ca^{2+} -Kanalantagonisten oder pharmakologische Ca^{2+} -Modulatoren wurden im Rahmen dieser Studie nicht geprüft. Zukünftig könnten auch neuartige Substanzen, welche die Signaltransduktion der $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle beeinflussen, von Bedeutung sein. [329]

Eine biophysikalische Charakterisierung dieser alternativen Wirkstoffe könnte im Falle eines Nichtansprechens des Kindes mit der G1169D-Variante auf Isradipin von Bedeutung sein.

Die klinische Anwendung von Isradipin beim Kind mit der G1169D-Variante steht noch aus. Dies könnte im Rahmen eines individuellen Heilversuchs zukünftig erfolgen. Die bisher beim Patienten erfolglos verwendete Substanz Nifedipin wurde in der biophysikalischen Charakterisierung nicht untersucht. Dies stellt eine weitere Einschränkung dieser Studie dar.

Bei den beiden bisher erfolgten individuellen Heilversuchen wurde nicht-retardiertes Nifedipin verwendet. Die Applikation mittels kontinuierlicher Verabreichung über eine nasogastrale Sonde war für die Pflegenden des Kindes mit der G1169D-Variante eine Herausforderung. Nicht zuletzt hat diese Applikationsform aufgrund der kontinuierlichen Verabreichung ein höheres Risiko für Fehldosierungen. Zudem müssen aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Substanz umfassende Schutzmaßnahmen ergriffen werden.

Bei einem zukünftigen individuellen Heilversuch mit Isradipin käme daher idealerweise die Substanz in retardierter Formulierung zum Einsatz. [330] Dies würde die Therapie deutlich erleichtern. Allerdings sind aufgrund der längeren Halbwertszeit schwieriger zu beherrschende Nebenwirkungen zu bedenken. [330] Retardiertes Isradipin könnte durch seine pharmazeutischen Formulierung den klinischen Einsatz vereinfachen. [331] Diese Präparate sind ausschließlich in Erwachsenenendosis erhältlich; diese Substanz weist eine Mikroverkapselung auf, dies führt zur gewünschten verzögerten Wirkstofffreisetzung. [332] Damit sind köpergewichtbezogene Dosierungen für den klinischen Gebrauch bei Kindern deutlich einfacher als bei Nifedipin herstellbar. [332] Trotzdem ist die Gabe bei dem Indexpatienten mit der G1169D-Variante aufgrund der schweren Erkrankung erschwert und nur durch nasogastrale Sondierung möglich.

Aus betriebswirtschaftlichen kommerziellen Gründen wurde der Vertrieb von mikroverkapseltem Isradipin von der einzigen Vertriebsfirma in Deutschland, der CHEPLAPHARM Arzneimittel GmbH, zu Beginn des Jahres 2023 eingestellt, diese Auskunft der Vertriebsfirma erfolgte auf Anfrage. Der aktive Verzicht der CHEPLAPHARM Arzneimittel GmbH auf die Zulassung von Isradipin erfolgte bereits im Juni 2022, auch diese Auskunft der Vertriebsfirma erfolgte auf Anfrage. Im Falle eines Heilversuches könnte zunächst auf Restbestände in Deutschland und im europäischen Ausland zurückgegriffen werden. Auch diese Informationen wurden nach Anfrage durch die CHEPLAPHARM Arzneimittel GmbH

ausgegeben. Langfristig müsste ein pharmazeutischer Hersteller gefunden werden, der weiterhin eine mikroverkapselte Form von Isradipin für klinische Forschungszwecke produzieren könnte.

Ein möglicher Auswertungsparameter für einen potentiellen individuellen Heilversuch mit retardiertem Isradipin wäre neben einer Verminderung der epileptischen Aktivität im EEG eine Reduktion des Tremors sowie der Anfallsfrequenz. Zudem wäre es von Interesse, ob Isradipin einen Effekt auf die schwere globale Entwicklungsstörung im Rahmen der DEE haben könnte. Dies hätte auch prognostische Relevanz für Patient*innen mit G1169D-Variante, die bereits frühzeitiger als der Indexpatient im Säuglingsalter therapiert werden könnten, beispielsweise für das Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik.

10 Schlussfolgerungen

Durch die biophysikalische Charakterisierung der G1169D-Variante im Vergleich zum WT ergaben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des *gatings*. (siehe **Kapitel 1.2, 1. Hypothese**)

Zusammengefasst handelt es sich bei der G1169D-Variante um eine Variante mit einem ausgeprägten Gain-of-Function-Effekt. [2, 3, 52] (siehe **Kapitel 1.2, 2. Hypothese**) Die G1169D-Mutation befindet sich in einer funktionalen Hotspot-Region der $\alpha 1$ -D-Untereinheit des $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanals. [2, 52, 242]

Da es beim Indexpatienten keine eindeutigen Hinweise auf Hypoglykämien oder einen primären Hyperaldosteronismus gab, wurde das klinische Bild des Indexpatienten als inkomplettes PASNA-Syndrom gewertet. [3, 4, 31, 52] Regelmäßige endokrinologische Kontrollen sollten auch beim inkompletten PASNA-Syndrom ohne eindeutige endokrine Störungen erfolgen. [52]

Der Nachweis eines weiteren Kindes mit der identischen Mutation im Rahmen eines Mosaiks mit ähnlicher Klinik unterstreicht die Korrelation von Genotyp und inkomplettem PASNA-Syndrom. [52] Die beiden Kinder mit der G1169D-Variante ohne bzw. mit Mosaik weisen neben vielen klinischen phänotypischen Ähnlichkeiten beide einen Tremor und damit einen Motorphänotyp auf. [3, 52] (siehe **Kapitel 1.2, 3. Hypothese**)

Im Vergleich zu den elektrophysiologischen Daten der anderen *de novo* dominanten *CACNA1D*-Varianten zeigt die G1169D-Variante die bisher stärksten Veränderungen des *gatings* im Sinne eines Gain-Of-Function [2, 3, 52] (siehe **Kapitel 1.2, 5. Hypothese**) Aufgrund einer Kombination aus einer ausgeprägten Linksverschiebung der Aktivierungskurve, einer Zunahme des Hintergrund- Ca^{2+} -Einstroms (*window current*) sowie einer stark verzögerten Deaktivierung ist ein beinahe kontinuierlicher Ca^{2+} -Einstrom in die entsprechenden Zellen anzunehmen. [3, 52]

Da der Indexpatient und das Kind mit der G1169D-Variante im Mosaik sowie ein Patient mit F767S-Variante als einzige beschriebene Fälle einen Motorphänotyp aufweisen, könnte dies auf einen neuen PASNA-Syndrom-Subtyp mit Tremor bzw. einer rhythmisch oszillierenden Bewegungsstörung (*jittering*) hinweisen. [3, 52] Diese Varianten haben nicht nur Tremor bzw. *jittering* gemeinsam, sondern sie weisen im Vergleich die stärksten Gain-of-Function-Effekte bei dominanten *de novo CACNA1D*-Varianten auf. [3, 52] Daher liegt die Vermutung nahe,

dass die starken Veränderungen des *gatings* mit dem Motorphänotyp in Beziehung stehen. [3, 52] (siehe **Kapitel 1.2, 4. und 5. Hypothese**)

Die G1169D-Variante weist jenseits der starken Ausprägung viele klinische und elektrophysiologische Gemeinsamkeiten mit den Phänotypen der anderen *de novo* dominanten Phänotypen auf und reiht sich ein ins klinische Spektrum des PASNA-Syndroms. [3, 52] Die schwere epileptische Enzephalopathie des Indexpatienten und seine globale Entwicklungsstörung wurde als DEE gewertet, diese Störungen entsprechen ebenfalls dem klinischen Spektrum des PASNA-Syndroms. (siehe **Kapitel 1.2, 4. und 5. Hypothese**)

Dies spricht neben den großen elektrophysiologischen Übereinstimmungen von G1169D-Variante und den anderen *de novo* dominanten *CACNA1D*-Varianten für einen Zusammenhang von Genotyp und Phänotyp; ein Beweis hierfür liegt bisher nicht vor. [52] (siehe **Kapitel 1.2, 4. Hypothese**)

Gemäß der Kriterien des *American College of Medical Genetics* wurde die G1169D-Variante als pathogen für den Indexpatienten und den Patienten mit der G1169D-Variante im Mosaik gewertet. [52] (siehe **Kapitel 1.2, 4. Hypothese**)

Isradipin stellt neben Nifedipin eine zukünftige zielgerichtete Therapieoption für den Indexpatienten dar. [3, 52] Die biophysikalische Prüfung ergab eine erhaltene Sensitivität der G1169D-Variante für Isradipin. (siehe **Kapitel 1.2, 6. Hypothese**) Die Sensitivität der G1169D-Variante für Isradipin unterscheidet sich nicht signifikant von der Sensitivität des WTs. (siehe **Kapitel 1.2, 7. Hypothese**)

Eine Therapie mit Isradipin könnte im Rahmen eines individuellen Heilversuchs im Sinne eines *drug repurposing* trotz potenziell relevanter Nebenwirkungen unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen realisiert werden. Allerdings ist zu bedenken, dass aktuell aus kommerziellen Gründen kein Vertrieb von mikroverkapseltem Isradipin in Deutschland erfolgt. (siehe **Kapitel 1.2, 8. Hypothese**)

Bei Neugeborenen mit Tremor, sollte eine Diagnostik insbesondere hinsichtlich relevanter endokriner Störungen wie Hyperinsulinismus und Hyperaldosteronismus erfolgen. [52]

11 Literaturverzeichnis

1. Striessnig, J., *Voltage-gated calcium channels - from basic mechanisms to disease*. The Journal of Physiology, 2016. **594**(20): p. 5817-5821.
2. Ortner, N.J., T. Kaserer, J.N. Copeland, and J. Striessnig, *De novo CACAN1D Ca²⁺ channelopathies: clinical phenotypes and molecular mechanism*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2020. **472**(7): p. 755-773.
3. Török, F., K. Tezcan, L. Filippini, M.L. Fernández-Quintero, L. Zanetti, K.R. Liedl, R.S. Drexel, J. Striessnig, and N.J. Ortner, *Germline de novo variant F747S extends the phenotypic spectrum of CACNA1D Ca²⁺ channelopathies*. Hum Mol Genet, 2022.
4. Scholl, U.I., G. Goh, G. Stölting, R.C. De Oliveira, M. Choi, J.D. Overton, A.L. Fonseca, R. Korah, L.F. Starker, J.W. Kunstman, M.L. Prasad, E.A. Hartung, N. Murras, M.R. Benson, T. Brady, J.R. Shapiro, E. Loring, C. Nelson-Williams, S.K. Libutti, S. Mane, P. Hellman, G. Westin, G. Åkerström, P. Björklund, T. Carling, C. Fahlke, P. Hidalgo, and R.P. Lifton, *Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism*. Nature Genetics, 2013. **45**(9): p. 1050-1054.
5. Bean, B.P., *The action potential in mammalian central neurons*. Nature Reviews Neuroscience, 2007. **8**(6): p. 451-465.
6. Zamponi, G.W., J. Striessnig, A. Koschak, and A.C. Dolphin, *The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential*. Pharmacological Reviews, 2015. **67**(4): p. 821-870.
7. Bronner, F., *Extracellular and Intracellular Regulation of Calcium Homeostasis*. The Scientific World JOURNAL, 2001. **1**: p. 919-925.
8. Islam, M.S., *Calcium Signaling: From Basic to Bedside*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1131**: p. 1-6.
9. Rizzuto, R. and T. Pozzan, *When calcium goes wrong: genetic alterations of a ubiquitous signaling route*. Nature Genetics, 2003. **34**(2): p. 135-141.
10. Walkon, L.L., J.O. Strubbe-Rivera, and J.N. Bazil, *Calcium Overload and Mitochondrial Metabolism*. Biomolecules, 2022. **12**(12): p. 1891.
11. Carafoli, E. and J. Krebs, *Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(40): p. 20849-20857.
12. Scholl, U.I., *Genetics of Primary Aldosteronism*. Hypertension, 2022. **79**(5): p. 887-897.
13. Frandsen, S.K., M. Vissing, and J. Gehl, *A Comprehensive Review of Calcium Electroporation—A Novel Cancer Treatment Modality*. Cancers, 2020. **12**(2): p. 290.
14. Comunanza, V., A. Marcantoni, D.H. Vandael, S. Mahapatra, D. Gavello, V. Carabelli, and E. Carbone, *Ca_v1.3 as pacemaker channels in adrenal chromaffin cells: Specific role on exo- and endocytosis?* Channels, 2010. **4**(6): p. 440-446.
15. Raghavan, M., D. Fee, and P.E. Barkhaus, *Generation and propagation of the action potential*. Handb Clin Neurol, 2019. **160**: p. 3-22.
16. Johnson, C.M., C.S. Hill, S. Chawla, R. Treisman, and H. Bading, *Calcium Controls Gene Expression via Three Distinct Pathways That Can Function Independently of the Ras/Mitogen-Activated Protein Kinases (ERKs) Signaling Cascade*. The Journal of Neuroscience, 1997. **17**(16): p. 6189-6202.

17. Kessi, M., B. Chen, J. Peng, F. Yan, L. Yang, and F. Yin, *Calcium channelopathies and intellectual disability: a systematic review*. Orphanet journal of rare diseases, 2021. **16**(1).
18. McKerr, N., A. Mohd-Sarip, H. Dorrian, C. Breen, J. A. James, S. McQuaid, I.G. Mills, and K.D. McCloskey, *CACNA1D overexpression and voltage-gated calcium channels in prostate cancer during androgen deprivation*. Scientific Reports, 2023. **13**(1).
19. Sakmann, B. and E. Neher, *Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes*. Annual Review of Physiology, 1984. **46**(1): p. 455-472.
20. Hill, C.L. and G.J. Stephens, *An Introduction to Patch Clamp Recording*. 2021, Springer US. p. 1-19.
21. Sontheimer, H. and C.B. Ransom, *Whole-Cell Patch-Clamp Recordings*. Humana Press. p. 35-68.
22. Shah, K., S. Seeley, C. Schulz, J. Fisher, and S. Gururaja Rao, *Calcium Channels in the Heart: Disease States and Drugs*. Cells, 2022. **11**(6): p. 943.
23. Caulfield, M.E., F.P. Manfredsson, and K. Steece-Collier, *The Role of Striatal Cav1.3 Calcium Channels in Therapeutics for Parkinson's Disease*. 2023, Springer Berlin Heidelberg.
24. Catterall, W.A., *Voltage-Gated Calcium Channels*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(8): p. a003947-a003947.
25. Motomura, N., Y. Yamazaki, X. Gao, Y. Tezuka, K. Omata, Y. Ono, R. Morimoto, F. Satoh, Y. Nakamura, J. Shim, M.H. Choi, A. Ito, and H. Sasano, *Visualization of calcium channel blockers in human adrenal tissues and their possible effects on steroidogenesis in the patients with primary aldosteronism (PA)*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2022. **218**: p. 106062.
26. Wang, H., X. Zhang, L. Xue, J. Xing, M.-H. Jouvin, James, Matthew, M. Trebak, and J.-P. Kinet, *Low-Voltage-Activated Ca V 3.1 Calcium Channels Shape T Helper Cell Cytokine Profiles*. Immunity, 2016. **44**(4): p. 782-794.
27. Allen, N.M., S. Weckhuysen, K. Gorman, M.D. King, and H. Lerche, *Genetic potassium channel-associated epilepsies: Clinical review of the Kv family*. European Journal of Paediatric Neurology, 2020. **24**: p. 105-116.
28. Zampese, E. and D.J. Surmeier, *Calcium, Bioenergetics, and Parkinson's Disease*. Cells, 2020. **9**(9): p. 2045.
29. Catterall, W.A. and N. Zheng, *Deciphering voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels by studying prokaryotic ancestors*. Trends in Biochemical Sciences, 2015. **40**(9): p. 526-534.
30. Liebeskind, B.J., D.M. Hillis, and H.H. Zakon, *Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(22): p. 9154-9159.
31. Hofer, N.T., P. Tuluc, N.J. Ortner, Y.V. Nikonishyna, M.L. Fernández-Quintero, K.R. Liedl, B.E. Flucher, H. Cox, and J. Striessnig, *Biophysical classification of a CACNA1D de novo mutation as a high-risk mutation for a severe neurodevelopmental disorder*. Molecular autism, 2020. **11**(1).
32. Vetulli, H.M., M.V. Elizari, G.V. Naccarelli, and M.D. Gonzalez, *Cardiac automaticity: basic concepts and clinical observations*. Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology, 2018. **52**(3): p. 263-270.
33. Louradour, J., O. Bortolotti, E. Torre, I. Bidaud, N. Lamb, A. Fernandez, J.-Y. Le Guennec, M.E. Mangoni, and P. Mesirca, *L-Type Cav1.3 Calcium Channels Are*

- Required for Beta-Adrenergic Triggered Automaticity in Dormant Mouse Sinoatrial Pacemaker Cells.* *Cells*, 2022. **11**(7): p. 1114.
34. Peercy, B.E. and A.S. Sherman, *Do oscillations in pancreatic islets require pacemaker cells?* *J Biosci*, 2022. **47**.
 35. Lakatta, E.G., V.A. Maltsev, and T.M. Vinogradova, *A Coupled SYSTEM of Intracellular Ca²⁺ Clocks and Surface Membrane Voltage Clocks Controls the Timekeeping Mechanism of the Heart's Pacemaker.* *Circulation Research*, 2010. **106**(4): p. 659-673.
 36. Capel, R.A. and D.A. Terrar, *The importance of Ca(2+)-dependent mechanisms for the initiation of the heartbeat.* *Front Physiol*, 2015. **6**: p. 80.
 37. Yang, S.N. and P.O. Berggren, *The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology.* *Endocr Rev*, 2006. **27**(6): p. 621-76.
 38. Wu, L.-G., E. Hamid, W. Shin, and H.-C. Chiang, *Exocytosis and Endocytosis: Modes, Functions, and Coupling Mechanisms.* *Annual Review of Physiology*, 2014. **76**(1): p. 301-331.
 39. Williams, C.L. and S.M. Smith, *Calcium dependence of spontaneous neurotransmitter release.* *Journal of Neuroscience Research*, 2018. **96**(3): p. 335-347.
 40. Sudhof, T.C., *Calcium Control of Neurotransmitter Release.* *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2012. **4**(1): p. a011353-a011353.
 41. Liu, C., P. Goel, and P.S. Kaeser, *Spatial and temporal scales of dopamine transmission.* *Nature Reviews Neuroscience*, 2021. **22**(6): p. 345-358.
 42. Uhlén, M., L. Fagerberg, B.M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A.-K. Szigartyo, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, and F. Pontén, *Tissue-based map of the human proteome.* *Science*, 2015. **347**(6220): p. 1260419.
 43. The Human Protein Atlas. *Cacna1d/tissue*. 2022 [cited 2023 19. June 2023]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157388-CACNA1D/tissue>.
 44. Koschak, A., *Impact of gating modulation in CaV1.3 L-type calcium channels.* *Channels*, 2010. **4**(6): p. 523-525.
 45. Joiner, M.-L. and A. Lee, *Voltage-Gated Ca²⁺ Channels in Disorders of Vision and Hearing.* *Current Molecular Pharmacology*, 2015. **8**(2): p. 143-148.
 46. Ortner, N.J. and J. Striessnig, *L-type calcium channels as drug targets in CNS disorders.* *Channels*, 2016. **10**(1): p. 7-13.
 47. Zhang, Q., J. Chen, Y. Qin, J. Wang, and L. Zhou, *Mutations in voltage-gated L-type calcium channel: implications in cardiac arrhythmia.* *Channels*, 2018. **12**(1): p. 201-218.
 48. Verheijck, E.E., A.C.G. Van Ginneken, R. Wilders, and L.N. Bouman, *Contribution of L-type Ca²⁺ current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits.* *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1999. **276**(3): p. H1064-H1077.
 49. Lester, H.A. and A. Karschin, *Gain of Function Mutants: Ion Channels and G Protein-Coupled Receptors.* *Annual Review of Neuroscience*, 2000. **23**(1): p. 89-125.

50. Mahapatra, S., A. Marcantoni, D.H. Vandael, J. Striessnig, and E. Carbone, *Are Cav1.3 pacemaker channels in chromaffin cells? Possible bias from resting cell conditions and DHP blockers usage*. *Channels*, 2011. **5**(3): p. 219-224.
51. Striessnig, J., *Voltage-Gated Ca²⁺-Channel α 1-Subunit de novo Missense Mutations: Gain or Loss of Function - Implications for Potential Therapies*. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 2021. **13**.
52. Ortner, N.J., *CACNA1D-Related Channelopathies: From Hypertension to Autism*. 2023, Springer Berlin Heidelberg.
53. Baig, S.M., A. Koschak, A. Lieb, M. Gebhart, C. Dafinger, G. Nürnberg, A. Ali, I. Ahmad, M.J. Sinnegger-Brauns, N. Brandt, J. Engel, M.E. Mangoni, M. Farooq, H.U. Khan, P. Nürnberg, J. Striessnig, and H.J. Bolz, *Loss of Cav1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness*. *Nature Neuroscience*, 2011. **14**(1): p. 77-84.
54. Liaqat, K., I. Schrauwen, S.I. Raza, K. Lee, S. Hussain, I. Chakchouk, A. Nasir, A. Acharya, I. Abbe, M. Umair, M. Ansar, I. Ullah, K. Shah, M.J. Bamshad, D.A. Nickerson, W. Ahmad, and S.M. Leal, *Identification of CACNA1D variants associated with sinoatrial node dysfunction and deafness in additional Pakistani families reveals a clinical significance*. *Journal of Human Genetics*, 2019. **64**(2): p. 153-160.
55. Pinggera, A. and J. Striessnig, *Ca_v1.3 (*CACNA1D*) L-type Ca²⁺ channel dysfunction in CNS disorders*. *The Journal of Physiology*, 2016. **594**(20): p. 5839-5849.
56. Mesirca, P., I. Bidaud, and M.E. Mangoni, *Rescuing cardiac automaticity in L-type Cav1.3 channelopathies and beyond*. *J Physiol*, 2016. **594**(20): p. 5869-5879.
57. Guo, Z., K. Nanba, A. Udager, B.C. McWhinney, J.P.J. Ungerer, M. Wolley, M. Thuzar, R.D. Gordon, W.E. Rainey, and M. Stowasser, *Biochemical, Histopathological, and Genetic Characterization of Posture-Responsive and Unresponsive APAs*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020. **105**(9): p. e3224-35.
58. Boulkroun, S., F.L. Fernandes-Rosa, and M.C. Zennaro, *Old and new genes in primary aldosteronism*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2020. **34**(2): p. 101375.
59. Omata, K., F. Satoh, R. Morimoto, S. Ito, Y. Yamazaki, Y. Nakamura, S.K. Anand, Z. Guo, M. Stowasser, H. Sasano, S.A. Tomlins, and W.E. Rainey, *Cellular and Genetic Causes of Idiopathic Hyperaldosteronism*. *Hypertension*, 2018. **72**(4): p. 874-880.
60. Pinggera, A., A. Lieb, B. Benedetti, M. Lampert, S. Monteleone, K.R. Liedl, P. Tuluc, and J. Striessnig, *CACNA1D de novo mutations in autism spectrum disorders activate Cav1.3 L-type calcium channels*. *Biol Psychiatry*, 2015. **77**(9): p. 816-22.
61. Pinggera, A., G. Negro, P. Tuluc, M.J. Brown, A. Lieb, and J. Striessnig, *Gating defects of disease-causing de novo mutations in Cav1.3 Ca²⁺ channels*. *Channels*, 2018. **12**(1): p. 388-402.
62. Perez-Rivas, L., T. Williams, and M. Reincke, *Inherited Forms of Primary Hyperaldosteronism: New Genes, New Phenotypes and Proposition of A New Classification*. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2019. **127**(02/03): p. 93-99.
63. Semenova, N.A., O.R. Ryzhkova, T.V. Strokova, and N.N. Taran, *[The third case report a patient with primary aldosteronism, seizures, and neurologic abnormalities (PASNA) syndrome de novo variant mutations in the CACNA1D gene]*. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 2018. **118**(12): p. 49-52.
64. Busquet, P., N.K. Nguyen, E. Schmid, N. Tanimoto, M.W. Seeliger, T. Ben-Yosef, F. Mizuno, A. Akopian, J. Striessnig, and N. Singewald, *CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels*

- modulate depression-like behaviour in mice independent of deaf phenotype.* Int J Neuropsychopharmacol, 2010. **13**(4): p. 499-513.
65. Limpitikul, W.B., I.E. Dick, M. Ben-Johny, and D.T. Yue, *An autism-associated mutation in CaV1.3 channels has opposing effects on voltage- and Ca²⁺-dependent regulation.* Scientific Reports, 2016. **6**.
 66. Lemke, J.R., *Diagnostik genetisch bedingter Epilepsien.* Medizinische Genetik, 2019. **31**(3): p. 303-312.
 67. Specchio, N., E.C. Wirrell, I.E. Scheffer, R. Nabbout, K. Riney, P. Samia, M. Guerreiro, S. Gwer, S.M. Zuberi, J.M. Wilmschurst, E. Yozawitz, R. Pressler, E. Hirsch, S. Wiebe, H.J. Cross, E. Perucca, S.L. Moshé, P. Tinuper, and S. Auvin, *International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset in childhood: Position paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions.* Epilepsia, 2022. **63**(6): p. 1398-1442.
 68. Rho, J.M., *Basic Science Behind the Catastrophic Epilepsies.* Epilepsia, 2004. **45**(s5): p. 5-11.
 69. Specchio, N. and P. Curatolo, *Developmental and epileptic encephalopathies: what we do and do not know.* Brain, 2021. **144**(1): p. 32-43.
 70. Bhatia, K.P., P. Bain, N. Bajaj, R.J. Elble, M. Hallett, E.D. Louis, J. Raethjen, M. Stamelou, C.M. Testa, and G. Deuschl, *Consensus Statement on the classification of tremors. from the task force on tremor of the International Parkinson and Movement Disorder Society.* Movement Disorders, 2018. **33**(1): p. 75-87.
 71. Lenka, A. and J. Jankovic, *Tremor Syndromes: An Updated Review.* Front Neurol, 2021. **12**: p. 684835.
 72. Shanker, V., *Essential tremor: diagnosis and management.* BMJ, 2019: p. l4485.
 73. Torres-Russotto, D., *Clinical approach to tremor in children.* Parkinsonism Relat Disord, 2019. **59**: p. 111-116.
 74. Goraya, J.S. and S. Kaur, *Infantile tremor syndrome: A review and critical appraisal of its etiology.* J Pediatr Neurosci, 2016. **11**(4): p. 298-304.
 75. Ebrahimi-Fakhari, D., C. Van Karnebeek, and A. Münchau, *Movement Disorders in Treatable Inborn Errors of Metabolism.* Mov Disord, 2019. **34**(5): p. 598-613.
 76. Fernandez-Alvarez, E., *Transient movement disorders in children.* J Neurol, 1998. **245**(1): p. 1-5.
 77. Antony, J.H., *Spasmus Nutans.* Archives of Neurology, 1980. **37**(6): p. 373.
 78. Deonna, T., E. Roulet, and H.U. Meyer, *Benign paroxysmal tonic upgaze of childhood--a new syndrome.* Neuropediatrics, 1990. **21**(4): p. 213-4.
 79. Drigo, P., G. Carli, and A.M. Laverda, *Benign paroxysmal torticollis of infancy.* Brain Dev, 2000. **22**(3): p. 169-72.
 80. Holmes, G.L., *Shuddering Attacks.* American Journal of Diseases of Children, 1986. **140**(1): p. 72.
 81. Lombroso, C.T. and N. Fejerman, *Benign myoclonus of early infancy.* Ann Neurol, 1977. **1**(2): p. 138-43.
 82. Ganos, C., M. Aguirregomez, A. Batla, M. Stamelou, P. Schwingenschuh, A. Münchau, M.J. Edwards, and K.P. Bhatia, *Psychogenic paroxysmal movement disorders--clinical features and diagnostic clues.* Parkinsonism Relat Disord, 2014. **20**(1): p. 41-6.
 83. Parker, S., B. Zuckerman, H. Bauchner, D. Frank, R. Vinci, and H. Cabral, *Jitteriness in full-term neonates: prevalence and correlates.* Pediatrics, 1990. **85**(1): p. 17-23.
 84. Singer, H.S., *Motor stereotypies.* Semin Pediatr Neurol, 2009. **16**(2): p. 77-81.

85. Merchant, S.H.I., F. Vial-Undurraga, G. Leodori, J.A. Van Gerpen, and M. Hallett, *Myoclonus: An Electrophysiological Diagnosis*. *Movement Disorders Clinical Practice*, 2020. **7**(5): p. 489-499.
86. Zutt, R., J.W. Elting, and M.A.J. Tijssen, *Tremor and myoclonus*. *Handb Clin Neurol*, 2019. **161**: p. 149-165.
87. Avanzini, G., H. Shibasaki, G. Rubboli, L. Canafoglia, F. Panzica, S. Franceschetti, and M. Hallett, *Neurophysiology of myoclonus and progressive myoclonus epilepsies*. *Epileptic Disorders*, 2016. **18**(s2): p. 11-27.
88. Mastrangelo, M., *Lennox-Gastaut Syndrome: A State of the Art Review*. *Neuropediatrics*, 2017. **48**(3): p. 143-151.
89. Scheffer, I.E. and R. Nabbout, *SCN1A-related phenotypes: Epilepsy and beyond*. *Epilepsia*, 2019. **60 Suppl 3**: p. S17-s24.
90. Mytinger, J.R., *Definitions and Diagnostic Criteria for Infantile Spasms and West Syndrome - Historical Perspectives and Practical Considerations*. *Semin Pediatr Neurol*, 2021. **38**: p. 100893.
91. Kälviäinen, R., J. Khyuppenen, P. Koskenkorva, K. Eriksson, R. Vanninen, and E. Mervaala, *Clinical picture of EPM1-Unverricht-Lundborg disease*. *Epilepsia*, 2008. **49**(4): p. 549-56.
92. van Rootselaar, A.F., I.N. van Schaik, A.M.J.M. van den Maagdenberg, J.H.T.M. Koelman, P.M.C. Callenbach, and M.A.J. Tijssen, *Familial cortical myoclonic tremor with epilepsy: A single syndromic classification for a group of pedigrees bearing common features*. *Movement Disorders*, 2005. **20**(6): p. 665-673.
93. van den Ende, T., S. Sharifi, S.M.A. van der Salm, and A.F. van Rootselaar, *Familial Cortical Myoclonic Tremor and Epilepsy, an Enigmatic Disorder: From Phenotypes to Pathophysiology and Genetics. A Systematic Review*. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*, 2018. **8**: p. 503.
94. Borg, M., *Symptomatic myoclonus*. *Neurophysiol Clin*, 2006. **36**(5-6): p. 309-18.
95. Saini, A.G. and S. Pandey, *Hypererekplexia and other startle syndromes*. *J Neurol Sci*, 2020. **416**: p. 117051.
96. Bhatia, P., J. Heim, P. Cornejo, L. Kane, J. Santiago, and M.C. Kruer, *Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in children*. *J Neurol*, 2022. **269**(2): p. 750-757.
97. Van Der Veen, S., R. Zutt, C. Klein, C. Marras, S.F. Berkovic, J.N. Caviness, H. Shibasaki, T.J. De Koning, and M.A.J. Tijssen, *Nomenclature of Genetically Determined Myoclonus Syndromes: Recommendations of the International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force*. *Movement Disorders*, 2019. **34**(11): p. 1602-1613.
98. Lauffer, M., H. Wen, B. Myers, A. Plumb, K. Parker, and A. Williams, *Deletion of the voltage-gated calcium channel, Ca_v1.3, causes deficits in motor performance and associative learning*. 2020, Cold Spring Harbor Laboratory.
99. Berger, S.M. and D. Bartsch, *The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function*. *Cell and Tissue Research*, 2014. **357**(2): p. 463-476.
100. Catoni, C., T. Calì, and M. Brini, *Calcium, dopamine and neuronal calcium sensor 1: Their contribution to Parkinson's disease*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2019. **12**: p. 55-55.
101. Abeliovich, A. and A.D. Gitler, *Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics*. *Nature*, 2016. **539**(7628): p. 207-216.

102. Zaidel, A., D. Arkadir, Z. Israel, and H. Bergman, *Akineto-rigid vs. tremor syndromes in Parkinsonism*. *Curr Opin Neurol*, 2009. **22**(4): p. 387-93.
103. Puschmann, A., *New Genes Causing Hereditary Parkinson's Disease or Parkinsonism*. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2017. **17**(9).
104. Armstrong, M.J. and M.S. Okun, *Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease*. *JAMA*, 2020. **323**(6): p. 548.
105. Marjama-Lyons, J. and W. Koller, *Tremor-Predominant Parkinson's Disease*. *Drugs & Aging*, 2000. **16**(4): p. 273-278.
106. Ghaemi, M., J. Raethjen, R.D. Hilker, J. Rudolf, J. Sobesky, G.N. Deuschl, and W.-D. Heiss, *Monosymptomatic resting tremor and Parkinson's disease: A multitracer positron emission tomographic study*. *Movement Disorders*, 2002. **17**(4): p. 782-788.
107. Day, J.O. and S. Mullin, *The Genetics of Parkinson's Disease and Implications for Clinical Practice*. *Genes*, 2021. **12**(7): p. 1006.
108. Trist, B.G., D.J. Hare, and K.L. Double, *Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease*. *Aging Cell*, 2019. **18**(6).
109. Arbutnott, G.W. and J. Wickens, *Space, time and dopamine*. *Trends Neurosci*, 2007. **30**(2): p. 62-9.
110. Trudeau, L.-E., T.S. Hnasko, Å. Wallén-Mackenzie, M. Morales, S. Rayport, and D. Sulzer, *The multilingual nature of dopamine neurons*. 2014, Elsevier. p. 141-164.
111. Filograna, R., S. Lee, K. Tiklová, M. Mennuni, V. Jonsson, M. Ringnér, L. Gillberg, E. Sopova, O. Shupliakov, C. Koolmeister, L. Olson, T. Perlmann, and N.-G. Larsson, *Mitochondrial dysfunction in adult midbrain dopamine neurons triggers an early immune response*. *PLOS Genetics*, 2021. **17**(9): p. e1009822.
112. Iovino, L., M.E. Tremblay, and L. Civiero, *Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells*. *J Pharmacol Sci*, 2020. **144**(3): p. 151-164.
113. Chan, C.S., J.N. Guzman, E. Ilijic, J.N. Mercer, C. Rick, T. Tkatch, G.E. Meredith, and D.J. Surmeier, *'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1081-1086.
114. Hung, A.Y. and M.A. Schwarzschild, *Approaches to Disease Modification for Parkinson's Disease: Clinical Trials and Lessons Learned*. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2020. **17**(4): p. 1393-1405.
115. Surmeier, D.J., J. Ding, M. Day, Z. Wang, and W. Shen, *D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons*. *Trends in Neurosciences*, 2007. **30**(5): p. 228-235.
116. Zhou, F.-M., *Chapter 25 - The striatal medium spiny neurons: what they are and how they link with Parkinson's disease*, in *Genetics, Neurology, Behavior, and Diet in Parkinson's Disease*, C.R. Martin and V.R. Preedy, Editors. 2020, Academic Press. p. 395-412.
117. Campanelli, F., G. Natale, G. Marino, V. Ghiglieri, and P. Calabresi, *Striatal glutamatergic hyperactivity in Parkinson's disease*. *Neurobiol Dis*, 2022. **168**: p. 105697.
118. Prager, E.M. and J.L. Plotkin, *Compartmental function and modulation of the striatum*. *Journal of Neuroscience Research*, 2019.
119. Perez, S., Y. Cui, G. Vignoud, E. Perrin, A. Mendes, Z. Zheng, J. Touboul, and L. Venance, *Striatum expresses region-specific plasticity consistent with distinct memory abilities*. *Cell Rep*, 2022. **38**(11): p. 110521.

120. Loonen, A.J. and S.A. Ivanova, *Neurobiological mechanisms associated with antipsychotic drug-induced dystonia*. *Journal of Psychopharmacology*, 2021. **35**(1): p. 3-14.
121. Allichon, M.C., V. Ortiz, P. Pousinha, A. Andrianarivelo, A. Petitbon, N. Heck, P. Trifilieff, J. Barik, and P. Vanhoutte, *Cell-Type-Specific Adaptions in Striatal Medium-Sized Spiny Neurons and Their Roles in Behavioral Responses to Drugs of Abuse*. *Front Synaptic Neurosci*, 2021. **13**: p. 799274.
122. Fjodorova, M., Z. Noakes, D.C. De La Fuente, A.C. Errington, and M. Li, *Dysfunction of cAMP–Protein Kinase A–Calcium Signaling Axis in Striatal Medium Spiny Neurons: A Role in Schizophrenia and Huntington’s Disease Neuropathology*. *Biological Psychiatry Global Open Science*, 2022.
123. Soares-Cunha, C., N.A.P. De Vasconcelos, B. Coimbra, A.V. Domingues, J.M. Silva, E. Loureiro-Campos, R. Gaspar, I. Sotiropoulos, N. Sousa, and A.J. Rodrigues, *Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion*. *Molecular Psychiatry*, 2020. **25**(12): p. 3241-3255.
124. Thompson, B.L., M. Oscar-Berman, and G.B. Kaplan, *Opioid-induced structural and functional plasticity of medium-spiny neurons in the nucleus accumbens*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021. **120**: p. 417-430.
125. Steece-Collier, K., J.A. Stancati, N.J. Collier, I.M. Sandoval, N.M. Mercado, C.E. Sortwell, T.J. Collier, and F.P. Manfredsson, *Genetic silencing of striatal CaV1.3 prevents and ameliorates levodopa dyskinesia*. *Movement Disorders*, 2019. **34**(5): p. 697-707.
126. Gao, L., L.A.C. Blair, G.D. Salinas, L.A. Needleman, and J. Marshall, *Insulin-Like Growth Factor-1 Modulation of CaV1.3 Calcium Channels Depends on Ca²⁺ Release from IP₃-Sensitive Stores and Calcium/Calmodulin Kinase II Phosphorylation of the 1 Subunit EF Hand*. 2006.
127. De Mingo Alemany, M.C., L. Mifsud Grau, F. Moreno Macián, B. Ferrer Lorente, and S. León Cariñena, *A de novo Cacna1d missense mutation in a patient with congenital hyperinsulinism*. *Primary Hyperaldosteronism and Hypotonia Channels (Austin)*, 2020. **14**(1): p. 175-180.
128. Giri, D., K. Hawton, and S. Senniappan, *Congenital hyperinsulinism: recent updates on molecular mechanisms, diagnosis and management*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2022. **35**(3): p. 279-296.
129. Rosenfeld, E., A. Ganguly, and D.D. De Leon, *Congenital hyperinsulinism disorders: Genetic and clinical characteristics*. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 2019. **181**(4): p. 682-692.
130. Marquard, J., A.A. Palladino, C.A. Stanley, E. Mayatepek, and T. Meissner, *Rare forms of congenital hyperinsulinism*. *Semin Pediatr Surg*, 2011. **20**(1): p. 38-44.
131. Carey, R.M., *Primary Aldosteronism*. *Hormone Research in Paediatrics*, 2009. **71**(Suppl. 1): p. 8-12.
132. Grams, M.E., M.P. Hoenig, and E.J. Hoorn, *Evaluation of Hypokalemia*. *JAMA*, 2021. **325**(12): p. 1216.
133. Hirtz, J.J., M. Boesen, N. Braun, J.W. Deitmer, F. Kramer, C. Lohr, B. Muller, H.G. Nothwang, J. Striessnig, S. Lohrke, and E. Friauf, *Cav1.3 Calcium Channels Are Required for Normal Development of the Auditory Brainstem*. *Journal of Neuroscience*, 2011. **31**(22): p. 8280-8294.

134. Brandt, A., J. Striessnig, and T. Moser, *CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells*. J Neurosci, 2003. **23**(34): p. 10832-10840.
135. Meredith, F.L. and K.J. Rennie, *Channeling your inner ear potassium: K(+) channels in vestibular hair cells*. Hear Res, 2016. **338**: p. 40-51.
136. Striessnig, J., H.J. Bolz, and A. Koschak, *Channelopathies in Cav1.1, Cav1.3, and Cav1.4 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2010. **460**(2): p. 361-374.
137. Liaqat, K., I. Schrauwen, S.I. Raza, K. Lee, S. Hussain, I. Chakchouk, A. Nasir, A. Acharya, I. Abbe, M. Umair, M. Ansar, I. Ullah, K. Shah, M.J. Bamshad, D.A. Nickerson, W. Ahmad, and S.M. Leal, *Identification of CACNA1D variants associated with sinoatrial node dysfunction and deafness in additional Pakistani families reveals a clinical significance*. Journal of human genetics, 2019. **64**(2): p. 153-153.
138. Sheets, L., K.S. Kindt, and T. Nicolson, *Presynaptic CaV1.3 Channels Regulate Synaptic Ribbon Size and Are Required for Synaptic Maintenance in Sensory Hair Cells*. Journal of Neuroscience, 2012. **32**(48): p. 17273-17286.
139. Sayers, E.W., E.E. Bolton, J.R. Brister, K. Canese, J. Chan, D.C. Comeau, R. Connor, K. Funk, C. Kelly, S. Kim, T. Madej, A. Marchler-Bauer, C. Lanczycki, S. Lathrop, Z. Lu, F. Thibaud-Nissen, T. Murphy, L. Phan, Y. Skripchenko, T. Tse, J. Wang, R. Williams, B.W. Trawick, K.D. Pruitt, and S.T. Sherry, *Database resources of the national center for biotechnology information*. Nucleic Acids Res, 2022. **50**(D1): p. D20-d26.
140. Hohaus, A., S. Beyl, M. Kudrnac, S. Berjukow, E.N. Timin, R. Marksteiner, M.A. Maw, and S. Hering, *Structural Determinants of L-type Channel Activation in Segment IIS6 Revealed by a Retinal Disorder*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(46): p. 38471-38477.
141. Kilicarlan, I., L. Zanetti, E. Novelli, C. Schwarzer, E. Strettoi, and A. Koschak, *Knockout of Ca(V)1.3 L-type calcium channels in a mouse model of retinitis pigmentosa*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 15146.
142. Dulon, D., S. Papal, P. Patni, M. Cortese, P.F.Y. Vincent, M. Tertrais, A. Emptoz, A. Tlili, Y. Bouleau, V. Michel, S. Delmaghani, A. Aghaie, E. Pepermans, O. Alegria-Prevot, O. Akil, L. Lustig, P. Avan, S. Safieddine, C. Petit, and A. El-Amraoui, *Clarin-1 gene transfer rescues auditory synaptopathy in model of Usher syndrome*. Journal of Clinical Investigation, 2018. **128**(8): p. 3382-3401.
143. Liss, B. and J. Striessnig, *The Potential of L-Type Calcium Channels as a Drug Target for Neuroprotective Therapy in Parkinson's Disease*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2019. **59**: p. 263-289.
144. Huang, H., D. Yu, and T.W. Soong, *C-Terminal Alternative Splicing of CaV1.3 Channels Distinctively Modulates Their Dihydropyridine Sensitivity*. Molecular Pharmacology, 2013. **84**(4): p. 643-653.
145. Gunasekar, R., R.L. Goodyear, I. Proietti Silvestri, and J. Xiao, *Recent developments in enantio- and diastereoselective hydrogenation of N-heteroaromatic compounds*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2022. **20**(9): p. 1794-1827.
146. A, P. and P. Makam, *1,4-Dihydropyridine: synthetic advances, medicinal and insecticidal properties*. RSC Advances, 2022. **12**(45): p. 29253-29290.
147. Xie, C.B., L.H. Shaikh, S. Garg, G. Tanriver, A.E. Teo, J. Zhou, C. Maniero, W. Zhao, S. Kang, R.B. Silverman, E.A. Azizan, and M.J. Brown, *Regulation of aldosterone secretion by Cav1.3*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24697.

148. Colbourne, L. and P.J. Harrison, *Brain-penetrant calcium channel blockers are associated with a reduced incidence of neuropsychiatric disorders*. Mol Psychiatry, 2022.
149. Uchida, S., S. Yamada, K. Nagai, Y. Deguchi, and R. Kimura, *Brain pharmacokinetics and in vivo receptor binding of 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonists*. Life Sci, 1997. **61**(21): p. 2083-90.
150. Venuto, C.S., L. Yang, M. Javidnia, D. Oakes, D. James Surmeier, and T. Simuni, *Isradipine plasma pharmacokinetics and exposure–response in early Parkinson’s disease*. Annals of Clinical and Translational Neurology, 2021. **8**(3): p. 603-612.
151. Guzman, J.N., E. Ilijic, B. Yang, J. Sanchez-Padilla, D. Wokosin, D. Galtieri, J. Kondapalli, P.T. Schumacker, and D.J. Surmeier, *Systemic isradipine treatment diminishes calcium-dependent mitochondrial oxidant stress*. Journal of Clinical Investigation, 2018. **128**(6): p. 2266-2280.
152. Zhu, J., N. Chen, M. Zhou, J. Guo, C. Zhu, J. Zhou, M. Ma, and L. He, *Calcium channel blockers versus other classes of drugs for hypertension*. Cochrane Database Syst Rev, 2021. **10**(10): p. Cd003654.
153. Blaszak, R.T., J.A. Savage, and E.N. Ellis, *The use of short-acting nifedipine in pediatric patients with hypertension*. J Pediatr, 2001. **139**(1): p. 34-7.
154. Johnson, C.E., P.A. Jacobson, and M.H. Song, *Isradipine therapy in hypertensive pediatric patients*. Ann Pharmacother, 1997. **31**(6): p. 704-7.
155. Flynn, J. and S. Warnick, *Isradipine treatment of hypertension in children: a single-center experience*. Pediatric Nephrology, 2002. **17**(9): p. 748-753.
156. Hijazzi, S., K. Moon, and N.G. Larkins, *Oral agents for acute severe hypertension in children with minimal or no symptoms*. Journal of Paediatrics and Child Health, 2022.
157. Seidl, S.E. and J.A. Potashkin, *The promise of neuroprotective agents in Parkinson's disease*. Front Neurol, 2011. **2**: p. 68.
158. Ilijic, E., J.N. Guzman, and D.J. Surmeier, *The L-type channel antagonist isradipine is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease*. Neurobiology of Disease, 2011. **43**(2): p. 364-371.
159. Elkouzi, A., V. Vedam-Mai, R.S. Eisinger, and M.S. Okun, *Emerging therapies in Parkinson disease — repurposed drugs and new approaches*. Nature Reviews Neurology, 2019. **15**(4): p. 204-223.
160. Surmeier, D.J., J.T. Nguyen, N. Lancki, C.S. Venuto, D. Oakes, T. Simuni, and R.K. Wyse, *Re-Analysis of the STEADY-PD II Trial-Evidence for Slowing the Progression of Parkinson's Disease*. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 2022. **37**(2): p. 334-342.
161. Torres, E.M. and S.B. Dunnett, *6-OHDA Lesion Models of Parkinson’s Disease in the Rat*. 2011, Humana Press. p. 267-279.
162. Soderstrom, K.E., J.A. O’Malley, N.D. Levine, C.E. Sortwell, T.J. Collier, and K. Steece-Collier, *Impact of dendritic spine preservation in medium spiny neurons on dopamine graft efficacy and the expression of dyskinesias in parkinsonian rats*. European Journal of Neuroscience, 2010. **31**(3): p. 478-490.
163. Hurley, M.J., B. Brandon, S.M. Gentleman, and D.T. Dexter, *Parkinson's disease is associated with altered expression of CaV1 channels and calcium-binding proteins*. Brain, 2013. **136**(Pt 7): p. 2077-97.
164. Balan, S., M.A.A. Hassali, and V.S.L. Mak, *Two decades of off-label prescribing in children: a literature review*. World Journal of Pediatrics, 2018. **14**(6): p. 528-540.

165. Magalhães, J., A.T. Rodrigues, F. Roque, A. Figueiras, A. Falcão, and M.T. Herdeiro, *Use of off-label and unlicensed drugs in hospitalised paediatric patients: a systematic review*. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2015. **71**(1): p. 1-13.
166. Choonara, I. and S. Conroy, *Unlicensed and Off-Label Drug Use in Children*. *Drug Safety*, 2002. **25**(1): p. 1-5.
167. *Calcium Channel Blockers*, in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. 2012, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda (MD).
168. St-Onge, M., P.A. Dubé, S. Gosselin, C. Guimont, J. Godwin, P.M. Archambault, J.M. Chauny, A.J. Frenette, M. Darveau, N. Le Sage, J. Poitras, J. Provencher, D.N. Juurlink, and R. Blais, *Treatment for calcium channel blocker poisoning: A systematic review*. *Clinical Toxicology*, 2014. **52**(9): p. 926-944.
169. Man in't Veld, A.J., *The place of isradipine in the treatment of hypertension*. *Am J Hypertens*, 1991. **4**(2 Pt 2): p. 96s-102s.
170. Yin, J., Z. Mei, S. Shi, P. Du, and S. Qin, *Nifedipine or amlodipine? The choice for hypertension during pregnancy: a systematic review and meta-analysis*. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2022. **306**(6): p. 1891-1900.
171. *World Medical Association Declaration of Helsinki*. *JAMA*, 2013. **310**(20): p. 2191.
172. Landrum, M.J., J.M. Lee, M. Benson, G.R. Brown, C. Chao, S. Chitipiralla, B. Gu, J. Hart, D. Hoffman, W. Jang, K. Karapetyan, K. Katz, C. Liu, Z. Maddipatla, A. Malheiro, K. McDaniel, M. Ovetsky, G. Riley, G. Zhou, J.B. Holmes, B.L. Kattman, and D.R. Maglott, *ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence*. *Nucleic Acids Res*, 2018. **46**(D1): p. D1062-d1067.
173. Karczewski, K.J., L.C. Francioli, G. Tiao, B.B. Cummings, J. Alföldi, Q. Wang, R.L. Collins, K.M. Laricchia, A. Ganna, D.P. Birnbaum, L.D. Gauthier, H. Brand, M. Solomonson, N.A. Watts, D. Rhodes, M. Singer-Berk, E.M. England, E.G. Seaby, J.A. Kosmicki, R.K. Walters, K. Tashman, Y. Farjoun, E. Banks, T. Poterba, A. Wang, C. Seed, N. Whiffin, J.X. Chong, K.E. Samocha, E. Pierce-Hoffman, Z. Zappala, A.H. O'Donnell-Luria, E.V. Minikel, B. Weisburd, M. Lek, J.S. Ware, C. Vittal, I.M. Armean, L. Bergelson, K. Cibulskis, K.M. Connolly, M. Covarrubias, S. Donnelly, S. Ferriera, S. Gabriel, J. Gentry, N. Gupta, T. Jeandet, D. Kaplan, C. Llanwarne, R. Munshi, S. Novod, N. Petrillo, D. Roazen, V. Ruano-Rubio, A. Saltzman, M. Schleicher, J. Soto, K. Tibbetts, C. Tolonen, G. Wade, M.E. Talkowski, B.M. Neale, M.J. Daly, and D.G. MacArthur, *The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans*. *Nature*, 2020. **581**(7809): p. 434-443.
174. Fokkema, I.F., P.E. Taschner, G.C. Schaafsma, J. Celli, J.F. Laros, and J.T. den Dunnen, *LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases*. *Hum Mutat*, 2011. **32**(5): p. 557-63.
175. Stosser, M.B., A.S. Lindy, E. Butler, K. Retterer, C.M. Piccirillo-Stosser, G. Richard, and D.A. McKnight, *High frequency of mosaic pathogenic variants in genes causing epilepsy-related neurodevelopmental disorders*. *Genet Med*, 2018. **20**(4): p. 403-410.
176. Mülhardt, C., *Die Klonierung von DNA-Fragmenten*. 2013, Springer Berlin Heidelberg. p. 133-161.
177. Allemandou, F., J. Nussberger, H.R. Brunner, and N. Brakch, *Rapid Site-Directed Mutagenesis Using Two-PCR-Generated DNA Fragments Reproducing the Plasmid Template*. *J Biomed Biotechnol*, 2003. **2003**(3): p. 202-207.

178. New England Biolabs GmbH. *Q5 site-directed mutagenesis kit*. 2023 [24 May 2023]; Available from: <https://www.neb-online.de/pcr-dna-amplifikation/q5-site-directed-mutagenesis-kit/>.
179. Sun, M., *The relationships of neurexins and voltage-gated calcium channel in neurotransmission* in *Inaugural-Dissertation*, M.-N. Fakultät and d.W.W.-U. Münster, Editors. 2020, Westfälische Wilhelms-Universität Münster Münster, Germany. p. 1-135.
180. Eurofins Genomics. *PCR primer - optimum primer for PCR & qPCR assay*. 2023 [25 May 2023]; Available from: <https://eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/optimised-application-oligos/pcr-primers/>.
181. New England Biolabs. *Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix*. 2023 [25 May 2023]; Available from: [https://international.neb.com/products/m0494-q5-hot-start-high-fidelity-2x-master-mix#Product%20Information Properties%20&%20Usage](https://international.neb.com/products/m0494-q5-hot-start-high-fidelity-2x-master-mix#Product%20Information%20Properties%20&%20Usage).
182. Ballmann, C., *Gezielte Sequenzierung von USP8 bei PatientInnen mit Morbus Cushing und Genome Editing in HAC15 Zellen mittels CRISPR/Cas9*, in *Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*. 2021, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf, Germany.
183. New England Biolabs. *Protocol for Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix*. 2023 [25 May 2023]; Available from: <https://international.neb.com/protocols/2012/08/30/protocol-for-q5-hot-start-high-fidelity-2x-master-mix-m0494>.
184. New England Biolabs GmbH. *KLD enzyme mix reaction protocol (m0554)*. 2023 [25 May 2023]; Available from: <https://international.neb.com/protocols/2017/03/31/kld-enzyme-mix-reaction-protocol-m0554>.
185. Thermo Fisher Scientific Inc. *Routine cloning using TOP10 competent cells*. 2023 [25 May 2022]; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/cloning/competent-cells-protocol/routine-cloning-using-top10-competent-cells.html>.
186. Thermo Fisher Scientific Inc. *S.O.C. medium*. 2023 [25 May 2023]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/en/15544034>.
187. Mülhardt, C., *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. Experimentator, ed. S. Koch. 2013, Heidelberg/ Berlin: Springer Spektrum Berlin, Heidelberg. XII, 303.
188. QIAGEN. *QIAprep spin miniprep kit*. 2013 [25 May 2023]; Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiaprep-spin-miniprep-kit>.
189. Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH. *Custom DNA sequencing*. 2023 [25 May 2023]; Available from: <https://eurofinsgenomics.eu/de/custom-dna-sequencing/>.
190. New England Biolabs. *PmlI*. 2023 [25 May 2023]; Available from: <https://international.neb.com/products/r0532-pmli#Product%20Information>.
191. New England Biolabs. *HindIII*. 2023 [25 May 2023]; Available from: <https://international.neb.com/products/r0104-hindiii#Product%20Information>.
192. QIAGEN. *QIAquick gel extraction kit*. 2023 [25 May 2023]; Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-gel-extraction-kit>.
193. Chu, X.-L., B.-W. Zhang, Q.-G. Zhang, B.-R. Zhu, K. Lin, and D.-Y. Zhang, *Temperature responses of mutation rate and mutational spectrum in an Escherichia coli strain and the correlation with metabolic rate*. *BMC Evolutionary Biology*, 2018. **18**(1).

194. Heitman, J., *How the EcoRI endonuclease recognizes and cleaves DNA*. Bioessays, 1992. **14**(7): p. 445-54.
195. Verma, M., S. Kulshrestha, and A. Puri, *Genome Sequencing*. 2017, Springer New York. p. 3-33.
196. Ortner, N.J., G. Bock, D.H.F. Vandael, R. Mauersberger, H.J. Draheim, R. Gust, E. Carbone, P. Tuluc, and J. Striessnig, *Pyrimidine-2,4,6-triones are a new class of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel activators*. Nature Communications, 2014. **5**.
197. Cinelli, R.A., A. Ferrari, V. Pellegrini, M. Tyagi, M. Giacca, and F. Beltram, *The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single-molecule level*. Photochem Photobiol, 2000. **71**(6): p. 771-6.
198. Hinard, V., A. Britan, J.S. Rougier, A. Bairoch, H. Abriel, and P. Gaudet, *ICEPO: the ion channel electrophysiology ontology*. Database (Oxford), 2016. **2016**.
199. Levis, R.A. and J.L. Rae, *Technology of Patch-Clamp Electrodes*. Humana Press. p. 01-34.
200. Neher, E., *Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments*. Methods Enzymol, 1992. **207**: p. 123-31.
201. Boczek, N.J., E.M. Miller, D. Ye, V.V. Nesterenko, D.J. Tester, C. Antzelevitch, R.J. Czocek, M.J. Ackerman, and S.M. Ware, *Novel Timothy syndrome mutation leading to increase in CACNA1C window current*. Heart Rhythm, 2015. **12**(1): p. 211-219.
202. Antoons, G., P.G. Volders, T. Stankovicova, V. Bito, M. Stengl, M.A. Vos, and K.R. Sipido, *Window Ca²⁺ current and its modulation by Ca²⁺ release in hypertrophied cardiac myocytes from dogs with chronic atrioventricular block*. J Physiol, 2007. **579**(Pt 1): p. 147-60.
203. Kimrey, J., T. Vo, and R. Bertram, *Canard analysis reveals why a large Ca²⁺ window current promotes early afterdepolarizations in cardiac myocytes*. PLOS Computational Biology, 2020. **16**(11): p. e1008341.
204. Stephan Immanuel Lauxmann, *Ein erhöhter „Subschwellen“-Natrium-Strom als neuer Mechanismus einer familiären Epilepsie mit einer SCN2A Mutation*, in *Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen*. 2016, Eberhard Karls Universität zu Tübingen: Tübingen. p. VIII, 90.
205. Crunelli, V., T.I. Tóth, D.W. Cope, K. Blethyn, and S.W. Hughes, *The 'window' T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states*. The Journal of Physiology, 2005. **562**(Pt 1): p. 121-121.
206. Huang, J., M. Estacion, P. Zhao, F.B. Dib-Hajj, B. Schulman, A. Abicht, I. Kurth, K. Brockmann, S.G. Waxman, and S.D. Dib-Hajj, *A Novel Gain-of-Function Nav1.9 Mutation in a Child With Episodic Pain*. Front Neurosci, 2019. **13**: p. 918.
207. Lambert, R.C., T. Bessaïh, V. Crunelli, and N. Leresche, *The many faces of T-type calcium channels*. Pflugers Arch, 2014. **466**(3): p. 415-23.
208. Ghovanloo, M.-R., S. Tyagi, P. Zhao, E. Kiziltug, M. Estacion, S.D. Dib-Hajj, and S.G. Waxman, *High-throughput combined voltage-clamp/current-clamp analysis of freshly isolated neurons*. Cell Reports Methods, 2023. **3**(1): p. 100385.
209. Golowasch, J., G. Thomas, A.L. Taylor, A. Patel, A. Pineda, C. Khalil, and F. Nadim, *Membrane capacitance measurements revisited: dependence of capacitance value on measurement method in nonisopotential neurons*. J Neurophysiol, 2009. **102**(4): p. 2161-75.
210. Clay, J.R., *Slow inactivation and reactivation of the K⁺ channel in squid axons. A tail current analysis*. Biophysical Journal, 1989. **55**(3): p. 407-414.

211. Cheng, Y.M., C.M. Hull, C.M. Niven, J. Qi, C.R. Allard, and T.W. Claydon, *Functional interactions of voltage sensor charges with an S2 hydrophobic plug in hERG channels*. *Journal of General Physiology*, 2013. **142**(3): p. 289-303.
212. Stanika, R., M. Campiglio, A. Pinggera, A. Lee, J. Striessnig, B.E. Flucher, and G.J. Obermair, *Splice variants of the CaV1.3 L-type calcium channel regulate dendritic spine morphology*. *Scientific Reports*, 2016. **6**(1): p. 34528.
213. Ortiz, M.E., L.J. Núñez-Vergara, and J.A. Squella, *Pharmaceutical Research*, 2003. **20**(2): p. 292-296.
214. Ortner, N.J., G. Bock, A. Dougalis, M. Kharitonova, J. Duda, S. Hess, P. Tuluc, T. Pomberger, N. Stefanova, F. Pitterl, T. Ciossek, H. Oberacher, H.J. Draheim, P. Kloppenburg, B. Liss, and J. Striessnig, *Lower affinity of isradipine for L-type Ca²⁺ channels during substantia nigra dopamine neuron-like activity: implications for neuroprotection in Parkinson's disease*. *J Neurosci*, 2017. **37**(28): p. 6761-6777.
215. Benjamini, Y., *Discovering the false discovery rate*. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Statistical Methodology*, 2010. **72**(4): p. 405-416.
216. Aye, A.A., T.E. Agida, A.A. Babalola, A.Y. Isah, and N.D. Adewole, *Accuracy of ultrasound estimation of fetal weight at term: A comparison of shepard and hadlock methods*. *Ann Afr Med*, 2022. **21**(1): p. 49-53.
217. Poojari, V.G., A. Jose, and M.V. Pai, *Sonographic Estimation of the Fetal Head Circumference: Accuracy and Factors Affecting the Error*. *J Obstet Gynaecol India*, 2022. **72**(Suppl 1): p. 134-138.
218. Kaminska, A., M. Eisermann, and P. Plouin, *Child EEG (and maturation)*. *Handb Clin Neurol*, 2019. **160**: p. 125-142.
219. Sheldrick, R.C., L.E. Schlichting, B. Berger, A. Clyne, P. Ni, E.C. Perrin, and P.M. Vivier, *Establishing New Norms for Developmental Milestones*. *Pediatrics*, 2019. **144**(6).
220. Hu, H., M.L. Matter, L. Issa-Jahns, M. Jijiwa, N. Kraemer, L. Musante, M. Vega, O. Ninnemann, D. Schindler, N. Damatova, K. Eirich, M. Sifringer, S. Schrötter, B.J. Eickholt, L. Heuvel, C. Casamina, G. Stoltenburg-Didinger, H.H. Ropers, T.F. Wienker, C. Hübner, and A.M. Kaindl, *Mutations in *PTRH2* cause novel infantile-onset multisystem disease with intellectual disability, microcephaly, progressive ataxia, and muscle weakness*. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2014. **1**(12): p. 1024-1035.
221. Yilmaz, G., P. Urgan, O. Sebik, P. Uginčius, and K.S. Türker, *Interference of tonic muscle activity on the EEG: a single motor unit study*. *Front Hum Neurosci*, 2014. **8**: p. 504.
222. Palmer, E.E., K. Howell, and I.E. Scheffer, *Natural History Studies and Clinical Trial Readiness for Genetic Developmental and Epileptic Encephalopathies*. *Neurotherapeutics*, 2021. **18**(3): p. 1432-1444.
223. Chrysaftides, S.M., S.J. Bordes, and S. Sharma, *Physiology, Resting Potential*, in *StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing
- Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
224. Gandini, M.A., A. Sandoval, and R. Felix, *Patch-Clamp Recording of Voltage-Sensitive Ca²⁺ Channels*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014. **2014**(4): p. pdb.top066092.
225. Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, and H.L. Rehm, *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the*

- American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med, 2015. 17(5): p. 405-24.*
226. Hirano, Y., A. Moscucci, and C.T. January, *Direct measurement of L-type Ca²⁺ window current in heart cells.* Circulation Research, 1992. **70(3)**: p. 445-455.
 227. Durante, P., C.G. Cardenas, J.A. Whittaker, S.T. Kitai, and R.S. Scroggs, *Low-threshold L-type calcium channels in rat dopamine neurons.* Journal of neurophysiology, 2004. **91(3)**: p. 1450-1454.
 228. Frenz, C.T., A. Hansen, N.D. Dupuis, N. Shultz, S.R. Levinson, T.E. Finger, and V.E. Dionne, *NaV1.5 sodium channel window currents contribute to spontaneous firing in olfactory sensory neurons.* Journal of Neurophysiology, 2014. **112(5)**: p. 1091-1091.
 229. Attwell, D., I. Cohen, D. Eisner, M. Ohba, and C. Ojeda, *The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres.* Pflügers Archiv 1979 379:2, 1979. **379(2)**: p. 137-142.
 230. Wilson, D., B. Ermentrout, J. Němec, and G. Salama, *A model of cardiac ryanodine receptor gating predicts experimental Ca²⁺-dynamics and Ca²⁺-triggered arrhythmia in the long QT syndrome.* Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science, 2017. **27(9)**: p. 093940.
 231. Catterall, W.A., M.J. Lenaeus, and T.M. Gamal El-Din, *Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2020. **60(1)**: p. 133-154.
 232. McCobb, D.P. and K.G. Beam, *Action potential waveform voltage-clamp commands reveal striking differences in calcium entry via low and high voltage-activated calcium channels.* Neuron, 1991. **7(1)**: p. 119-27.
 233. Elhamdani, A., Z. Zhou, and C.R. Artalejo, *Timing of dense-core vesicle exocytosis depends on the facilitation L-type Ca channel in adrenal chromaffin cells.* J Neurosci, 1998. **18(16)**: p. 6230-40.
 234. Llinás, R., I.Z. Steinberg, and K. Walton, *Presynaptic calcium currents in squid giant synapse.* Biophys J, 1981. **33(3)**: p. 289-321.
 235. Augustine, G.J., M.P. Charlton, and S.J. Smith, *Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid.* J Physiol, 1985. **367**: p. 163-81.
 236. Zhou, Z. and D.M. Bers, *Ca²⁺ influx via the L-type Ca²⁺ channel during tail current and above current reversal potential in ferret ventricular myocytes.* J Physiol, 2000. **523 Pt 1(Pt 1)**: p. 57-66.
 237. Hofer, N.T., A. Pinggera, Y.V. Nikonishyna, P. Tuluc, E.M. Fritz, G.J. Obermair, and J. Striessnig, *Stabilization of negative activation voltages of Cav1.3 L-Type Ca²⁺-channels by alternative splicing.* Channels, 2021. **15(1)**: p. 38-52.
 238. Fitzgerald, T.W., S.S. Gerety, W.D. Jones, M. Van Kogelenberg, D.A. King, J. McRae, K.I. Morley, V. Parthiban, S. Al-Turki, K. Ambridge, D.M. Barrett, T. Bayzatinova, S. Clayton, E.L. Coomber, S. Gribble, P. Jones, N. Krishnappa, L.E. Mason, A. Middleton, R. Miller, E. Prigmore, D. Rajan, A. Sifrim, A.R. Tivey, M. Ahmed, N. Akawi, R. Andrews, U. Anjum, H. Archer, R. Armstrong, M. Balasubramanian, R. Banerjee, D. Baralle, P. Batstone, D. Baty, C. Bennett, J. Berg, B. Bernhard, A.P. Bevan, E. Blair, M. Blyth, D. Bohanna, L. Bourdon, D. Bourn, A. Brady, E. Bragin, C. Brewer, L. Brueton, K. Brunstrom, S.J. Bumpstead, D.J. Bunyan, J. Burn, J. Burton, N. Canham, B. Castle, K. Chandler, S. Clasper, J. Clayton-Smith, T. Cole, A. Collins, M.N. Collinson, F. Connell, N. Cooper, H. Cox, L. Cresswell, G. Cross, Y. Crow, M. D'Alessandro, T. Dabir, R. Davidson, S. Davies, J. Dean, C. Deshpande, G. Devlin, A. Dixit, A. Dominiczak, C. Donnelly, D. Donnelly, A. Douglas, A. Duncan, J. Eason, S. Edkins, S. Ellard, P. Ellis, F.

- Elmslie, K. Evans, S. Everest, T. Fendick, R. Fisher, F. Flinter, N. Foulds, A. Fryer, B. Fu, C. Gardiner, L. Gaunt, N. Ghali, R. Gibbons, S.L. Gomes Pereira, J. Goodship, D. Goudie, E. Gray, P. Greene, L. Greenhalgh, L. Harrison, R. Hawkins, S. Hellens, A. Henderson, E. Hobson, S. Holden, S. Holder, G. Hollingsworth, T. Homfray, M. Humphreys, J. Hurst, S. Ingram, M. Irving, J. Jarvis, L. Jenkins, D. Johnson, D. Jones, E. Jones, D. Josifova, S. Joss, B. Kaemba, S. Kazembe, B. Kerr, U. Kini, E. Kinning, G. Kirby, C. Kirk, E. Kivuva, A. Kraus, D. Kumar, K. Lachlan, W. Lam, A. Lampe, C. Langman, M. Lees, D. Lim, G. Lowther, S.A. Lynch, A. Magee, E. Maher, S. Mansour, K. Marks, K. Martin, U. Maye, E. McCann, V. McConnell, M. McEntagart, R. McGowan, K. McKay, S. McKee, D.J. McMullan, S. McNerlan, S. Mehta, K. Metcalfe, E. Miles, S. Mohammed, T. Montgomery, D. Moore, S. Morgan, A. Morris, J. Morton, H. Mugalaasi, V. Murday, L. Nevitt, R. Newbury-Ecob, A. Norman, R. O'Shea, C. Ogilvie, S. Park, M.J. Parker, C. Patel, J. Paterson, S. Payne, J. Phipps, D.T. Pilz, D. Porteous, N. Pratt, K. Prescott, S. Price, A. Pridham, A. Procter, H. Purnell, N. Ragge, J. Rankin, L. Raymond, D. Rice, L. Robert, E. Roberts, G. Roberts, J. Roberts, P. Roberts, A. Ross, E. Rosser, A. Saggarr, S. Samant, R. Sandford, A. Sarkar, S. Schweiger, C. Scott, R. Scott, A. Selby, A. Seller, C. Sequeira, N. Shannon, S. Sharif, C. Shaw-Smith, E. Shearing, D. Shears, I. Simonic, D. Simpkin, R. Singzon, Z. Skitt, A. Smith, B. Smith, K. Smith, S. Smithson, L. Sneddon, M. Splitt, M. Squires, F. Stewart, H. Stewart, M. Suri, V. Sutton, G.J. Swaminathan, E. Sweeney, K. Tatton-Brown, C. Taylor, R. Taylor, M. Tein, I.K. Temple, J. Thomson, J. Tolmie, A. Torokwa, B. Treacy, C. Turner, P. Turnpenny, C. Tysoe, A. Vandersteen, P. Vasudevan, J. Vogt, E. Wakeling, D. Walker, J. Waters, A. Weber, D. Wellesley, M. Whiteford, S. Widaa, S. Wilcox, D. Williams, N. Williams, G. Woods, C. Wragg, M. Wright, F. Yang, M. Yau, N.P. Carter, H.V. Firth, D.R. FitzPatrick, C.F. Wright, J.C. Barrett and M.E. Hurles, *Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders*. *Nature*, 2015. **519**(7542): p. 223-228.
239. Flanagan, S.E., F. Vairo, M.B. Johnson, R. Caswell, T.W. Laver, H. Lango Allen, K. Hussain, and S. Ellard, *A CACNA1D mutation in a patient with persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia, heart defects, and severe hypotonia*. *Pediatr Diabetes*, 2017. **18**(4): p. 320-323.
240. Garza-Lopez, E., J.A. Lopez, J. Hagen, R. Sheffer, V. Meiner, and A. Lee, *Role of a conserved glutamine in the function of voltage-gated Ca²⁺ channels revealed by a mutation in human CACNA1D*. *The Journal of biological chemistry*, 2018. **293**(37): p. 14444-14454.
241. Sun, H., N. Leblanc, and S. Nattel, *Mechanisms of inactivation of L-type calcium channels in human atrial myocytes*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(4 Pt 2): p. H1625-35.
242. Long, X. and H. Xue, *Genetic-variant hotspots and hotspot clusters in the human genome facilitating adaptation while increasing instability*. *Hum Genomics*, 2021. **15**(1): p. 19.
243. *UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021*. *Nucleic Acids Res*, 2021. **49**(D1): p. D480-d489.
244. Brunklaus, A., T. Feng, T. Brünger, E. Perez-Palma, H. Heyne, E. Matthews, C. Semsarian, J.D. Symonds, S.M. Zuberi, D. Lal, and S. Schorge, *Gene variant effects across sodium channelopathies predict function and guide precision therapy*. *Brain*, 2022. **145**(12): p. 4275-4286.
245. Guzman, J.N., J. Sanchez-Padilla, C.S. Chan, and D.J. Surmeier, *Robust Pacemaking in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons*. *Journal of Neuroscience*, 2009. **29**(35): p. 11011-11019.

246. Verma, A. and V. Ravindranath, *Ca(V)1.3 L-Type Calcium Channels Increase the Vulnerability of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons in MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease*. *Front Aging Neurosci*, 2019. **11**: p. 382.
247. Vandael, D., A. Marcantoni, and E. Carbone, *Cav1.3 channels as key regulators of neuron-like firings and catecholamine release in chromaffin cells*. *Curr Mol Pharmacol*, 2015. **8**(2): p. 149-161.
248. Grace, A.A. and B.S. Bunney, *Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization*. *Neuroscience*, 1983. **10**(2): p. 301-15.
249. Fujimura, K. and Y. Matsuda, *Autogenous oscillatory potentials in neurons of the guinea pig substantia nigra pars compacta in vitro*. *Neurosci Lett*, 1989. **104**(1-2): p. 53-7.
250. Harris, N.C., C. Webb, and S.A. Greenfield, *A possible pacemaker mechanism in pars compacta neurons of the guinea-pig substantia nigra revealed by various ion channel blocking agents*. *Neuroscience*, 1989. **31**(2): p. 355-362.
251. Kang, Y. and S.T. Kitai, *Calcium spike underlying rhythmic firing in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra*. *Neuroscience Research*, 1993. **18**(3): p. 195-207.
252. Mangoni, M.E., B. Couette, E. Bourinet, J. Platzer, D. Reimer, J. Striessnig, and J. Nargeot, *Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5543-5548.
253. Mohiuddin, M., R.F. Kooy, and C.E. Pearson, *De novo mutations, genetic mosaicism and human disease*. *Front Genet*, 2022. **13**: p. 983668.
254. Lehmann, U. and A. Stenzinger, *[The molecular pathological breviary: allele frequencies in NGS analysis]*. *Pathologie*, 2022. **43**(2): p. 154-156.
255. Gajecka, M., *Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era*. *Mol Genet Genomics*, 2016. **291**(2): p. 513-30.
256. Spinner, N.B. and L.K. Conlin, *Mosaicism and clinical genetics*. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 2014. **166**(4): p. 397-405.
257. Alzahrani, A., M. Alshalan, M. Alfurayh, A. Bin Akrish, N.A. Alsubeeh, and F. Al Mutairi, *Case Report: Clinical delineation of CACNA1D mutation: New cases and literature review*. *Front Neurol*, 2023. **14**: p. 1131490.
258. Oliver, K.L., M. Trivisano, S.A. Mandelstam, Angela, D.I. Francis, T.E. Green, A.M. Muir, A. Chowdhary, C. Hertzberg, K. Goldhahn, J. Metreau, C. Prager, J. Pinner, M. Cardamone, K.A. Myers, R.J. Leventer, G. Lesca, M. Bahlo, M.S. Hildebrand, H.C. Mefford, A.M. Kaindle, N. Specchio, and I.E. Scheffer, *WWOX developmental and epileptic encephalopathy: Understanding the epileptology and the mortality risk*. *Epilepsia*, 2023. **64**(5): p. 1351-1367.
259. Hu, C., D. Liu, T. Luo, Y. Wang, and Z. Liu, *Phenotypic spectrum and long-term outcome of children with genetic early-infantile-onset developmental and epileptic encephalopathy*. *Epileptic Disord*, 2022. **24**(2): p. 343-352.
260. Gowda, V.K., R. Amoghmath, M. Battina, S.K. Shivappa, and N. Benakappa, *Case Series of Early SCN1A-Related Developmental and Epileptic Encephalopathies*. *J Pediatr Neurosci*, 2021. **16**(3): p. 212-217.
261. Niedermeyer, E., *The Burst-Suppression Electroencephalogram*. *American Journal of Electroneurodiagnostic Technology*, 2009. **49**(4): p. 333-341.
262. Afra, P., V.C. Samara, L. Fagatele, and B. Adamolekun, *A case of ictal burst-suppression*. *Epilepsy Behav Case Rep*, 2019. **11**: p. 73-76.

263. Strzelczyk, A. and S. Schubert-Bast, *Expanding the Treatment Landscape for Lennox-Gastaut Syndrome: Current and Future Strategies*. CNS Drugs, 2021. **35**(1): p. 61-83.
264. Lacuey, N., B. Zonjy, J.P. Hampson, M.R.S. Rani, A. Zaremba, R.K. Sainju, B.K. Gehlbach, S. Schuele, D. Friedman, O. Devinsky, M. Nei, R.M. Harper, L. Allen, B. Diehl, J.J. Millichap, L. Bateman, M.A. Granner, D.N. Dragon, G.B. Richerson, and S.D. Lhatoo, *The incidence and significance of periictal apnea in epileptic seizures*. Epilepsia, 2018. **59**(3): p. 573-582.
265. Trivisano, M., G.C. Pavia, A. Ferretti, L. Fusco, F. Vigevano, and N. Specchio, *Generalized tonic seizures with autonomic signs are the hallmark of SCN8A developmental and epileptic encephalopathy*. Epilepsy Behav, 2019. **96**: p. 219-223.
266. Hayashida, T., Y. Saito, A. Ishii, H. Yamada, A. Itakura, T. Minato, T. Fukuyama, Y. Maegaki, and S. Hirose, *CACNA1A-related early-onset encephalopathy with myoclonic epilepsy: A case report*. Brain and Development, 2018. **40**(2): p. 130-133.
267. Faught, E., *Clinical Presentations and Phenomenology of Myoclonus*. Epilepsia, 2003. **44**(s11): p. 7-12.
268. Espay, A.J., S.H. Fox, C. Marras, A.E. Lang, and R. Chen, *Isolated diaphragmatic tremor: Is there a spectrum in "respiratory myoclonus"?* Neurology, 2007. **69**(7): p. 689-692.
269. Di Marco, R., A. Hallemans, G. Bellon, F. Ragona, E. Piazza, T. Granata, B. Ceulemans, A.-S. Schoonjans, P. Van De Walle, F. Darra, B. Dalla Bernardina, M. Vecchi, Z. Sawacha, B. Scarpa, S. Masiero, M.G. Benedetti, and A. Del Felice, *Gait abnormalities in people with Dravet syndrome: A cross-sectional multi-center study*. European Journal of Paediatric Neurology, 2019. **23**(6): p. 808-818.
270. Oguni, H., *Epilepsy with myoclonic-atonic seizures, also known as Doose syndrome: Modification of the diagnostic criteria*. Eur J Paediatr Neurol, 2022. **36**: p. 37-50.
271. Raga, S., N. Specchio, S. Rheims, and J.M. Wilmshurst, *Developmental and epileptic encephalopathies: recognition and approaches to care*. Epileptic Disorders, 2021. **23**(1): p. 40-52.
272. Pena, A.B. and J.N. Caviness, *Physiology-Based Treatment of Myoclonus*. Neurotherapeutics, 2020. **17**(4): p. 1665-1680.
273. Trinka, E. and M. Leitinger, *Which EEG patterns in coma are nonconvulsive status epilepticus?* Epilepsy Behav, 2015. **49**: p. 203-22.
274. Young, G.B., *The EEG in coma*. J Clin Neurophysiol, 2000. **17**(5): p. 473-85.
275. Strzelczyk, A., S.M. Zuberi, P. Striano, F. Rosenow, and S. Schubert-Bast, *The burden of illness in Lennox-Gastaut syndrome: a systematic literature review*. Orphanet J Rare Dis, 2023. **18**(1): p. 42.
276. McAuley, J.H. and C.D. Marsden, *Physiological and pathological tremors and rhythmic central motor control*. Brain, 2000. **123 (Pt 8)**: p. 1545-67.
277. Marchand, G.J., K. Meassick, H. Wolf, S.K. Hopewell, K. Sainz, S.M. Anderson, K. Ware, J. Vallejo, A. King, S. Ruther, G. Brazil, K. Cieminski, and N. Calteux, *Respiratory depression in a neonate born to mother on maximum dose sertraline: a case report*. J Med Case Rep, 2021. **15**(1): p. 88.
278. Umemoto, G. and H. Furuya, *Management of Dysphagia in Patients with Parkinson's Disease and Related Disorders*. Intern Med, 2020. **59**(1): p. 7-14.
279. Suttrup, I. and T. Warnecke, *Dysphagia in Parkinson's Disease*. Dysphagia, 2016. **31**(1): p. 24-32.
280. Balint, B., N.E. Mencacci, E.M. Valente, A. Pisani, J. Rothwell, J. Jankovic, M. Vidailhet, and K.P. Bhatia, *Dystonia*. Nature Reviews Disease Primers, 2018. **4**(1).

281. Helbig, K.L. and E.M. Goldberg, *SCN3A-Related Neurodevelopmental Disorder*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle Copyright © 1993-2023, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).
282. McTague, A., K.B. Howell, J.H. Cross, M.A. Kurian, and I.E. Scheffer, *The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood*. *Lancet Neurol*, 2016. **15**(3): p. 304-16.
283. Shin, J., L. Kovacheva, D. Thomas, S. Stojanovic, C.J. Knowlton, J. Mankel, J. Boehm, N. Farassat, C. Paladini, J. Striessnig, C.C. Canavier, G. Geisslinger, and J. Roeper, *Cav1.3 calcium channels are full-range linear amplifiers of firing frequencies in lateral DA SN neurons*. *Science advances*, 2022. **8**(23): p. eabm4560-eabm4560.
284. Geerlings, R.P., P.J. Koehler, D.Y. Haane, A.H. Stam, B. de Vries, E.M. Boon, and J. Haan, *Head tremor related to CACNA1A mutations*. *Cephalalgia*, 2011. **31**(12): p. 1315-9.
285. Molloy, A., O. Kimmich, J. Martindale, H. Moore, M. Hutchinson, and S. O'Riordan, *A novel CACNA1A mutation associated with adult-onset, paroxysmal head tremor*. *Movement Disorders*, 2013. **28**(6): p. 842-843.
286. Jiang, H.S., D.M. Wang, Q. Wang, M. Yang, W. Wang, S.Y. Pan, and Y.F. Hu, *[Missense mutation R1345Q in CACNA1A gene causes a new type of ataxia with episodic tremor: clinical features, genetic analysis and treatment in a familial case]*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2016. **36**(7): p. 883-6.
287. Liao, P. and T.W. Soong, *CaV1.2 channelopathies: from arrhythmias to autism, bipolar disorder, and immunodeficiency*. *Pflugers Arch*, 2010. **460**(2): p. 353-359.
288. Liu, Y., M. Harding, A. Pittman, J. Dore, J. Striessnig, A. Rajadhyaksha, and X. Chen, *Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels regulate dopaminergic firing activity in the mouse ventral tegmental area*. *J Neurophysiol*, 2014. **112**(5): p. 1119-30.
289. Latorre, A., L. Rocchi, F. Magrinelli, E. Mulroy, A. Berardelli, J.C. Rothwell, and K.P. Bhatia, *Unravelling the enigma of cortical tremor and other forms of cortical myoclonus*. *Brain*, 2020. **143**(9): p. 2653-2663.
290. Striano, P. and F. Zara, *Autosomal dominant cortical tremor, myoclonus and epilepsy*. *Epileptic Disord*, 2016. **18**(S2): p. 139-144.
291. Bittigau, P., M. Sifringer, U. Felderhoff-Mueser, H.H. Hansen, and C. Ikonomidou, *Neuropathological and biochemical features of traumatic injury in the developing brain*. *Neurotoxicity Research*, 2003. **5**(7): p. 475-490.
292. Xu, Y., B.-B. Wu, H.-J. Wang, S.-Z. Zhou, G.-Q. Cheng, and Y.-F. Zhou, *A term neonate with early myoclonic encephalopathy caused by RARS2 gene variants: a case report*. *Translational Pediatrics*, 2020. **9**(5): p. 707-712.
293. Rubboli, G., S. Franceschetti, S.F. Berkovic, L. Canafoglia, A. Gambardella, L.M. Dibbens, P. Riguzzi, C. Campieri, A. Magaudda, C.A. Tassinari, and R. Michelucci, *Clinical and neurophysiologic features of progressive myoclonus epilepsy without renal failure caused by SCARB2 mutations*. *Epilepsia*, 2011. **52**(12): p. 2356-2363.
294. Striano, P. and F. Zara, *Autosomal dominant cortical tremor, myoclonus and epilepsy*. *Epileptic Disorders*, 2016. **18**(s2): p. 139-144.
295. De Valles-Ibáñez, G., M.S. Hildebrand, M. Bahlo, C. King, M. Coleman, T.E. Green, J. Goldsmith, S. Davis, D. Gill, S. Mandelstam, I.E. Scheffer, and L.G. Sadleir, *Infantile-onset myoclonic developmental and epileptic encephalopathy: A new RARS2 phenotype*. *Epilepsia Open*, 2022. **7**(1): p. 170-180.

296. Van Den Berg, K.R.E. and R.C. Helmich, *The Role of the Cerebellum in Tremor – Evidence from Neuroimaging*. Tremor and Other Hyperkinetic Movements, 2021. **11**(1).
297. Bruun, M., L.E. Hjermind, C. Thomsen, E. Danielsen, L.L. Thomsen, L.H. Pinborg, N. Khabbazbavani, and J.E. Nielsen, *Familial Hemiplegic Migraine Type 1 Associated with Parkinsonism: A Case Report*. Case Reports in Neurology, 2015. **7**(1): p. 84-89.
298. Bidesi, N.S.R., I. Vang Andersen, A.D. Windhorst, V. Shalgunov, and M.M. Herth, *The role of neuroimaging in Parkinson's disease*. J Neurochem, 2021. **159**(4): p. 660-689.
299. Tamborska, A., J. Bashford, A. Wickham, R. Iniesta, U. Masood, C. Cabassi, D. Planinc, E. Hodson-Tole, E. Drakakis, M. Boutelle, K. Mills, and C. Shaw, *Non-invasive measurement of fasciculation frequency demonstrates diagnostic accuracy in amyotrophic lateral sclerosis*. Brain Commun, 2020. **2**(2): p. fcaa141.
300. Kim, H., *Muscle length-dependent contribution of motoneuron Ca(v)1.3 channels to force production in model slow motor unit*. J Appl Physiol (1985), 2017. **123**(1): p. 88-105.
301. Xu, W. and D. Lipscombe, *Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines*. J Neurosci, 2001. **21**(16): p. 5944-51.
302. Khoriaty, D., V.B. Arya, S.E. Flanagan, S. Ellard, and K. Hussain, *Prematurity, macrosomia, hyperinsulinaemic hypoglycaemia and a dominant ABCC8 gene mutation*. BMJ Case Rep, 2013. **2013**.
303. Pearson, E.R., S.F. Boj, A.M. Steele, T. Barrett, K. Stals, J.P. Shield, S. Ellard, J. Ferrer, and A.T. Hattersley, *Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene*. PLoS Med, 2007. **4**(4): p. e118.
304. Kc, K., S. Shakya, and H. Zhang, *Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review*. Ann Nutr Metab, 2015. **66 Suppl 2**: p. 14-20.
305. Langer, O., *Fetal macrosomia: etiologic factors*. Clin Obstet Gynecol, 2000. **43**(2): p. 283-97.
306. Ortner, N.J., A. Pinggera, N.T. Hofer, A. Siller, N. Brandt, A. Raffener, K. Vilusic, I. Lang, K. Blum, G.J. Obermair, E. Stefan, J. Engel, and J. Striessnig, *RBP2 stabilizes slow Cav1.3 Ca²⁺ channel inactivation properties of cochlear inner hair cells*. Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 2020. **472**(1): p. 3-25.
307. Malik, M.F., J.H. Randall, J.G. Campbell, M.J. McLaughlin, and J.F. Koenig, *Dosing Variability and Clinical Outcomes of Oxybutynin: A Pediatric Cohort of Patients With Neurogenic Bladder*. Top Spinal Cord Inj Rehabil, 2022. **28**(3): p. 9-14.
308. Sakakibara, R., T. Uchiyama, T. Yamanishi, K. Shirai, and T. Hattori, *Bladder and bowel dysfunction in Parkinson's disease*. J Neural Transm (Vienna), 2008. **115**(3): p. 443-60.
309. Mercuri, N.B., A. Bond, P. Calabresi, F. Stratta, A. Stefani, and G. Bernardi, *Effects of dihydropyridine calcium antagonists on rat midbrain dopaminergic neurones*. British Journal of Pharmacology, 1994. **113**(3): p. 831-831.
310. Nedergaard, S., J.A. Flatman, and I. Engberg, *NIFEDIPINE-AND)-CONOTOXIN-SENSITIVE Ca²⁺ CONDUCTANCES IN GUINEA-PIG SUBSTANTIA NIGRA PARS COMPACTA NEURONES*. Journal of Physiology, 1993. **466**: p. 727-747.
311. Alawdi, S.H., H. Eidi, M.M. Safar, and M.A. Abdel-Wahhab, *Loading Amlodipine on Diamond Nanoparticles: A Novel Drug Delivery System*. Nanotechnol Sci Appl, 2019. **12**: p. 47-53.

312. Amobi, N., J. Guillebaud, and C.H. Smith, *Comparative effects of T-type and L-type Ca(2+)-antagonists against noradrenaline-induced contractions of human vas deferens*. BJU Int, 2010. **106**(4): p. 578-85.
313. Striessnig, J., M. Grabner, J. Mitterdorfer, S. Hering, M.J. Sinnegger, and H. Glossmann, *Structural basis of drug binding to L Ca2+ channels*. Trends Pharmacol Sci, 1998. **19**(3): p. 108-15.
314. Crocker, J.F., K.W. Renton, T.L. LeVatte, and D.H. McLellan, *The interaction of the calcium channel blockers verapamil and nifedipine with cyclosporin A in pediatric renal transplant patients*. Pediatr Nephrol, 1994. **8**(4): p. 408-11.
315. Asadi Faezi, N., B. Mehramouz, S. Taghizadeh, P. Pagliano, and H.S. Kafil, *Acute hepatitis (Non Hepa A-E) of unknown origin among pediatrics*. Infez Med, 2022. **30**(3): p. 353-361.
316. Andrade, R.J., N. Chalasani, E.S. Björnsson, A. Suzuki, G.A. Kullak-Ublick, P.B. Watkins, H. Devarbhavi, M. Merz, M.I. Lucena, N. Kaplowitz, and G.P. Aithal, *Drug-induced liver injury*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 58.
317. Perez Ruiz de Garibay, A., A. Kortgen, J. Leonhardt, A. Zipprich, and M. Bauer, *Critical care hepatology: definitions, incidence, prognosis and role of liver failure in critically ill patients*. Crit Care, 2022. **26**(1): p. 289.
318. *Isradipine*, in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. 2012, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda (MD).
319. Shepherd, A.M., A.A. Carr, M. Davidov, J. Hamilton, H. Schnaper, M. Velasquez, B. Brockway, L.M. Prisant, B. Hamilton, and L. Gonasun, *Efficacy and safety of isradipine in hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 1989. **13**(4): p. 580-5.
320. Katsonis, P., K. Wilhelm, A. Williams, and O. Lichtarge, *Genome interpretation using in silico predictors of variant impact*. Human Genetics, 2022.
321. Latorre, A., B. Hale, and L. Rocchi, *How Do I Find Clues About Where Myoclonus Is Originating?* Mov Disord Clin Pract, 2022. **9**(5): p. 721-722.
322. Abele, M.B., R.; Ceballos-Baumann, A.; Conrad, B.; Deuschl, G.; Gündel, H.; Klockgether, Th.; Köster, B.; Kurz, A.; Möller, C.; Münchau, A.; Oertel, W.; Poewe, W.; Raethjen, J.; Trenkwalder, C.; Vieregge, P.; Weindl, A.; Wenning, G., *Bewegungsstörungen*. 2005, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
323. Shibasaki, H., Y. Yamashita, R. Neshige, S. Tobimatsu, and R. Fukui, *Pathogenesis of giant somatosensory evoked potentials in progressive myoclonic epilepsy*. Brain, 1985. **108 (Pt 1)**: p. 225-40.
324. Vanmechelen, I., H. Haberfehlner, J. De Vleeschhauwer, E. Van Wonterghem, H. Feys, K. Desloovere, J.M. Aerts, and E. Monbaliu, *Assessment of movement disorders using wearable sensors during upper limb tasks: A scoping review*. Front Robot AI, 2022. **9**: p. 1068413.
325. Tolosa, E., A. Garrido, S.W. Scholz, and W. Poewe, *Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2021. **20**(5): p. 385-397.
326. Rubin, D.I., *Needle electromyography: Basic concepts*. Handb Clin Neurol, 2019. **160**: p. 243-256.
327. Menkes, D.L. and R. Pierce, *Needle EMG muscle identification: A systematic approach to needle EMG examination*. Clin Neurophysiol Pract, 2019. **4**: p. 199-211.
328. Wu, C.H., K.Y. Peng, D.Y. Hwang, Y.H. Lin, V.C. Wu, and J.S. Chueh, *Novel Mutations Detection with Next-Generation Sequencing and Its Association with Clinical Outcome in Unilateral Primary Aldosteronism*. Biomedicines, 2021. **9**(9).

329. Colecraft, H.M., *Designer genetically encoded voltage-dependent calcium channel inhibitors inspired by RGK GTPases*. J Physiol, 2020. **598**(9): p. 1683-1693.
330. Hirschberger, R., *[Pharmacokinetics and -dynamics of retard formation of isradipine. Summary of studies]*. Fortschr Med, 1993. **111**(30): p. 481-4.
331. Holmes, D.G. and K. Kutz, *Bioequivalence of a slow-release and a non-retard formulation of isradipine*. Am J Hypertens, 1993. **6**(3 Pt 2): p. 70s-73s.
332. Leroueil-Le Verger, M., L. Fluckiger, Y.I. Kim, M. Hoffman, and P. Maincent, *Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent*. Eur J Pharm Biopharm, 1998. **46**(2): p. 137-43.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Fabian Dannenberg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Biophysikalische und klinische Charakterisierung des PASNA-Tremor-Subtyps einer neuen de novo dominanten CACNA1D-Variante**“ (*Biophysical and clinical characterization of a new de novo dominant CACNA1D variant's PASNA subtype with tremor*) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Kapitel 7.1). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

13 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

14 Danksagung

Allen voran danke ich Frau Prof. Dr. med. Ute Scholl von ganzem Herzen für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe „Hypertension und molekulare Biologie endokriner Tumore“ des Berlin Institut of Health der Charité zu promovieren.

Von den vielen Gesprächen, ihrer steten Unterstützung, ihrer kritische Lektüre und ihren Beistand habe sehr profitiert; ohne sie hätte ich dieses Projekt nicht abschließen können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gabriel Stölting - seine Wertschätzung, Ansprechbarkeit, inhaltliche Schulung, Erläuterung der theoretischen Hintergründe Hilfsbereitschaft waren von entscheidendem Wert für diese Arbeit. Er hat mich mit seiner Begeisterung für die Elektrophysiologie und das Patch-Clamp-Verfahren im Besonderen angesteckt. Seine kritische Lektüre half mir so manchen Fehler zu erkennen.

Die Zusammenarbeit mit Frau Dr. Nadine Ortner von der Universität Innsbruck war ein Glücksfall für mich. Ich danke ihr für das Zurverfügungstellen ihrer elektrophysiologischen Daten und Ergebnisse und ihr offenes Ohr. Ihre Unterstützung war ein entscheidender Baustein für diese Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Striessnig (Institut für Pharmakologie der Universität Innsbruck) für seine Einschätzungen, Expertise und stete Ansprechbarkeit während des Projektes während des Projektes bedanken.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Schülke-Gerstenfeld. Er war als Zweitbetreuer während der gesamten Zeit ein Anker für mein Promotionsprojekt. Er hatte immer eine unkomplizierte Lösung parat, wenn ich einmal nicht weiterwusste. Während der gesamten Zeit übernahm er die Supervision der klinischen Behandlung.

Im Labor von Herrn Prof. Markus Schülke-Gerstenfeld sowie von Frau Prof. Dr. Ute Scholl konnte ich, unterstützt durch die jeweiligen Mitarbeiter*innen der Arbeitsgruppen, Einblicke in das Verständnis der verwendeten Methoden und die Auswertung erlangen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Angela Kaindl und Frau PD Dr. Petra Bittigau, die mich als meine Vorgesetzten in der Klinik für Neuropädiatrie der Charité stets anspornten und motivierten die Promotion neben der Klinik zu vollenden und mir die entsprechenden Räume dafür ermöglichten. Sie waren für mich jederzeit ansprechbar für klinische Fragen im Rahmen der Dissertation. Sie waren kritische Leserinnen dieser Arbeit, ihren Anmerkungen und

Gedanken waren sehr wertvoll für mich. Ich möchte zudem Frau Prof. Dr. Kaindl für die Möglichkeit danken Ideen zu meiner Arbeit beim „Forschungsretreat Neuropädiatrie 2023“ sowie beim Symposium „Genetic Epilepsies“ zu diskutieren.

Ein Kind steht mit seiner Geschichte im Zentrum dieser Arbeit. Mein Dank gilt ihm und seiner Familie. Durch die gemeinsamen Erfahrungen während der Dissertation konnte ich die Bedeutung der abstrakten elektrophysiologischen Veränderungen und klinischen Daten für sein Leben und das seiner Familie ein Stück nachvollziehen. Ich bin sehr dankbar für diese Erfahrung und hoffe, dass unser Team weitere Wege zur Linderung der Beschwerden für unseren Patienten finden wird. Mein Dank und meine besten Wünsche gelten ihm und seiner Familie.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Arpad von Moers (DRK Kliniken Westend) bedanken, der für die Behandlung des Indexpatienten in den ersten Lebensmonaten zuständig war sowie für seine Bereitstellung von wichtigen Befunden und klinischen Daten.

Ferner möchte ich mich bei Dr. M. Mahdi Motazacker, PhD sowie seinen Mitarbeiter*innen der Abteilung für Humangentik der Universität Amsterdam für die Bereitstellung von klinischen Informationen und seiner Expertise bedanken.

Ich danke meiner Mutter, die mich mein Leben lang darin unterstützt hat neugierig zu sein, fleißig zu arbeiten und meine Projekte vollenden zu können. Danke, dass Du immer für mich da bist und fest an mich glaubst. Dir ist diese Arbeit gewidmet.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Freundin, Nicola Rost, für ihre Unterstützung. Gemeinsam mussten wir während der Arbeit schwere familiäre Schicksalsschläge bewältigen. Du warst bei jedem Schritt dieser langen Reise dabei.

15 Bescheinigung der akkreditierten Statistikerin



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzke

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietzke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Dannenberg, Fabian

Emailadresse: fabian.dannenberg@charite.de

Matrikelnummer:

PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. med. Ute Scholl

Promotionsinstitution / Klinik: Medizinische Klinik m.S.

Nephrologie und Internistische Intensivmedizin

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr *Fabian Dannenberg* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 30.08.2022

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Verwendung von geeigneten Lage- und Streumaßen
- Konfidenzintervalle angeben
- Bitte explizit in den Methoden schreiben, dass alle Auswertungen rein explorativ sind und die p-Werte entsprechend keinen confirmatorischen Charakter haben, und dass keine Adjustierung für multiples Testen vorgenommen wurde. Interpretation der Ergebnisse entsprechend vorsichtig diskutieren.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum:

Name des Beraters\ der Beraterin: