



Fakultät für Medizin

Phänotypische und genotypische Charakterisierung einer Dystoniekohorte

Sandrina Katharina Weber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Juliane Winkelmann
2. apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Die Dissertation wurde am 21.04.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.10.2021 angenommen.

Meiner Oma

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Dystonie	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Klassifikation.....	3
1.1.4	Isolierte fokale bzw. segmentale Dystonie (IFSD) und generalisierte Dystonie.....	7
1.2	Genetik.....	8
1.2.1	Monogene Erkrankungen.....	8
1.2.2	Exom-Sequenzierung	9
1.3	Genetik der Dystonie	10
1.3.1	Überblick.....	10
1.3.2	<i>TOR1A</i>	12
1.3.3	<i>THAP1</i>	13
1.3.4	<i>GNAL</i>	14
1.3.5	<i>ANO3</i>	14
1.3.6	<i>COL6A3</i>	15
1.4	Fragestellung.....	16
2	Methoden	18
2.1	Rekrutierung der Patientenkohorte.....	18
2.2	Statistische Analyse	21
2.3	Molekulargenetische Methoden.....	21
2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.3.2	Primer	22
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.3.4	Sanger-Sequenzierung.....	30

2.3.5	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRMA)	33
2.3.6	Analyse der Haplotypen	37
2.3.7	Exom-Sequenzierung (WES)	37
2.3.8	Bioinformatische Analyse	38
2.3.9	Variantenfilterung	38
2.3.10	In-silico-Prädiktionsprogramme	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Klinische Charakteristika	46
3.1.1	Demografische Daten	46
3.1.2	Erkrankungsalter der IFSD-Subtypen	48
3.1.3	Unterschiede zwischen Männern und Frauen innerhalb der IFSD-Subtypen	51
3.1.4	Unterschiede zwischen Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese innerhalb der IFSD-Subtypen	53
3.1.5	Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne dystonen Kopftremor .	63
3.2	Molekulargenetische Untersuchungen	65
3.2.1	Sanger-Sequenzierung von <i>TOR1A</i> , <i>THAP1</i> und <i>COL6A3</i> und HRMA von <i>GNAL</i> und <i>ANO3</i> in 263 Patienten mit IFSD	67
3.2.2	WES in 26 ausgewählten Fällen	73
3.2.3	HRMA von <i>ADCY5</i> in 243 Patienten mit IFSD	82
4	Diskussion	85
4.1	Klinische Charakteristika	85
4.1.1	Erkrankungsalter der IFSD-Subtypen	85
4.1.2	Unterschiede zwischen Männern und Frauen innerhalb der IFSD-Subtypen	86
4.1.3	Unterschiede zwischen Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese innerhalb der IFSD-Subtypen	87
4.1.4	Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne dystonen Kopftremor .	89
4.2	Genetische Charakteristika	92

4.2.1	Sanger-Sequenzierung von <i>TOR1A</i> , <i>THAP1</i> und <i>COL6A3</i> und HRMA von <i>GNAL</i> und <i>ANO3</i> in 263 Patienten mit IFSD	92
4.2.2	WES in 26 ausgewählten Fällen	96
4.2.3	HRMA von <i>ADCY5</i> in 243 Patienten mit IFSD	101
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis	107
7	Abbildungsverzeichnis	123
8	Tabellenverzeichnis	125
9	Danksagung	127
10	Publikationen	128

Abkürzungsverzeichnis

ΔGAG	Deletion c.907_909delGAG in <i>TOR1A</i>
μl	10 ⁻⁶ Liter
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
AD	autosomal-dominant
<i>ADCY5</i>	Gen das Adenylatcyclase-5 kodiert
Ala	Alanin
<i>ANO3</i>	Gen das Anoctamin-3 kodiert
AR	autosomal-rezessiv
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BS	Bewegungsstörung
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CADD	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
<i>COL6A3</i>	Gen das Alpha-3-Typ-VI-Kollagen kodiert
ddNTP	2'-3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat

EA	europäische, nicht finnische Allele
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
f	weiblich
F	<i>forward</i>
FA	Familienanamnese
FDFM	familiäre Dyskinesie und faziale Myokymie
fok	fokal
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²), Gramm
G	Guanosin
GB	Gigabasen
gen	generalisiert
Glu	Glutaminsäure
GNAL	Gen das die Alpha-Untereinheit des Guanosintri-phosphat-bindenden Proteins G(olf) kodiert
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
GRCh37	<i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i>
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HRMA	hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (<i>high resolution melting curve analysis</i>)
IFSD	isolierte fokale bzw. segmentale Dystonie
J	Jahre
KT	Kopftremor
L-Dopa	Levodopa
Lys	Lysin

m	männlich
MAF	Frequenz des selteneren Allels (<i>minor allele frequency</i>)
Max	Maximum
Met	Methionin
min	Minute(n)
Min	Minimum
ml	Milliliter
mM	10 ⁻³ Mol/Liter
n	Anzahl
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	10 ⁻⁹ Gramm, Nanogramm
nm	10 ⁻⁹ Meter, Nanometer
OA	ostasiatische Allele
oEx	obere Extremität
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pmol	10 ⁻¹² Mol, Pikomol
Pro	Prolin
R	<i>reverse</i>
s	Sekunde(n)
seg	segmental
Ser	Serin
SIFT	<i>Sorting Intolerated from Tolerated</i>
T	Thymin

TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
<i>THAP1</i>	Gen das Thanatos-associated domain-containing apoptosis-associated Protein 1 kodiert
Thr	Threonin
THS	tiefe Hirnstimulation
<i>TOR1A</i>	Gen das Torsin-1A kodiert
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
uEx	untere Extremität
UV	ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
WT	Wildtyp
X-Chr.	X-Chromosomal
ZD	zervikale Dystonie
ZDT	zervikale Dystonie mit dystonem Tremor
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Unter dem Überbegriff *Bewegungsstörungen* werden neurologische Erkrankungen zusammengefasst, die zu einem Übermaß (Hyperkinesien) oder einem Mangel an Bewegung (Hypokinesien) führen (Fahn et al., 2011). Prinzipiell kann zwischen dem Parkinson-Syndrom als Hauptvertreter der hypokinetischen Störungen und der heterogenen Gruppe der hyperkinetischen Störungen unterschieden werden. Letztere setzt sich aus den folgenden fünf differenzierbaren Krankheitsbildern zusammen: Tremor, Chorea, Tic, Myoklonus und Dystonie (Edwards et al., 2016).

1.1 Dystonie

1.1.1 Definition

Der Begriff *Dystonie* wurde erstmals von dem deutschen Nervenarzt Hermann Oppenheim 1911 in der Veröffentlichung „Über eine eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (*Dysbasia lordotica progressiva, Dystonia musculorum deformans*)“ verwendet (Oppenheim, 1911). Oppenheim fasst darin detailliert die Beobachtungen und Untersuchungsbefunde zusammen, die er bei vier nicht miteinander verwandten Kindern mit bemerkenswert ähnlichen Symptomen und Krankheitsverläufen gemacht hatte und die sich seinerzeit nicht eindeutig einem anderen Krankheitsbild zuordnen ließen (Klein & Fahn, 2013). Er schlussfolgerte demnach, dass es sich bei den vier Fällen um eine eigene Krankheitsentität mit organischer Genese handele (Klein & Fahn, 2013) und beschrieb aus heutiger Sicht die klinische Präsentation einer generalisierten Dystonie mit Beginn im Kindesalter.

Nach Albanese et al. (2013) ist die Dystonie folgendermaßen definiert: Dystonie ist eine Bewegungsstörung, die durch andauernde oder intermittierende Muskelkontraktionen charakterisiert ist und dabei abnorme, oftmals repetitive Bewegungen, Haltungen oder beides verursacht. Die Bewegungen folgen typischerweise einem Muster, sind drehend oder schraubend und können von einem Tremor begleitet sein. Die Dystonie wird häufig durch willkürliche Bewegungen ausgelöst oder verstärkt und ist mit einem Übergreifen der Muskelaktivität auf weitere Regionen assoziiert. Diese Definition beschreibt drei der insgesamt fünf charakteristischen klinischen Merkmale der Dystonie (Albanese & Lalli, 2009). Unterteilt in zwei Haupt- und drei Nebenkriterien,

können sie zur Diagnose der Erkrankung beitragen und besitzen vor allem zur Abgrenzung gegenüber anderen Bewegungsstörungen entscheidende Relevanz (Albanese & Lalli, 2009). Im folgenden Abschnitt werden die Merkmale nach Albanese und Lalli (2009) erläutert. Die zwei Hauptmerkmale sind: (1) dystone Haltungen und (2) dystone Bewegungen. Dystone Haltungen stellen die tonische Komponente der Erkrankung dar und die betroffenen Körperteile werden typischerweise in ihrer longitudinalen Achse verdreht oder gebeugt. Dystone Bewegungen repräsentieren die phasische Komponente der Erkrankung und äußern sich durch irreguläre, repetitive Bewegungen oder Zuckungen, die den betroffenen Körperteil in eine bevorzugte Richtung ziehen. Sie folgen einem bestimmten wiederkehrenden Muster, sind vorhersagbar und können am Punkt der maximalen Ausprägung einen anhaltenden Charakter aufweisen. Des Weiteren können sie auch eine rhythmische, tremoröse Ausprägung annehmen, was als dystoner Tremor bezeichnet wird. Die drei Nebenkriterien sind: (3) *geste antagoniste*, (4) *overflow* und (5) *mirror dystonia*. Können dystone Haltungen und Bewegungen durch eine bestimmte willkürliche Aktion unmittelbar gemildert werden, liegt eine sogenannte *geste antagoniste* vor. Unter *overflow* versteht man das Übergreifen der Muskelkontraktionen auf benachbarte und zuvor nicht betroffene Regionen, was häufig während der maximalen Ausprägung der dystonen Bewegung erfolgt. Ein weiteres typisches Phänomen ist *mirror dystonia* bzw. die Spiegeldystonie. Sie beschreibt das Auslösen von dystonen Haltungen oder Bewegungen auf der betroffenen Körperseite, wenn spiegelbildlich Willkürbewegungen auf der nicht betroffenen Seite ausgeführt werden.

1.1.2 Epidemiologie

Mit einer Prävalenz von 16,43 : 100.000 (Steeves et al., 2012) gehört die Dystonie formal zu der Gruppe der seltenen Erkrankungen, an denen laut Definition der Europäischen Kommission weniger als 5 von 10.000 Personen leiden (European Commission, 2020). Die mit Abstand häufigsten Formen der Dystonie sind die fokale und die segmentale Dystonie, an denen zusammengenommen durchschnittlich 15,36 von 100.000 Personen erkrankt sind (Steeves et al., 2012). Die generalisierte Dystonie, die im Gegensatz zu den fokalen und segmentalen Formen einen Großteil des

Körpers betrifft und vorwiegend im Kindesalter beginnt, ist eine äußerst seltene Erkrankung. Ihre Prävalenz in der Gesamtbevölkerung beträgt lediglich 0,44 : 100.000 (Steeves et al., 2012). Insgesamt ist die Dystonie eine der häufigsten Bewegungsstörungen. Obwohl die Erkrankung im älteren Anteil der Allgemeinbevölkerung (50–89 Jahre) nach Tremor, Restless-Legs-Syndrom und Parkinson-Syndrom nur die viert häufigste Prävalenz aufweist (Wenning et al., 2005), repräsentieren Patienten mit Dystonie (nach Patienten mit Parkinson-Syndrom) das zweitgrößte Patientenkollektiv in Fachabteilungen für Bewegungsstörungen (Fahn et al., 2011).

1.1.3 Klassifikation

In der aktuellen Klassifikation der Dystonie nach Albanese et al. (2013) wird das klinische Erscheinungsbild und die Ätiologie der Dystonie in zwei getrennten Achsen klassifiziert. Ziel dieser Herangehensweise ist es, zunächst das klinische Syndrom des Patienten durch Zusammenschau der Merkmale in Achse I möglichst umfassend zu definieren (Albanese et al., 2013). Basierend darauf erfolgt durch die syndromorientierte Anwendung diagnostischer Untersuchungen die Klassifikation der Ätiologie in Achse II und letztendlich die Auswahl des optimalen Therapieansatzes (Albanese et al., 2013; Albanese et al., 2018). Im folgenden Abschnitt wird die Klassifikation der Dystonie nach Albanese et al. (2013) zusammengefasst.

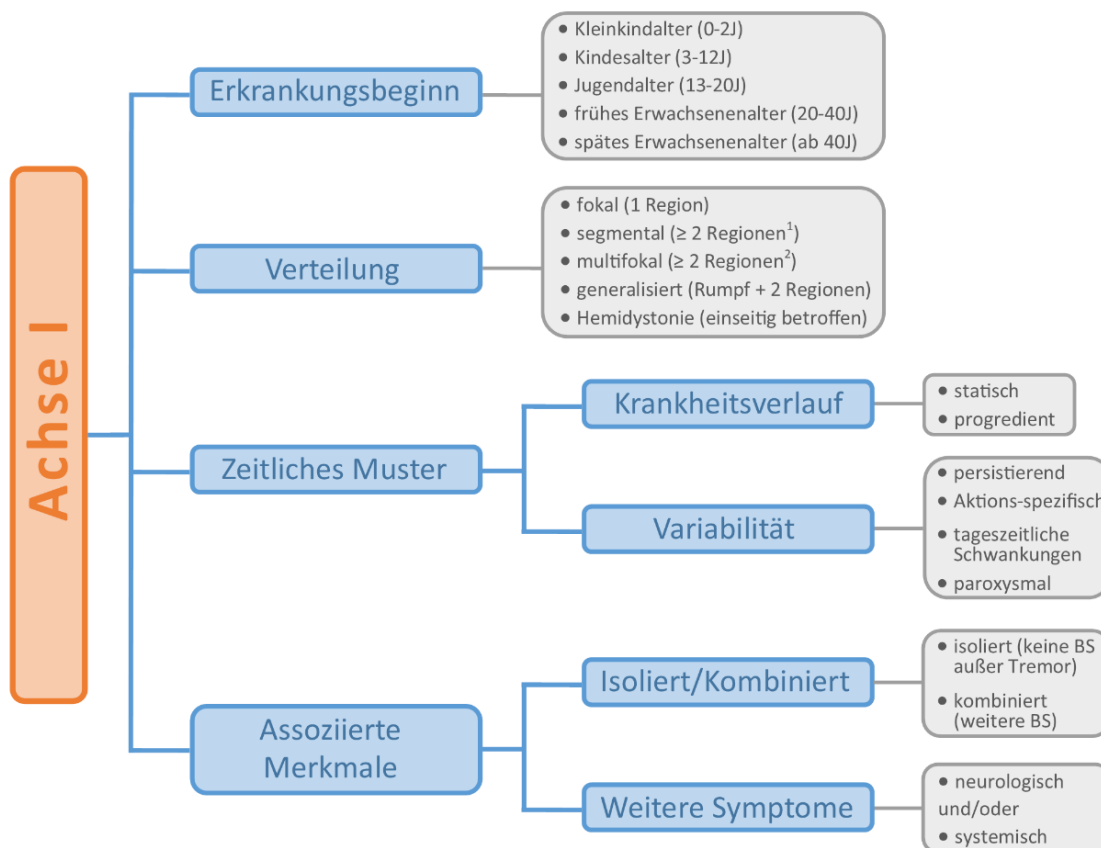


Abb. 1: Achse I der Dystonie-Klassifikation

¹ ≥ 2 benachbarte Regionen

² ≥ 2 nicht benachbarte Regionen

J: Jahre; BS: Bewegungsstörung. Auf Basis von Albanese et al. (2018) ergänzt aus Albanese et al. (2013).

Die Klassifikation nach Albanese et al. (2013) entlang der Achse I (Abb. 1) umfasst Erkrankungsbeginn, Verteilung und zeitliches Muster als klinische Charakteristika der Dystonie sowie das Bestehen weiterer assoziierter Merkmale. Der Erkrankungsbeginn wird in fünf Alterskategorien stratifiziert: Kleinkindalter (0–2 Jahre), Kindesalter (3–12 Jahre), Jugendalter (13–20 Jahre), frühes Erwachsenenalter (21–40 Jahre) und spätes Erwachsenenalter (> 40 Jahre). Unter dem Kriterium der Verteilung werden die betroffenen Körperregionen erfasst und entsprechend der Anzahl und des Musters der betroffenen Regionen werden verschiedene Typen differenziert. Folgende individuelle Regionen werden hierfür voneinander abgegrenzt: obere Gesichtshälfte, untere Gesichtshälfte, zervikale Region, Larynx, obere Extremitäten und untere Extremitäten. Ist nur eine Region betroffen, liegt eine fokale Dystonie vor. Die segmentale Verteilung

beschreibt die Dystonie an zwei oder mehr benachbarten Regionen, die multifokale Verteilung hingegen die Dystonie an zwei oder mehr nicht benachbarten Regionen. Betrifft die Erkrankung nur eine Körperseite, liegt eine Hemidystonie vor; sind der Rumpf und mindestens zwei weitere Regionen betroffen, handelt es sich um eine generalisierte Dystonie. Unter dem zeitlichen Muster der Dystonie werden die Merkmale Krankheitsverlauf und Variabilität charakterisiert. Während der Krankheitsverlauf die Entwicklung seit Erstmanifestation der Erkrankung beschreibt und dieser entweder statisch oder progredient sein kann, charakterisiert die zeitliche Variabilität das Auftreten und den Schweregrad der Dystonie innerhalb eines kürzeren Zeitintervalls. Die Symptomausprägung kann auf einem Niveau persistieren oder tageszeitlichen Schwankungen unterliegen. Treten Symptome nicht dauerhaft, sondern nur bei bestimmten Handlungen oder Bewegungen auf, handelt es sich um eine aktionsspezifische Dystonie. Bei der paroxysmalen Form treten die Symptome ebenfalls nur zeitlich begrenzt in Erscheinung, jedoch im Gegensatz zur aktionsspezifischen Form komplett unabhängig von spezifischen Triggern. Das letzte Kriterium der ersten Achse berücksichtigt die Existenz assoziierter Merkmale. Liegen mit Ausnahme eines Tremors keine weiteren Bewegungsstörungen vor, handelt es sich um eine isolierte Dystonie. Bezüglich des Tremors wird ferner zwischen einem dystonen und einem Dystonie-assoziierten Tremor differenziert, wobei sich der dystone Tremor in derselben Region wie die Dystonie manifestiert (beispielsweise als Kopftremor bei zervikaler Dystonie) und der Dystonie-assoziierte Tremor in einer nicht betroffenen Region auftritt (beispielsweise als Armtremor bei Blepharospasmus) (Bhatia et al., 2018). Leidet ein Patient neben der Dystonie unter einer oder mehreren weiteren Bewegungsstörungen, handelt es sich um eine kombinierte Dystonie (Albanese et al., 2013). Zusätzliche neurologische oder systemische Symptome werden unter dem Kriterium der assoziierten Merkmale erfasst (Albanese et al., 2013).

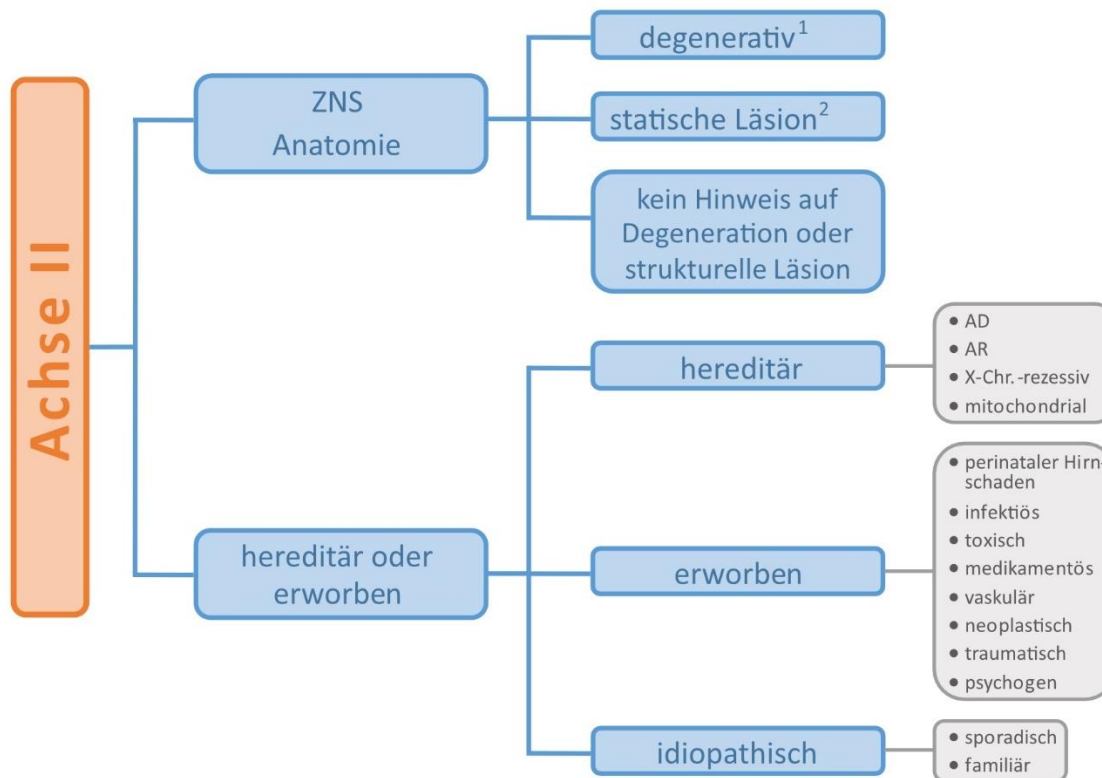


Abb. 2: Achse II der Dystonie-Klassifikation

¹ progressive strukturelle Abnormalitäten

² nicht progressive Anomalien der Hirnentwicklung oder erworbene Läsionen

AD: autosomal-dominant, AR: autosomal-rezessiv, X-Chr.-rezessiv: X-Chromosomal-rezessiv. Auf Basis von Albanese et al. (2018) ergänzt aus Albanese et al. (2013).

Die zweite Achse (Abb. 2) der Klassifikation nach Albanese et al. (2013) dient der ätiologischen Klassifikation des Dystonie-Syndroms und integriert unter anderem die Befunde aus bildgebender und molekulargenetischer Diagnostik. Das erste Kriterium dieser Achse berücksichtigt die Anatomie im zentralen Nervensystem und unterscheidet zwischen Formen mit degenerativen Veränderungen, statischen Läsionen oder Formen ohne Hinweise auf degenerative oder strukturelle Veränderungen. Das zweite Kriterium differenziert zwischen hereditären, erworbenen oder idiopathischen Formen der Dystonie. Entsprechend des Erbgangs werden die hereditären Formen weiter in autosomal-dominante, autosomal-rezessive, X-Chromosomal-rezessive und mitochondriale Dystonie-Syndrome unterteilt. Unter den erworbenen Dystonie-Syndromen werden Fälle subsummiert, in denen die Erkrankung auf eine bekannte, nicht genetische Ursache zurückzuführen ist. Kann keine Ursache identifiziert werden, wird die

Genese der Dystonie als idiopathisch klassifiziert und entsprechend der Familienanamnese weiter zwischen sporadischen und familiären Fällen differenziert.

1.1.4 Isolierte fokale bzw. segmentale Dystonie (IFSD) und generalisierte Dystonie

Zwei charakteristische Dystonie-Syndrome sind die isolierte fokale bzw. segmentale Dystonie mit Beginn im Erwachsenenalter und die generalisierte Dystonie mit Beginn im Kindes- bis Jugendalter (Albanese et al., 2013).

Die isolierte fokale bzw. segmentale Dystonie (IFSD) ist das häufigste Dystonie-Syndrom (Steeves et al., 2012). Die Erkrankung tritt an einer (fokal) bzw. an zwei oder mehr benachbarten Regionen (segmental) auf und ist nicht mit weiteren neurologischen oder systemischen Symptomen assoziiert (Albanese et al., 2013). In Bezug auf die unterschiedlichen Regionen sind die beiden häufigsten Subtypen die zervikale Dystonie (Dystonie der Halsmuskulatur) und der Blepharospasmus (Dystonie der periorbitalen Muskulatur) (Steeves et al., 2012). Weitere Subtypen wie die spasmodische Dysphonie (Dystonie der laryngealen Muskulatur), die oromandibuläre Dystonie und der aktionsabhängige Schreibkrampf sind deutlich seltener (Steeves et al., 2012; Wang et al., 2016; Williams et al., 2017). Frauen sind insgesamt häufiger betroffen und stellen auch innerhalb der verschiedenen Subtypen – mit Ausnahme des Schreibkrampfes – den Großteil der Erkrankten dar (Soland et al., 1996; Williams et al., 2017). Obwohl die meisten Patienten im Erwachsenenalter erkranken, kann sich diese Form auch bereits im Kindes- und Jugendalter manifestieren (Koukouni et al., 2007). Ätiologisch tritt die überwiegende Mehrheit der IFSD idiopathisch, also ohne identifizierbare Ursache, auf (Albanese et al., 2013). Bei einem geringen Anteil der Fälle liegt jedoch durch den Nachweis einer kausalen Variante in einem Dystonie-assoziierten Gen eine hereditäre Form der IFSD vor (LeDoux et al., 2016).

Die generalisierte Dystonie ist durch eine Dystonie der Rumpfmuskulatur und mindestens zwei weiterer Regionen charakterisiert (Albanese et al., 2013). Sie beginnt zumeist im Kindes- bis Jugendalter und ist ein schwerwiegendes Krankheitsbild, das zu gravierenden körperlichen Beeinträchtigungen und muskuloskelettalen Deformitäten führen kann (Lumsden et al., 2016). Die generalisierte Dystonie ist insgesamt deutlich seltener als die fokalen und segmentalen Dystonien (Steeves et al., 2012) und kann isoliert, kombiniert oder im Rahmen einer Multisystemerkrankung mit weiteren

neurologischen und systemischen Symptomen auftreten (van Egmond et al., 2015). Neben einer Vielzahl an erworbenen schädigenden Einflüssen (z. B. strukturelle Hirnläsionen, Autoimmunerkrankungen, Medikamente) stellen vor allem genetische Defekte eine äußerst häufige Ursache der generalisierten Dystonie dar (van Egmond et al., 2015).

1.2 Genetik

1.2.1 Monogene Erkrankungen

Unter dem Begriff *monogene Erkrankungen* werden Krankheiten zusammengefasst, die durch Varianten in einzelnen Genen verursacht werden (Schaaf & Zschocke, 2018). Während wichtige Hinweise auf das Vorliegen einer monogenen Erkrankung häufig aus der Familienanamnese der Patienten abgeleitet werden können, schließt umgekehrt eine negative Familienanamnese die monogene Ätiologie einer Erkrankung nicht aus. Mögliche Ursachen für dieses Phänomen sind unter anderem rezessive Erkrankungen, die verminderte Penetranz einer Variante oder die Neuentstehung einer pathogenen Variante (de-novo-Variante). Obwohl genetische Faktoren eine grundlegende Rolle in der Pathogenese vieler Krankheiten spielen, sind monogene Erkrankungen äußerst selten (Strachan et al., 2014). Weitaus häufiger wird die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps polygen, also durch das Zusammenwirken unterschiedlicher genetischer Faktoren, determiniert (Strachan et al., 2014). Im Gegensatz zu Varianten monogener Erkrankungen, die einen hohen Einfluss bzw. eine große Effektstärke auf die Ausbildung der Erkrankung besitzen, ist der individuelle Beitrag von Varianten polygener Erkrankungen geringer (Strachan et al., 2014). Zudem ist für die Entstehung vieler Erkrankungen das Zusammenwirken aus genetischen und nicht genetischen Umweltfaktoren entscheidend (Strachan et al., 2014). Diese Erkrankungen werden als multifaktorielle oder komplexe Erkrankungen bezeichnet und zu ihnen zählen viele häufige Krankheitsbilder wie beispielsweise der Diabetes mellitus oder die koronare Herzerkrankung (Strachan et al., 2014). Da genetische Varianten, die monogene Erkrankungen hervorrufen, die Wahrscheinlichkeit des Überlebens und der Reproduktion eines betroffenen Individuums negativ beeinflussen können, unterliegen sie einer negativen Selektion und sind in der Population äußerst selten (Strachan & Read, 2018). Insgesamt beinhaltet das Genom eines Individuums jedoch eine Vielzahl an

seltenen Varianten, die nicht zur Ausbildung von monogenen Erkrankungen führen (P. C. Ng et al., 2008). Die klinische Signifikanz einer bestimmten Variante wird anhand verschiedener Kriterien bestimmt, welche in den Standards und Leitlinien zur Interpretation von Sequenz-Varianten des *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* definiert sind (Richards et al., 2015). Dabei werden unter anderem die Beschreibung und Bewertung der Variante in der wissenschaftlichen Literatur, die Frequenz der Variante in gesunden Kontrollprobanden, biologische Charakteristika der Variante und des entsprechenden Genprodukts sowie die genetischen Befunde der Familienmitglieder berücksichtigt (Richards et al., 2015). Eine Variante wird entsprechend der Erfüllung der unterschiedlich gewichteten Kriterien des ACMG-Klassifizierungssystems als (1) pathogen, (2) wahrscheinlich pathogen, (3) Variante unklarer Signifikanz (VUS), (4) wahrscheinlich benigne oder (5) benigne klassifiziert (Richards et al., 2015).

1.2.2 Exom-Sequenzierung

Mit dem Begriff *Next Generation Sequencing (NGS)* werden innovative und leistungsstarke DNA-Sequenzieretechnologien bezeichnet, die im Gegensatz zur zeit- und kostenintensiven Sanger-Methode das parallele Sequenzieren zahlreicher DNA-Fragmente in großem Umfang ermöglichen (Mardis, 2008). Die Einführung und zunehmende Anwendung der NGS-Technologien in der genetischen Forschung und Diagnostik haben die Identifikation neuer Krankheitsgene in den letzten Jahren entscheidend erleichtert und beschleunigt (Chong et al., 2015).

Die Mehrheit aller mit monogenen Erkrankungen assoziierten Varianten liegt innerhalb der proteinkodierenden Abschnitte des Genoms (Botstein & Risch, 2003). Diese Abschnitte setzen sich aus den Exonen der proteinkodierenden Gene zusammen und umfassen zusammengenommen nur etwa 1,2 % der gesamten DNA (Strachan et al., 2014). Die Exom-Sequenzierung (*whole-exome sequencing, WES*) ist eine auf NGS-Technologien basierende Methode, die die selektive Sequenzierung der Exone eines Individuums ermöglicht (P. C. Ng et al., 2008). Verglichen mit der Analyse des kompletten Genoms führt das Prinzip der WES zu einer kosteneffizienten Reduktion der Gesamtmenge an sequenzierter DNA (S. B. Ng et al., 2009). Des Weiteren ermöglicht die Methode eine Anreicherung von klinisch relevanten proteinkodierenden Bereichen

und hat sich für die Identifikation monogener Varianten als überaus erfolgreich erwiesen (Bamshad et al., 2011; S. B. Ng et al., 2010; S. B. Ng et al., 2009).

1.3 Genetik der Dystonie

1.3.1 Überblick

Mit der Identifikation einer Deletion im Gen *TOR1A* gelang 1997 der Nachweis einer kausalen Genvariante als Ursache der isolierten generalisierten Dystonie mit Beginn im Kindesalter (Ozelius et al., 1997). Während in den folgenden Jahren weitere kombinierte und generalisierte Dystonie-Syndrome mit Varianten in bestimmten Genen assoziiert wurden (Klein, 2014), blieb die monogene Basis der IFSD lange ungeklärt. Einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung leisteten die Innovationen des NGS (Olgiati et al., 2016). Mit Hilfe von WES gelang im Jahr 2012 kurz hintereinander mit *ANO3* und *GNAL* die Aufklärung von zwei Genen, die mit einer autosomal-dominant vererbten IFSD assoziiert sind (Charlesworth et al., 2012; Fuchs et al., 2013). Insgesamt ermöglichten die neuen Technologien neben einem rapiden Wachstum der Liste neu identifizierter Gene auch die Erweiterung des phäno- und genotypischen Spektrums bereits etablierter Gene (Olgiati et al., 2016). In Abb. 3 ist der Einfluss des NGS auf die Identifikation Dystonie-assoziiierter Gene schematisch dargestellt (auf Basis von Klein (2014) ergänzt durch Charlesworth et al. (2015), Groen et al. (2015a), Groen et al. (2015b), Mencacci et al. (2015b) und Zech et al. (2015b)).

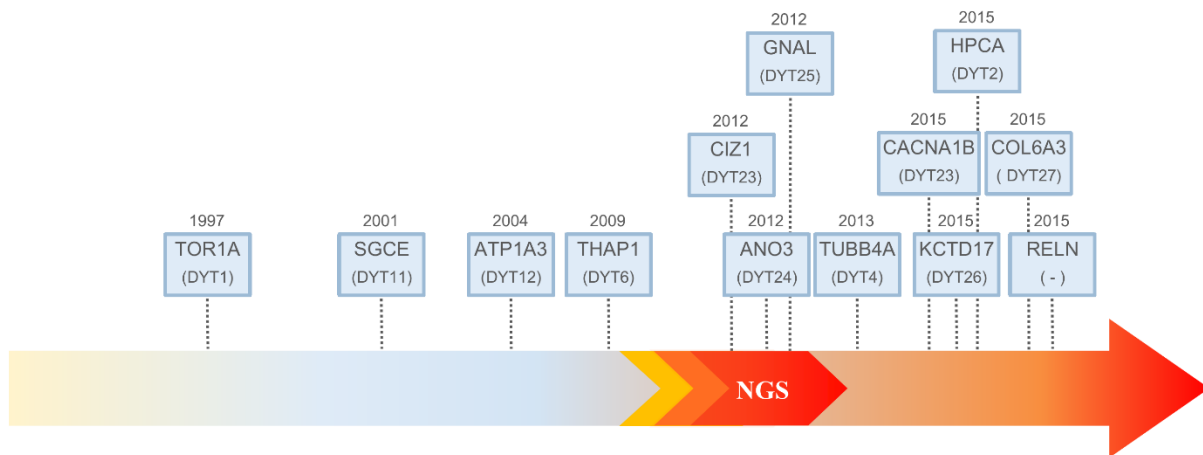


Abb. 3: Einfluss des NGS auf die Identifikation von Dystonie-assoziierten Genen

Alte Nomenklatur der DYT-Loci in Klammern; NGS: *Next Generation Sequencing*. Auf Basis von Klein (2014) ergänzt durch Charlesworth et al. (2015), Groen et al. (2015a), Groen et al. (2015b), Mencacci et al. (2015b) und Zech et al. (2015b).

Ursprünglich wurden die assoziierten chromosomalen Loci und die identifizierten Gene in der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung nummeriert und mit der Vorsilbe DYT als DYT1 bis DYT28 bezeichnet (Marras et al., 2016). Aufgrund unterschiedlicher Probleme wurde dieses System kürzlich ersetzt und stattdessen die Verwendung des entsprechenden Gens in Kombination mit dem assoziierten Phänotyp (abgekürzt als Vorsilbe, z. B. DYT oder DYT-PARK bei kombinierten Syndromen mit Parkinson) empfohlen (Marras et al., 2016). Prinzipiell kann zwischen Genen unterschieden werden, in denen pathogene Varianten zu einer isolierten oder zu einer kombinierten Dystonie führen (Balint & Bhatia, 2015). Des Weiteren sind einige Gene vorwiegend mit einem bestimmten Verteilungsmuster der Dystonie oder mit zusätzlichen klinischen Charakteristika assoziiert, während andere Gene ein breites phänotypisches Spektrum aufweisen (Balint & Bhatia, 2015). In Abb. 4 ist eine Phänotyp-basierte Einteilung ausgewählter Gene dargestellt (auf Basis von Balint & Bhatia (2015) ergänzt durch Charlesworth et al. (2015), Groen et al. (2015b), Mencacci et al. (2015b) und Zech et al. (2015b)).

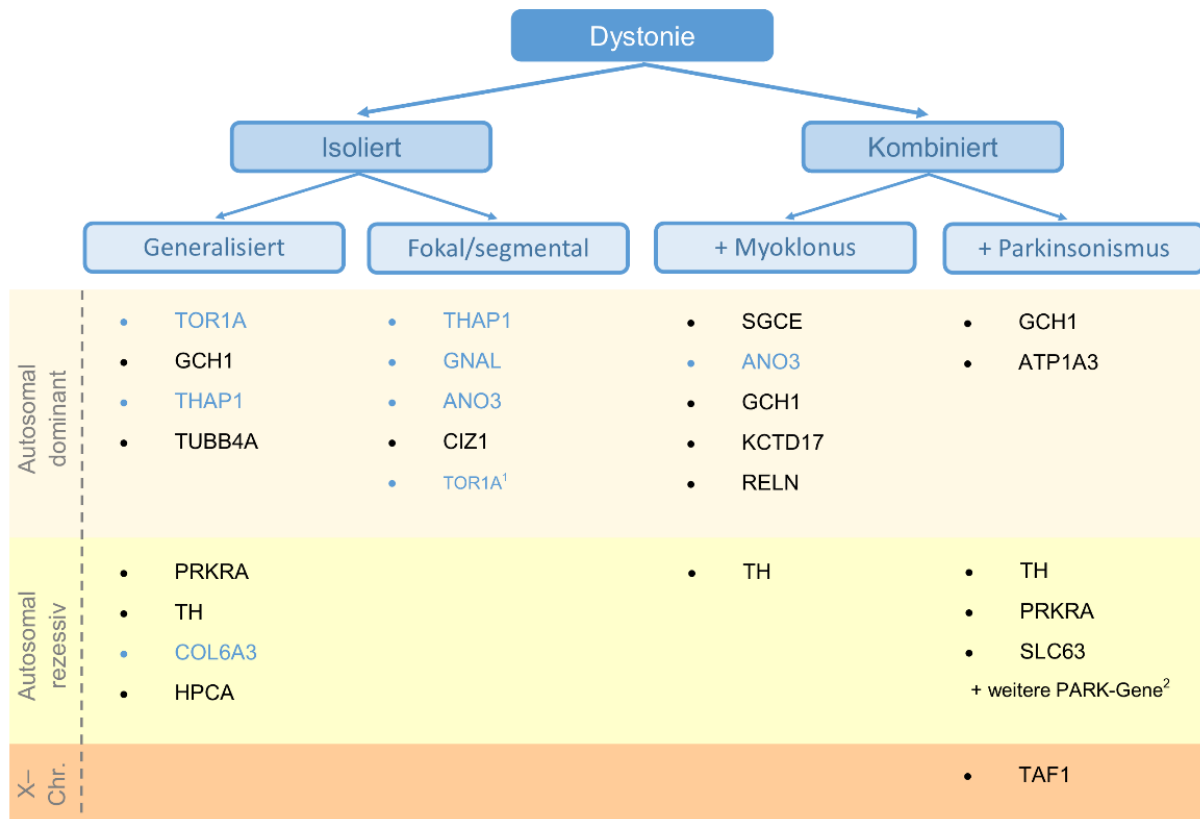


Abb. 4: Phänotyp-basierte Einteilung Dystonie-assoziiertes Gene

Gene, die blau markiert sind, wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Sanger-Sequenzierung oder hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (HRMA) analysiert. X-Chr.: X-Chromosomal.

¹ Die fokale bzw. segmentale Verteilung ist eine seltene Präsentation der *TOR1A*-assoziierten Dystonie.

² Unter anderem *PARK2*, *PINK*, *DJ1*. Auf Basis von Balint & Bhatia (2015) ergänzt durch Charlesworth et al. (2015), Groen et al. (2015b), Mencacci et al. (2015b) und Zech et al. (2015b).

Im folgenden Abschnitt werden fünf Gene, die mit einer isolierten Dystonie assoziiert sind und in der vorliegenden Arbeit bei allen Patienten mit IFSD sequenziert wurden, ausführlicher beschrieben.

1.3.2 TOR1A

Mit der drei Basenpaare umfassenden Deletion c.907_909delGAG im Gen *TOR1A* gelang Ozelius et al. (1997) die Aufklärung der molekulargenetischen Ätiologie der Erkrankung in Familien mit isolierter generalisierter Dystonie. Übertragen auf das durch *TOR1A* kodierte Protein Torsin-1A führt die Variante zu einem Verlust der Aminosäure Glutamat an Position 303 der Primärstruktur (p.Glu303del) (Ozelius et al., 1997). Diese

charakteristische Deletion (Δ GAG) ist insgesamt eine der häufigsten Ursachen der isolierten generalisierten Dystonie mit Beginn im Kindes- und Jugendalter (Bressman, 2006). Die Δ GAG-*TOR1A*-assoziierte Dystonie wird autosomal-dominant mit einer verminderten Penetranz von circa 30 % vererbt (Bressman et al., 1989). Die Erkrankung beginnt typischerweise vor dem 30. Lebensjahr an den Extremitäten und generalisiert innerhalb von durchschnittlich fünf Jahren (Bressman et al., 2000). Klassischerweise wird hierbei ein Fortschreiten der Dystonie von kaudal nach kranial beobachtet und die kraniale Muskulatur in der Regel ausgespart (Bressman et al., 2000). Trotz der Prädominanz des früh beginnenden, generalisierten Phänotyps sind fokale, segmentale und spät beginnende Formen als Manifestationen von Δ GAG-*TOR1A* bekannt (Edwards et al., 2003; Gasser et al., 1998; Grundmann et al., 2003; Valente et al., 1998). Neben der klassischen Δ GAG-Deletion in Exon 5 wurden vereinzelt weitere Varianten (sogenannte non- Δ GAG-Varianten) in *TOR1A* als Ursache einer Dystonie beschrieben (Dobricic et al., 2015; LeDoux et al., 2016; Vulinovic et al., 2014; Zirn et al., 2008).

1.3.3 *THAP1*

Varianten in *THAP1* wurden erstmals 2009 mit dem Phänotyp einer isolierten Dystonie assoziiert (Fuchs et al., 2009). Neben *TOR1A* stellen Varianten in diesem Gen eine häufige Ursache der isolierten generalisierten Dystonie dar (Bressman et al., 2009). Die *THAP1*-assoziierte Dystonie wird autosomal-dominant mit einer verminderten Penetranz von circa 60 % vererbt (Bressman et al., 2009). Verglichen mit der *TOR1A*-assoziierten Dystonie ist diese Form durch eine größere Variabilität im klinischen Erscheinungsbild charakterisiert und manifestiert sich in etwa 40 % der Fälle als generalisierte und in etwa 60 % der Fälle als fokale oder segmentale Dystonie (Blanchard et al., 2011; Xiromerisiou et al., 2012). Auch der Erkrankungsbeginn ist variabler und kann zwischen dem frühen Kindes- und fortgeschrittenen Erwachsenenalter liegen (Blanchard et al., 2011). Der größte Unterschied zur *TOR1A*-assoziierten Dystonie besteht in der charakteristischen Beteiligung der kranialen, laryngealen und zervikalen Regionen (Blanchard et al., 2011; Bressman et al., 2009). Beginnt eine generalisierte Dystonie mit einer spasmodischen Dysphonie oder oromandibulären Dystonie, kann daraus bereits ein starker Hinweis auf das Vorliegen einer Variante in *THAP1* abgeleitet werden (Djarmati et al., 2009; Houlden et al., 2010). Auch das genetische Spektrum

der *THAP1*-assoziierten Dystonie ist deutlich heterogener als das der *TOR1A*-assoziierten Dystonie und umfasst über 100 verschiedene Varianten (Lohmann & Klein, 2017), darunter heterozygote Missense-, Nonsense-, Frameshift- und Splice-site-Varianten, Deletionen und Insertionen (Blanchard et al., 2011) sowie homozygote Missense-Varianten (Houlden et al., 2010; Schneider et al., 2011).

1.3.4 *GNAL*

Varianten in *GNAL* führen zu einer autosomal-dominanten Dystonie (Fuchs et al., 2013). Während die meisten Patienten nach dem 30. Lebensjahr erkranken, ist der Erkrankungsbeginn prinzipiell sehr variabel und kann im frühen Kindes- bis späten Erwachsenenalter liegen (Fuchs et al., 2013). Die *GNAL*-assoziierte Dystonie manifestiert sich charakteristischerweise in über 80 % der Fälle in Form einer zervikalen Dystonie und breitet sich im Verlauf bei circa 50 % der Patienten zu einem segmentalen Verteilungstyp mit kranialem Schwerpunkt aus (Fuchs et al., 2013). Neben den fokalen und segmentalen Verteilungen wurden vereinzelt generalisierte Fälle mit einem für diesen Phänotyp ungewöhnlich späten Erkrankungsbeginn von 41 Jahren (Miao et al., 2013) und 63 Jahren (Vemula et al., 2013) beschrieben. Die in der Literatur beschriebenen *GNAL*-Varianten setzen sich aus heterozygoten Missense-, Nonsense-, Frameshift- und Splice-site-Varianten sowie Deletionen zusammen (Fuchs et al., 2013; Vemula et al., 2013; Zech et al., 2015a).

1.3.5 *ANO3*

Die *ANO3*-assoziierte Dystonie wird autosomal-dominant mit reduzierter Penetranz vererbt (Charlesworth et al., 2012; Munchau et al., 2000). Die Erkrankung beginnt im Kindes- bis mittleren Erwachsenenalter als zervikale Dystonie, spasmodische Dysphonie oder aktionsabhängiger Schreibkrampf. Bezüglich der Verteilung sind fokale und segmentale Formen in der Literatur beschrieben worden (Ma et al., 2015a; Miltgen et al., 2016; Stamelou et al., 2014). Ein Kopf- oder Haltetremor der Arme kann den dystonen Symptomen um einige Jahre vorausgehen und die prädominante klinische Auffälligkeit darstellen (Stamelou et al., 2014). Das genetische Spektrum von *ANO3*-Varianten umfasst verschiedene Missense-Varianten (Charlesworth et al., 2012; Ma et al., 2015a; Miltgen et al., 2016; Zech et al., 2014). Insgesamt finden sich in der Literatur

nur wenige Fälle mit *ANO3*-assoziiierter Dystonie (Charlesworth et al., 2012; Ma et al., 2015a; Miltgen et al., 2016; Zech et al., 2014).

1.3.6 *COL6A3*

Biallelische Varianten in *COL6A3* wurden unlängst als Ursache der isolierten rezessiven Dystonie identifiziert (Zech et al., 2015b). Phänotypisch führen *COL6A3*-Varianten zu einem variablen klinischen Bild mit prädominanter zervikaler Beteiligung und Ausparung der unteren Extremitäten (Jochim et al., 2016; Zech et al., 2015b). Die Erkrankung manifestiert sich zwischen dem 6. und 24. Lebensjahr in Form einer zervikalen Dystonie oder eines Schreibkrampfes. Zusätzlich können bei den generalisierten Formen als assoziierte Merkmale ein Kopf- und Aktionstremor der oberen Extremitäten sowie faziale Dyskinesien auftreten (Jochim et al., 2016; Zech et al., 2015b).

1.4 Fragestellung

Die Dystonie ist eine hyperkinetische Bewegungsstörung, die durch eine ausgeprägte phänotypische Heterogenität gekennzeichnet ist. Ein Teil der Dystonien sind monogene Erkrankungen und können ätiologisch auf Varianten in bestimmten Genen zurückgeführt werden (Albanese et al., 2013). Trotz der wachsenden Liste der Dystonie-assoziierten Gene (Olgiati et al., 2016) und eines hohen Anteils familiärer Krankheitsfälle (Leube et al., 1997; Waddy et al., 1991) kann nur bei einem geringen Anteil der isolierten fokalen bzw. segmentalen Dystonien (IFSD) des Erwachsenenalters eine genetische Ursache identifiziert werden (LeDoux et al., 2016; Lohmann et al., 2012; Zech et al., 2015a). Auch innerhalb der generalisierten Dystonien des Kindesalters gelingt aufgrund der hohen genetischen Heterogenität nicht immer der Nachweis einer pathogenen Variante (Lin & Nardocci, 2016). Des Weiteren ist die ätiologische Relevanz einiger kürzlich identifizierter Gene in der Pathogenese der Dystonien aufgrund ausstehender Replikation der Varianten oder hoher Frequenz von seltenen Varianten in gesunden Kontrollprobanden unklar (Zech et al., 2014).

Hauptaufgabe dieser Arbeit soll die phänotypische und genotypische Charakterisierung einer neu rekrutierten Patientenkohorte mit Dystonie sein.

In diesem Rahmen sollen die demografischen und klinischen Merkmale der Kohorte erfasst und Unterschiede der einzelnen IFSD-Subtypen zwischen Männern und Frauen sowie zwischen Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese untersucht werden. Zudem sollen Unterschiede der Patienten mit und ohne dystonen Kopftremor betrachtet werden.

Anschließend soll die Kohorte systematisch molekulargenetisch analysiert werden: Patienten mit IFSD sollen mittels Sanger-Sequenzierung und hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (HRMA) auf Varianten in *TOR1A*, *THAP1*, *COL6A3*, *GNAL* und *ANO3* untersucht und die Frequenz von monogenen Fällen innerhalb dieser Patientengruppe bestimmt werden. Ausgewählte Fälle mit einer hohen a-priori-Wahrscheinlichkeit für eine monogene Ätiologie sollen mittels Exom-Sequenzierung (WES) analysiert werden. In diesem Rahmen soll durch den breiten analytischen Ansatz der

WES die Identifikation neuer genetischer Assoziationen ermöglicht werden, die anschließend durch ein molekulargenetisches Screening in der Patientenkohorte mit IFSD überprüft werden sollen.

2 Methoden

2.1 Rekrutierung der Patientenkohorte

Alle Studienteilnehmer wurden über die Studie aufgeklärt und erteilten ihr schriftliches Einverständnis für die Teilnahme an der Studie durch Unterzeichnung einer Einverständniserklärung. Die Studie und Einverständniserklärung wurden durch das Votum der lokalen Ethikkommissionen genehmigt.

Die Patientenkohorte dieser Arbeit wurde an folgenden neurologischen Zentren in Bayern und Österreich rekrutiert: (1) Schön Klinik München Schwabing (Deutschland), Leitung: Professor Dr. med. A. Ceballos-Baumann; (2) Neurologische Klinik, Universitätsklinikum Innsbruck (Österreich), Leitung: Professor Dr. med. W. Poewe.

Die Studienteilnehmer waren Patienten der Spezialambulanzen für Botulinumtoxin-Therapie. Ausschlusskriterien dieser Studie waren: (1) Molekulargenetisch bereits diagnostizierte pathogene Variante in einem Gen, das als Ursache monogener Dystonien etabliert ist; (2) molekulargenetisch bereits diagnostizierte pathogene Variante in einem Gen, dessen assoziierter Phänotyp mit dystonen Manifestationen vereinbar ist; (3) Hinweise auf eine nicht genetische Ätiologie der Dystonie. Beispielhaft wurden bei der Rekrutierung der Kohorte dieser Arbeit folgende Fälle ausgeschlossen: Generalisierte Dystonie als Folge eines neonatalen Kernikterus bei Rhesusinkompatibilität, zervikale Dystonie als Symptom einer molekulargenetisch gesicherten Chorea Huntington, tardive Dystonie als Spätfolge einer medikamentösen Therapie (z. B. Neuroleptika, Dopaminantagonisten). Die Erfassung der Ausschlusskriterien erfolgte anamnestisch. Alle Patienten mit generalisierter Dystonie erhielten zudem im Krankheitsverlauf mindestens einmal eine kraniale Bildgebung, um degenerative oder strukturelle Pathologien des ZNS auszuschließen (Zech et al., 2017). Zusätzlich erfolgte bei allen Patienten mit generalisierter Dystonie und Krankheitsbeginn vor dem 20. Lebensjahr im Krankheitsverlauf ein Therapieversuch mit L-Dopa zum Ausschluss einer L-Dopa-responsiven Dystonie (Zech et al., 2017).

Die systematische Erhebung und Dokumentation der demografischen und klinischen Merkmale erfolgten mit Hilfe eines standardisierten Data-Sets. Das verwendete Data-Set wurde für wissenschaftliche Studien konzipiert und erfasst die in Abb. 5 aufgeführten Informationen. Im Falle einer positiven Familienanamnese für eine Dystonie oder

einen isolierten Kopftremor wurde der Stammbaum der Indexperson grafisch dokumentiert und das klinische Erkrankungsbild der betroffenen Angehörigen vermerkt. Die Extraktion der genomischen DNA für die molekulargenetische Analyse erfolgte aus einer Vollblutprobe der Studienteilnehmer gemäß standardisierter Protokolle am Helmholtz Zentrum München (Institut für Humangenetik und Institut für Neurogenomik).

Demographische Daten	
Geschlecht:	
Alter:	
Ethnizität:	
Klinische Charakterisierung	
Dystonie	
<input type="radio"/> definitiv	<input type="radio"/> wahrscheinlich
<input type="radio"/> möglich	<input type="radio"/> keine Dystonie
Erkrankungsbeginn	
Lokalisation:	
Verlauf:	
Alter:	
Symptomverteilung	
<input type="radio"/> Generalisiert	<input type="radio"/> Hemidystonie
<input type="radio"/> Multifokal	<input type="radio"/> Segmental
<input type="radio"/> Fokal	
Assoziierte Charakteristika	
<input type="radio"/> Plötzlicher/rascher Beginn	
<input type="radio"/> Tageszeitliche Schwankungen	
Kombinierte Dystonie	
<input type="radio"/> Myoklonus	<input type="radio"/> Parkinsonismus
<input type="radio"/> Intentionstremor	<input type="radio"/> andere
Anamnesen, die möglicherweise mit einer Dystonie assoziiert sind	
<input type="radio"/> perinatale Anoxie	<input type="radio"/> Tumor
<input type="radio"/> Cerebrovaskuläres Ereignis	<input type="radio"/> Infektion
<input type="radio"/> Trauma des ZNS	<input type="radio"/> Trauma außerhalb des ZNS
<input type="radio"/> Mitochondriale Erkrankung	<input type="radio"/> Allgemeinanästhesie
<input type="radio"/> Neurodegenerative Erkrankung	<input type="radio"/> Neuropathie in Körperregion der Dystonie
<input type="radio"/> Metabolische Erkrankung	
<input type="radio"/> Neuroleptika/Dopamin-Antagonisten Medikation	
Familienanamnese	
Dystonie und/oder Tremor	
<input type="radio"/> positiv	
<input type="radio"/> wahrscheinlich	
<input type="radio"/> negativ	
<input type="radio"/> unbekannt	
Klassifikation der Dystonie	
Nach klinischen Charakteristika	
<input type="radio"/> Isoliert	
<input type="radio"/> Kombiniert	
Nach Ätiologie	
<input type="radio"/> Idiopathisch	
<input type="radio"/> Erworben	
<input type="radio"/> Hereditär	

Abb. 5: Data-Set

ZNS: Zentrales Nervensystem

2.2 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der demografischen und klinischen Charakteristika erfolgte mit dem Programm R (Version 3.6.3). Unterschiede bezüglich des Erkrankungsalters wurden mit dem Welch-Test für unabhängige Stichproben untersucht; quantitative Unterschiede klinischer Merkmale mit dem Chi-Quadrat-Test. Insgesamt wurden 18 paarweise Vergleiche durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde daher von $p < 0,05$ nach Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni ($p < \frac{0,05}{18}$) auf $p < 0,0028$ festgelegt.

2.3 Molekulargenetische Methoden

2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualitätstestung der extrahierten DNA und die Bestimmung der Reaktionsbedingungen der Primer erfolgten mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese Methode ermöglicht die Auftrennung und Identifikation unterschiedlich langer DNA-Fragmente und basiert auf der Siebfunktion des Agarose-Gels und den elektrochemischen Eigenschaften der DNA (Mülhardt, 2013). Agarose ist ein Polysaccharid und bildet, nachdem es in Flüssigkeit aufgekocht und abgekühlt wurde, einen Feststoff mit geleeartiger Konsistenz. Lässt man DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge durch ein Agarose-Gel laufen, bewegen sich kürzere Fragmente schneller als längere, da die Struktur des Agarose-Polymers ihnen weniger Widerstand entgegensetzt (Mülhardt, 2013). Eine über die Länge des Agarose-Gels angelegte Gleichspannung dient dabei als Triebkraft für die Migration der negativ geladenen DNA-Moleküle, wobei höhere Spannungen schnellere Wanderungsgeschwindigkeiten bewirken (Mülhardt, 2013). Je nach Fragestellung und der erwarteten Länge der Fragmente können die Agarose-Konzentration und damit der Widerstand des Gels variiert werden. Für die Visualisierung der DNA wird ein interkalierender Farbstoff zugesetzt. Durch Beleuchtung des Gels nach erfolgter Elektrophorese mit UV-Licht von 230 nm Länge fluoresziert der an die DNA gebundene Farbstoff und die Lokalisation der einzelnen Fragmente innerhalb des Gels wird als Bandendarstellung sichtbar (Mülhardt, 2013).

Für die Beurteilung der DNA-Qualität wurde ein 0,8%iges und für die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen der Primer ein 1,5%iges Gel verwendet. Zur Herstellung eines 1,5%igen Gels wurde insgesamt 1,5 g Agarose-Pulver pro 100 ml TAE-

Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) gelöst und aufgekocht. Nach vollständiger Auflösung der Agarose wurde jeweils 2,5 µl MidoriGreen (NIPPON Genetics Europe GmbH) pro 100 ml TAE-Puffer hinzugefügt und die Agarose-Lösung in eine Gelform gegossen. Das erstarrte Gel wurde anschließend in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer platziert. Die zu analysierende DNA bzw. die PCR-Produkte wurden mit BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB) gemischt (1 µl DNA plus 5 µl BlueJuice™) und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V und einer Laufzeit von 60 Minuten.

2.3.2 Primer

Das Design der verwendeten Primer (Tab. 1) erfolgte mittels ExonPrimer (<https://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>) und die Synthese der Oligonukleotide durch die Firma Metabion international AG (Martinsried). Durch Testläufe mit Kontroll-DNA unter Verwendung verschiedener Reaktionsansätze (Tab. 2–4) konnten die Funktion der Primer getestet und die optimalen Reaktionsbedingungen bestimmt werden. Die PCR wurde für diesen Zweck unter Verwendung des Gradienten-PCR-Protokolls durchgeführt, das in den unterschiedlichen Wells einer Platte verschiedene Temperaturprogramme generieren kann. Die PCR-Produkte wurden nach der Amplifizierung mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese qualitativ evaluiert. Die verwendeten Primer sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1 Verwendete Primer für PCR, HRMA und Sanger-Sequenzierung

Gen	Exon	Richtung	Sequenz
<i>TOR1A</i>	5	F	GTCTATAGGGCAGGTGGGTG
<i>TOR1A</i>	5	R	GGGTGGAAGTGTGGAAGGAC
<i>THAP1</i>	1_1	F	ACTTCGGCAACTCTGAAGCC
<i>THAP1</i>	1_1	R	GGGTCCTCACTTGTGGAAAG
<i>THAP1</i>	1_2	F	CGGAAGGATGGTGCAGTC
<i>THAP1</i>	1_2	R	TTCTATTTTAAATTTACCCCTAAGACC
<i>THAP1</i>	2	F	CTGGAAGTTTGGGTGCC
<i>THAP1</i>	2	R	TCTCTTAACACTAACTCAATTTTCCAC
<i>THAP1</i>	3	F	CCTGGTCAGTCCACAGATTC
<i>THAP1</i>	3	R	CCTTTACAGGCTAGAGGAGGATATG
<i>GNAL</i>	1 + 2	F	CAGGAAAGAGAGGAGCCGTC
<i>GNAL</i>	1 + 2	R	TTTAGAGAAAGCACTTTTGGGAC
<i>GNAL</i>	3 + 4	F	TGAAACCAGTCTAGGTCAGTGC

GNAL	3+4	R	GAGAGCTGGATTTCTGAAGAAAG
GNAL	5	F	CCACAAAGAAAATCTGAATGCTAC
GNAL	5	R	CAGTACTGAGAAGGCAGCATAATC
GNAL	6	F	CCATCCTTGCTGTACTTGGG
GNAL	6	F	AGGGCAGTACAAACAATTTGC
GNAL	7	R	CGGGCTTTACCTTGAAGAAG
GNAL	7	F	TTAAACCTCACAGCCCTTCG
GNAL	8	R	ATGTGTGAACGCTGGAACCT
GNAL	8	F	GCAGTGCTGAGTGTTAGAATTCAC
GNAL	9	R	TGCGTTACTGAAGCAACCAG
GNAL	9	F	CAAGCTCCTGAGTCACTGGG
GNAL	10	F	AATTTAGCAACTTCTATGTTAGAGGC
GNAL	10	R	TTCTTTGATTCATCAGAGGTATGTG
GNAL	11	F	TGCTGGGAATATACAGCAGTC
GNAL	11	R	TGTGAAATTAAGTAACATACCCTTTG
GNAL	12	F	TCCTTCCCAGAGTACATGC
GNAL	12	R	CTGGCAGTCAGGCAGTCC
COL6A3	2	F	ATTCCCTTTGCCCTGTTTTTC
COL6A3	2	R	TATGTCAGTGCCTGATGTCTAAG
COL6A3	3_1	F	ACCAAATTTGTTTAGGAAGGC
COL6A3	3_1	R	CCATCCTTCGAGTGTCCATC
COL6A3	3_2	F	GAACCAATCAGACTGGAAAAGG
COL6A3	3_2	R	CAGTTGCCAAGCTCATCTCC
COL6A3	4_1	F	GGTTTCAAAGAAACATGTCAG
COL6A3	4_1	R	CTACCACCCGTAGCGAATC
COL6A3	4_2	F	CCTCGCCCTTGATTTTCG
COL6A3	4_2	R	ATGCTGGTACCCACCTTACG
COL6A3	5_1	F	GGTGTCCTTTAAATGGAGTTAGC
COL6A3	5_1	R	CCAAAAGCTTAGGAATCCCC
COL6A3	5_2	F	GAAAATGAAGCCCCTGGAC
COL6A3	5_2	R	GTTCTTAAAGGCCCTGCCTG
COL6A3	6_1	F	TGTGCACGTGTTGTAGGCAC
COL6A3	6_1	R	CAGAAGCAGGAGCTGCG
COL6A3	6_2	F	TTCGGGCCTGAACACAG
COL6A3	6_2	R	TCAGACTGGCAAACCTACCCTC
COL6A3	7_1	F	CGCTTTGGTTCCTGTTATGC
COL6A3	7_1	R	GGAAGTGAAGCACTCCATCC
COL6A3	7_2	F	AGATCAAGACGGGCAAAGC
COL6A3	7_2	R	AGCCTACCCTCAACTCATGC
COL6A3	8_1	F	TTTGGACTTGGACATCCCTG
COL6A3	8_1	R	ATCATCCCCAGACCTGTCTG
COL6A3	8_2	F	GCCCTGGAGTTTGTCTCTG
COL6A3	8_2	R	CCAGACAAGTAGCCCCAGAC
COL6A3	9_1	F	GGTGGCTCATGAACGCTAAG
COL6A3	9_1	R	TTCCAGACGAGATGAGGACC
COL6A3	9_2	F	CAATGCCCTGGAGTACGTG
COL6A3	9_2	R	GAGTACCATGGCCTTTGAGC

COL6A3	10_1	F	CCTGGGTGAGGGCTACTTAC
COL6A3	10_1	R	ATCGTCCTGGGATTTTCCAC
COL6A3	10_2	F	CCACTGAACACTGGCAAGG
COL6A3	10_2	R	GAAGAAACAACCCAGAGAGAAG
COL6A3	11_1	F	TGTGTATTTATGTTCTGGGTCTGG
COL6A3	11_1	R	ACAAAGGCAATCTGAGGGAC
COL6A3	11_2	F	CAACACTAAGGTGGGCCTTG
COL6A3	11_2	R	CCAGGGACCAGACAGCTAAAG
COL6A3	12	F	AGAGTTCGTCTCCTCAGCCC
COL6A3	12	R	GAAGGGCTTCCTCCTTTCC
COL6A3	13	F	GCGAGTCTCTCAGTTTTCTATCAG
COL6A3	13	R	CAGTACACCCCCGCCTCAC
COL6A3	14	F	ATTGCATTTTCCACATGCC
COL6A3	14	R	TCTTGAAATGCCAAAAGGTG
COL6A3	15	F	TTTATGATTTTCTGCTGGGC
COL6A3	15	R	GTCGGGCTTCTGACACC
COL6A3	16	F	GGGGACCACAGGGATTC
COL6A3	16	R	CCAATGGGTAAGGATCAAGG
COL6A3	17	F	GAGAAAGGGTGATGAAGGGC
COL6A3	17	R	CAGCATCTGGAGAAACTGC
COL6A3	18 + 19 + 20	F	ACAGCCCTTGGCCTCTTC
COL6A3	18 + 19 + 20	R	TTCCCTAAATGAAATGTTGATATTC
COL6A3	21	F	TTGCCTTCATGGTGAATGAG
COL6A3	21	R	TTCCCAACAACCCTCTTCC
COL6A3	22	F	CCTGACCATCCAGTCCAGTG
COL6A3	22	R	GCCGAGAAGTGTGTCTTTTC
COL6A3	23	F	TGTCTTGTGCAGCATTTCAG
COL6A3	23	R	TTGGGCAGATCTTATGGCAC
COL6A3	24	F	CTGAAAGAGCTCTAGGCCCC
COL6A3	24	R	TTTTCACTCCTGGGCTGG
COL6A3	25	F	GAGCTGACATTGACAGGAACC
COL6A3	25	R	CCGATATAAATGCCACCC
COL6A3	26	F	GCTTCTCATGGAAAGTCACC
COL6A3	26	R	GAAACTCTCTCAGCCTGCTTG
COL6A3	27	F	AGAGACCAATTTGCCTGGAC
COL6A3	27	R	CTGACCAAAGAGGGAGAGGG
COL6A3	28	F	ATCACACTGTAAGCCAGCCC
COL6A3	28	R	GCACCTTCCAGCAAAGAGTC
COL6A3	29_30	F	GGCAGAGACGGTGGTTATG
COL6A3	29_30	R	GGACATACCAGAGCCATCCC
COL6A3	31	F	TCCTGGATGTCTTACCCAC
COL6A3	31	R	AATTGTCAAAGCCTCAGCAG
COL6A3	32	F	TCCA ACTATAGGAGCCTTAAATTC
COL6A3	32	R	AGGGACCACGTGTAAAGCAC
COL6A3	33 + 34 + 35	F	GGGCCAAAGCCTGTTTATTC
COL6A3	33 + 34 + 35	R	CTGTACTTACTACAAAAGGGAGGC
COL6A3	36	F	TTCTCCTAAGGAAAGGAAGCC

COL6A3	36	R	AACCTTCTCAGAGCCCCAG
COL6A3	37	F	TGTAGCTTTGATTTACTCCTCTGC
COL6A3	37	R	TCCCATGGATATTATGTTTTGC
COL6A3	38_1	F	AGCTGTGTATCCTGCTGTGG
COL6A3	38_1	R	CTTCAAAGACATTCTCTATGGTG
COL6A3	38_2	F	CCCTGACTGACTATGGCTCC
COL6A3	38_2	R	CCTACACTTCTCCTGGCCC
COL6A3	39	F	TGTGATTCATTTAACTTGTTGACAG
COL6A3	39	R	CCATAAAGTCAGGAGGTGG
COL6A3	40	F	TGTAGCTCATGGGGTTATGTC
COL6A3	40	R	ACCCTGGAGCAGGAAATGAG
COL6A3	41	F	CCTCTCTCGCTCATGCACTAC
COL6A3	41	R	TCCTTTGTGTCCTATTTGATACTCTAC
COL6A3	42	F	CTAAGGATTCCCAAGCCCTC
COL6A3	42	R	TTGGAATCAAGATGGGTATTTTC
COL6A3	43	F	CACTGGGAGCCGAGTAACAC
COL6A3	43	R	CAAGGTGACTTATTGACCTGAATC
COL6A3	44	F	CTTTTGGGTCAGTAATGTGGC
COL6A3	44	R	GTTGGCGATGGCTGACTC
ANO3	1	F	CTACTGTTCTCCGCCTCC
ANO3	1	R	TCCTACACAACCTGCAAGGGC
ANO3	2	F	CATTCCTGAAACAGGTATCACAAAG
ANO3	2	R	GGAAGGAAAGGAGTGTTTGG
ANO3	3	F	TCATGTTTGGCCATCATTG
ANO3	3	R	GAACACAGCTTACCTTTGGAGAG
ANO3	4	F	AATAGGCAGGCTTTACATTAC
ANO3	4	R	TTTTATATTCTCCAGCAGAAAACC
ANO3	5	F	AACATCACTCGCTAATGTGGC
ANO3	5	R	AAATAGTCATGCCCTTTGAAAATAC
ANO3	6	F	ATTCCCAAATCAAACCTGTGG
ANO3	6	R	AGAAGGGGTTGCATTTGTTG
ANO3	7	F	AATGTTGTCACTCACTCGTATCAC
ANO3	7	R	GATTTACAACCTGCTGATATGGGG
ANO3	8	F	CAATGCACGTGTATGTGTGG
ANO3	8	R	AACAATGGAAATGGTCCCAG
ANO3	9	F	TTGCTGGATTCTGTGTTCTG
ANO3	9	R	GGAATGCTTATAGAGTGTGTGTTT
ANO3	10	F	CCCCGTATATTTCTGTTGCTTC
ANO3	10	R	CAAGCATTGAGCATGAAAACC
ANO3	11	F	AAGTTGTTAAATTATTCTGCAAGGG
ANO3	11	R	TGTAGACTGCATCCTCACTGG
ANO3	12	F	AGCTGAGGAGGAACTGAGTG
ANO3	12	R	AACTTTTGCCATTTCAGAAGAC
ANO3	13	F	TTTGCTGTAGGGGCTAAGTG
ANO3	13	R	TTCTTACAGCCTGCTTCTCAG
ANO3	14	F	TGCAAACAGTATTCACTGGC
ANO3	14	R	GCAAACAAATCAAGTACCAACC

ANO3	15	F	CACCCCTCTAGCAGTGTATGC
ANO3	15	R	GTGGTTAACTGCTTCCAGCC
ANO3	16	F	AGGCCAAATTTAGGAGTATCG
ANO3	16	R	CAACGTCACAAAATGAGTTGG
ANO3	17	F	ACGGTTTTGCTTTTGA CTTG
ANO3	17	R	TAGACCTCTCCCCTTTCCAC
ANO3	18	F	AAATAGTGTAAATACCAGCCTTTTCC
ANO3	18	R	CAACTTCCTATACTACCCCTCTCC
ANO3	19	F	GTTTCTGCCTCCATGTCCAG
ANO3	19	R	GCTGGTGGCTGTCAGAAATC
ANO3	20	F	TCTACCCACACATGCACTCG
ANO3	20	R	CGCAGTAACTGGCCCATATC
ANO3	21	F	TAATGGTGGGCATGTCTGAG
ANO3	21	R	TCACGCCACCTCTAGCTTTC
ANO3	22	F	CCGAGGAGCTGGAATTGG
ANO3	22	R	TTTTCTCTGTTGAACCAAAGC
ANO3	23	F	TGTCCTAACTGTAAAATGAGATAAAGC
ANO3	23	R	CACACTCAAACCATAGCAACC
ANO3	24	F	TTTCCAAAATAAGATTAATTACAGGG
ANO3	24	R	CACCACCCTTAATGGTCACAG
ANO3	25 + 26	F	TGGAATAAAAGAGCTTG GTTG
ANO3	25 + 26	R	GAGGAACTGATTTCAAAGAGGC
ANO3	27	F	TGATTCAAGGCAAATGCAAC
ANO3	27	R	TTGCCAAGTATGCCTTCCTC
ADCY5	2	F	CTGAGGGCTTCATGCTTTG
ADCY5	2	R	GAGGTACATCTCAGGGCTCG
ADCY5	3	F	GTGTGGAGGAGCGAGCAC
ADCY5	3	R	AAGTGGGATGTCTCCACAGG
ADCY5	4	F	TGTAATGTATGAATTTGGGAGACAC
ADCY5	4	R	ACAGCAGCCTCCCTCAACAG
ADCY5	5	F	TTTCCCTCCCCTTCTCTTTT
ADCY5	5	R	AGCCGGCAGGTCAGTCAG
ADCY5	6	F	CCCATTCTGTGTGCCTGG
ADCY5	6	R	GCCTCTGCAGGATGGTCAC
ADCY5	7	F	GGGGCTGACATTATGACTTTG
ADCY5	7	R	CACGAAAATGTTCTCCCTG
ADCY5	8	F	AGGTACGATGTTTGGGGAAG
ADCY5	8	R	AGAAGGCCCTAGCCTTGGAG
ADCY5	9	F	CGCCTCTGAGCTTTCAGTTC
ADCY5	9	R	AAGTGATAAGGTGGATTGGGAG
ADCY5	10	F	GGAAGAGCCAGCCCTCTG
ADCY5	10	R	CTCCTCCTGGTCCTGGTTC
ADCY5	11	F	GTGTGTGGGATTGACAGGG
ADCY5	11	R	CTCCCACTCCTGGGATTC
ADCY5	17	F	CAGAGCCCGCTGTGAGG
ADCY5	17	R	GCAGACGAGCCTGTTGTCTC
ADCY5	18	F	ACGGAGAGGAGGAGGTGG

<i>ADCY5</i>	18	R	CATACCAGGGACTTGTAGGC
<i>ADCY5</i>	19	F	TTCCCTGGACATCCTCTGTC
<i>ADCY5</i>	19	R	CAGCCCTCTGCCTGACTG
<i>ADCY5</i>	20	F	ATGTGGGGAGACAGATGGTG
<i>ADCY5</i>	20	R	TGTCAGACACAGGACCTCCC
<i>ADCY5</i>	21	F	GCTCTACCCACAGCAGTTC
<i>ADCY5</i>	21	R	CTGCTCCATGCCTCTGG

F: *forward*; R: *reverse*. Große Exone (z. B. Exon 1 von *THAP1*) wurden für die optimale Analyse der Basensequenz aufgeteilt und die Primerpaare des ersten Abschnittes mit *_1* und des zweiten Abschnittes mit *_2* gekennzeichnet. Mehrere kleine Exone (z. B. Exon 1 und Exon 2 von *GNAL*) konnten mit einem Primerpaar erfasst werden.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ermöglicht die selektive Anreicherung einer definierten Nukleotidsequenz *in vitro* (Mullis et al., 1986). Das Prinzip beruht auf der mehrfachen Wiederholung von drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten: der thermischen Trennung eines doppelsträngigen DNA-Fragments (Denaturierung), der Anlagerung von komplementären Oligonukleotiden (*Annealing*) und der semikonservativen Replikation der beiden Einzelstränge durch eine DNA-Polymerase (Elongation) (Mullis et al., 1986). Die Selektion der zu amplifizierenden Nukleotidsequenzen erfolgt durch die Basensequenz der Primer. Sie rahmen die Zielsequenz auf beiden Seiten ein und hybridisieren mit jeweils einem der beiden Einzelstränge. Die 3'-OH-Gruppe des letzten Nukleotids der Primer befindet sich vor der Zielsequenz und dient als Startpunkt der neu zu synthetisierenden DNA. Am Ende jedes Zyklus liegen doppelsträngige DNA-Fragmente vor, die im darauffolgenden Zyklus erneut zu Einzelsträngen denaturiert und semikonservativ repliziert werden. Dadurch verdoppelt sich die Anzahl der Zielsequenzen mit jedem Reaktionszyklus (Mullis et al., 1986). Für die DNA-Synthese wird die thermostabile *taq*-DNA-Polymerase verwendet. Sie wird aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen und zeigt bei hohen Temperaturen keinen Verlust ihrer enzymatischen Funktion (Saiki et al., 1988). Die in dieser Arbeit für die PCR verwendeten Reagenzien und Geräte sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Reagenzien und Geräte der PCR

Funktion	Produkt
Polymerase	HotStarTaq® DNA Polymerase, Quiagen
Puffer	HotStarTaq® 10X PCR Buffer, Quiagen
Q-Solution	Q-Solution®, Quiagen
Nukleotide	dNTP Set von Fermentas, Waltham, USA
PCR-Cycler	Biorad-S1000-Thermal-Cycler von Bio-Rad, Hercules, USA

Tab. 3: Standardansatz PCR ohne Zusätze

Inhalt	Konzentration	Einzelansatz in μ l
10X PCR-Puffer		2,0
dNTP-Mix	je dNTP 2 mM	2,0
<i>Forward</i> -Primer	10 pmol/ μ l	1,0
<i>Reverse</i> -Primer	10 pmol/ μ l	1,0
H ₂ O		12,9
DNA	10 ng/ μ l	1,0
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	0,1
Gesamtvolumen		20,0

Tab. 4: Standardansatz PCR mit Q-Solution

Inhalt	Konzentration	Einzelansatz in μl
10X PCR-Puffer		2,0
dNTP-Mix	je dNTP 2 mM	2,0
<i>Forward</i> -Primer	10 pmol/ μl	1,0
<i>Reverse</i> -Primer	10 pmol/ μl	1,0
5 x Q-Solution		4,0
H ₂ O		8,9
DNA	10 ng/ μl	1,0
Taq-Polymerase	5 U/ μl	0,1
Gesamtvolumen		20,0

Tab. 5: Standardansatz PCR mit Magnesiumchlorid

Inhalt	Konzentration	Einzelansatz in μl
10X PCR-Puffer		2,0
dNTP-Mix	je dNTP 2 mM	2,0
<i>Forward</i> -Primer	10 pmol/ μl	1,0
<i>Reverse</i> -Primer	10 pmol/ μl	1,0
MgCl ₂	25 mM	0,8
H ₂ O		12,1
DNA	10 ng/ μl	1,0
Taq-Polymerase	5 U/ μl	0,1
Gesamtvolumen		20,0

Tab. 6: Protokoll PCR

Temperatur in °Celsius	Zeit	Zyklen
95	15 min	
95	30 s	34 Zyklen
*50–60	30 s	
72	60 s	
72	10 min	
20	30 s	

*Temperatur zwischen 50° und 60° Celsius kann entsprechend der optimalen Reaktionsbedingungen der Primer gewählt werden.

Tab. 7: Protokoll Touchdown-PCR

Temperatur in °Celsius	Zeit	Zyklen
95	10 min	
95	30 s	25 Zyklen
70 (-0,5 pro Zyklus)	30 s	
72	30 s	
95	30 s	25 Zyklen
54	30 s	
72	30 s	
72	10 min	
94	30 s	
25	30 s	

2.3.4 Sanger-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) beruht auf dem Prinzip der PCR: Analog der Reaktionsabfolge der PCR (Kapitel 2.3.3) wird ein doppelsträngiges DNA-Fragment zunächst thermisch zu Einzelsträngen denaturiert, ein komplementärer Primer hybridisiert und anschließend unter Verwendung freier 2'-Desoxynukleosidtriphos-

phaten (dNTP) der einzelsträngige Matrizenstrang durch eine DNA-Polymerase semi-konservativ repliziert. Der essenzielle Unterschied besteht in der zusätzlichen Verwendung von 2'-3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP). Wird ein ddNTP anstelle eines dNTP in die neu synthetisierte DNA eingebaut, fehlt die für die Elongation notwendige Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom der Ribose, was zu einem Abbruch der Synthese führt (Sanger et al., 1977). Da weniger ddNTP als dNTP im Reaktionsgemisch vorhanden sind und der Einbau an einer zufälligen Stelle geschieht, entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die jeweils mit einem ddNTP enden (Sanger et al., 1977). Werden diese anschließend ihrer Länge nach aufgetrennt, kann anhand des letzten Nukleotids an der 3'-OH-Gruppe die Sequenz des Matrizenstrangs bestimmt werden (Sanger et al., 1977). Dazu werden die verwendeten ddNTP – die für diesen Zweck zusätzlich mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (entsprechend der jeweiligen Base des Nukleotids) markiert sind – durch einen Laser angeregt und das emittierte Signal detektiert (Strachan & Read, 2011). Der Standardansatz und das Protokoll der Sequenzierreaktion sind in den Tab. 8 und 9 aufgeführt. Als Reagenzien wurden Puffer und Reaktionsansatz des BigDye™-Terminator-v3.1-Kits (Applied Biosystems), die Primer aus Tab. 1 und die aufgereinigten PCR-Produkte verwendet. Im Gegensatz zu den PCR-Standardansätzen (Tab. 3–5) wurden nur entweder der *Forward*- oder der *Reverse*-Primer dem Ansatz zugefügt. Die maschinelle Analyse der Sequenzen der Produkte der Sequenzierreaktion erfolgte durch den AB/Hitachi 3730 DNA Analyzer.

Tab. 8: Standardansatz Sequenzierreaktion

Inhalt	Konzentration	Einzelansatz in μl
5 x BigDye™-Puffer		1,5
Primer (F oder R)	10 pmol/ μl	1,0
BigDye™-Terminator		0,5
H ₂ O		1,0
PCR-Produkt (gereinigt)		1,0
Gesamtvolumen		5,0

Tab. 9: Protokoll Sequenzierreaktion

Temperatur in °Celsius	Zeit	Zyklen
96	1 min	
96	10 s	35 Zyklen
50	5 s	
60	4 min	
4	5 min	

2.3.4.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte müssen vor der Sequenzierreaktion von überständigen Nukleotiden, Primern und Puffersubstanzen der PCR-Reaktion getrennt werden. Dafür wird die gesamte Menge des Produkts in die Wells einer NucleoFast-Platte (NucleoFast® 96 PCR Plates; MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) pipettiert, deren Boden aus einer speziellen Membran besteht. Über ein Vakuumsystem wird ein Sog erzeugt, der überschüssige Flüssigkeit durch die Membran in eine Auffangschale zieht. Anschließend werden je 40 µl H₂O in die trockenen Wells pipettiert und die PCR-Produkte durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mechanisch von der Membran gelöst.

2.3.4.2 Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion

Nach Ablauf der Sequenzierreaktion wurden die Produkte vor der maschinellen Auslesung durch die Sephadex™-Säulenfiltration aufgereinigt. Dazu wurde 2,8 g Sephadex™ (Sephadex™ G-50 DNA Grade Fine, Sigma-Aldrich) in 40 ml H₂O gelöst und circa 30 Minuten quellen gelassen. Anschließend wurden 400 µl der Sephadex™-Lösung in jedes Well einer leeren Centri-Sep™-Platte (Centri-Sep™ 96 kit, Princeton Separations) pipettiert und überschüssige Flüssigkeit drei Minuten bei 750 g in eine Auffangschale abzentrifugiert. Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden mit 20 µl H₂O gemischt, auf die trockenen Sephadex™-Säulen pipettiert und die Platte erneut drei Minuten bei 750 g zentrifugiert. In diesem Schritt wurde eine leere Platte unter die Centri-Sep™-Platte gestellt, die die aufgereinigten Produkte auffing.

2.3.5 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRMA)

Die beiden komplementären Stränge eines doppelsträngigen DNA-Fragments werden über Wasserstoffbrückenbindungen nicht kovalent miteinander verbunden – die gegenüberliegenden Basen Adenin und Thymin über zwei, Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken. Daraus folgt, dass mehr thermische Energie zur Trennung eines Doppelstrangs aufgewendet werden muss, je höher der Guanin- und Cytosin-Gehalt der Sequenz ist. Das Prinzip der hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (HRMA, *high resolution melting curve analysis*) beruht auf den charakteristischen physikochemischen Schmelzeigenschaften unterschiedlicher Nukleotidsequenzen (Wittwer et al., 2003). Um die Eigenschaften zu bestimmen, wird den PCR-Amplikons ein Farbstoff zugegeben, der nur während der Bindung an doppelsträngige DNA fluoresziert (Wittwer et al., 2003). Werden die doppelsträngigen Fragmente anschließend graduell erhitzt und zu Einzelsträngen denaturiert, nimmt die Fluoreszenz entsprechend der Schmelzeigenschaften des Fragments ab (Wittwer et al., 2003). Die Änderung der Fluoreszenz wird durch den Idaho Technology LightScanner® HR/384 detektiert und in Abhängigkeit vom Temperaturanstieg als Kurve grafisch dargestellt (Software Call-IT® von LightScanner®).

Für die HRMA wurden 384-Well-Platten verwendet, in denen 376 DNA-Proben von 188 unterschiedlichen Probanden (zwei Wells je Probanden) gleichzeitig analysiert wurden. Als Negativkontrolle befand sich in insgesamt acht Wells der Standardansatz ohne DNA. Die Differenzierung von abweichenden Schmelzkurven erfolgte anschließend manuell durch Abgleich der einzelnen Kurven einer Platte miteinander. In Abb. 6 und Abb. 7 sind exemplarisch die Schmelzkurven (dargestellt mit der Software Call-IT® von LightScanner®) von zwei 384-Well-Platten mit unterschiedlichen Sequenzen abgebildet, in denen seltene Varianten identifiziert werden konnten. Die Reagenzien des Standardansatzes der HRMA-PCR sind in Tab. 10 aufgelistet. Als Farbstoff wurde LCGreen® Plus Dye (Idaho Technology Inc.) verwendet. Da in einem vorausgehenden Arbeitsschritt bereits jeweils 1 µl DNA in insgesamt 376 Wells der Platten maschinell pipettiert wurde, enthält der Standardansatz der HRMA-PCR keine DNA.

Tab. 10: Standardansatz HRMA-PCR

Inhalt	Konzentration	Einzelansatz in μl
10 x Puffer		0,5
dNTP-Mix	je dNTP 2 mM	0,5
<i>Forward</i> -Primer	10 pmol/ μl	0,1
<i>Reverse</i> -Primer	10 pmol/ μl	0,1
LCGreen [®] Dye		0,25
H ₂ O		3,0
Taq-Polymerase	5 U/ μl	0,05
Gesamtvolumen		4,5

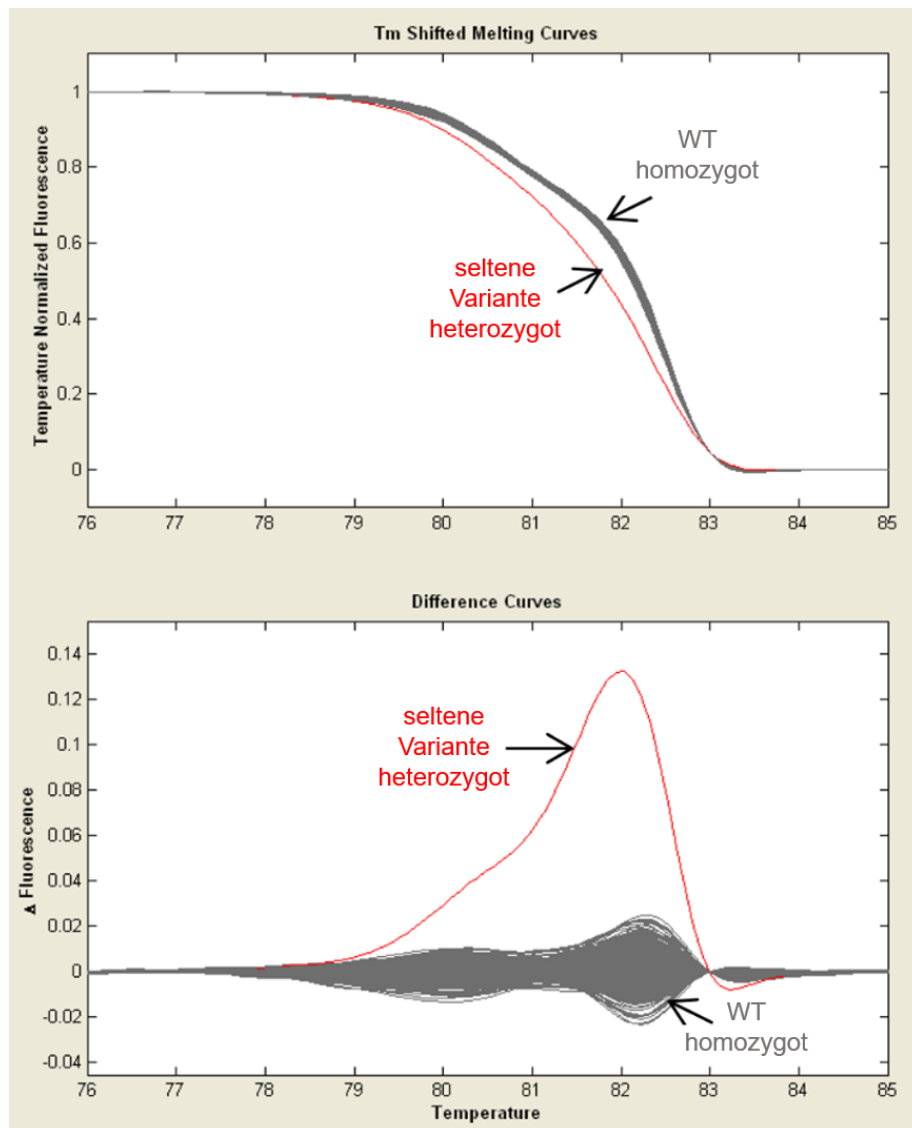


Abb. 6: HRMA Beispiel 1

Schmelzkurven der DNA-Segmente einer 384-Well-Platte, dargestellt mit der Software Call-IT® von LightScanner®. Grau: Schmelzkurven des homozygoten Wildtyps (WT); rot: Schmelzkurven einer seltenen heterozygoten Variante.

Oben: Fluoreszenz (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Temperatur (X-Achse).

Unten: Differenz der Fluoreszenz (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Temperatur (X-Achse). Als Referenz wurde eine zufällige Schmelzkurve des homozygoten WT bestimmt. Die Unterschiede der Schmelzkurven sind mit Hilfe dieser Darstellung visuell gut zu differenzieren.

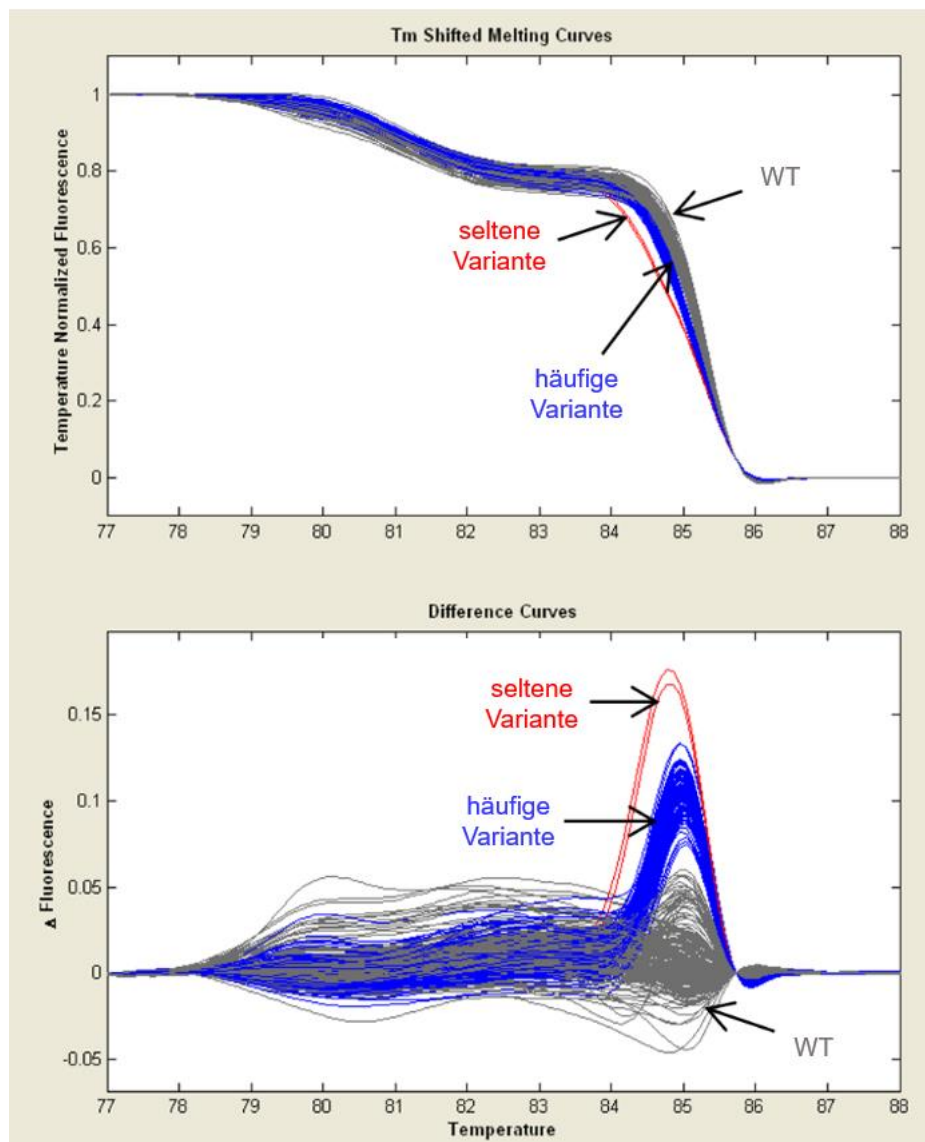


Abb. 7: HRMA Beispiel 2

Schmelzkurven der DNA-Segmente einer 384-Well-Platte, dargestellt mit der Software Call-IT® von LightScanner®. Grau: Schmelzkurven des Wildtyps (WT); blau: Schmelzkurven einer häufigen Variante; rot: Schmelzkurven einer seltenen Variante.

Oben: Fluoreszenz (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Temperatur (X-Achse).

Unten: Differenz der Fluoreszenz (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Temperatur (X-Achse). Als Referenz wurde eine zufällige Schmelzkurve des homozygoten WT bestimmt. Unterschiede der Schmelzkurven sind mit Hilfe dieser Darstellung visuell gut zu differenzieren.

2.3.6 Analyse der Haplotypen

Die Genotypisierung erfolgte mit Hilfe des Arrays *HumanOmni2.5 BeadChip* (Illumina) und die Analyse der Haplotypen mit der Software *SHAPEIT* (Version v2.r790) (Delaneau et al., 2013).

2.3.7 Exom-Sequenzierung (WES)

Die einzelnen Schritte der Exom-Sequenzierung (WES) erfolgten gemäß standardisierter Protokolle am Institut für Humangenetik und Institut für Neurogenomik, Helmholtz Zentrum München. Die Durchführung der Laborarbeiten im Rahmen der WES erfolgte durch Mitarbeiter der Institute. Zusammengefasst wurde die aufgereinigte genomische DNA zunächst an zufälligen Stellen in etwa 150 bis 250 Basenpaare lange Abschnitte fragmentiert. Spezifische Markeroligonukleotide erkennen und hybridisieren anschließend in einem als *Capturing* bezeichneten Schritt mit Exon-tragenden Fragmenten (Bamshad et al., 2011). Durch die Entfernung nicht-hybridisierter Fragmente wurde anschließend eine Anreicherung von Exonen erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde für diesen Zweck das SureSelect Human All Exon 50 Mb Kit (Agilent Technologies) verwendet. Anschließend wurden die Fragmente mit dem HiSeq 2500 von Illumina sequenziert. Im folgenden Abschnitt werden die grundsätzlichen Schritte der WES mit der Illumina Sequenzierplattform kurz beschrieben (zusammengefasst nach Mardis, 2008). Zuerst werden an beide Enden der Fragmente je zwei unterschiedliche Adaptoroligonukleotide gebunden. Sie vermitteln die Bindung der Fragmente an eine zufällige Stelle in einer festen Matrix (*Flow-cell*), die mit komplementären Adaptoroligonukleotiden bestückt ist. In einem als *Bridge Amplification* genannten Syntheseschritt hybridisieren die Fragmente mit ihrem freien Ende an nahe gelegene freie Adaptoren der *Flow-cell* und werden durch eine Polymerase semikonservativ repliziert. Anschließend werden die doppelsträngigen Fragmente wieder getrennt und der beschriebene Amplifikationszyklus mehrfach wiederholt. Nach abgeschlossener Anreicherung befinden sich in der *Flow-cell* durch dieses Prinzip räumliche Cluster von Fragmenten mit identischer Basensequenz. Die Sequenzierung der unterschiedlichen Cluster erfolgt parallel in mehreren Zyklen: Nach der Hybridisierung von Start-Primern an die einzelsträngigen Fragmente wird der komplementäre Strang schrittweise um jeweils ein Nukleotid verlängert. Die fluoreszenzmarkierten Nukleotide sind für diesen

Zweck an ihren freien 3'-OH-Enden chemisch geblockt. Nach dem Einbau eines Nucleotids wird zunächst die Fluoreszenz des gesamten Clusters registriert, bevor das 3'-OH-Ende entblockt und der Fluoreszenzfarbstoff entfernt wird. Die Sequenzierung der Basensequenz erfolgt somit für alle Cluster parallel durch schrittweise Synthese der komplementären Stränge (Mardis, 2008).

2.3.8 Bioinformatische Analyse

Die bioinformatische Verarbeitung und Analyse der generierten Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung einer laborintern entwickelten bioinformatischen Pipeline durch Bioinformatiker am Institut für Humangenetik, Helmholtz Zentrum München und am Institut für Humangenetik, Klinikum rechts der Isar. Zusammengefasst wurden die Sequenzen der einzelnen Cluster (*Reads*) mit einer Referenzsequenz verglichen und die jeweiligen Positionen innerhalb des Genoms ermittelt (*Read Alignment*). Da die sequenzierte DNA an zufälligen Stellen zerschnitten wurde, wird eine bestimmte genomische Position in unterschiedlichen *Reads* abgebildet. Wie oft eine bestimmte Zielregion insgesamt erfasst wurde, beschreibt die *Coverage*. Der Abgleich der sequenzierten DNA mit einer Referenzsequenz erlaubte die Identifikation von Varianten (*Variant Calling*). Im Rahmen dieser Arbeit wurde für das Alignment der *Reads* gegen das Referenzgenom GRCh37 die Software Burrows-Wheeler Aligner verwendet. *Variant Calling* erfolgte mit Hilfe von SAMtools und die Annotation der Varianten durch Perl-Skripte.

2.3.9 Variantenfilterung

Durchschnittlich wurden durch die WES 24.000 Varianten pro Patientenprobe identifiziert. Das Ziel der Variantenfilterung ist grundsätzlich, die Menge der Varianten auf eine manuell auswertbare Anzahl zu reduzieren, ohne eine Überfilterung und Fehlklassifikation der pathogenen Varianten zu riskieren (Rehm et al., 2013). Für die Priorisierung pathogener Varianten wurde in der vorliegenden Arbeit die im nachfolgenden Abschnitt beschriebene und in Abb. 8 schematisch dargestellte Variantenfilterung nach Zech et al. (2017) angewendet:

Anhand eines Katalogs an Kandidatengenen wurden die identifizierten Varianten zunächst auf Varianten in 225 Dystonie-assoziierten Genen reduziert (Tab. 11). Die Auswahl dieser 225 Gene erfolgte durch eine Volltextsuche aller Einträge in der OMIM® (*Online Mendelian Inheritance in Man*®)-Datenbank (<https://omim.org>) mit dem Suchbegriff „*dystonia*“ (Stand 07/2016). Ziel dieser Strategie war es, möglichst alle Gene zu erfassen, in deren klinischer Manifestation dystone Symptome beschrieben sind (Zech et al., 2017). Im ersten Schritt des dreistufigen Filterungsprozesses wurden die Varianten der 225 Gene nach der Frequenz gefiltert und seltene Varianten selektiert: Alle Varianten mit einer MAF (Frequenz des selteneren Allels, *minor allele frequency*) $> 0,005$ in der hausinternen Exom-Datenbank (bestehend aus den Daten der WES von insgesamt 5.700 nicht neurologischen Kontrollprobanden) oder der ExAC (*Exome Aggregation Consortium*)-Datenbank (<http://exac.broadinstitute.org>) (Lek et al., 2016) wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da sie in der Population zu häufig auftraten. Anschließend wurden im zweiten Schritt nur Varianten ausgewählt, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des kodierten Proteins führen konnten: Missense-, Nonsense-, Stop-loss- und Splice-site-Varianten sowie kleine (< 50 Basenpaare lange) Insertionen und Deletionen (*Indels*). Der letzte Schritt berücksichtigte für die Selektion zwei Gruppen von Varianten: (1) bekannte pathogene Varianten oder (2) neue Varianten mit prädikierter schädigender Auswirkung. Um Varianten zu identifizieren, die zur ersten Gruppe zählten, erfolgte eine umfassende Recherche in den Datenbanken NCBI PubMed® (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), HGMD® (<http://www.hgmd.org>) (Stenson et al., 2017) und NCBI ClinVar® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>). Zur zweiten Gruppe zählten neue Varianten, die entweder zu einem *Loss-of-function* (LoF) des kodierten Protein führen konnten (Nonsense-, Frameshift-, Splice-site- oder Stop-loss-Varianten), oder Missense-Varianten, die entsprechend der Prädiktion von mindestens zwei von drei In-silico-Prädiktionsprogrammen (SIFT, Polyphen2, CADD) mit hoher Wahrscheinlichkeit einen schädigenden Effekt verursachten. Nach dem Filterungsprozess wurde der Erbgang der identifizierten Varianten betrachtet. Dabei wurden heterozygote Varianten in rezessiven Krankheitsgenen nicht weiter berücksichtigt, vorausgesetzt es lagen keine weiteren seltenen nicht-synonymen Varianten in diesen Genen vor. Die gefilterten Varianten stellten potenziell krankheitsverursachende Varianten dar. Sie wurden ausführlicher charakterisiert und Segregationsanalysen bei Familienangehörigen durchgeführt. Des

Weiteren wurde anhand des Klassifizierungssystems des *American College of Medical Genetics* (ACMG) die klinische Signifikanz der Varianten bestimmt (Richards et al., 2015).

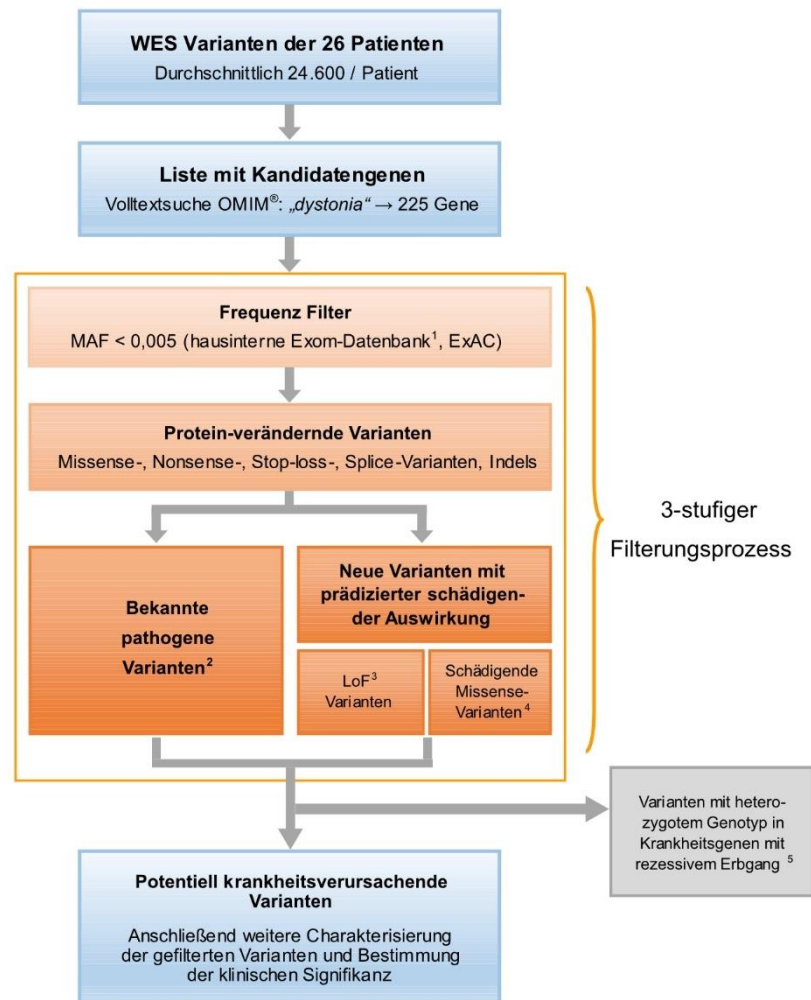


Abb. 8: Variantenfilterung

WES: Exom-Sequenzierung; OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*®; MAF: *minor allele frequency* (Frequenz des selteneren Allels); ExAC: *Exome Aggregation Consortium*-Datenbank (Lek et al., 2016); LoF: *loss-of-function*.

¹Bestehend aus den Daten der WES von 5.700 nicht neurologischen Kontrollprobanden.

²Systematische Recherche in den Datenbanken NCBI PubMed®, HGMD® und NCBI ClinVar®.

³Nonsense-, Frameshift-, Splice- oder Stop-loss-Varianten.

⁴Schädigender Effekt entsprechend der Prädiktion von ≥ 2 In-silico-Prädiktionsprogrammen (SIFT, Polyphen2, CADD).

⁵Bei fehlendem Nachweis einer weiteren seltenen nicht-synonymen Variante im selben Gen.

Abbildung modifiziert nach Zech et al. (2017).

Tab. 11: In der Variantenfilterung verwendete Liste mit 225 Dystonie-assoziierten Genen

Erstellt durch Volltextsuche in der OMIM®-Datenbank (<https://omim.org>) unter Verwendung des Suchbegriffs „*dystonia*“ (Stand 07/2016).

Gen	OMIM®-Nummer	Gen	OMIM®-Nummer
<i>AARS</i>	601065	<i>AARS2</i>	612035
<i>ACOX1</i>	609751	<i>ACSF3</i>	614245
<i>ACTB</i>	102630	<i>ADAR</i>	146920
<i>ADCY5</i>	600293	<i>ADH1C</i>	103730
<i>AFG3L2</i>	604581	<i>AIMP1</i>	603605
<i>ALDH18A1</i>	138250	<i>ALDH5A1</i>	610045
<i>ALDH6A1</i>	603178	<i>ALS2</i>	606352
<i>AMPD2</i>	102771	<i>ANO3</i>	610110
<i>AP4B1</i>	607245	<i>APTX</i>	606350
<i>ARSA</i>	607574	<i>ARX</i>	300382
<i>ATCAY</i>	608179	<i>ATM</i>	607585
<i>ATP13A2</i>	610513	<i>ATP1A2</i>	182340
<i>ATP1A3</i>	182350	<i>ATP6V0A2</i>	611716
<i>ATP7B</i>	606882	<i>ATXN1</i>	601556
<i>ATXN2</i>	601517	<i>ATXN3</i>	607047
<i>ATXN8OS</i>	603680	<i>AUH</i>	600529
<i>B4GALNT1</i>	601873	<i>BCAP31</i>	300398
<i>BCS1L</i>	603647	<i>BSCL2</i>	606158
<i>C19orf12</i>	614297	<i>C9orf72</i>	614260
<i>CA8</i>	114815	<i>CACNA1A</i>	601011
<i>CACNA1B</i>	601012	<i>CHMP2B</i>	609512
<i>CHRNA4</i>	118504	<i>CIZ1</i>	611420
<i>CLN3</i>	607042	<i>CLN6</i>	606725
<i>CLPB</i>	616254	<i>CNBP</i>	116955
<i>COASY</i>	609855	<i>COL4A1</i>	120130
<i>COL6A3</i>	120250	<i>COQ9</i>	612837
<i>COX10</i>	602125	<i>COX15</i>	603646
<i>CP</i>	117700	<i>CTC1</i>	613129

<i>DCAF17</i>	612515	<i>DDC</i>	107930
<i>DLAT</i>	608770	<i>DLD</i>	238331
<i>DMPK</i>	605377	<i>DMXL2</i>	612186
<i>DNAJC6</i>	608375	<i>DRD3</i>	126451
<i>DRD5</i>	126453	<i>EARS2</i>	612799
<i>ECHS1</i>	602292	<i>EXOSC3</i>	606489
<i>FA2H</i>	611026	<i>FBXL4</i>	605654
<i>FBXO7</i>	605648	<i>FKBP5</i>	602623
<i>FOXG1</i>	164874	<i>FOXRED1</i>	613622
<i>FTL</i>	134790	<i>FUCA1</i>	612280
<i>GBA</i>	606463	<i>GCDH</i>	608801
<i>GCH1</i>	600225	<i>GJC2</i>	608803
<i>GLB1</i>	611458	<i>GNAL</i>	139312
<i>GNAO1</i>	139311	<i>GOSR2</i>	604027
<i>GRIK2</i>	138244	<i>H19</i>	103280
<i>HDC</i>	142704	<i>HEXA</i>	606869
<i>HIBCH</i>	610690	<i>HPCA</i>	142622
<i>HPRT1</i>	308000	<i>HSD17B10</i>	300256
<i>HTR2A</i>	182135	<i>HTT</i>	613004
<i>IFIH1</i>	606951	<i>JPH3</i>	605268
<i>KCNQ2</i>	602235	<i>KCTD17</i>	616386
<i>KIF1C</i>	603060	<i>L2HGDH</i>	609584
<i>LIPT1</i>	610284	<i>MAPT</i>	157140
<i>MARS2</i>	609728	<i>MAT1A</i>	610550
<i>MCCC1</i>	609010	<i>MCEE</i>	608419
<i>MCOLN1</i>	605248	<i>MECP2</i>	300005
<i>MMADHC</i>	611935	<i>MPV17</i>	137960
<i>MR1</i>	609023	<i>MRE11A</i>	600814
<i>MTO1</i>	614667	<i>MUT</i>	609058
<i>NDUFA1</i>	300078	<i>NDUFA10</i>	603835
<i>NDUFA11</i>	612638	<i>NDUFA12</i>	614530
<i>NDUFA2</i>	602137	<i>NDUFA9</i>	603834
<i>NDUFAF1</i>	606934	<i>NDUFAF2</i>	609653
<i>NDUFAF3</i>	612911	<i>NDUFAF4</i>	611776

<i>NDUFAF5</i>	612360	<i>NDUFAF6</i>	612392
<i>NDUFB3</i>	603839	<i>NDUFB9</i>	601445
<i>NDUFS1</i>	157655	<i>NDUFS2</i>	602985
<i>NDUFS3</i>	603846	<i>NDUFS4</i>	602694
<i>NDUFS6</i>	603848	<i>NDUFS7</i>	601825
<i>NDUFS8</i>	602141	<i>NDUFV1</i>	161015
<i>NDUFV2</i>	600532	<i>NKX2-1</i>	600635
<i>NPC1</i>	607623	<i>NPC2</i>	601015
<i>NUBPL</i>	613621	<i>NUP62</i>	605815
<i>PANK2</i>	606157	<i>PARK2</i>	602544
<i>PCCA</i>	232000	<i>PCCB</i>	232050
<i>PCDH19</i>	300460	<i>PDC</i>	609023
<i>PDGFB</i>	190040	<i>PDHA1</i>	300502
<i>PINK1</i>	608309	<i>PLA2G6</i>	603604
<i>PLP1</i>	300401	<i>PNKD</i>	609023
<i>PNKP</i>	605610	<i>PNPLA8</i>	612123
<i>PNPT1</i>	610316	<i>POLR3A</i>	614258
<i>POLR3B</i>	614366	<i>PPP2R2B</i>	604325
<i>PRKCG</i>	176980	<i>PRKRA</i>	603424
<i>PRRT2</i>	614386	<i>PSEN1</i>	104311
<i>PTS</i>	612719	<i>QDPR</i>	612676
<i>RNASEH2B</i>	610326	<i>RNASEH2C</i>	610330
<i>RNASET2</i>	612944	<i>SCP2</i>	184755
<i>SDHA</i>	600857	<i>SDHAF1</i>	612848
<i>SDHD</i>	602690	<i>SEPSECS</i>	613009
<i>SERAC1</i>	614725	<i>SETX</i>	608465
<i>SGCE</i>	604149	<i>SLA</i>	613009
<i>SLC13A5</i>	608305	<i>SLC16A2</i>	300095
<i>SLC19A3</i>	606152	<i>SLC20A2</i>	158378
<i>SLC2A1</i>	138140	<i>SLC30A10</i>	611146
<i>SLC6A3</i>	126455	<i>SLC6A8</i>	300036
<i>SLITRK1</i>	609678	<i>SNCA</i>	163890
<i>SPECC1L</i>	614140	<i>SPR</i>	182125
<i>SUCLA2</i>	603921	<i>SUCLG1</i>	611224

<i>SUOX</i>	606887	<i>SURF1</i>	185620
<i>SYNJ1</i>	604297	<i>TAF1</i>	313650
<i>TBC1D24</i>	613577	<i>TBP</i>	600075
<i>TBX18</i>	604613	<i>TH</i>	191290
<i>THAP1</i>	609520	<i>TIMM8A</i>	300356
<i>TOR1A</i>	605204	<i>TPH2</i>	607478
<i>TPI1</i>	190450	<i>TPK1</i>	606370
<i>TRAPPC11</i>	614138	<i>TREX1</i>	606609
<i>TRPM7</i>	605692	<i>TSEN2</i>	608753
<i>TSEN54</i>	608755	<i>TSM</i>	604723
<i>TTC19</i>	613814	<i>TTF1</i>	600635
<i>TUBB4A</i>	602662	<i>UQCRCQ</i>	612080
<i>VAMP1</i>	185880	<i>VCP</i>	601023
<i>VPS13A</i>	605978	<i>VPS35</i>	601501
<i>VPS37A</i>	609927	<i>WDR45</i>	300526
<i>WDR73</i>	616144	<i>XPR1</i>	605237
<i>ZC4H2</i>	300897		

2.3.10 In-silico-Prädiktionsprogramme

In-silico-Prädiktionsprogramme berechnen unter Anwendung bioinformatischer Algorithmen die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine Variante schädigend auf das kodierte Protein auswirkt. In dieser Arbeit wurden die folgenden drei In-silico-Prädiktionsprogramme angewendet: SIFT (P. Kumar et al., 2009), Polyphen2 (Adzhubei et al., 2010) und CADD (Kircher et al., 2014). Das Prädiktionsprogramm SIFT (*Sorting Intolerated from Tolerated*) verwendet für die Klassifikation der Variante Informationen über die phylogenetische Konservierung des Wildtyps (P. Kumar et al., 2009). Dieser Ansatz zählt zu den sequenzbasierten Verfahren, die davon ausgehen, dass hochkonservierte Aminosäuren intolerant gegenüber Substitutionen sind (P. Kumar et al., 2009). Anhand der Alignments der homologen Proteine verschiedener Spezies wird der Grad der Konservierung bestimmt und die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass ein Aminosäureaustausch an dieser Position toleriert wird: Je höher der Score, desto wahrscheinlicher

wird der Austausch „toleriert“ (*tolerated*) (P. Kumar et al., 2009). Varianten mit Werten $< 0,05$ werden als „schädigend“ (*damaging*) eingestuft (P. Kumar et al., 2009). Der Algorithmus von Polyphen2 nutzt zusätzlich zu verschiedenen sequenzbasierten auch strukturbasierte Ansätze (Adzhubei et al., 2010). Die Wahrscheinlichkeit eines schädigenden Effekts wird als Score zwischen 0 und 1 angegeben, wobei Werte $< 0,15$ als „benigne“ (*benign*) und Werte $> 0,15$ als „möglicherweise schädigend“ (*possibly damaging*) und „wahrscheinlich schädigend“ (*probably damaging*) klassifiziert werden (Adzhubei et al., 2010). Der Algorithmus von CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*) integriert eine Vielzahl unterschiedlicher Informationen (Kircher et al., 2014). Neben der phylogenetischen Konservierung werden unter anderem auch regulatorische Informationen wie beispielsweise die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder Daten zur Expression verschiedener Gene berücksichtigt (Kircher et al., 2014). Der berechnete Score wird als roher und skaliertes Wert angegeben: Der skalierte Wert ordnet die Variante relativ zu allen möglichen Einzelnukleotid-Varianten des menschlichen Genoms ein und kann Werte zwischen 0 und 99 annehmen (Kircher et al., 2014). Ein skaliertes Score > 10 bedeutet, dass die Variante zu den 10 % der schädigendsten Varianten zählt, die innerhalb des Genoms auftreten können. Ein Score > 20 indiziert, dass die Variante zu den schädigendsten 1 % aller Varianten zählt und ein Score > 30 , dass die Variante zu den schädigendsten 0,1 % zählt (Kircher et al., 2014). Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurde der skalierte CADD-Score angegeben. Bei der Variantenfilterung (Kapitel 2.3.9) wurde ein skaliertes CADD-Score ≥ 20 als Hinweis auf einen schädigenden Effekt der Variante gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Charakteristika

3.1.1 Demografische Daten

Tab. 12: Demografische Daten und Verteilungsform der Dystonie

Patienten	n	Verteilungsform der Dystonie		
		fokal (% von n)	segmental (% von n)	generalisiert (% von n)
alle	269	207 (77,0)	56 (20,8)	6 (2,2)
Männer	85	65 (76,5)	19 (22,3)	1 (1,2)
Frauen	184	142 (77,2)	37 (20,1)	5 (2,7)

n: Anzahl.

Die in dieser Arbeit untersuchte Kohorte umfasst 269 Patienten mit Dystonie. Insgesamt wurden 85 Männer (31,6 %) und 184 Frauen (68,4 %) untersucht. Die demografischen Daten der Kohorte und deren Zusammensetzung bezüglich der unterschiedlichen klinischen Verteilungsformen der Dystonie sind in Tab. 12 angegeben.

Häufigste Verteilungsform der Dystonie innerhalb der Kohorte war die fokale Dystonie in ungefähr drei Viertel der Fälle (77,0 %), gefolgt von der segmentalen (20,8 %) und generalisierten Dystonie (2,2 %). Dieses Verhältnis bildete sich auch innerhalb der einzelnen Geschlechter ab: An einer fokalen Dystonie waren 77,2 % der Frauen und 76,5 % der Männer erkrankt und an einer segmentalen Dystonie 20,1 % der Frauen und 22,3 % der Männer. Der Anteil der Patienten mit generalisierter Form war bei beiden Geschlechtern mit 1,2 % (Männer) bzw. 2,7 % (Frauen) äußerst gering. Alle Patienten mit fokaler und segmentaler Dystonie wiesen mit Ausnahme eines Tremors keine weiteren Bewegungsstörungen auf und wurden entsprechend als isolierte Dystonie klassifiziert (Albanese et al., 2013). In der Gruppe der Patienten mit generalisierter Dystonie erfüllten zwei der sechs Patienten durch das Auftreten weiterer Bewegungsstörungen die Kriterien einer kombinierten Dystonie (Albanese et al., 2013). Die klinischen Charakteristika der Patienten mit generalisierter Dystonie sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Klinische Charakteristika der Patienten mit generalisierter Dystonie

Indexpatient	Geschlecht	Alter bei Erkrankungsbeginn	Alter bei Studieneinschluss	betroffene Regionen								Erstmanifestation	weitere Bewegungsstörungen			Klassifikation der Dystonie	
				periorbital	oromandibulär	zervikal	laryngeal	Zungenmuskulatur	Rumpf	obere Extremität	untere Extremität		Tremor	Myoklonus	Chorea		Familienanamnese
G1	m	9	44	+	+	+	+	+	+	+	+	Hand	+	+	-	-	kombiniert
G2	f	3	63	+	+	+	+	-	+	+	+	Hals	+	-	-	-	isoliert
G3	f	2	28	-	-	-	-	-	+	+	+	Fuß	-	-	-	-	isoliert
G4	f	12	42	-	-	+	+	+	+	+	+	Fuß	+	+	-	-	kombiniert
G5	f	7	30	-	+	+	+	+	+	+	+	Fuß	-	-	-	-	isoliert
G6	f	20	43	-	-	+	-	-	+	+	+	Hals	-	-	-	-	isoliert

+: Region betroffen / Merkmal vorhanden/ positiv; -: Region nicht betroffen / Merkmal nicht vorhanden/ negativ; m: männlich; f: weiblich.

3.1.2 Erkrankungsalter der IFSD-Subtypen

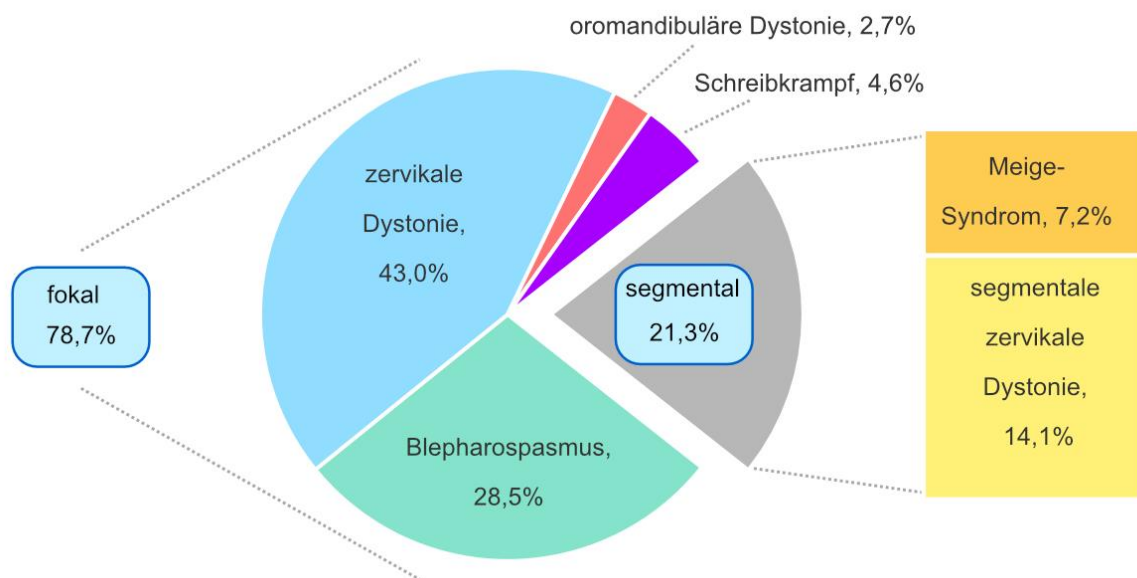


Abb. 9: Grafische Darstellung der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Subtypen innerhalb der IFSD-Kohorte.

Im Folgenden werden die demografischen und klinischen Merkmale der Patienten mit isolierter fokaler und isolierter segmentaler Dystonie (IFSD) genauer analysiert. Die weiteren Grafiken und Tabellen des Kapitels beziehen sich auf die Daten der 263 Probanden mit IFSD.

Die prozentualen Anteile der verschiedenen IFSD-Subtypen innerhalb der IFSD-Kohorte sind grafisch in Abb. 9 dargestellt und die Anzahl der Patienten innerhalb der jeweiligen Subtypen ist in Tab. 14 angegeben. Insgesamt betrug der Anteil der fokalen Dystonien innerhalb der IFSD-Kohorte 78,7 % (207/263) und der der segmentalen Dystonien 21,3 % (56/263). Bezüglich der betroffenen Regionen stellten die fokale zervikale Dystonie mit 113 Fällen (43,0 %) und der Blepharospasmus mit 75 Fällen (28,5 %) die beiden Hauptmanifestationen dar. Weitaus seltener lagen eine fokale oromandibuläre Dystonie mit 7 Fällen (2,7 %) und ein isolierter Schreibkrampf mit 12 Fällen (4,6 %) vor. Innerhalb der variablen Manifestationsmuster der segmentalen Dystonien wurden in dieser Arbeit Formen mit und ohne zervikale Dystonie voneinander abgegrenzt. Verteilungsformen ohne zervikale Dystonie traten dabei vorwiegend

als Meige-Syndrom (Kombination aus Blepharospasmus und oromandibulärer Dystonie) in insgesamt 19 Fällen (7,2 %) auf. Etwa zwei Drittel der Patienten mit segmentaler Verteilung (37 Fälle) wiesen in der klinischen Präsentation der Erkrankung eine zervikale Dystonie auf. Am häufigsten kam innerhalb dieser heterogenen Gruppe die Kombination aus zervikaler Dystonie, Blepharospasmus und oromandibulärer Dystonie (15 Fälle) vor, gefolgt von der Kombination aus zervikaler und oromandibulärer Dystonie (13 Fälle). Das gemeinsame Auftreten von zervikaler Dystonie und Blepharospasmus (5 Fälle) sowie von zervikaler Dystonie und spasmodischer Dysphonie (4 Fälle) wurde hingegen selten beobachtet.

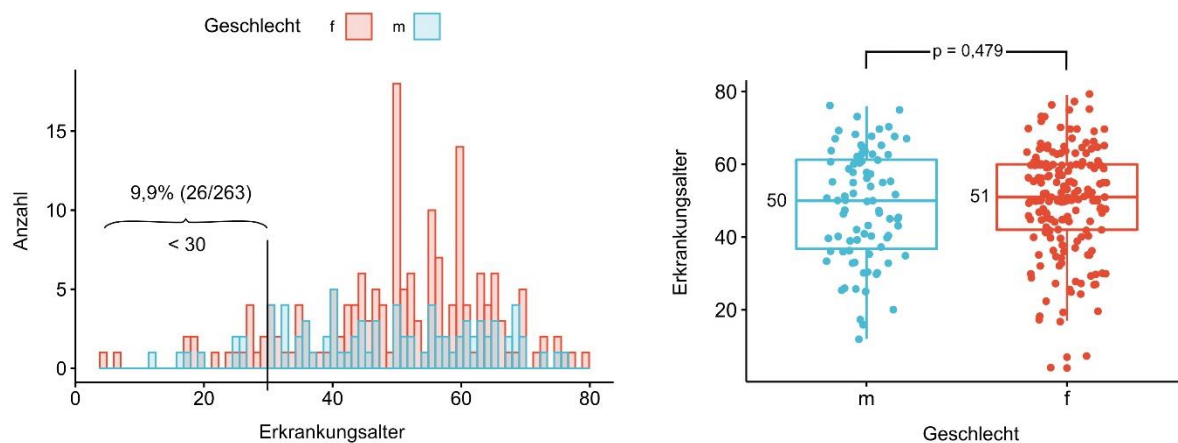


Abb. 10: Geschlecht und Erkrankungsalter der Patienten mit IFSD

Das Erkrankungsalter und die Anzahl der Patienten sind für Männer (blau) und Frauen (rot) dargestellt; 9,9 % (26/263) aller Patienten haben ein Erkrankungsalter < 30 Jahren.

Das mittlere Erkrankungsalter aller 263 Patienten mit IFSD betrug 49,5 Jahre (Tab. 14). Zwischen Frauen (Mittelwert 50,0 Jahre; Median 51 Jahre) und Männern (Mittelwert 48,6 Jahre; Median 50 Jahre) konnte über alle Fälle gemittelt kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden ($p = 0,479$) (Abb. 10). Insgesamt 9,9 % (26/263) aller IFSD-Patienten erkrankten vor dem 30. Lebensjahr. Da für die einzelnen Subtypen der IFSD Unterschiede bezüglich des Erkrankungsalters beschrieben sind (Defazio et al., 2003a; O'Riordan et al., 2004), wurden die einzelnen Subtypen im folgenden Abschnitt getrennt betrachtet.

Tab.14: Geschlecht und Erkrankungsalter der Patienten mit IFSD

IFSD-Typ	n	% aller IFSD	Männer (% von n)	Frauen (% von n)	Mittelwert Erkrankungsalter alle (Max; Min)	Mittelwert Erkrankungsalter Männer (Max; Min)	Mittelwert Erkrankungsalter Frauen (Max; Min)
alle	263	100	84 (31,9)	179 (68,1)	49,5 (79; 4)	48,6 (76; 12)	50,0 (79; 4)
fokal							
Blepharospasmus	75	28,5	27 (36,0)	48 (64,0)	58,7 (76; 16)	58,9 (76; 16)	58,6 (75; 35)
fokale zervikale Dystonie	113	43,0	29 (25,7)	84 (74,3)	43,0 (70; 4)	42,2 (68; 17)	43,3 (70; 4)
oromandibuläre Dystonie	7	2,7	3 (42,9)	4 (57,1)	61,4 (69; 47)	66,7 (69; 63)	57,5 (66; 47)
Schreibkrampf	12	4,6	6 (50,0)	6 (50,0)	36,3 (51; 25)	37,2 (51; 25)	35,5 (51; 27)
Segmental							
Meige-Syndrom	19	7,2	6 (31,6)	13 (68,4)	57,1 (79; 30)	51,2 (70; 30)	59,8 (79; 50)
segmentale zervikale Dystonie	37	14,1	13 (35,1)	24 (64,9)	49,1 (77; 12)	41,3 (63; 12)	53,3 (77; 25)

n: Anzahl; Max: Maximum; Min: Minimum.

In Tab. 14 ist das Erkrankungsalter der einzelnen IFSD-Subtypen dargestellt. Am frühesten manifestierte sich innerhalb der untersuchten Kohorte der aktionsabhängige Schreibkrampf im Alter von durchschnittlich 36,3 Jahren. Das zweitniedrigste mittlere Erkrankungsalter hatten Patienten mit einer fokalen zervikalen Dystonie, die hieran durchschnittlich mit 43,0 Jahren erkrankten. Zusammen mit der segmentalen zervikalen Dystonie wies die fokale zervikale Dystonie die höchste Variabilität des Erkrankungsalters auf: Die Spanne zwischen dem frühesten und dem spätesten Auftreten krankheitstypischer Symptome betrug für die fokale zervikale Dystonie 66 Jahre (4 bis 70 Jahre) und für die segmentale zervikale Dystonie 65 Jahre (12 bis 77 Jahre). Ein vergleichbar variables Erkrankungsalter innerhalb einer Spanne von 60 Jahren hatten Patienten mit einem fokalen Blepharospasmus (16 bis 76 Jahre). Am spätesten erkrankten Patienten an einer oromandibulären Dystonie mit durchschnittlich 61,4 Jahren. Verglichen mit dem durchschnittlichen Erkrankungsalter der Patienten mit einer oromandibulären Dystonie bzw. mit einem Blepharospasmus, erkrankten Patienten mit einem Schreibkrampf ($p < 0,0001$ bzw. $p < 0,0001$) und einer fokalen zervikalen Dystonie ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,0001$) signifikant früher (Abb. 11). Zwischen den beiden

früh und den beiden spät beginnenden Formen (Schreibkrampf verglichen mit fokaler zervikaler Dystonie bzw. Blepharospasmus verglichen mit oromandibulärer Dystonie) unterschied sich das Erkrankungsalter hingegen nicht signifikant. An einer segmentalen zervikalen Dystonie erkrankten Patienten im Mittel 8,0 Jahre früher als an einem isolierten Meige-Syndrom und verglichen mit der fokalen zervikalen Dystonie durchschnittlich 6,1 Jahre später. Beide Unterschiede waren jedoch nicht als statistisch signifikant zu werten. Des Weiteren bestand kein signifikanter Unterschied im Erkrankungsalter zwischen dem fokalen Blepharospasmus und dem Meige-Syndrom.

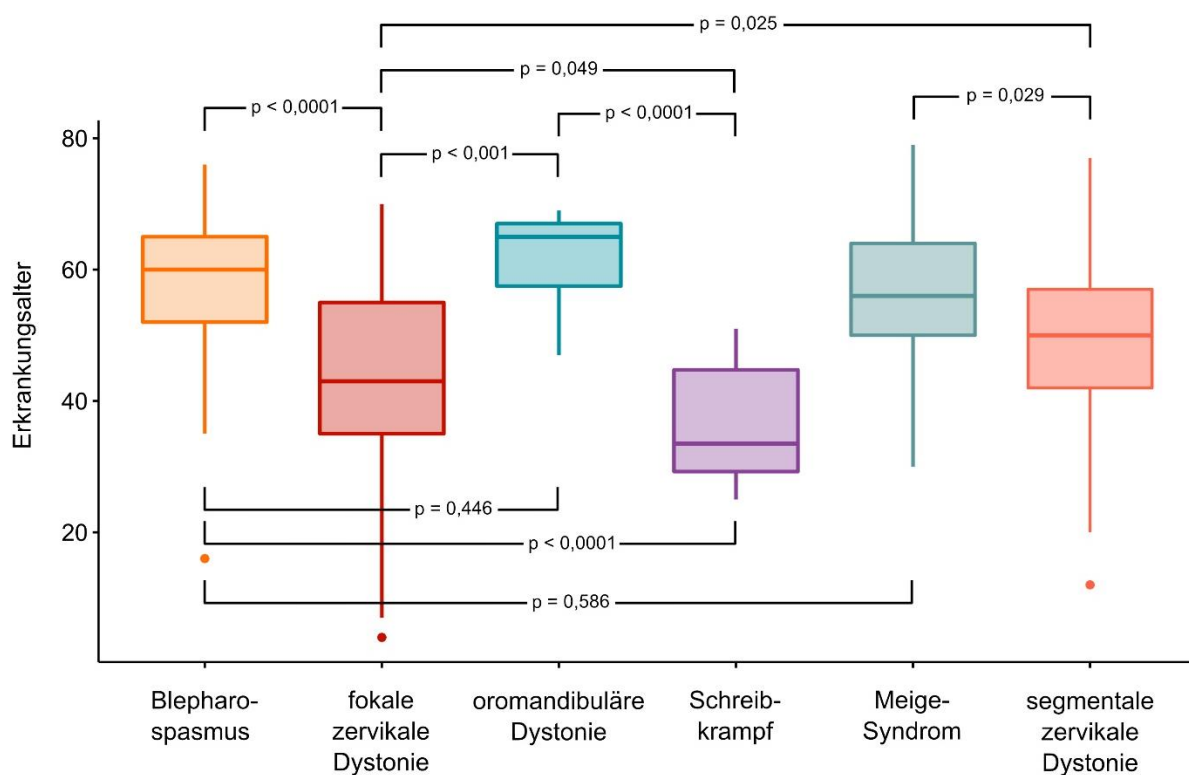


Abb. 11: Erkrankungsalter der einzelnen IFSD-Subtypen

Grafische Darstellung des Erkrankungsbeginns der einzelnen Subtypen; Signifikanzniveau: $p < 0,0028$ (Bonferroni-Korrektur).

3.1.3 Unterschiede zwischen Männern und Frauen innerhalb der IFSD-Subtypen

Nachfolgend wurden Unterschiede zwischen Männern und Frauen innerhalb der verschiedenen IFSD-Subtypen untersucht. In Tab. 14 sind die Anzahl von Männern und

Frauen sowie das jeweilige Erkrankungsalter angegeben. Zwischen den verschiedenen Subtypen unterschied sich das Verhältnis von Männern zu Frauen (Abb. 12): Am niedrigsten war der relative Anteil der Männer bei der fokalen zervikalen Dystonie mit 25,7 % und am höchsten beim Schreibkrampf mit 50,0 %. Innerhalb des Blepharospasmus und der beiden segmentalen Formen betrug der Anteil an Männern ungefähr ein Drittel und entsprach somit dem allgemeinen Geschlechterverhältnis der Studienkohorte. Bezogen auf das durchschnittliche Erkrankungsalter manifestierten sich der Blepharospasmus (Männer: 58,9 Jahre; Frauen: 58,6 Jahre), die fokale zervikale Dystonie (Männer: 42,2 Jahre; Frauen: 43,3 Jahre) und der Schreibkrampf (Männer: 37,2 Jahre; Frauen: 35,5 Jahre) bei beiden Geschlechtern etwa im gleichen Alter. Im Gegensatz dazu begann bei Männern das Meige-Syndrom durchschnittlich 8,6 Jahre und die segmentale zervikale Dystonie durchschnittlich 12,0 Jahre früher. Insgesamt war keiner der geschlechtsspezifischen Unterschiede im Erkrankungsalter der jeweiligen IFSD-Subtypen als statistisch signifikant zu werten (Abb. 12).

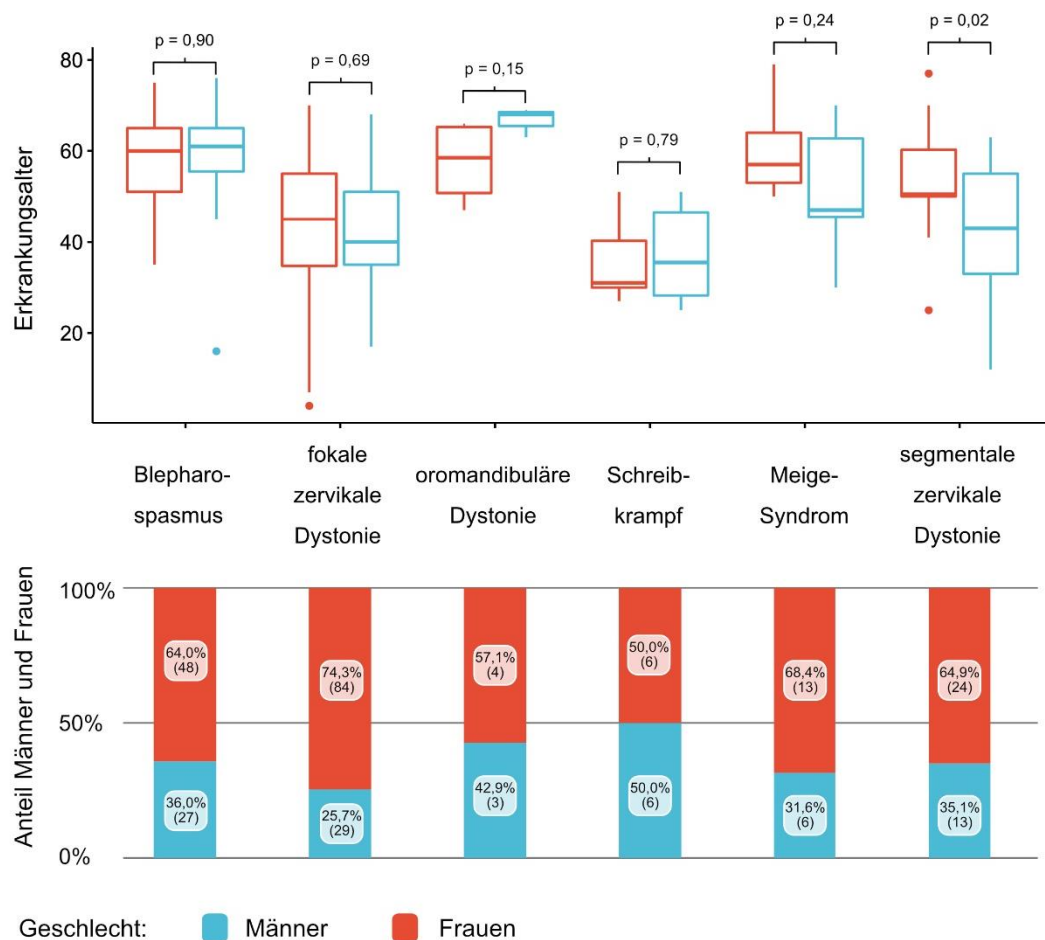


Abb. 12: Unterschiede zwischen Männern und Frauen innerhalb der IFSD-Subtypen

Oben: Grafische Darstellung des Erkrankungsalters von Männern (blau) und Frauen (rot) innerhalb der IFSD-Subtypen.

Unten: Grafische Darstellung des relativen Anteils von Männern und Frauen innerhalb der IFSD-Subtypen (absolute Anzahl in Klammern). Signifikanzniveau: $p < 0,0028$ (Bonferroni-Korrektur).

3.1.4 Unterschiede zwischen Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese innerhalb der IFSD-Subtypen

Im folgenden Abschnitt wurden Unterschiede zwischen Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese innerhalb der verschiedenen IFSD-Subtypen untersucht. In Tab. 15 sind die Anzahl von Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese sowie das jeweilige Erkrankungsalter angegeben.

Tab. 15: Anzahl und Erkrankungsalter von Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese innerhalb der IFSD-Subtypen

IFSD-Typ	n	Patienten mit positiver FA (% von n)	Patienten mit negativer FA (% von n)	Mittelwert Erkrankungsalter positive FA (Max; Min)	Mittelwert Erkrankungsalter negative FA (Max; Min)
alle	263	55 (20,9)	208 (79,1)	41,5 (70; 4)	51,7 (79; 17)
fokal					
Blepharospasmus	75	6 (8,0)	69 (92,0)	45,5 (69; 16)	59,2 (76; 42)
fokale zervikale Dystonie	113	33 (29,2)	80 (70,8)	38,5 (63; 4)	44,9 (70; 17)
oromandibuläre Dystonie	7	0	7 (100)	-	64,4 (69; 47)
Schreibkrampf	12	4 (33,3)	8 (66,7)	35,8 (51; 26)	36,6 (51;25)
segmental					
Meige-Syndrom	19	1 (5,3)	18 (94,7)	58,0 (58; 58)	57,0 (79; 30)
segmentale zervikale Dystonie	37	11 (29,7)	26 (70,3)	49,0 (70; 12)	49,1 (77;20)

n: Anzahl; FA: Familienanamnese; Max: Maximum; Min: Minimum.

Insgesamt hatten 20,9% der Patienten eine positive Familienanamnese für eine Dystonie oder einen isolierten Kopftremor. Ein isolierter Armtremor wurde nicht als positive Familienanamnese gewertet. Der relative Anteil von Patienten mit positiver Familienanamnese variierte dabei zwischen den einzelnen IFSD-Subtypen. Am häufigsten war der Schreibkrampf mit einem familiären Auftreten assoziiert; hier besaßen ein Drittel der Patienten erkrankte Angehörige. Etwas geringer war der Anteil familiärer Fälle bei der segmentalen zervikalen Dystonie (29,7%) und der fokalen zervikalen Dystonie (29,2%). Im Gegensatz dazu hatten nur 8,0 % der Patienten mit Blepharospasmus, 5,3 % der Patienten mit Meige-Syndrom und keiner der Patienten mit einer oromandibulären Dystonie eine positive Familienanamnese. Insgesamt erkrankten Patienten mit einer positiven Familienanamnese durchschnittlich 10,2 Jahre früher an einer Dystonie als Patienten mit einer negativen Familienanamnese. Dabei begannen der familiäre Blepharospasmus durchschnittlich 13,7 Jahren früher und die familiäre fokale zervikale Dystonie durchschnittlich 6,4 Jahren früher als die entsprechenden nicht-familiären Formen. Beim Schreibkrampf und der segmentalen zervikalen Dystonie erkrankten beide Patientengruppen ungefähr im gleichen Alter. Insgesamt waren

die Unterschiede im Erkrankungsalter zwischen den Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese nicht statistisch signifikant (Abb. 13).

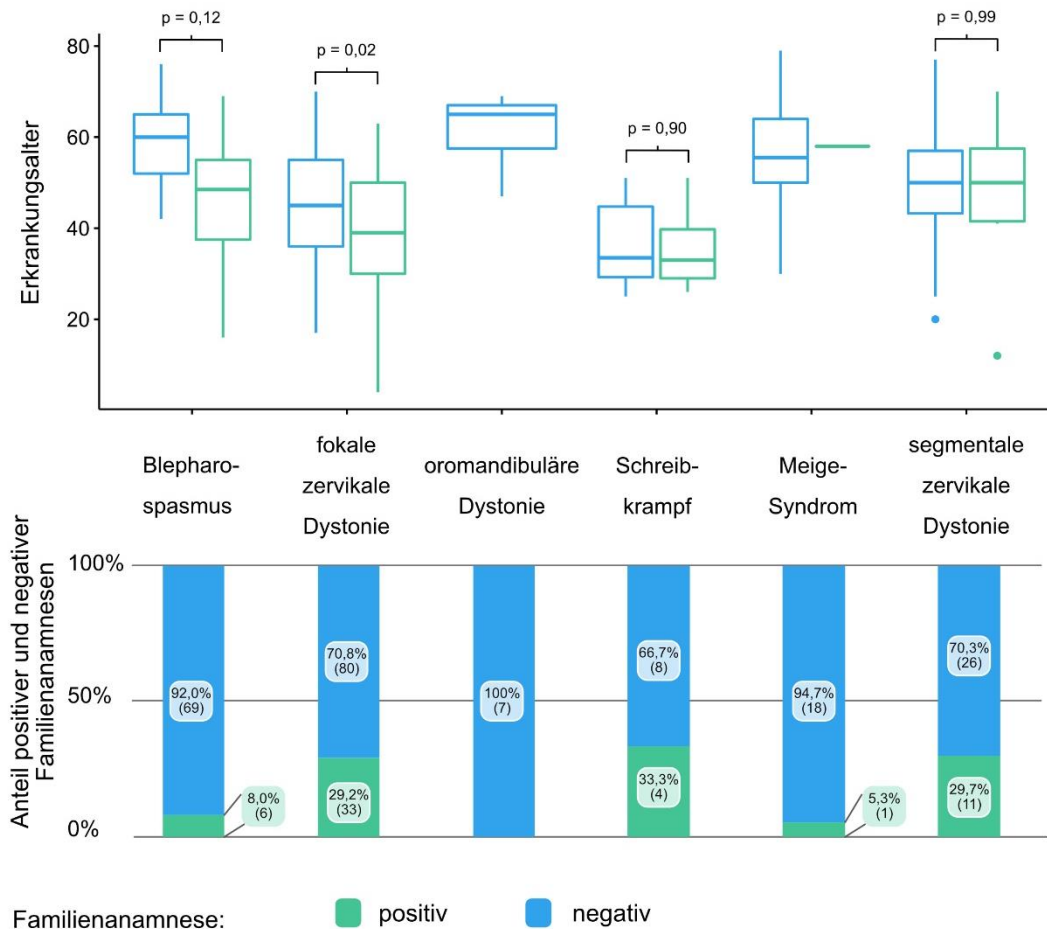


Abb. 13: Unterschiede zwischen Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese innerhalb der IFSD-Subtypen

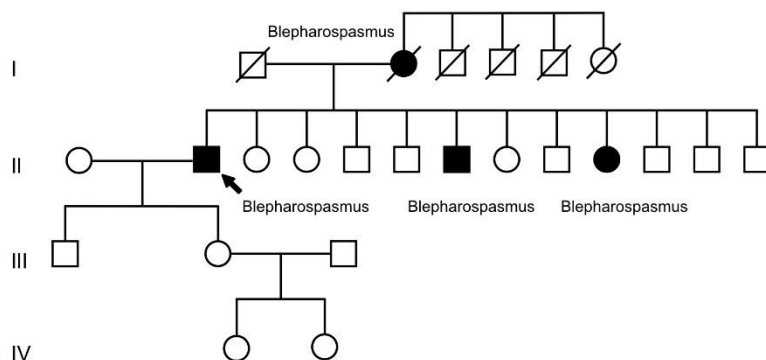
Oben: Grafische Darstellung des Erkrankungsalters von Patienten mit positiver Familienanamnese (grün) und Patienten mit negativer Familienanamnese (blau) innerhalb der IFSD-Subtypen.

Unten: Grafische Darstellung des relativen Anteils von Patienten mit positiver Familienanamnese und negativer Familienanamnese innerhalb der IFSD-Subtypen (absolute Anzahl in Klammern). Signifikanzniveau: $p < 0,0028$ (Bonferroni-Korrektur).

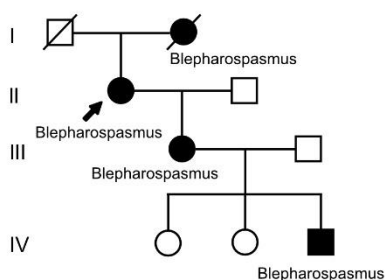
3.1.4.1 Stammbäume

Insgesamt wurden 45 Stammbäume der 55 Indexpatienten mit positiver Familienanamnese grafisch dokumentiert. Im folgenden Abschnitt sind die Stammbäume nach Phänotypen gruppiert abgebildet. Es wurden vier Stammbäume mit isoliertem Blepharospasmus (Abb. 14) und vier Stammbäume mit gemischten IFSD-Subtypen ohne zervikale Dystonie (Abb. 15) erfasst. Die Stammbäume mit zervikaler Dystonie wurden in zwei Gruppen unterteilt: zervikale Dystonie ohne dystonen Tremor (Abb. 16, Abb. 17) und zervikale Dystonie mit dystonem Tremor (Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20). Diese beiden Gruppen wurden hinsichtlich der Anzahl der erkrankten Personen weiter unterteilt.

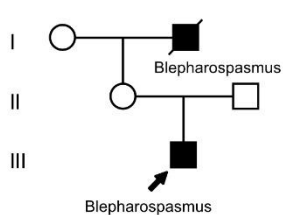
Stammbaum #1



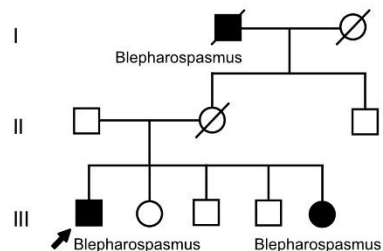
Stammbaum #2



Stammbaum #3

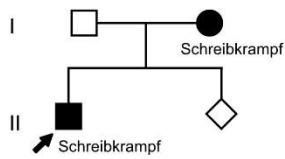


Stammbaum #4

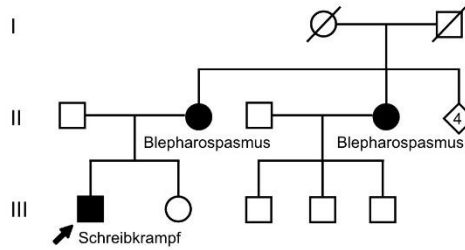
**Abb. 14:** Stammbäume mit Blepharospasmus

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: Indexpatient; römische Ziffern: Generationen.

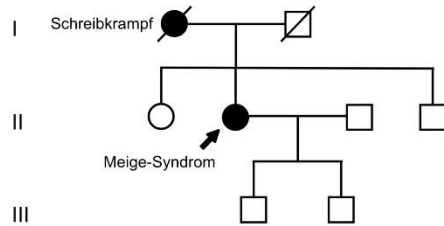
Stammbaum #5



Stammbaum #6



Stammbaum #7



Stammbaum #8

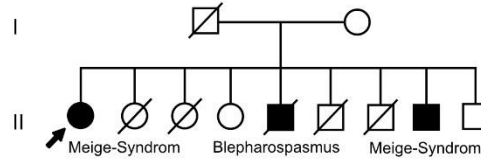
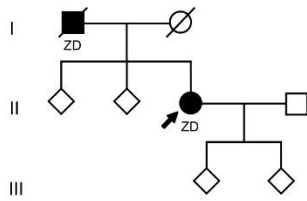


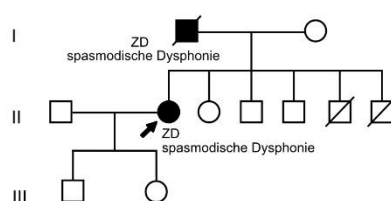
Abb. 15: Stammbäume mit gemischten IFSD-Subtypen ohne zervikale Dystonie

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; Raute: Geschlecht nicht bekannt; Raute mit Zahl: Anzahl der Geschwister mit unbekanntem Geschlecht; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: Indexpatient; römische Ziffern: Generationen.

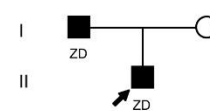
Stammbaum #9



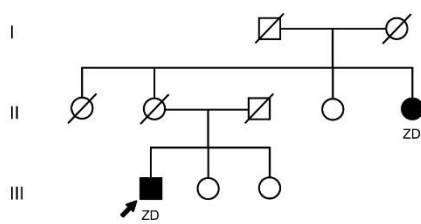
Stammbaum #10



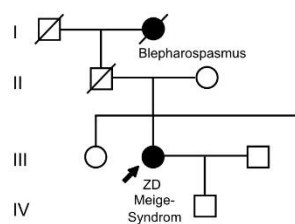
Stammbaum #11



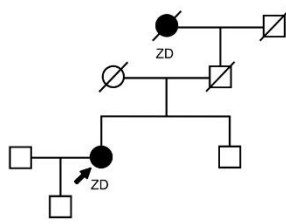
Stammbaum #12



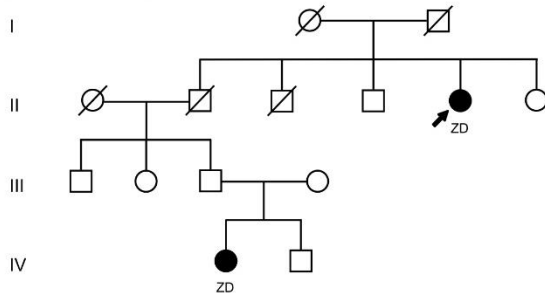
Stammbaum #13



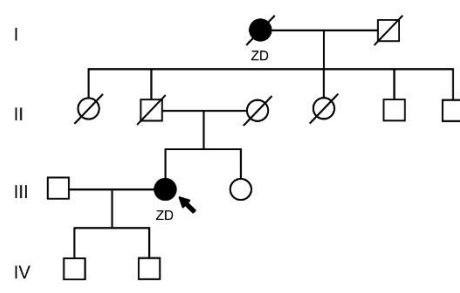
Stammbaum #14



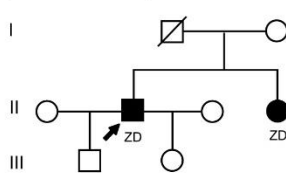
Stammbaum #15



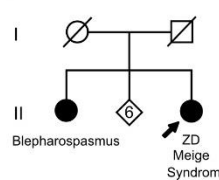
Stammbaum #16



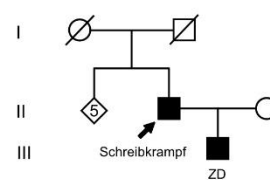
Stammbaum #17



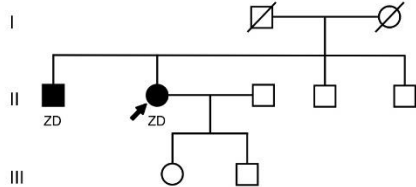
Stammbaum #18



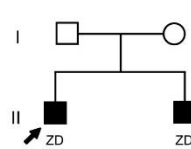
Stammbaum #19



Stammbaum #20



Stammbaum #21



Stammbaum #22

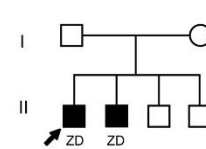
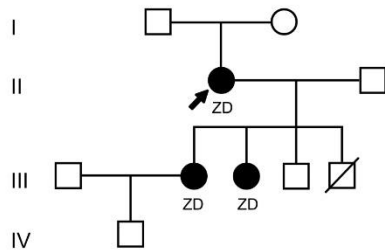


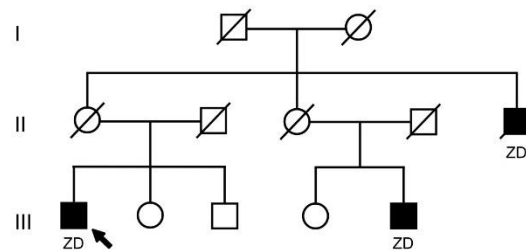
Abb. 16: Stammbäume mit zervikaler Dystonie und insgesamt zwei erkrankten Personen

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; Raute: Geschlecht nicht bekannt; Raute mit Zahl: Anzahl der Geschwister mit unbekanntem Geschlecht; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: In-dexpatient; römische Ziffern: Generationen; ZD: zervikale Dystonie.

Stammbaum #23



Stammbaum #24

**Abb. 17:** Stammbäume mit zervikaler Dystonie und insgesamt drei erkrankten Personen

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: Indexpatient; römische Ziffern: Generationen; ZD: zervikale Dystonie.

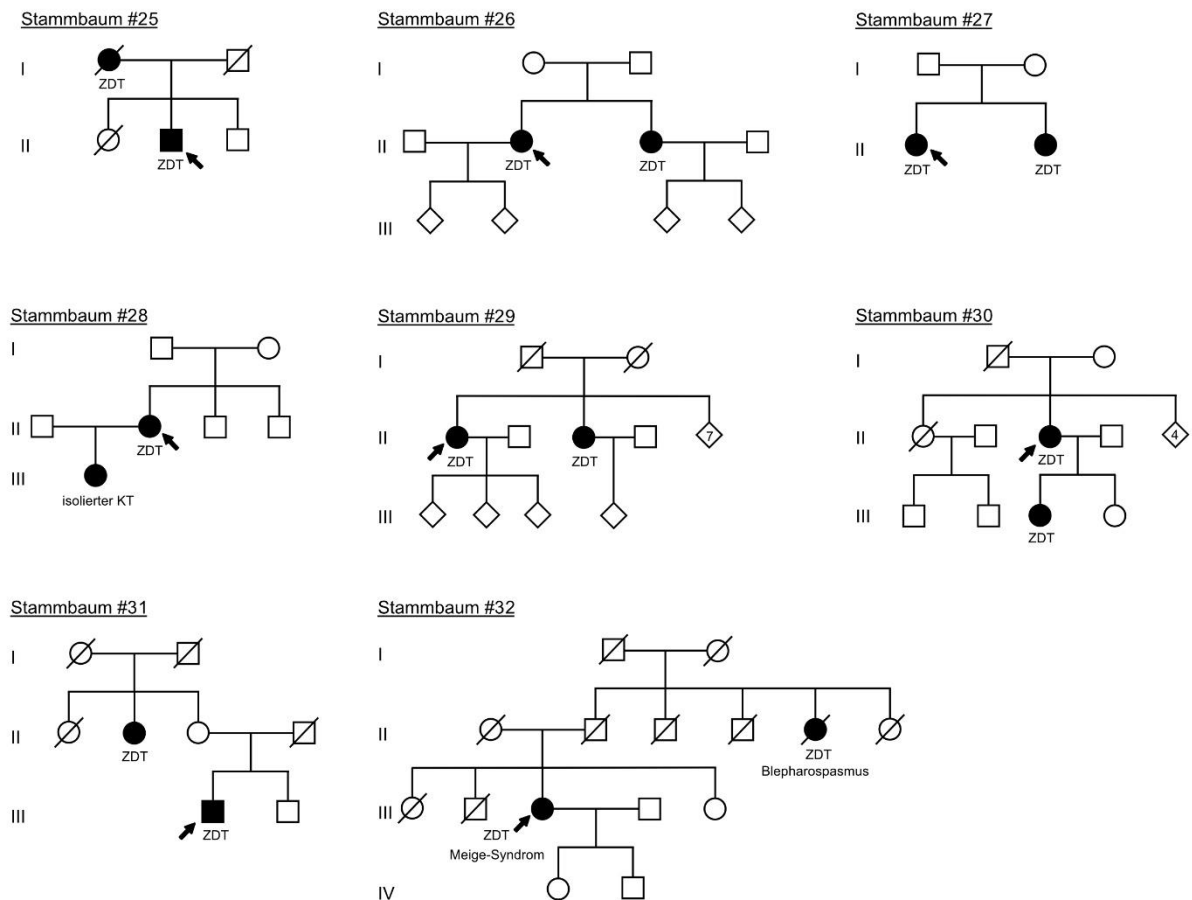
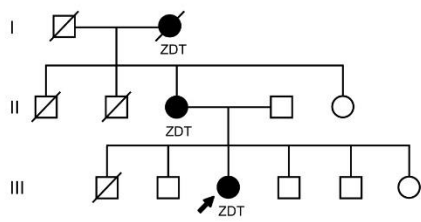


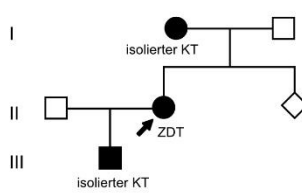
Abb. 18: Stammbäume mit zervikaler Dystonie und dystonem Tremor und insgesamt zwei erkrankten Personen

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; Raute: Geschlecht nicht bekannt; Raute mit Zahl: Anzahl der Geschwister mit unbekanntem Geschlecht; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: Indexpatient; römische Ziffern: Generationen; ZDT: zervikale Dystonie mit dystonem Tremor; KT: Kopftremor. Stammbaum #30 ist nach Zech et al. (2017) mit zusätzlichen Informationen in Abb. 32 abgebildet.

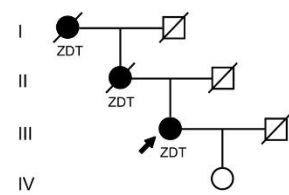
Stammbaum #33



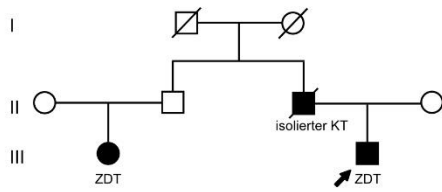
Stammbaum #34



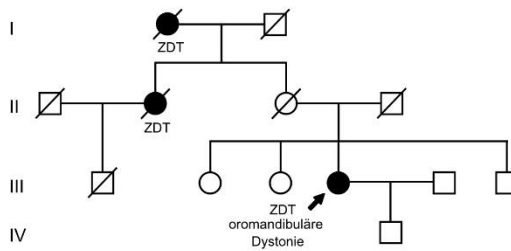
Stammbaum #35



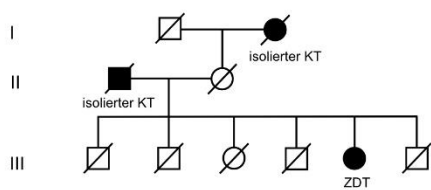
Stammbaum #36



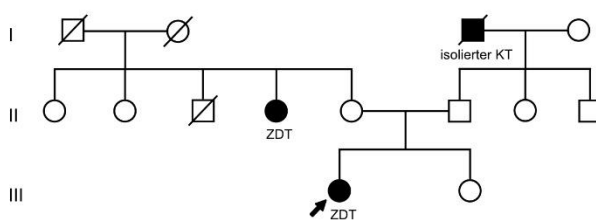
Stammbaum #37



Stammbaum #38



Stammbaum #39



Stammbaum #40

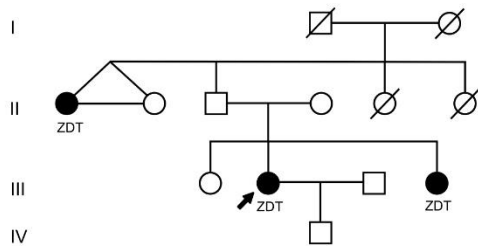
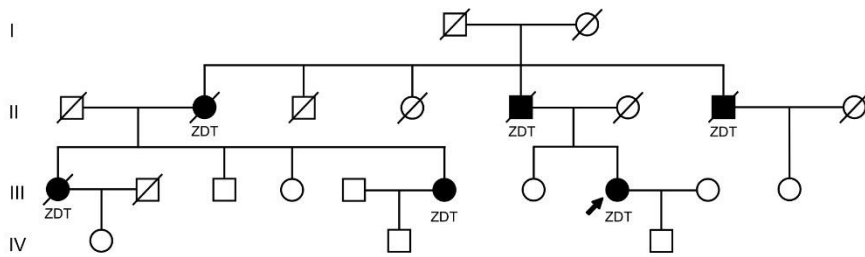


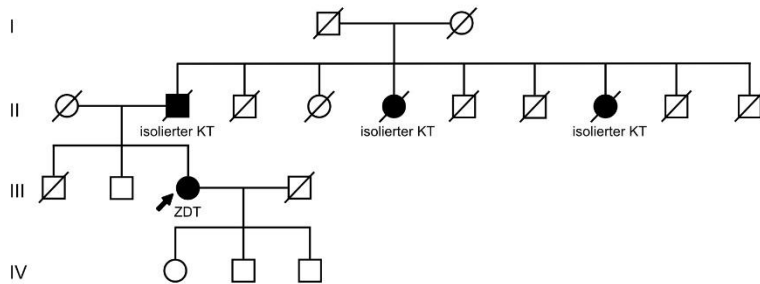
Abb. 19: Stammbäume mit zervikaler Dystonie und dystonem Tremor und insgesamt drei erkrankten Personen

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; Raute: Geschlecht nicht bekannt; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: Indexpatient; römische Ziffern: Generationen; ZDT: zervikale Dystonie mit dystonem Tremor; KT: Kopftremor.

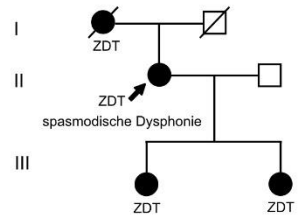
Stammbaum #41



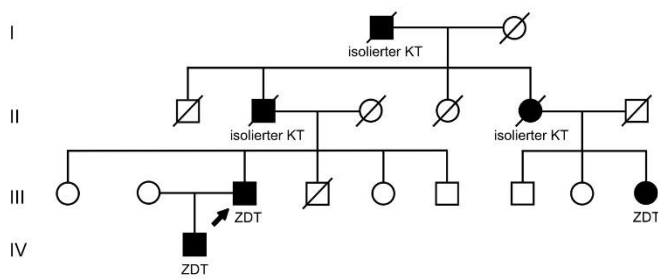
Stammbaum #42



Stammbaum #43



Stammbaum #44



Stammbaum #45

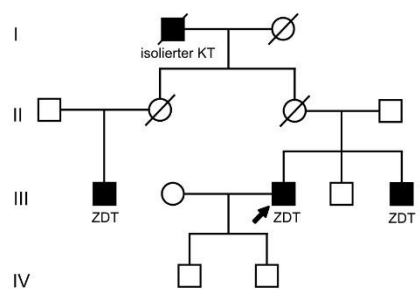


Abb. 20: Stammbäume mit zervikaler Dystonie und dystonem Tremor und insgesamt mindestens vier erkrankten Personen

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: Indexpatient; römische Ziffern: Generationen; ZDT: zervikale Dystonie mit dystonem Tremor; KT: Kopftremor.

3.1.5 Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne dystonen Kopftremor

In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein eines dystonen Kopftremors bei Patienten mit zervikaler Dystonie erfasst und der Zusammenhang zwischen einem dystonen Kopftremor und einer positiven Familienanamnese untersucht. In Tab. 16 sind die Anteile der Patienten mit und ohne Kopftremor innerhalb der fokalen und segmentalen zervikalen Dystonie dargestellt. In Tab. 17 sind die Anteile der Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese an den Patienten mit und ohne Kopftremor aufgeführt.

Tab. 16: Patienten mit zervikaler Dystonie und dystonem Kopftremor

IFSD-Typ	n	Patienten mit Kopftremor (% von n)	Patienten ohne Kopftremor (% von n)
fokale und segmentale zervikale Dystonie	150	55 (36,7)	95 (63,3)
fokale zervikale Dystonie	113	42 (37,2)	71 (62,8)
segmentale zervikale Dystonie	37	13 (35,1)	24 (64,9)

n: Anzahl.

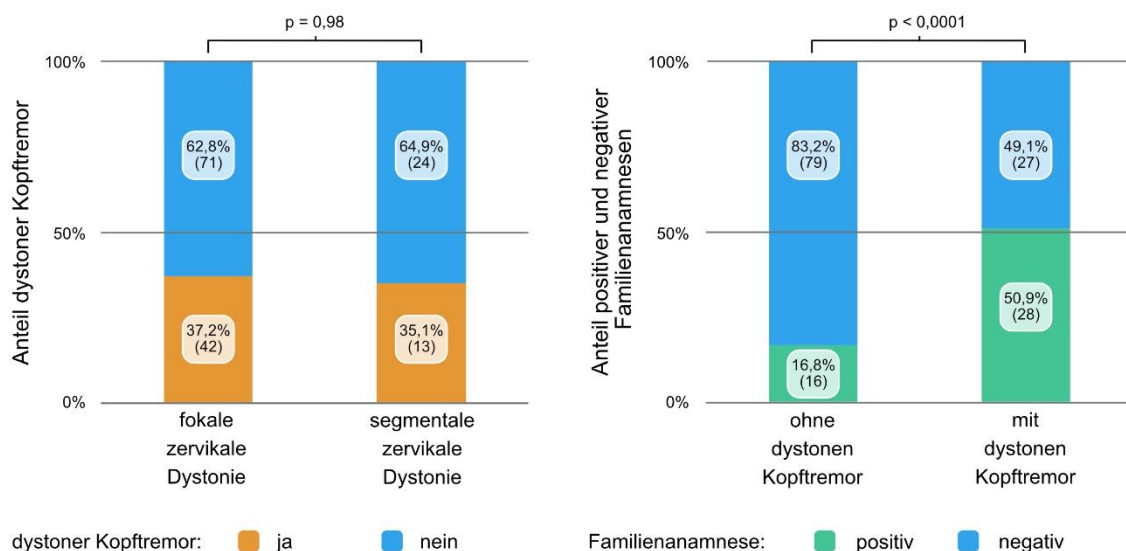
Ein dystoner Kopftremor trat bei insgesamt 36,7 % der Patienten mit fokaler und segmentaler zervikaler Dystonie auf. Im Vergleich der beiden IFSD-Subtypen hatten etwas mehr Patienten mit fokaler zervikaler Dystonie (37,2 %) einen dystonen Kopftremor als Patienten mit segmentaler zervikaler Dystonie (35,1 %). Statistisch war die fokale Form nicht häufiger mit einem dystonen Tremor assoziiert als die segmentale Form ($p=0,98$; Abb. 21).

Tab. 17: Patienten mit Kopftremor und positiver Familienanamnese

IFSD-Typ	n	Patienten mit Positiver FA (% von n)	Patienten mit negativer FA (% von n)
fokale und segmentale zervikale Dystonie ohne Kopftremor	95	16 (16,8)	79 (83,2)
fokale und segmentale zervikale Dystonie mit Kopftremor	55	28 (50,9)	27 (49,1)

n: Anzahl; FA: Familienanamnese

Während etwa die Hälfte der Patienten (50,9 %) mit einem dystonen Kopftremor eine positive Familienanamnese hatte, lag eine familiäre Form nur bei 16,8% der Patienten ohne Kopftremor vor. Die Assoziation zwischen einem dystonen Kopftremor und einer positiven Familienanamnese ist mit einem p-Wert $< 0,0001$ als statistisch signifikant zu werten (Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p < 0,0028$).

**Abb. 21:** Unterschiede von Patienten mit und ohne dystonen Kopftremor

Links: Grafische Darstellung des relativen Anteils der Patienten mit (orange) und ohne (blau) dystonen Kopftremor an den Patienten mit fokaler und segmentaler zervikaler Dystonie (absolute Anzahl in Klammern). Rechts: Grafische Darstellung des relativen Anteils der Patienten mit positiver (grün) und negativer (blau) Familienanamnese an den Patienten mit und ohne dystonen Kopftremor (absolute Anzahl in Klammern). Signifikanzniveau: $p < 0,0028$ (Bonferroni-Korrektur).

3.2 Molekulargenetische Untersuchungen

Die systematische molekulargenetische Analyse der rekrutierten Kohorte erfolgte anhand folgender Strategie (schematische grafische Darstellung in Abb. 22): Alle Patienten mit IFSD (n=263) wurden entweder mittels Sanger-Sequenzierung oder mittels HRMA und nachfolgender Sanger-Sequenzierung auf die Existenz seltener Varianten in fünf Genen untersucht. Die hierfür ausgewählten Gene *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *ANO3* und *COL6A3* sind mit dem Phänotyp einer IFSD assoziiert. Während das komplette proteinkodierende Transkript von *THAP1* sequenziert wurde, fokussierte sich die Analyse von *TOR1A* und *COL6A3* auf Abschnitte, die durch ein erhöhtes Aufkommen pathogener Varianten gekennzeichnet sind: Exon 5 von *TOR1A* (Klein, 2014) und Exon 41 und 42 von *COL6A3* (Zech et al., 2015b). Für *COL6A3* sind neben Varianten in diesen Abschnitten auch Varianten in weiteren Regionen beschrieben (Zech et al., 2015b). Um das Vorhandensein zusätzlicher Varianten zu bestimmen, schloss sich an die Identifikation einer seltenen heterozygoten Variante in Exon 41 oder Exon 42 die Sanger-Sequenzierung aller proteinkodierenden Abschnitte von *COL6A3* an. Die beiden Gene *GNAL* und *ANO3* wurden aufgrund ihrer genomischen Größe zunächst mit Hilfe der HRMA gescreent. Anschließend wurden die Basensequenzen von PCR-Produkten mit abweichenden Schmelzkurven durch Sanger-Sequenzierungen bestimmt. Eine Gruppe von Patienten mit einer hohen a-priori-Wahrscheinlichkeit für eine monogene Ätiologie wurde mittels WES molekulargenetisch evaluiert. Hierzu zählten alle Patienten mit einer generalisierten Dystonie (n=6), da dieser Phänotyp sowohl durch einen hohen Anteil monogener Fälle als auch durch eine ausgesprochene genetische Heterogenität gekennzeichnet ist (Balint & Bhatia, 2015; Charlesworth et al., 2013). Zusätzlich wurden 20 Patienten der IFSD-Kohorte ausgewählt, bei denen in der vorgeschalteten molekulargenetischen Analyse keine seltenen Varianten in *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *ANO3* und *COL6A3* identifiziert worden waren und die gleichzeitig durch einen frühen Erkrankungsbeginn (vor dem 30. Lebensjahr) oder eine positive Familienanamnese weitere Hinweise auf eine mögliche monogene Dystonie aufwiesen. Konnten mittels WES im Phänotyp der IFSD klinisch relevante Varianten in einem bisher noch nicht mit diesem Phänotyp assoziierten Gen identifiziert werden, erfolgte anschließend ein molekulargenetisches Screening des Gens mittels HRMA in der Pa-

tientenkohorte mit IFSD. Ziel dieses Screenings war die Identifikation weiterer Varianten und die Bestimmung der kausalen Relevanz des Gens in der Pathogenese dieses Phänotyps. Die Kohorte bestand aus den Patienten der IFSD-Kohorte dieser Arbeit mit Ausnahme der 20 Patienten, die mittels WES analysiert wurden (n=243). Die Ergebnisse dieses Kapitels entstanden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Michael Zech.

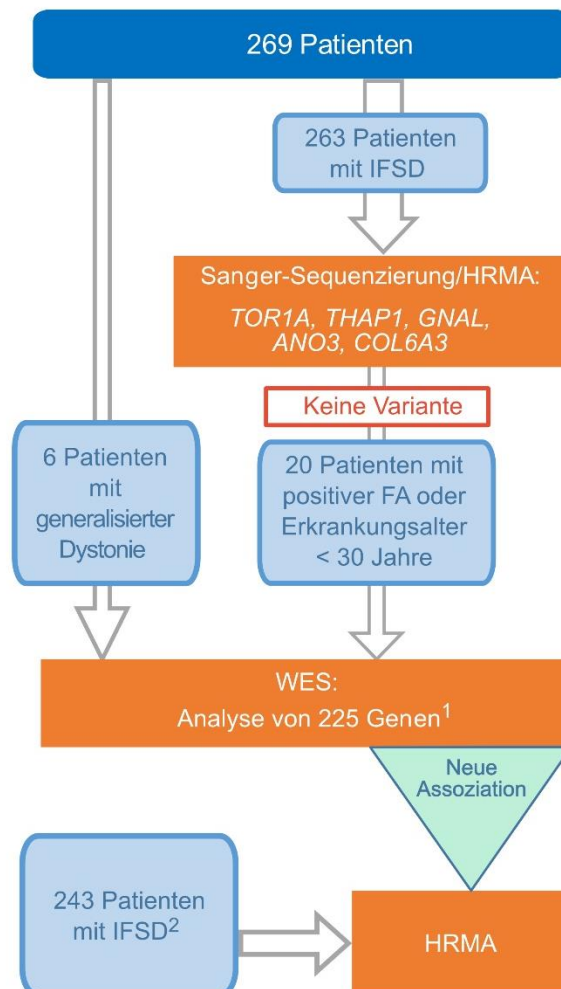


Abb. 22: Strategie der molekulargenetischen Untersuchungen der Kohorte

IFSD: isolierte fokale bzw. segmentale Dystonie; FA: Familienanamnese; HRMA: hochauflösende Schmelzkurvenanalyse; WES: Exom-Sequenzierung.

¹: siehe Tab. 11

²: Patienten mit IFSD ausgenommen der mittels WES analysierten 20 Patienten

3.2.1 Sanger-Sequenzierung von *TOR1A*, *THAP1* und *COL6A3* und HRMA von *GNAL* und *ANO3* in 263 Patienten mit IFSD

Im folgenden Abschnitt sind die identifizierten Varianten der Sanger-Sequenzierung und HRMA aufgeführt. Die Allelfrequenzen der Varianten wurden in folgenden Datenbanken bestimmt: In der hausinternen Exom-Datenbank (bestehend aus den WES-Daten von insgesamt 5.700 nicht neurologischen Kontrollprobanden), in der ExAC (Exome Aggregation Consortium) - Datenbank (Lek et al., 2016) und in gnomAD (Genome Aggregation Database) Version v.2.1.1 (Karczewski et al., 2020). Zudem wurden die phylogenetischen Konservierungen betrachtet, die Varianten anhand der Ergebnisse der In-silico-Prädiktionsprogramme SIFT, Polyphen2 und CADD charakterisiert und die klinischen Phänotypen beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tab. 18 zusammengefasst.

3.2.1.1 *TOR1A*

Variante c.962C>T (p.Thr321Met)

In *TOR1A* (NM_000113, NP_000104) konnte die heterozygote Missense-Variante c.962C>T (p.Thr321Met) in Exon 5 nachgewiesen werden (Zech et al., 2016). Die Variante ist äußerst selten und nicht in der hausinternen Exom-Datenbank vertreten. Innerhalb der europäischen Allele findet sie sich zweimal in der ExAC-Datenbank (2/66738) und dreimal in gnomAD (3/129188), was Allelfrequenzen von 0,00003 und 0,00002 entspricht. *TOR1A* kodiert das Protein Torsin-1A. Das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Torsin-1A ist in Abb. 23 schematisch dargestellt und demonstriert die hohe phylogenetische Konservierung an der Position der Variante. Die Wahrscheinlichkeit eines schädigenden Effekts ist entsprechend den Ergebnissen aller drei In-silico-Prädiktionsprogramme hoch. Die Variante wurde bei einem Patienten mit isolierter segmentaler Dystonie nachgewiesen, der im Alter von 33 Jahren an einer zervikalen Dystonie und im weiteren Verlauf zusätzlich an einer oromandibulären Dystonie erkrankt war (Zech et al., 2016). Die Familienanamnese des Patienten war negativ (Zech et al., 2016).

UniProt-ID	Spezies	Δ GAG																	321											
O14656	Mensch	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	R	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
H2QZU6	Schimpanse	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	R	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
H9FQW3	Rhesusaffe	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	R	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
Q9ER39	Maus	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	K	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
Q68G38	Ratte	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	K	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
A0A1U7QT91	Goldhamster	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	R	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
W5PF91	Schaf	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	R	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
F6V735	Hund	A	D	E	M	T	F	F	P	K	E	E	R	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
M3W2T0	Katze	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	R	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
A7YX22	Schwein	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	R	V	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
H7APJ8	Pferd	A	E	E	M	T	F	F	P	K	E	E	R	I	F	S	D	K	G	C	K	T	V	F	T	K	L	D	Y	Y
F1P2B1	Huhn	A	D	E	M	T	Y	F	P	R	E	E	R	I	Y	S	D	K	G	C	K	T	V	D	A	K	L	D	Y	Y

Abb. 23: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Thr321Met in *TOR1A*

Schematisch dargestellt ist das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Torsin-1A. Die Position der Variante p.Thr321Met ist rot markiert. Δ GAG kennzeichnet die wiederkehrende pathogene Variante c.907_909delGAG, (p.Glu303del). Alignment wurde mit dem Align-Tool erstellt (Pundir et al., 2016); UniProt-ID der Proteine nach UniProt (UniProt Consortium, 2018). Grün: nicht konservierte Aminosäuren.

3.2.1.2 *THAP1*

In der kompletten proteinkodierenden Sequenz von *THAP1* konnten mittels Sanger-Sequenzierung keine seltenen Varianten identifiziert werden.

3.2.1.3 *GNAL*

In allen mittels HRMA untersuchten Exonen von *GNAL* konnten keine seltenen Varianten ermittelt werden.

3.2.1.4 *COL6A3*

Variante c.9017A>G (p.Lys3006Arg)

In Exon 41 von *COL6A3* (NM_004369, NP_004360) wurde die heterozygote Missense-Variante c.9017A>G (p.Lys3006Arg) identifiziert. In der nachfolgenden Sanger-Sequenzierung der gesamten proteinkodierenden Sequenz von *COL6A3* konnte keine weitere seltene Variante nachgewiesen werden. Die Variante c.9017A>G (p.Lys3006Arg) ist innerhalb der europäischen Allele in der ExAC-Datenbank und in

gnomAD nicht annotiert. Innerhalb der ostasiatischen Allele ist sie mit einer Allelfrequenz von 0,01874 (162/8644) in der ExAC-Datenbank und 0,01754 (350/19952) in gnomAD hingegen deutlich häufiger und liegt zudem in beiden Datenbanken je einmal in einem homozygoten Zustand vor. In der hausinternen Exom-Datenbank beträgt die Allelfrequenz 0,00035; sie ist viermal in einem heterozygoten Zustand vertreten (4/11400). *COL6A3* kodiert das Protein Alpha-3-Typ-VI-Kollagen. Die Position der Variante ist innerhalb der Proteinhomologe von Alpha-3-Typ-VI-Kollagen verschiedener Spezies nicht konserviert (Abb. 24). Die In-silico-Prädiktionsprogramme schätzen eine schädigende Auswirkung der Variante einheitlich als unwahrscheinlich ein. Die Variante wurde bei einer Patientin identifiziert, die mit 50 Jahren an einer fokalen zervikalen Dystonie erkrankt war. Die Familienanamnese war positiv und ein Bruder hatte ebenfalls eine fokale zervikale Dystonie. Leider standen weder der Bruder noch weitere Angehörige für eine Segregationsanalyse der Variante zur Verfügung. Der Stammbaum der Indexpatientin ist in Abb. 16 mit der Nummer 20 abgebildet.

UniProt-ID	Spezies	3006																												
CO6A3	Mensch	K	M	S	R	E	V	Q	V	F	E	I	T	E	N	S	A	K	L	H	W	E	R	A	E	P	P	G	P	
A0A2I3TIQ8	Schimpanse	K	M	S	R	E	V	Q	V	F	E	I	T	E	N	S	A	K	L	H	W	E	R	P	E	P	P	G	P	
F7AG99	Rhesusaffe	K	V	S	R	E	V	Q	V	S	E	I	T	E	N	S	A	R	L	H	W	E	R	P	E	P	P	S	P	
E9PWQ3	Maus	R	V	S	R	E	V	Q	V	S	E	V	T	E	N	S	A	R	L	H	W	E	R	P	E	P	S	S	S	
D0G7D9	Goldhamster	R	V	S	R	E	V	Q	V	S	E	V	T	E	N	S	A	R	L	H	W	E	R	P	E	P	S	G	S	
W5QCP9	Schaf	K	A	P	R	E	V	H	V	S	E	V	T	E	N	S	A	R	L	H	W	E	R	P	E	P	P	S	P	
F1PR31	Hund	K	A	T	R	E	V	R	V	S	D	I	T	E	N	S	A	K	L	H	W	E	R	P	E	P	P	S	P	
I3LUR7	Schwein	*	E	A	A	K	V	H	V	S	E	I	T	E	N	S	A	K	L	H	W	E	R	P	E	P	P	S	P	
F6R735	Pferd	K	A	S	R	E	V	Q	V	S	E	I	T	E	N	S	A	K	L	H	W	E	R	P	E	P	P	S	P	
E1BVP3	Huhn	A	K	M	N	D	I	Q	I	T	D	V	T	E	N	S	A	R	L	R	W	A	S	P	E	P	H	N	A	
F1Q4X1	Zebrafisch	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	E	P	C	S	L	D	F	D	T	G	L	P	C	K	D

Abb. 24: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Lys3006Arg in *COL6A3*

Schematisch dargestellt ist das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Alpha-3-Typ-VI-Kollagen. Die Position der Variante p.Lys3006Arg ist rot markiert. Alignment wurde mit dem Align-Tool erstellt (Pundir et al., 2016); UniProt-ID der Proteine nach UniProt (UniProt Consortium, 2018). Grün: nicht konservierte Aminosäuren; Stern: fehlende Aminosäuren.

Variante c.9245C>G (p.Pro3082Arg)

Bei zwei nicht verwandten Patienten konnte in Exon 42 von *COL6A3* (NM_004369, NP_004360) die heterozygote Missense-Variante c.9245C>G (p.Pro3082Arg) nachgewiesen werden. An die Identifikation der beiden heterozygoten Varianten schloss sich die Sequenzierung der gesamten proteinkodierenden Sequenz von *COL6A3* an, in der bei keinem der beiden Patienten weitere Varianten identifiziert werden konnten. In der hausinternen Exom-Datenbank beträgt die Allelfrequenz der Variante 0,00123 (14/11400), innerhalb der europäischen Allele in der ExAC-Datenbank 0,00143 (95/6660) und innerhalb der europäischen Allele in gnomAD 0,00112 (144/129170). Die Position der Variante ist phylogenetisch nicht in allen Proteinhomologen konserviert (Abb. 25) und die Ergebnisse der In-silico-Prädiktionsprogramme sprechen gegen einen schädigenden Effekt. Die Variante wurde jeweils bei einem Mann und einer Frau nachgewiesen, die im Alter von 65 und 75 Jahren an einem fokalen Blepharospasmus erkrankt waren. Die Familienanamnese war in beiden Fällen negativ.

UniProt-ID	Spezies	3082																											
CO6A3	Mensch	H	G	S	*	*	F	S	T	K	K	S	Q	P	P	P	Q	P	A	R	S	A	S	S	S	T	I	N	
A0A2I3TIQ8	Schimpanse	H	G	S	*	*	F	S	T	K	K	S	Q	P	P	P	Q	P	A	R	S	A	S	S	S	T	I	N	
F7AG99	Rhesusaffe	H	G	S	*	*	F	S	T	K	K	S	Q	P	P	P	Q	P	A	R	S	A	S	S	S	T	I	N	
E9PWQ3	Maus	Q	G	S	*	*	F	N	T	K	K	T	Q	P	P	L	Q	A	A	H	R	A	S	S	S	T	I	N	
D0G7D9	Goldhamster	Q	G	S	*	*	F	N	T	K	K	T	Q	P	P	L	Q	P	A	R	P	A	S	S	S	T	I	N	
W5QCP9	Schaf	Q	G	S	*	*	F	S	T	K	K	I	Q	L	P	P	Q	A	E	R	S	A	S	S	A	T	V	N	
F1PR31	Hund	Q	G	S	*	*	F	S	T	K	K	A	Q	P	P	*	S	Q	A	R	L	A	S	S	S	T	V	N	
I3LUR7	Schwein	H	G	S	*	*	F	S	T	S	K	S	T	V	*	*	G	L	W	K	V	A	S	S	S	T	I	N	
F6R735	Pferd	Q	G	S	*	*	F	S	T	K	K	T	P	P	P	P	Q	P	A	R	S	A	S	S	S	T	I	N	
E1BVP3	Huhn	T	G	T	*	*	F	S	T	K	T	P	A	Q	P	K	V	*	*	*	*	*	*	*	*	A	L	A	N
F1Q4X1	Zebrafisch	Q	R	A	A	D	E	H	I	K	A	V	L	P	P	A	P	A	P	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Abb. 25: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Pro3082Arg in *COL6A3*

Schematisch dargestellt ist das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Alpha-3-Typ-VI-Kollagen. Die Position der Variante p.Pro3082Arg ist rot markiert. Alignment wurde mit dem Align-Tool erstellt (Pundir et al., 2016); UniProt-ID der Proteine nach UniProt (UniProt Consortium, 2018). Grün: nicht konservierte Aminosäuren; Stern: fehlende Aminosäuren.

3.2.1.5 ANO3

Variante c.1387G>A (p.Val463Met)

In *ANO3* (NM_031418, NP_113606) konnte die heterozygote Missense-Variante c.1387G>A (p.Val463Met) in Exon 14 nachgewiesen werden (Zech et al., 2017). Die Variante ist sehr selten und in keiner der Datenbanken (hausinterne Exom-Datenbank, ExAC-Datenbank, gnomAD) aufgeführt. *ANO3* kodiert das Protein Anoctamin-3. Das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Anoctamin-3 ist in Abb. 26 schematisch dargestellt und demonstriert die hohe phylogenetische Konservierung an der Position der Variante. Die Ergebnisse der In-silico-Prädiktionsprogramme sind einheitlich: Während SIFT keine pathogene Auswirkung der Variante prognostiziert, weisen die Ergebnisse von PolyPhen2 und CADD auf einen schädigenden Einfluss der Variante hin. Die Variante wurde bei einer Frau mit Blepharospasmus identifiziert, die im Alter von 50 Jahren erkrankte und keine weiteren betroffenen Familienangehörigen hatte (Zech et al., 2017).

UniProt-ID	Spezies	463																												
Q9BYT9	Mensch	Q	R	L	N	D	S	C	I	Y	A	K	V	T	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
H2Q3B5	Schimpanse	Q	R	L	N	D	S	C	I	Y	A	K	V	T	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
F6RSE7	Rhesusaffe	Q	R	L	N	D	S	C	I	Y	A	K	V	T	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
A2AHL1	Maus	Q	R	L	N	D	S	C	I	Y	A	K	V	T	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
F1M0A0	Ratte	Q	R	L	N	D	S	C	I	Y	A	K	V	T	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
W5PXE9	Schaf	Q	R	L	N	D	S	C	I	Y	A	K	V	T	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
F1PA73	Hund	Q	R	L	N	E	S	C	I	Y	A	K	V	T	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
A0A2I2UMS2	Katze	Q	R	L	N	E	S	C	I	Y	A	K	V	T	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
A0A287A3U4	Schwein	Q	R	L	N	E	S	C	I	Y	A	K	V	T	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
F6Z5U6	Pferd	Q	R	L	N	D	S	C	I	Y	A	K	V	S	Y	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
E1BVP3	Huhn	Q	R	L	N	E	S	C	I	Y	A	K	V	T	H	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A
X1WC49	Zebrafisch	W	T	L	S	D	S	C	V	Y	A	K	V	T	H	L	F	D	N	G	G	T	V	F	F	A	I	F	M	A

Abb. 26: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Val463Met in *ANO3*

Schematisch dargestellt ist das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Anoctamin-3. Die Position der Variante p.Val463Met ist rot markiert. Alignment wurde mit dem Align-Tool erstellt (Pundir et al., 2016); UniProt-ID der Proteine nach UniProt (UniProt Consortium, 2018). Grün: nicht konservierte Aminosäuren.

Tab. 18: Durch Sanger-Sequenzierung von *TOR1A*, *THAP1* und *COL6A3* und HRMA von *GNAL* und *ANO3* identifizierte seltene Varianten in 263 Patienten mit IFSD

Gen	Variante ^a	Allelfrequenz in Datenbanken			Ergebnisse der In-silico-Prädiktionsprogramme			Klinische Merkmale/Phänotyp					
		ExAC ^b	gnomAD ^c v2.1.1	hauseigene Exom- Datenbank ^d	SIFT (Score)	PolyPhen2 (Score)	CADD	G	Er- krankungs- alter	Ver- teilung	Betroffene Regionen (Erstmanifestation)	Tremor	Familien- anamnese
<i>TOR1A</i>	c.962C>T p.Thr321Met	EA: 0,00003	EA: 0,00002	-	damaging (0,03)	probably damaging (1,0)	29,6	m	33	seg	<u>zervikal</u> , oromandibulär	nein	negativ
<i>COL6A3</i>	c.9017A>G p.Lys3006Arg	EA: - OA: 0,01874	EA: - OA: 0,01754	0,00035	tolerated (0,23)	benign (0,002)	0,1	f	50	fok	<u>zervikal</u>	nein	positiv
<i>COL6A3</i>	c.9245C>G p.Pro3082Arg	EA: 0,00143	EA: 0,00112	0,00123	tolerated (0,17)	benign (0,11)	15,7	f	75	fok	<u>Blepharospasmus</u>	nein	negativ
<i>COL6A3</i>	c.9245C>G p.Pro3082Arg	EA: 0,00143	EA: 0,00112	0,00123	tolerated (0,17)	benign (0,11)	15,7	m	65	fok	<u>Blepharospasmus</u>	nein	negativ
<i>ANO3</i>	c.1387G>A p.Val463Met	-	-	-	tolerated (0,08)	probably damaging (0,999)	24	f	50	fok	<u>Blepharospasmus</u>	nein	negativ

EA: Europäische, nicht finnische Allele; OA: Ostasiatische Allele; G: Geschlecht; m: männlich; f: weiblich; seg: segmental; fok: fokal. ^aNummerierung entsprechend NM_000113 und NP_000104 für *TOR1A*, NM_031418 und NP_113606 für *ANO3* und NM_004369 und NP_004360 für *COL6A3*. ^b(Lek et al., 2016); ^c(Karczewski et al., 2020); ^dbestehend aus den WES-Daten von 5700 nicht neurologischen Kontrollprobanden.

3.2.2 WES in 26 ausgewählten Fällen

Exemplarisch wird in der nachfolgenden Tab. 19 die WES-Statistik von sechs Patienten mit generalisierter Dystonie aufgeführt.

Tab. 19: WES-Statistik von Patienten mit generalisierter Dystonie

Patient	Reads	Gemappte Reads	Prozent	Gemappte Sequenz (GB)	Coverage des Zielbereichs				Durchschnittliche Coverage	Anzahl Varianten
					> 1x	> 4x	> 8x	> 20x		
G1	85.480.684	85.371.702	99,87	8,63	99,85	99,58	99,1	96,16	107,6	24.472
G2	96.281.590	96.146.663	99,86	9,72	99,76	99,6	99,36	97,69	122,44	24.615
G3	116.714.305	116.519.263	99,83	11,79	99,77	99,65	99,51	98,41	140,28	24.724
G4	99.987.536	99.837.319	99,85	10,10	99,77	99,62	99,42	97,96	125,73	24.086
G5	123.825.063	123.550.183	99,78	12,51	99,78	99,66	99,52	98,47	147,22	24.584
G6	111.545.754	111.313.621	99,79	11,27	99,89	99,76	99,58	98,25	136	24.817
Schnitt	105.639.155	105.456.459	99,83	10,67	99,80	99,65	99,42	97,82	129,88	24.550
Gesamt	633.834.932	632.738.751		64,02						147.298

GB: Gigabasen

Die WES der sechs Patienten erzeugte zusammengenommen 633.834.932 einzelne *Reads*, deren genomische Position entsprechend des Referenzgenoms (GRCh37) in durchschnittlich 99,8 % der Fälle ermittelt werden konnte (*Gemappte Reads*). Im Schnitt wurden die Zielregionen 129,88-fach abgedeckt, mit einer mindestens 20-fachen *Coverage* in 97,82 % der Fälle. Insgesamt wurden 147.298 Varianten identifiziert, was durchschnittlich 24.550 synonymen und nicht-synonymen Varianten pro Patienten entsprach.

Im ersten Schritt der Variantenfilterung wurden Varianten selektiert, die innerhalb der in Tab. 11 aufgeführten 225 Dystonie-assoziierten Genen lagen. Nach Abschluss des darauffolgenden dreistufigen Filterungsprozesses (Abb. 8), konnte die Anzahl der Varianten auf ein bis drei Varianten pro Patienten reduziert werden. Anschließend wurden die Erbgänge der gefilterten Varianten betrachtet. Hier zeigte sich, dass innerhalb der rezessiven Gene nur heterozygote Varianten und keine homozygoten oder compound-heterozygoten Varianten identifiziert werden konnten. Die heterozygoten Varianten

dieser Gene wurden aus diesem Grund nicht weiter berücksichtigt. Insgesamt konnten drei Varianten in zwei Genen identifiziert werden, die mit einem autosomal-dominanten Erbgang assoziiert sind und als potenziell krankheitsverursachende Varianten im nachfolgenden Abschnitt weiter charakterisiert werden: Zwei Varianten in *ANO3* und eine Variante in *ADCY5*. Die beiden Varianten in *ANO3* wurden bei zwei Patienten mit einer generalisierten Dystonie nachgewiesen und die Variante in *ADCY5* bei einer Patientin mit IFSD.

3.2.2.1 *ANO3*

Variante c.1528G>A (p.Glu510Lys)

Die identifizierte Missense-Variante c.1528G>A (p.Glu510Lys) befindet sich in Exon 15 von *ANO3* (NM_031418, NP_113606) (Zech et al., 2017). Die Seltenheit der Variante wird durch ihre Abwesenheit in der hausinternen Exom-Datenbank, der ExAC-Datenbank und in gnomAD verdeutlicht. *ANO3* kodiert das Protein Anoctamin-3. Das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies ist in Abb. 27 schematisch dargestellt und verdeutlicht die hohe phylogenetische Konservierung an der Position der Variante. Alle verwendeten In-silico-Prädiktionsprogramme prognostizieren einheitlich eine schädigende Auswirkung der Variante. Die Variante wurde bei einem Patienten mit generalisierter Dystonie nachgewiesen. Die klinischen Merkmale des bei Studieneinschluss 44 Jahre alten Patienten (Patient G1) sind in Tab. 13 aufgeführt. Im folgenden Abschnitt wird der Krankheitsverlauf des Patienten nach Zech et al. (2017) beschrieben: Die Dystonie begann im Alter von neun Jahren in Form eines einseitigen Schreibkrampfes und breitete sich unter Einschluss der kranialen, zervikalen und laryngealen Muskulatur sowie des Rumpfes und der unteren Extremitäten zunehmend aus. Des Weiteren bestand ein Haltetremor der oberen Extremitäten, der von myokloniformen Zuckungen überlagert wurde. Die myokloniformen Zuckungen wurden durch Bewegung und Sprechen verstärkt. Der Patient erhielt im Alter von 31 Jahren eine beidseitige tiefe Hirnstimulation (THS) des Globus pallidus internus, die bis auf eine residuelle Fußdystonie zu einer deutlichen Reduktion der dystonen Symptome und des Tremors führte. Die Myoklonien bestanden weiterhin und traten bei der Untersuchung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses in generalisierter Verteilung auf, wobei sie nur durch die Ausführung bestimmter Bewegungen und durch Sprechen induziert wurden

(Zech et al., 2017). Die Familienanamnese des Patienten war negativ. Im Rahmen der Segregationsanalyse wurde Exon 15 von *ANO3* in der genomischen DNA von insgesamt sieben gesunden Angehörigen (Geschwister III.2, III.3, III.5, III.6, III.10, III.11 und die Mutter II.11 des Patienten) mittels Sanger-Sequenzierung analysiert (Abb. 28). Dabei zeigte sich eine vollständige Kosegregation der Variante mit der Erkrankung; alle untersuchten Familienangehörigen waren Träger des Wildtyps (WT) (Zech et al., 2017). Des Weiteren konnte durch eine Haplotypen-Analyse der untersuchten Familienmitglieder gezeigt werden, dass der verstorbene Vater ein Wildtyp-Allel an insgesamt fünf Kinder inklusive des erkrankten Indexpatienten weitergegeben hatte und die Variante im Genom des Indexpatienten somit de-novo entstanden war (Zech et al., 2017).

UniProt-ID	Spezies	510																													
Q9BYT9	Mensch	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	T	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	K	M	E	
H2Q3B5	Schimpanse	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	E	T	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	K	M	E
F6RSE7	Rhesusaffe	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	E	T	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	K	M	E
A2AHL1	Maus	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	E	T	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	R	M	E
F1M0A0	Ratte	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	E	T	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	R	M	E
W5PXE9	Schaf	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	E	T	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	K	M	E
F1PA73	Hund	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	E	T	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	K	M	E
A0A2I2UMS2	Katze	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	E	T	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	K	M	E
A0A287A3U4	Schwein	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	E	T	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	K	M	E
F6Z5U6	Pferd	L	T	Y	T	W	D	L	I	E	W	E	E	E	E	E	E	T	V	R	P	Q	F	E	A	K	Y	Y	K	M	E
E1BVP3	Huhn	L	T	Y	D	W	D	L	I	D	W	E	D	E	E	E	E	E	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	S	Q	V	E
X1WC49	Zebrafisch	L	T	Y	D	W	D	L	I	D	W	E	E	E	E	E	E	E	L	R	P	Q	F	E	A	K	Y	S	R	K	E

Abb. 27: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Glu510Lys in *ANO3*

Schematisch dargestellt ist das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Anoctamin-3. Die Position der Variante p.Glu510Lys ist rot markiert. Alignment wurde mit dem Align-Tool erstellt (Pundir et al., 2016); UniProt-ID der Proteine nach UniProt (UniProt Consortium, 2018). Grün: nicht konservierte Aminosäuren.

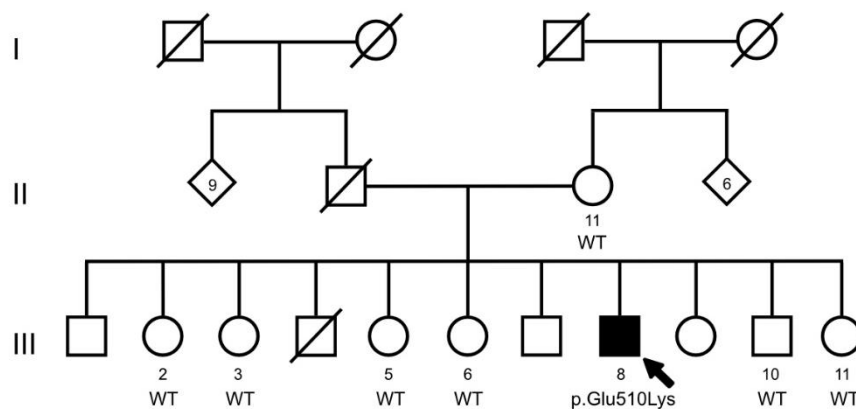


Abb. 28: Stammbaum des Indexpatienten mit der Variante p.Glu510Lys in *ANO3*

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; Raute: Geschlecht nicht bekannt; Raute mit Zahl: Anzahl der Geschwister mit unbekanntem Geschlecht; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: Indexpatient; römische Ziffern: Generationen; arabische Ziffern: Nummerierung der Personen in einer Generation. WT: Wildtyp. Modifiziert nach Zech et al. (2017).

Variante c.1969G>A (p.Ala657Thr)

In Exon 19 von *ANO3* konnte die Missense-Variante c.1969G>A (p.Ala657Thr) nachgewiesen werden (Zech et al., 2017). Sie ist äußerst selten und findet sich weder in der hausinternen Exom-Datenbank noch in der ExAC-Datenbank oder in gnomAD. Auf Proteinebene führt die Variante zu einer Aminosäuresubstitution innerhalb der evolutionär stark konservierten Aminosäuresequenz der fünften Transmembrandomäne des Transmembranproteins Anoctamin-3. Das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Anoctamin-3 in Abb. 29 demonstriert die hochkonservierte Position der Variante. Die Ergebnisse der In-silico-Prädiktionsprogramme deuten einheitlich auf einen pathogenen Effekt der Variante hin. Die Variante wurde bei einer Patientin mit generalisierter Dystonie nachgewiesen. Die klinischen Merkmale der bei Studieneinschluss 42 Jahre alten Patientin (Patient G4) sind in Tab. 13 aufgeführt. Im folgenden Abschnitt wird der Krankheitsverlauf der Patientin nach Zech et al. (2017) beschrieben: Erste Symptome begannen im Alter von 12 Jahren in Form von unwillkürlichen Zuckungen des linken Fußes. Etwa drei bis vier Jahre später kamen unnatürliche Haltungen des Kopfes und des Rumpfes als weiteres Symptom dazu. Zusätzlich zu einer schweren generalisierten Dystonie des Rumpfes, aller Extremitäten sowie der zervikalen und laryngealen Muskulatur bestanden als zusätzliche motorische Symptome ein

rechtsbetonter Halte- und Aktionstremor der Arme sowie myokloniforme Zuckungen der Rumpfmuskulatur und unteren Extremitäten, die durch abrupte Bewegungen ausgelöst wurden (Zech et al., 2017). Die einzige kraniale Manifestation bildete eine Dystonie der Zungenmuskulatur, die oromandibuläre und periorbitale Region waren bei der Untersuchung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses nicht betroffen (Tab. 13). Die Familienanamnese der Patientin war negativ. Im Rahmen der Segregationsanalyse wurde Exon 19 von *ANO3* in der genomischen DNA der gesunden Mutter (I.2) und des gesunden Bruders (II.1) mittel Sanger-Sequenzierung analysiert (Abb. 30). Die Variante konnte bei beiden Angehörigen nicht nachgewiesen werden (Zech et al., 2017).

UniProt-ID	Spezies	657																											
Q9BYT9	Mensch	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
H2Q3B5	Schimpanse	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
F6RSE7	Rhesusaffe	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
A2AHL1	Maus	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
F1M0A0	Ratte	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
W5PXE9	Schaf	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
F1PA73	Hund	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
A0A2I2UMS2	Katze	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
A0A287A3U4	Schwein	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
F6Z5U6	Pferd	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	V	G	H	P	G
E1BVP3	Huhn	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	I	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	A	G	R	P	G
X1WC49	Zebrafisch	M	F	L	F	Q	F	V	N	L	N	S	S	T	F	Y	I	A	F	F	L	G	R	F	A	G	R	P	G

Abb. 29: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Ala657Thr in *ANO3*

Schematisch dargestellt ist das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Anoctamin-3. Die Position der Variante p.Ala657Thr ist rot markiert. Alignment wurde mit dem Align-Tool erstellt (Pundir et al., 2016); UniProt-ID der Proteine nach UniProt (UniProt Consortium, 2018). Grün: nicht konservierte Aminosäuren.

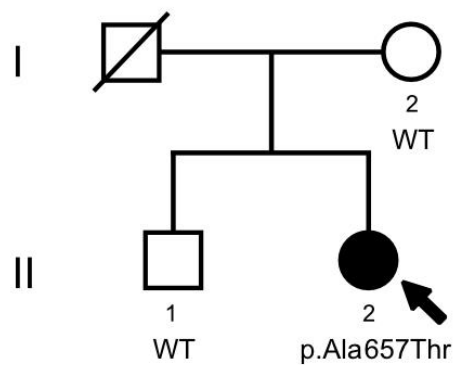


Abb. 30: Stammbaum der Indexpatientin mit der Variante p.Ala657Thr in *ANO3*

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: Indexpatient; römische Ziffern: Generationen; arabische Ziffern: Nummerierung der Personen in einer Generation. WT: Wildtyp. Modifiziert nach Zech et al. (2017).

3.2.2.2 *ADCY5*

Variante c.2180G>A, p.Arg727Lys

Die Missense-Variante c.2180G>A (p.Arg727Lys) wurde in Exon 10 von *ADCY5* (NM_183357 und NP_899200) detektiert (Zech et al., 2017). Die Variante ist extrem selten und weder in der hausinternen Exom-Datenbank, noch in der ExAC-Datenbank oder in gnomAD aufgeführt. *ADCY5* kodiert das Protein Adenylatcyclase-5. Die Variante liegt innerhalb einer phylogenetisch hochkonservierten Region des Proteins, in der bereits zwei Varianten identifiziert werden konnten: p.Leu720Pro (D. H. Chen et al., 2015) und p.Ala726Thr (Y. Z. Chen et al., 2012). Das Alignment der Proteinhomologe von Adenylatcyclase-5 verschiedener Spezies ist in Abb. 31 dargestellt und demonstriert den hohen Grad der evolutionären Konservierung. Eine pathogene Auswirkung der Variante wird von allen In-silico-Prädiktionsprogrammen mit hoher Wahrscheinlichkeit prognostiziert. Die Variante wurde bei einer 52 Jahre alten Patientin mit einer fokalen zervikalen Dystonie mit dystonem Kopftremor nachgewiesen (Zech et al., 2017). Die Erkrankung begann im Alter von 29 Jahren in Form eines Kopftremors, gefolgt von Drehungen des Kopfes zur rechten Seite (Zech et al., 2017). Die Patientin konnte die Symptome mit einer *geste antagoniste* lindern: das Berühren

des Kinns mit der Hand führte zu einer deutlichen Abnahme der unwillkürlichen Bewegungen (Zech et al., 2017). Der restliche neurologische Status der Patientin war zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses unauffällig (Zech et al., 2017). Die Familienanamnese der Patientin war positiv. Die älteste Tochter (III.3) der Indexpatientin (II.3) war ebenfalls seit dem 29. Lebensjahr an einer fokalen zervikalen Dystonie mit dystonem Kopftremor erkrankt (Abb. 32) (Zech et al., 2017). Die neurologische Untersuchung der Tochter zeigte bei Studieneinschluss keine weiteren Auffälligkeiten (Zech et al., 2017). Im Rahmen der Segregationsanalyse wurde die Sequenz von Exon 10 von *ADCY5* in der genomischen DNA der gesunden Mutter (I.2) sowie der erkrankten (III.3) und der gesunden Tochter (III.4) analysiert (Abb. 32). Dabei zeigte sich eine vollständige Kosegregation der Variante mit der Erkrankung: Während bei beiden gesunden Angehörigen ein Wildtyp vorlag, konnte bei der erkrankten Tochter ebenfalls die Variante c.2180G>A (p.Arg727Lys) in *ADCY5* nachgewiesen werden (Zech et al., 2017).

UniProt-ID	Spezies		720		726 727																									
O95622	Mensch	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
H2QN88	Schimpanse	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
A0A2R8QEV2	Rhesusaffe	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
P84309	Maus	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
Q04400	Ratte	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
P40144	Kaninchen	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
P30803	Hund	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
M3VVP2	Katze	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
I3L9P4	Schwein	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
F65VW7	Pferd	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
A0A1D5P0J0	Huhn	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	R	K
D2CFN3	Zebrafisch	N	P	E	D	E	V	D	E	F	L	G	R	A	I	D	A	R	S	I	D	R	L	R	S	E	H	V	V	K

Abb. 31: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Arg727Lys in *ADCY5*

Schematisch dargestellt ist das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Adenylatcyclase-5. Die Position der Variante p.Arg727Lys ist rot markiert. Die Position der Variante p.Ala726Thr ist lila markiert und die Position der Variante p.Leu720Pro ist gelb markiert. Alignment wurde mit dem Align-Tool erstellt (Pundir et al., 2016); UniProt-ID der Proteine nach UniProt (UniProt Consortium, 2018). Grün: nicht konservierte Aminosäuren.

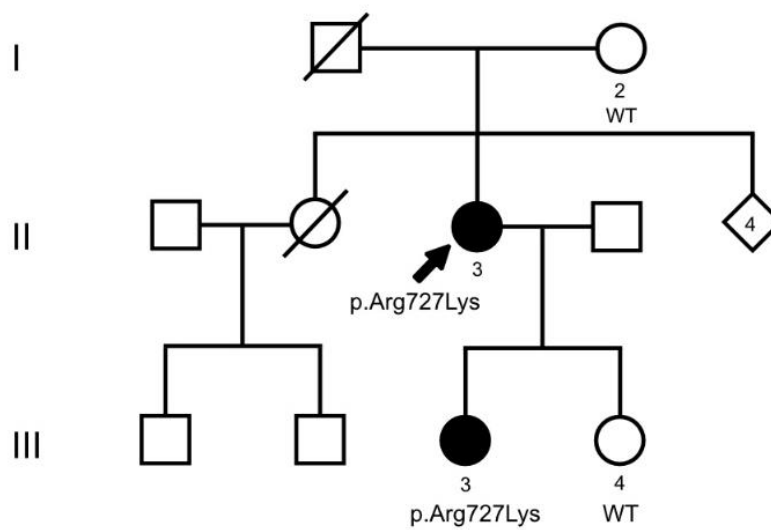


Abb. 32: Stammbaum der Indexpatientin mit der Variante p.Arg727Lys in *ADCY5*

Quadrat: Mann; Kreis: Frau; Raute: Geschlecht nicht bekannt; Raute mit Zahl: Anzahl der Geschwister mit unbekanntem Geschlecht; schwarz: erkrankt; weiß: gesund; durchgestrichen: verstorben; Pfeil: Indexpatient; römische Ziffern: Generationen; arabische Ziffern: Nummerierung der Personen in einer Generation. WT: Wildtyp. Modifiziert nach Zech et al. (2017).

Tab. 20: Durch WES identifizierte und nach Variantenfilterung priorisierte seltene Varianten in 26 ausgewählten Fällen

Gen	Variante ^a	Allelfrequenz in Datenbanken			Ergebnisse der In-silico-Prädiktionsprogramme			Klinische Merkmale/Phänotyp					
		ExAC ^b	gnomAD ^c v2.1.1	hauseigene Exom- Datenbank ^d	SIFT (Score)	PolyPhen2 (Score)	CADD	G	Er- krankungs- alter	Ver- teilung	Betroffene Regionen (<u>Erstmanifestation</u>)	Tremor (Myoklonus)	Familien- anamnese
<i>ANO3</i>	c.1528G>A p.Glu510Lys	-	-	-	damaging (0,02)	possibly damaging (0,868)	34	m	9	gen	<u>Hand</u> , uEx, oEx, Rumpf, zervikal, laryngeal, oromandibulär, Blepharospasmus	ja (ja)	negativ
<i>ANO3</i>	c.1969G>A p.Ala657Thr	-	-	-	damaging (0)	probably damaging (1,00)	33	f	12	gen	<u>Fuß</u> , uEx, oEx, Rumpf, zervikal, laryngeal	ja (ja)	negativ
<i>ADCY5</i>	c.2180G>A p.Arg727Lys	-	-	-	damaging (0,03)	possibly damaging (0,887)	34	f	29	fok	<u>zervikal</u>	ja (nein)	positiv

G: Geschlecht; m: männlich; f: weiblich; gen: generalisiert; fok: fokal; uEx: untere Extremität; oEx: obere Extremität. ^aNummerierung entsprechend NM_031418 und NP_113606 für *ANO3* sowie NM_183357 und NP_899200 für *ADCY5*. ^b(Lek et al., 2016); ^c(Karczewski et al., 2020); ^dbestehend aus 5700 nicht neurologischen Kontrollprobanden.

3.2.3 HRMA von *ADCY5* in 243 Patienten mit IFSD

Aufgrund der Detektion einer seltenen und familiär segregierenden *ADCY5*-Variante bei einer Patientin mit IFSD erfolgte ein molekulargenetisches Screening von *ADCY5* mittels HRMA in der Patientenkohorte mit IFSD (n = 243) dieser Arbeit (ohne die für die WES ausgewählten 20 Fälle). Hierfür wurden von *ADCY5* die Abschnitte ausgewählt, die für die beiden intrazytoplasmatischen Domänen des Enzyms Adenylatcyclase-5 kodieren: Exon 2 bis Exon 11 und Exon 17 bis Exon 21. Beide Regionen sind mit pathogenen Varianten angereichert (Carapito et al., 2015; Chang et al., 2016; D. H. Chen et al., 2015; Y. Z. Chen et al., 2014; Y. Z. Chen et al., 2012; Mencacci et al., 2015a). Insgesamt konnte in der IFSD-Kohorte eine weitere seltene Variante in *ADCY5* identifiziert werden.

Variante c.1400A>G (p.Asn467Ser)

In Exon 3 von *ADCY5* wurde die Missense-Variante c.1400A>G (p.Asn467Ser) nachgewiesen (Zech et al., 2017). Sie ist äußerst selten und weder in der hausinternen Exom-Datenbank noch in der ExAC-Datenbank oder in gnomAD annotiert. Das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies an der Position der Variante ist in Abb. 33 dargestellt. Die Variante befindet sich innerhalb einer phylogenetisch hochkonservierten Region des Enzyms Adenylatcyclase-5. Die Ergebnisse aller In-silico-Prädiktionsprogrammen lassen auf einen schädigenden Effekt der Variante schließen. Die Variante wurde bei einer Patientin identifiziert, die im Alter von 26 Jahren an einer fokalen zervikalen Dystonie mit dystonem Kopftremor erkrankt war (Zech et al., 2017). Die Familienanamnese der Patientin war negativ.

UniProt-ID	Spezies	467																												
O95622	Mensch	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
H2QN88	Schimpanse	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
A0A2R8QEV2	Rhesusaffe	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
P84309	Maus	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
Q04400	Ratte	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
P40144	Kaninchen	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
P30803	Hund	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
M3VVP2	Katze	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
I3L9P4	Schwein	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
F6SVW7	Pferd	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
A0A1D5P0J0	Huhn	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S
D2CFN3	Zebrafisch	Q	E	D	M	M	F	H	K	I	Y	I	Q	K	H	D	N	V	S	I	L	F	A	D	I	E	G	F	T	S

Abb. 33: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Asn467Ser in *ADCY5*

Schematisch dargestellt ist das Alignment der Proteinhomologe verschiedener Spezies von Adenylatcyclase-5. Die Position der Variante p.Asn467Ser ist rot markiert. Alignment wurde mit dem Align-Tool erstellt (Pundir et al., 2016); UniProt-ID der Proteine nach UniProt (UniProt Consortium, 2018).

Tab. 21: Durch HRMA identifizierte seltene Varianten in *ADCY5* in 243 Patienten mit IFSD

Gen	Variante ^a	Allelfrequenz in Datenbanken			Ergebnisse der In-silico-Prädiktionsprogramme			Klinische Merkmale/Phänotyp					
		ExAC ^b	gnomAD ^c v2.1.1	hauseigene Exom- Datenbank ^d	SIFT (Score)	PolyPhen2 (Score)	CADD	G	Er- krankungs- alter	Ver- teilung	Betroffene Regionen (<u>Erstmanifestation</u>)	Tremor	Familien- anamnese
<i>ADCY5</i>	c.1400A>G p.Asn467Ser	-	-	-	damaging (0)	possibly damaging (0,954)	25	f	26	fok	<u>zervikal</u>	ja	negativ

G: Geschlecht; f: weiblich; fok: fokal. ^aNummerierung entsprechend NM_183357 und NP_899200 für *ADCY5*; ^b(Lek et al., 2016); ^c(Karczewski et al., 2020); ^dbestehend aus 5700 nicht neurologischen Kontrollen

4 Diskussion

Im Zentrum dieser Arbeit stand die systematische phänotypische und genotypische Charakterisierung einer neu rekrutierten Patientenkohorte ($n = 269$) mit Dystonie. Diese umfasste 263 (97,8 %) Patienten mit isolierter fokaler oder segmentaler Dystonie (IFSD) und 6 (2,2 %) Patienten mit generalisierter Dystonie.

4.1 Klinische Charakteristika

4.1.1 Erkrankungsalter der IFSD-Subtypen

In dieser Studie konnten Unterschiede bezüglich des durchschnittlichen Erkrankungsalters der einzelnen IFSD-Subtypen aufgezeigt werden. Das niedrigste Erkrankungsalter hatten Patienten mit einem fokalen Schreibkrampf (36,3 Jahre), gefolgt von Patienten mit einer fokalen zervikalen Dystonie (43,0 Jahre). Deutlich später begannen im Mittel der Blepharospasmus (58,7 Jahre) und die oromandibuläre Dystonie (61,4 Jahre). Die Unterschiede im durchschnittlichen Erkrankungsalter waren dabei im Vergleich der beiden früh mit den beiden spät beginnenden Formen jeweils statistisch signifikant. Die Assoziation zwischen der initial betroffenen Körperregion und dem Erkrankungsalter wurde in der Literatur bereits in mehreren Studien beschrieben (Defazio et al., 2003a; O'Riordan et al., 2004; Waddy et al., 1991; Williams et al., 2017). Am frühesten manifestiert sich die Erkrankung an den unteren Extremitäten (O'Riordan et al., 2004). In einer von kaudal nach kranial fortschreitenden Sequenz weist die Dystonie der oberen Extremitäten das nächsthöhere Erkrankungsalter auf, gefolgt von der Dystonie der laryngealen und zervikalen Region (O'Riordan et al., 2004; Williams et al., 2017). Der Blepharospasmus und die oromandibuläre Dystonie sind als kraniale Dystonien regelhaft durch das höchste Erkrankungsalter charakterisiert (O'Riordan et al., 2004; Williams et al., 2017). Betrachtet man die klinischen Daten der Patienten mit generalisierter Dystonie in der vorliegenden Arbeit, begannen erste Symptome bei drei der sechs Patienten an der unteren Extremität und im Alter von durchschnittlich sieben Jahren. In Zusammenschau der klinischen Charakteristika der generalisierten Dystonien und der IFSD-Subtypen konnte in dieser Studie die Assoziation zwischen der Region der Erstmanifestation und dem Erkrankungsalter in einer unabhängigen Kohorte repliziert werden.

4.1.2 Unterschiede zwischen Männern und Frauen innerhalb der IFSD-Subtypen

Insgesamt sind deutlich mehr Frauen (68,1 %) als Männer (31,9 %) mit IFSD in die Studie eingeschlossen worden. Dieses Verhältnis von ungefähr zwei Drittel Frauen zu einem Drittel Männer bildete sich auch innerhalb der Patienten mit Blepharospasmus und der Patienten mit segmentalen Subtypen der Dystonie ab. Ein etwas niedrigerer Anteil an Männern konnte innerhalb der Patienten mit fokaler zervikaler Dystonie (25,7 %) und ein höherer innerhalb der Patienten mit oromandibulärer Dystonie (42,9 %) festgestellt werden, wobei die Aussagekraft der Beobachtung in dieser Patientengruppe aufgrund der geringen Patientenzahl eingeschränkt ist. An einem Schreibkrampf erkrankten in dieser Studie Männer und Frauen hingegen zu gleichen Anteilen. Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten verschiedene Studien, die das Geschlechterverhältnis von Patienten mit fokalen Dystonien analysierten (Defazio et al., 2003a; Elia et al., 2006; Soland et al., 1996). Dabei zeigte sich eine weibliche Prädominanz innerhalb der fokalen kraniozervikalen Dystonien (Blepharospasmus, oromandibuläre Dystonie, fokale zervikale Dystonie), während bei Patienten mit einem Schreibkrampf sogar eine Umkehr des Verhältnisses zugunsten der Männer festgestellt wurde (Defazio et al., 2003a; Elia et al., 2006; Soland et al., 1996). Allerdings wiesen die Autoren einer dieser Studien darauf hin, dass der höhere Anteil von Frauen möglicherweise auf einem Selektionsbias beruht haben könnte (Soland et al., 1996). Beispielsweise war in der Studie von Soland et al. (1996) der Frauenanteil der Patienten, die eine ambulante Botulinumtoxin-Therapie der zervikalen Dystonie in Anspruch nahmen, höher als der Frauenanteil aller in der Klinik registrierten Patienten mit zervikaler Dystonie. Da die Studienteilnehmer der vorliegenden Arbeit in den Ambulanzen für Botulinumtoxin-Therapie rekrutiert wurden, kann folglich ein Einfluss der Rekrutierungsstrategie auf das Geschlechterverhältnis und eine damit verbundene Überrepräsentation von weiblichen Patienten nicht ausgeschlossen werden.

Nachfolgend wurde untersucht, ob innerhalb der verschiedenen IFSD-Subtypen geschlechtsspezifische Unterschiede im Erkrankungsalter vorlagen. Während beide Geschlechter ungefähr im gleichen Alter an einer fokalen zervikalen Dystonie, einem Blepharospasmus oder einem Schreibkrampf erkrankten, manifestierten sich die beiden segmentalen Subtypen bei Männern durchschnittlich 8,6 bzw. 12,0 Jahre früher als bei Frauen. Nach der Korrektur des Signifikanzniveaus für multiples Testen konnte dieser

Unterschied jedoch nicht mehr als statistisch signifikant gewertet werden. Vergleichbare Ergebnisse finden sich in einer Studie von Shang et al. (2005): Während die Autoren innerhalb der fokalen Dystonien keinen geschlechtsspezifischen Unterschied des Erkrankungsalters ermitteln konnten, erkrankten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Männer an den segmentalen Dystonien signifikant früher als Frauen (Shang et al., 2005). Zusammengefasst sind die Angaben in der Literatur bezüglich eines geschlechtsspezifischen Einflusses auf das Erkrankungsalter jedoch inkonsistent. Während in einigen Studien kein Unterschied zwischen beiden Geschlechtern festgestellt werden konnte (Camargo et al., 2014a; Chan et al., 1991; Groen et al., 2012; LeDoux et al., 2016), erkrankten Männer in anderen Studien innerhalb bestimmter klinischer Subtypen signifikant früher als Frauen (Elia et al., 2006; Williams et al., 2017). Als mögliche Ursachen wurden protektive hormonelle Faktoren und geschlechtsspezifische genetische Einflüsse angeführt (Williams et al., 2017). Die Ergebnisse einer Studie von Defazio et al. (2003a) weisen hingegen auf mögliche nicht-biologische Einflussfaktoren hin. In dieser wurde die Abhängigkeit des Erkrankungsalters vom Bildungsniveau des Patienten nachgewiesen (Defazio et al., 2003a). Ein niedrigeres Bildungsniveau war mit einem höheren Erkrankungsalter assoziiert, welches möglicherweise durch eine geringere Krankheitserkenntnis vermittelt wurde und zu einer späteren Diagnose führte (Defazio et al., 2003a). Nach der Korrektur dieser Einflussgröße konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied mehr detektiert werden (Defazio et al., 2003a). Die Autoren folgerten, dass die in der Literatur beschriebenen Unterschiede des Erkrankungsalters von Männern und Frauen auf das unterschiedliche Bildungsniveau in den untersuchten Gruppen zurückzuführen seien (Defazio et al., 2003a).

4.1.3 Unterschiede zwischen Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese innerhalb der IFSD-Subtypen

Insgesamt hatten 20,9 % der Patienten der IFSD-Kohorte eine positive Familienanamnese für eine Dystonie oder einen isolierten Kopftremor. Die Erfassung der Familienanamnese erfolgte dabei ausschließlich fremdanamnestisch durch Befragung der Indexpersonen und ist daher grundsätzlich als fehlerbehaftet anzusehen. Durch gezielte

ärztliche Nachuntersuchungen von Angehörigen konnte in verschiedenen Studien verifiziert werden, dass Patienten ihre betroffenen Familienmitglieder häufig als falsch negativ klassifiziert hatten und milde Krankheitsfälle nicht selten erst im Rahmen der Nachuntersuchungen diagnostiziert wurden (Leube et al., 1997; Martino et al., 2004; Waddy et al., 1991). Demnach ist davon auszugehen, dass der tatsächliche Anteil von Patienten mit einer positiven Familienanamnese in dieser Kohorte vermutlich größer ist als 20,9 %. Insgesamt betrachtet korrespondiert das Ergebnis dieser Arbeit mit den Ergebnissen verschiedener Studien, die in den untersuchten Patientenkohorten einen Anteil positiver Familienanamnesen von 11,5 % bis 26,7 % nachweisen konnten (Camargo et al., 2014a; Chan et al., 1991; Defazio et al., 2012; Defazio et al., 2003b; Elia et al., 2006; Groen et al., 2012; Jankovic et al., 1991; Leube et al., 1997; Maniak et al., 2003; Stojanovic et al., 1995; Waddy et al., 1991). Eine mögliche Ursache der variablen Anteile könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der jeweiligen Studienkohorte darstellen. So wurden in der Arbeit von Camargo et al. (2014a), in der 26,7% der Patienten eine positive Familienanamnese hatten, beispielsweise mehrere Mitglieder einer Familie eingeschlossen, was folglich den Anteil an Fällen mit positiver Familienanamnese erhöht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten zudem darauf hin, dass nicht alle IFSD-Subtypen gleich häufig mit einer positiven Familienanamnese assoziiert sind. Am häufigsten berichteten Patienten mit einem Schreibkrampf (33,3%) über ein familiäres Auftreten der Erkrankung, gefolgt von Patienten mit einer fokalen zervikalen und segmentalen zervikalen Dystonie mit beinahe identischen Anteilen von 29,2 % bzw. 29,7 %. Demgegenüber gaben nur 8,0 % der Patienten mit Blepharospasmus, nur ein Patient mit Meige-Syndrom (5,3 %) und kein Patient mit oromandibulärer Dystonie weitere Fälle innerhalb der Familie an.

In der Literatur finden sich bezüglich des Anteils von Patienten mit positiver Familienanamnese an den verschiedenen IFSD-Subtypen unterschiedliche Angaben (Groen et al., 2012; Williams et al., 2017). Beispielsweise variiert der Anteil von Patienten mit einem Blepharospasmus und einer positiven Familienanamnese in verschiedenen Studien zwischen 10 % und 32 % (Groen et al., 2012; Peckham et al., 2011; Williams et al., 2017). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind in einer Untersuchung von Williams et al. (2017) der Schreibkrampf nur in 9,5 % der Fälle und die fokale zervikale Dystonie nur in 17,2 % der Fälle mit einer positiven Familienanamnese assoziiert.

Laut der vorliegenden Arbeit erkrankten Patienten mit positiver Familienanamnese durchschnittlich 10,2 Jahre früher an einer IFSD als Patienten mit negativer Familienanamnese. Der Unterschied in der gesamten IFSD-Kohorte ist dabei auf das frühere Erkrankungsalter des familiären Blepharospasmus und der familiären fokalen zervikalen Dystonie zurückzuführen: Verglichen mit Patienten mit negativer Familienanamnese, erkrankten Patienten mit positiver Familienanamnese durchschnittlich 13,7 Jahre früher an einem Blepharospasmus und durchschnittlich 6,4 Jahre früher an einer fokalen zervikalen Dystonie. Beide Unterschiede sind statistisch jedoch nicht als signifikant zu werten. Innerhalb der restlichen IFSD-Subtypen erkrankten Patienten beider Gruppen durchschnittlich ungefähr im gleichen Alter. Zusammengefasst sind die Angaben in der Literatur bezüglich eines früheren Erkrankungsalters von Patienten mit positiver Familienanamnese uneinheitlich: Einige Studien beschreiben ein früheres Auftreten der familiären Dystonie (Camargo et al., 2014a; Elia et al., 2006; Groen et al., 2012; Shang et al., 2005), während andere Studien keinen Unterschied feststellen konnten (Defazio et al., 2012; Stojanovic et al., 1995; Waddy et al., 1991). Verschiedene Arbeiten konnten für die zervikale Dystonie ein signifikant früheres Erkrankungsalter der Patienten mit positiver Familienanamnese im Vergleich zu Patienten mit negativer Familienanamnese aufzeigen (Chan et al., 1991; Groen et al., 2012; Williams et al., 2017). Die Autoren Williams et al. (2017) wiesen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass das niedrigere Erkrankungsalter von Patienten mit positiver Familienanamnese einerseits auf das Vorliegen bisher nicht identifizierter Varianten mit höherer Penetranz hinweisen könnte. Andererseits erachteten sie es als wahrscheinlicher, dass das höhere Krankheitsbewusstsein bei Angehörigen von Dystoniekranke und die im Rahmen der Studie früh identifizierten betroffenen Angehörigen das niedrigere Erkrankungsalter in dieser Patientengruppe beeinflusst haben könnten (Williams et al., 2017).

4.1.4 Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne dystonen Kopftremor

Insgesamt hatten 36,7 % der Patienten mit einer zervikalen Dystonie (fokale und segmentale zervikale Dystonie) einen dystonen Kopftremor. In dieser Arbeit ist dabei ausschließlich das Vorhandensein eines dystonen Tremors (Tremor im Bereich der Dystonie (Bhatia et al., 2018)) bei zervikaler Dystonie erhoben worden. Unter

Berücksichtigung weiterer, nicht erfasster dystoner und Dystonie-assoziiertes Tremores (z.B. Tremor der Arme), ist demnach von einem höheren gesamten Anteil des Tremors auszugehen. Da das Vorhandensein eines Kopftremors während des Patienteninterviews evaluiert wurde, kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass ein diskreter Tremor nicht erkannt und der Patient falsch negativ klassifiziert wurde.

Die Koinzidenz der beiden hyperkinetischen Bewegungsstörungen Dystonie und Tremor ist in der Literatur seit langem beschrieben (Yanagisawa et al., 1972). Der Anteil von Dystoniepatienten, die zusätzlich zu einer Dystonie einen Tremor aufweisen, ist dabei sehr variabel und beträgt verschiedenen Untersuchungen zufolge zwischen 16,7 % (Defazio et al., 2013) und 60 % (Jankovic et al., 1991). Für die segmentale zervikale Dystonie wurde zudem gezeigt, dass sie signifikant häufiger mit einem dystonen Kopftremor assoziiert war als die fokale zervikale Dystonie (Rubio-Agusti et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Zusammenhang nicht repliziert werden, da der dystone Kopftremor häufiger bei der fokalen zervikalen Dystonie (37,2 %) auftrat als bei der segmentalen Form (35,2 %). Die Daten dieser Arbeit beruhen jedoch auf einer einzeitigen Evaluation der klinischen Merkmale. Es besteht daher prinzipiell die Möglichkeit, dass sich die Erkrankung bei einigen Patienten mit dystonem Tremor und fokaler Dystonie im weiteren Krankheitsverlauf zu einer segmentalen Verteilungsform ausbreitet und so zu einem höheren Anteil des Tremors innerhalb der segmentalen Fälle führt.

In dieser Arbeit wurde ein isolierter Kopftremor bei Angehörigen von Patienten mit IFSD als positive Familienanamnese gewertet. Ein Kopftremor kann prinzipiell im Rahmen verschiedener Erkrankungen auftreten und stellt insgesamt nach einem Tremor der oberen Extremitäten die zweithäufigste Manifestation des essenziellen Tremors dar (W. Chen et al., 2017). Der essenzielle Tremor ist die häufigste Bewegungsstörung bei Erwachsenen (Louis & Ferreira, 2010) und darüber hinaus durch einen hohen Anteil an familiären Fällen gekennzeichnet (Louis et al., 2001). Grundsätzlich kann vor diesem Hintergrund nicht ausgeschlossen werden, dass bei Patienten, die lediglich Angehörige mit einem Kopftremor und keine Angehörige mit einer Dystonie hatten, eine positive Familienanamnese bezüglich eines essenziellen Tremors erfasst wurde; vor allem da die Angehörigen in dieser Studie nicht direkt untersucht wurden. Folgende Merkmale des essenziellen Tremors und des isolierten Kopftremors unterstützen hingegen die Annahme, dass ein isolierter Kopftremor bei Angehörigen einen Hinweis auf

eine familiäre Dystonie darstellen kann: Ein Kopftremor manifestiert sich in Zusammenhang mit einem essentiellen Tremor typischerweise nach einem Tremor der Arme und äußerst selten vor dem 40. Lebensjahr (Louis, 2013). Studien an Familien mit einem essenziellen Tremor konnten zudem zeigen, dass ein Kopftremor innerhalb dieser Familien nicht isoliert ohne einen Armtremor auftrat (Bain et al., 1994). Des Weiteren besteht für den Kopftremor im Kontext eines essenziellen Tremors keine familiäre Häufung (Louis et al., 2013). Sein Auftreten ist vielmehr von intrinsischen biologischen Faktoren des Patienten wie Alter und Geschlecht abhängig (Louis, 2013). Im Rahmen einer zervikalen Dystonie stellte ein isolierter Kopftremor hingegen häufig das erste klinische Symptom der Erkrankung dar und klassische dystone Charakteristika entwickelten sich erst im weiteren Krankheitsverlauf (Jankovic et al., 1991; van Herwaarden et al., 1994). Der isolierte Kopftremor wird in diesem Zusammenhang als klinischer Hinweis auf eine zugrundeliegende Dystonie interpretiert (Rivest & Marsden, 1990) und Patienten mit einer Dystonie weisen häufig Angehörige mit einem Kopftremor auf (van Herwaarden et al., 1994).

Der Zusammenhang zwischen einer zervikalen Dystonie mit dystonem Kopftremor und einer positiven Familienanamnese war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Insgesamt hatten 50,9 % der Patienten mit Kopftremor und nur 16,8% der Patienten ohne Kopftremor erkrankte Angehörige. Es konnte gezeigt werden, dass die zervikale Dystonie mit dystonem Kopftremor signifikant häufiger mit einer positiven Familienanamnese assoziiert war als die zervikale Dystonie ohne Kopftremor ($p < 0,0001$). Auf einen Zusammenhang zwischen einem Kopftremor und einem familiären Tremor-Syndrom wurde bereits in einer Arbeit von Pal et al. (2000) hingewiesen. Demnach besaßen Patienten mit zervikaler Dystonie und Kopftremor signifikant häufiger Angehörige mit Kopf- und/oder Armtremor als Patienten ohne Kopftremor (Pal et al., 2000). Eine Studie von Rubio-Agusti et al. (2013) untersuchte zusätzlich das familiäre Auftreten einer Dystonie und konnte zeigen, dass die zervikale Dystonie mit dystonem Kopftremor (50%) signifikant häufiger mit einer positiven Familienanamnese assoziiert war als die zervikale Dystonie ohne Kopftremor (18%). Die relativen Anteile der familiären Fälle (50% und 18%) korrespondierten zudem mit den relativen Anteilen der in dieser Arbeit analysierten Kohorte (50,9% und 16,8%). Insgesamt konnte die vorliegende Arbeit die Ergebnisse von Rubio-Agusti et al. (2013) in einer unabhängigen Kohorte replizieren

und die Relevanz genetischer Faktoren in der Pathogenese der zervikalen Dystonie mit dystonem Kopftremor bekräftigen.

4.2 Genetische Charakteristika

4.2.1 Sanger-Sequenzierung von *TOR1A*, *THAP1* und *COL6A3* und HRMA von *GNAL* und *ANO3* in 263 Patienten mit IFSD

Insgesamt konnten durch gezielte Sanger-Sequenzierung und HRMA der Patientenkohorte mit isolierter fokaler bzw. segmentaler Dystonie (IFSD) fünf seltene heterozygote Missense-Varianten identifiziert werden: Eine bekannte Variante in *TOR1A* (1/263; 0,4%), eine neue sowie zwei bekannte Varianten in *COL6A3* (3/263; 1,1%) und eine neue Variante in *ANO3* (1/263; 0,4%).

Bei einem Patienten mit sporadischer, segmentaler Dystonie wurde die non- Δ GAG-Variante c.962C>T (p.Thr321Met) in *TOR1A* nachgewiesen (Zech et al., 2016). Sie befindet sich innerhalb einer phylogenetisch hochkonservierten Region von Exon 5, in unmittelbarer Nähe zur pathogenen Δ GAG-Variante (c.907_909delGAG) und der daraus resultierenden Glutamat-Deletion (p.Glu303del). Die identische Variante konnte unlängst bei zwei nicht verwandten Familien mit IFSD als monogene Ursache der Erkrankung identifiziert werden (LeDoux et al., 2016). Mit dem Nachweis von c.962C>T (p.Thr321Met) im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung repliziert und die klinische Relevanz der Variante bestärkt werden (Zech et al., 2016). Entsprechend des ACMG-Klassifizierungssystems (Richards et al., 2015) wird die Variante aufgrund folgender Kriterien als „wahrscheinlich pathogen“ klassifiziert (Zech et al., 2016): (1) Die Allelfrequenz in Kontrolldatenbanken entspricht der Frequenz einer sehr seltenen Variante; (2) Die Wahrscheinlichkeit eines negativen Effekts ist mehreren In-silico-Prädiktionsprogrammen zufolge hoch; (3) Die Variante befindet sich innerhalb einer phylogenetisch hochkonservierten Region; (4) Die Variante wurde bereits von LeDoux et al. (2016) in zwei Familien mit kraniozervikal betonter Dystonie vorbeschrieben.

Non- Δ GAG-Varianten in *TOR1A* und ihre pathomechanistische Relevanz in der Genese einer Dystonie haben in den vergangenen Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen (Calakos et al., 2010; Dobricic et al., 2015; Vulinovic et al., 2014; Zirn

et al., 2008). Bisher sind in der Literatur unterschiedliche heterozygote Varianten beschrieben, die phänotypisch überwiegend mit isolierter fokaler (Calakos et al., 2010; Dobricic et al., 2015; Vulinovic et al., 2014) und segmentaler Dystonie (Vulinovic et al., 2014; Zech et al., 2015a) assoziiert wurden. Eine non- Δ GAG-Variante innerhalb von Exon 5 konnte zudem bei einem Fall mit schwerer generalisierter Dystonie identifiziert werden (Zirn et al., 2008). Obwohl funktionelle Studien einiger non- Δ GAG-Varianten teilweise vergleichbare pathophysiologische Effekte wie die der Δ GAG-Deletion nachweisen konnten (Vulinovic et al., 2014; Zirn et al., 2008), ist die klinische Relevanz der non- Δ GAG-Varianten nicht abschließend geklärt. Innerhalb der Familien der Indexpatienten fanden sich beispielsweise unauffällige Variantenträger (Zirn et al., 2008) oder neben Varianten in *TOR1A* zusätzliche Varianten in anderen Dystonie-assoziierten Genen (Cheng et al., 2014; Leung et al., 2001). Des Weiteren wurden non- Δ GAG-Varianten auch bei gesunden Kontrollprobanden identifiziert (Dobricic et al., 2015; Kabakci et al., 2004; Zech et al., 2016) und eine unabhängige Replikation ist für die meisten Varianten bisher nicht erfolgt.

Die wiederkehrende pathogene Δ GAG-Deletion in *TOR1A* oder seltene Varianten in *THAP1* und *GNAL* konnten in der IFSD-Kohorte dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Innerhalb der untersuchten fünf Gene sind *TOR1A* und *THAP1* am längsten als Dystonie-assoziierte Gene etabliert und die ätiologische Relevanz beider Gene in der Pathogenese der Dystonie wird durch zahlreiche Studien bekräftigt (Charlesworth et al., 2013). Die Hauptmanifestation der Δ GAG-Deletion in *TOR1A* ist die isolierte generalisierte Dystonie mit Beginn im Kindes- bis Jugendalter (Bressman et al., 2000). Innerhalb dieses Dystonie-Syndroms stellt die *TOR1A*-Deletion insgesamt eine der häufigsten molekulargenetischen Veränderungen dar (Bressman, 2006). Neben der prädominanten generalisierten Form, an der etwa 60 % der klinisch manifesten Variantenträger erkranken, sind auch fokale und segmentale Dystonien im klinischen Spektrum der Deletion beschrieben (Bressman et al., 2000). Insgesamt betrachtet ist jedoch nur ein sehr geringer Anteil aller fokalen oder segmentalen Dystonien ätiologisch auf diese Variante zurückzuführen (Klein et al., 1999; Xiao et al., 2009). Das Ergebnis dieser Arbeit repliziert die Befunde mehrerer unabhängiger Studien, die in IFSD-Kohorten mit einer Größe von 68 bis 217 Fällen ebenfalls keine Δ GAG-Deletion in *TOR1A* detektieren konnten (Camargo et al., 2014b; Hjermind et al., 2002; Maniak et al., 2003; Wang et al., 2016; Zech et al., 2015a). Die Seltenheit dieser Variante wird

ferner durch die Ergebnisse großer Kohortenstudien verdeutlicht. So konnte innerhalb von zwei Kohorten mit > 700 bzw. > 900 IFSD-Fällen die Variante jeweils nur einmal identifiziert werden (LeDoux et al., 2016; Xiao et al., 2009). Betrachtet man die Ergebnisse von Studien mit einer höheren Nachweisquote von circa 1 %, scheint vor allem der ein- oder beidseitige Schreibkrampf eine häufige nicht generalisierte Manifestation der Δ GAG-Deletion darzustellen (Grundmann et al., 2003; Kabakci et al., 2004). In der IFSD-Kohorte der vorliegenden Arbeit waren jedoch nur 12 Patienten mit einem Schreibkrampf eingeschlossen. Der geringe Anteil dieses Phänotyps (4,6%) an den untersuchten Fällen könnte folglich zusätzlich zum fehlenden Nachweis der Variante beitragen haben.

Im Gegensatz zu *TOR1A* sind Varianten in *THAP1* durch eine höhere Penetranz von circa 50 % und einen größeren Anteil nicht generalisierter Manifestationen gekennzeichnet (Blanchard et al., 2011; Bressman et al., 2009). Dennoch beträgt die Nachweisrate klinisch relevanter Varianten bei Patienten mit einer IFSD in verschiedenen Studien weniger als 1 % (LeDoux et al., 2012; Lohmann et al., 2012; Zech et al., 2015a). Vergleichbar mit *TOR1A* scheint die *THAP1*-assoziierte IFSD ebenfalls eine bevorzugte klinische Manifestation aufzuweisen: Die zervikale Dystonie mit spasmodischer Dysphonie (Xiromerisiou et al., 2012). Eine große Analyse der klinischen Merkmale verschiedener *THAP1*-assoziiierter Fälle zeigte, dass die Erkrankung bei etwa einem Drittel der segmentalen und etwa der Hälfte der fokalen Formen als zervikale Dystonie begann (Xiromerisiou et al., 2012). Eine spasmodische Dysphonie lag insgesamt bei 50 % der segmentalen und 18,5 % der fokalen Formen vor (Xiromerisiou et al., 2012). Während die zervikale Dystonie die klinische Hauptmanifestation der IFSD-Kohorte dieser Arbeit darstellte, war die spasmodische Dysphonie die am seltensten vertretene Form: Nur 1,5 % (4/263) der Patienten der untersuchten IFSD-Kohorte wiesen eine Kombination aus zervikaler Dystonie und spasmodischer Dysphonie auf. Analog zur Δ GAG-Deletion in *TOR1A*, könnte der fehlende Nachweis von *THAP1*-Varianten somit auch auf die geringe Fallzahl des charakteristischen klinischen Subtyps der *THAP1*-assoziierten Dystonie zurückzuführen sein.

Obwohl Varianten in *GNAL* deutlich häufiger als Varianten in *TOR1A* oder *THAP1* mit dem Phänotyp einer IFSD assoziiert sind (Fuchs et al., 2013), konnte in dieser Arbeit ebenfalls keine seltene Variante in diesem Gen identifiziert werden. In der Studie von Fuchs et al. (2013) lagen bei einem Screening von familiären Fällen in etwa

19 % der untersuchten Familien Varianten in *GNAL* vor. Diese hohe Nachweisrate könnte jedoch auf die Zusammensetzung der Studienkohorte zurückzuführen sein, da ausschließlich Familien mit mehr als drei betroffenen Angehörigen eingeschlossen wurden und davon in 8 der 41 Familien eine *GNAL*-assoziierte Dystonie diagnostiziert wurde (Fuchs et al., 2013). In unterschiedlichen Arbeiten mit gemischten Kohorten aus familiären und sporadischen Fällen ist die Frequenz von *GNAL*-Varianten hingegen deutlich niedriger und variiert zwischen 0 % und 3,4 % (Charlesworth et al., 2014; K. R. Kumar et al., 2014; LeDoux et al., 2016; Ma et al., 2015b; Miao et al., 2013; Vemula et al., 2013; Zech et al., 2015a).

Der Detektion der drei heterozygoten *COL6A3*-Varianten in Exon 41 bzw. Exon 42 schloss sich die Sequenzierung des kompletten proteinkodierenden Transkripts des Gens an. Hierbei konnte jedoch in keinem der drei Fälle eine weitere seltene Variante nachgewiesen werden. Da die *COL6A3*-assoziierte Dystonie durch biallelische Varianten verursacht wird, sind die identifizierten heterozygoten Missense-Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit ohne klinische Relevanz. Das Ergebnis dieser Arbeit repliziert die Beobachtungen von Lohmann et al. (2016), die in einer vergleichbaren Studienkohorte lediglich heterozygote Varianten identifizieren konnten und unterstreicht die Seltenheit der rezessiven *COL6A3*-assoziierten Dystonie.

Mit Hilfe des HRMA-Screenings und nachfolgender Sanger-Sequenzierung gelang der Nachweis der seltenen Variante c.1387G>A (p.Val463Met) in *ANO3* bei einer Patientin mit fokalem Blepharospasmus und negativer Familienanamnese (Zech et al., 2017). Obwohl sich die *ANO3*-assoziierte Dystonie vorwiegend als tremoröse kraniozervikale Dystonie manifestiert (Stamelou et al., 2014), sind auch Fälle mit kranialer Dystonie ohne zervikale Beteiligung beschrieben (Ma et al., 2015a; Zech et al., 2014). Bei einer weiteren Patientin war ein schwerer Blepharospasmus mit Lidöffnungsapraxie das führende klinische Symptom und die zusätzlich bestehende zervikale und oromandibuläre Dystonie nur mild ausgeprägt (Miltgen et al., 2016). Obwohl der fokale Blepharospasmus der Patientin mit c.1387G>A (p.Val463Met) demnach mit dem klinischen Spektrum der *ANO3*-assoziierten Dystonie gut vereinbar war, erfüllte die Variante die formalen Kriterien einer „wahrscheinlich pathogenen“ Variante nicht hinreichend und wurde als „Variante unklarer Signifikanz“ (VUS) klassifiziert. Um die pathogene Signifikanz näher zu bestimmen, wären beispielsweise funktionelle Studien oder die unabhängige Replikation der Variante nötig gewesen. Insgesamt ist die

ANO3-assoziierte Dystonie äußerst selten: So konnte beispielsweise nur eine *ANO3*-Variante in einer Kohorte von 387 Patienten (0,3 %) nachgewiesen werden, von denen über ein Drittel eine positive Familienanamnese besaßen (Charlesworth et al., 2012). In einer Voruntersuchung aus unserem Institut betrug die Nachweisrate in einer Kohorte mit 342 Patienten 0,6 % (Zech et al., 2014) und in einer großen Studie mit 729 Patienten 1,0 % (Olschewski et al., 2019). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist somit mit den Ergebnissen aus vergleichbaren Studien vereinbar und bestätigt, dass Varianten in *ANO3* keine häufige Ursache der IFSD darstellen. Anzumerken ist, dass in einer Studie von Ma et al. (2015a) mit 6,1 % eine deutlich höhere Nachweisrate von klinisch relevanten *ANO3*-Varianten festgestellt wurde. In dieser Arbeit wurden jedoch ausschließlich familiäre Fälle untersucht und eine identische Variante in 2 von 33 Familien identifiziert (Ma et al., 2015a).

4.2.2 WES in 26 ausgewählten Fällen

Eine ausgewählte Patientengruppe mit einer hohen a-priori-Wahrscheinlichkeit für eine monogene Ätiologie der Dystonie wurde molekulargenetisch mit Hilfe der WES analysiert. Die Methode ermöglichte die Identifikation von insgesamt zwei seltenen heterozygoten Missense-Varianten in *ANO3* bei zwei Patienten mit generalisierter Dystonie und einer seltenen heterozygoten Missense-Variante in *ADCY5* bei einer Patientin mit IFSD (Zech et al., 2017). Die Nachweisrate klinisch relevanter Varianten betrug innerhalb der generalisierten Dystonien 33,3 % (2/6) und innerhalb der ausgewählten IFSD-Fälle 5,0 % (1/20). Hervorzuheben ist, dass alle drei Varianten möglicherweise nicht durch eine gezielte molekulargenetische Panel-Diagnostik erfasst worden wären, da die klinischen Präsentationen der drei Patienten außerhalb der bekannten phänotypischen Manifestationen der zwei Gene lagen.

Das Gen *ANO3* kodiert für Anoctamin-3, eine Calcium-abhängige Phospholipid-Scramblase der Anoctamin-/TMEM16-Familie (Suzuki et al., 2013; Yang et al., 2008). Phospholipid-Scramblasen regulieren die Verteilung der unterschiedlichen Phospholipide zwischen den zwei Schichten einer Plasmamembran (Suzuki et al., 2013). Anoctamin-3 wird innerhalb des zentralen Nervensystems vor allem im Striatum, Hippocampus und Kortex exprimiert (Huang et al., 2013). Die genaue physiologische

Rolle von Anoctamin-3 ist noch weitgehend unklar (Falzone et al., 2018). Die funktionelle Evaluation der pathogenen Variante c.1470G>C (p.Trp490Cys) konnte eine Beeinflussung des Calcium-Signals innerhalb des endoplasmatischen Retikulums nachweisen (Charlesworth et al., 2012).

Mittels WES konnte bei zwei Patienten mit generalisierter Dystonie der Nachweis folgender Missense-Varianten in *ANO3* erfolgen: c.1528G>A (p.Glu510Lys) bei Patient G1 und c.1969G>A (p.Ala657Thr) bei Patientin G4 (Zech et al., 2017). Während es sich bei c.1528G>A (p.Glu510Lys) um eine neue, zuvor nicht in der Literatur annotierte Variante handelte, wurde c.1969G>A (p.Ala657Thr) bereits als Ursache der Erkrankung in einer französischen Familie mit isolierter zervikaler Dystonie beschrieben (Miltgen et al., 2016). Bis zur Veröffentlichung der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen *ANO3*-Varianten in der wissenschaftlichen Literatur (Zech et al., 2017), setzten sich die bekannten *ANO3*-Varianten ausschließlich aus nicht replizierten Varianten zusammen (Charlesworth et al., 2012; Ma et al., 2015a; Miltgen et al., 2016). Neben der fehlenden Bestätigung einer kausalen Variante, stellte die hohe Frequenz von seltenen *ANO3*-Varianten in gesunden Kontrollprobanden (Zech et al., 2014) die kausale Rolle des Gens in der Ätiologie der Dystonie infrage. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Variante c.1969G>A (p.Ala657Thr) repräsentierte die erste unabhängige Replikation einer *ANO3*-Variante und bekräftigte damit die pathogene Relevanz des Gens (Zech et al., 2017). Entsprechend den Kriterien des ACMG-Klassifizierungssystems (Richards et al., 2015) wird die klinische Signifikanz von c.1969G>A (p.Ala657Thr) als „pathogen“ eingestuft (Zech et al., 2017). Die detaillierten Kriterien hierfür sind: (1) Die Variante ist äußerst selten und nicht in Kontrolldatenbanken vertreten; (2) Die Wahrscheinlichkeit eines pathogenen Effekts ist entsprechend den Ergebnissen verschiedener In-silico-Prädiktionsprogramme hoch; (3) Die Variante befindet sich innerhalb einer phylogenetisch hochkonservierten Region; (4) Die Variante wurde bereits von Miltgen et al. (2016) in einer Familien mit zervikaler Dystonie vorbeschrieben; (4) Die Variante segregiert innerhalb der Familie mit der Erkrankung. Die erste Identifikation von c.1969G>A (p.Ala657Thr) erfolgte in einer Familie mit spät beginnender, kraniozervikal betonter Dystonie (Miltgen et al., 2016). Der Stammbaum zeigte einen autosomal-dominanten Erbgang mit reduzierter Penetranz und variabler Expressivität (Miltgen et al., 2016). Der Phänotyp von Patientin G4 unterscheidet sich

dabei in mehreren Merkmalen deutlich von den Phänotypen innerhalb der beschriebenen Familie: Beginn im Kindesalter, generalisierte Verteilung der Dystonie unter Ausparung der kranialen Region, assoziierter Tremor und Myoklonus. Diese Beobachtungen unterstreichen die variable Expressivität und phänotypische Heterogenität der Variante. Innerhalb der monogenen Dystonien ist eine vergleichbare phänotypische Heterogenität mit generalisierten und fokalen bzw. segmentalen Manifestationen beispielsweise für die Δ GAG-Deletion in *TOR1A* bekannt (Gambarin et al., 2006; Opal et al., 2002).

Mit der Identifikation von c.1528G>A (p.Glu510Lys) gelang der erste Nachweis einer de-novo entstandenen *ANO3*-Variante bei einem Patienten mit Dystonie (Zech et al., 2017). Grundsätzlich stellt die Koinzidenz von einer seltenen de-novo-Variante in einem Krankheitsgen mit der entsprechenden Erkrankung (bei negativer Familienanamnese) ein starkes Argument für die Pathogenität der Variante dar (Richards et al., 2015). In Zusammenschau aller Kriterien wird die pathogene Signifikanz von c.1528G>A (p.Glu510Lys) entsprechend des ACMG-Klassifizierungssystems (Richards et al., 2015) als „wahrscheinlich pathogen“ eingestuft: (1) De-novo-Genese der Variante; (2) Lokalisation innerhalb einer hochkonservierten Proteinregion; (3) Seltenheit der Variante in Kontrolldatenbanken; (4) Hohe Wahrscheinlichkeit einer schädigenden Auswirkung entsprechend den Ergebnissen unterschiedlicher In-silico-Prädiktionsprogramme (Zech et al., 2017). Da Patient G1 die Implantation einer tiefen Hirnstimulation (THS) zur Therapie der Dystonie erhalten hatte, konnte zudem der ersten Fall einer therapeutisch wirksamen THS bei einer *ANO3*-assoziierten Dystonie beschrieben werden (Zech et al., 2017).

Durch die Identifikation beider *ANO3*-Varianten bei den Patienten G1 und G4 konnte das klinische Spektrum der *ANO3*-assoziierten Dystonie entscheidend erweitert werden: Bis zur Veröffentlichung der beiden im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Fälle (Zech et al., 2017) waren ausschließlich fokale oder segmentale Dystonien der kraniozervikalen Region oder der oberen Extremitäten bei Patienten mit *ANO3*-Varianten beschrieben (Ma et al., 2015a; Miltgen et al., 2016; Stamelou et al., 2014; Zech et al., 2014). Im Gegensatz dazu lagen die beiden Varianten dieser Arbeit bei Patienten mit einer generalisierten Verteilungsform der Dystonie vor und stellten somit die ersten Fälle einer *ANO3*-assoziierten generalisierten Dystonie dar (Zech et al., 2017). Weiterführende Studien mit einem Screening größerer Kohorten werden nötig

sein, um den Anteil von *ANO3*-Varianten innerhalb des Phänotyps der generalisierten Dystonie zu bestimmen. Die Frequenz erscheint in dieser Kohorte mit rund 33 % (2/6) außergewöhnlich hoch. Im Gegensatz dazu konnte beispielsweise in einer Studie von Charlesworth et al. (2012) keine seltene *ANO3*-Variante in insgesamt 40 Fällen von generalisierter Dystonie identifiziert werden. Seit der Veröffentlichung der in dieser Arbeit beschriebenen Fälle (Zech et al., 2017) konnten in verschiedenen Fallstudien sowohl die de-novo-Genese einer pathogenen *ANO3*-Variante, als auch die Assoziation von *ANO3* mit einer generalisierten Dystonie bestätigt werden (Nelin et al., 2018; Tunc et al., 2018; Yoo et al., 2018). Die de-novo-Variante c.1952G>A (p.Ser651Asn) wurde bei einem Patienten mit generalisierter Dystonie identifiziert, dessen Krankheitsverlauf dem von Patientin G4 entspricht: Erste Symptome der Dystonie begannen ebenfalls im Kindesalter an den unteren Extremitäten und generalisierten durch Ausbreitung der Dystonie auf Arme und Hals mit Aussparung der kranialen Muskulatur (Yoo et al., 2018). Das Auftreten multifokaler Myoklonien vervollständigte das phänotypische Bild, das somit weite Übereinstimmungen zu dem von Patientin G4 aufweist (Yoo et al., 2018). Die pathogene Signifikanz der Variante c.1952G>A (p.Ser651Asn) wurde durch die Replikation in einem weiteren Fall von generalisierter Dystonie bekräftigt (Tunc et al., 2018). Der zweite Patient litt ebenfalls an einer früh beginnenden generalisierten Dystonie mit Erstmanifestation an der unteren Extremität, multifokalen Myoklonien und dem Fehlen einer fazialen Dystonie (Tunc et al., 2018). Beide Varianten, die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Variante c.1969G>A (p.Ala657Thr) und die wiederkehrende Variante c.1952G>A (p.Ser651Asn), befinden sich in der phylogenetisch hochkonservierten Transmembrandomäne M5 von Anoctamin-3, im Abstand von nur fünf Aminosäuren zueinander (UniProt Consortium, 2018). Kürzlich konnte die Lokalisation der funktionell wichtigen Scramblase-Domäne von Anoctamin-3 aufgeklärt werden, die von den beiden benachbarten Transmembrandomänen M4 und M5 gebildet wird (Gyobu et al., 2017). Eine weitere neue *ANO3*-Variante, die phänotypisch mit einem schweren Krankheitsbild bestehend aus generalisierter Dystonie, Parkinsonismus, Ataxie, Makrozephalie und Entwicklungsverzögerung assoziiert ist (Nelin et al., 2018), befindet sich innerhalb der Transmembrandomäne M4 (UniProt Consortium, 2018). Möglicherweise beeinflussen Veränderungen der hochkonservierten Aminosäuresequenzen innerhalb dieser Regionen die Regulation der Phospholipide. Diese

Hypothese, die es in funktionellen Studien zu überprüfen gilt, könnte die pathogene Relevanz der Varianten in M4 und M5 erklären.

Das zweite Gen, in dem mittels WES eine klinisch relevante Variante identifiziert werden konnte, ist *ADCY5*. Das Gen kodiert für das Enzym Adenylatcyclase-5, das die Bildung des universellen *second messengers* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. In striatalen Neuronen ist das Enzym essenzieller Bestandteil der Signaltransduktion an Dopamin-D1-, Dopamin-D2- und Adenosin-A2-Rezeptoren (Lee et al., 2002).

Seit der Erstbeschreibung 2012 in einer Familie mit autosomal-dominanter familiärer Dyskinesie und fazialer Myokymie (FDFM) (Y. Z. Chen et al., 2012; Fernandez et al., 2001) erweiterte sich mit der Identifikation neuer Varianten und Phänotypen das klinische Spektrum *ADCY5*-assoziierter Erkrankungen (Barrett et al., 2017; Mencacci et al., 2015a; Waalkens et al., 2018). Hauptmanifestation ist eine im Kindesalter beginnende hyperkinetische Bewegungsstörung, bei der choreatiforme, dystone oder myokloniforme Symptome das klinische Bild dominieren (D. H. Chen et al., 2015; Mencacci et al., 2015a). Darüber hinaus bestehen häufig eine verzögerte motorische und sprachliche Entwicklung sowie milde kognitive Einschränkungen (Chang et al., 2016). Weitere neurologische Auffälligkeiten werden in Form von axialer Hypotonie (D. H. Chen et al., 2015), gesteigerten Reflexen (Carapito et al., 2015; Chang et al., 2016) und Augenbewegungsstörungen beschrieben (Balint et al., 2018; Chang et al., 2016; Mencacci et al., 2015a). Vor allem zu Beginn der Erkrankung treten oft episodische Exazerbationen der Dyskinesien auf (Chang et al., 2016), wobei das nächtliche Auftreten dieser Exazerbationen als differenzialdiagnostisch wegweisend und relativ charakteristisch anzusehen ist (Balint et al., 2018; Friedman et al., 2016).

Durch WES konnte die seltene Missense-Variante c.2180G>A (p.Arg727Lys) in *ADCY5* bei einer Patientin mit isolierter zervikaler Dystonie und dystonem Kopftremor identifiziert werden (Zech et al., 2017). Die Familienanamnese war positiv und die Tochter der Patientin, die die gleiche Variante aufwies, zeigte eine identische klinische Manifestation der Dystonie (Zech et al., 2017). Der Phänotyp einer IFSD wurde bis zur Veröffentlichung der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Fälle nicht mit Varianten in *ADCY5* assoziiert (Zech et al., 2017). Trotz den Ergebnissen der In-silico-Pädiktionsprogramme, der Seltenheit der Variante und der intrafamiliären Kosegregation der

Variante mit der Erkrankung, wird die Variante entsprechend des ACMG-Klassifizierungssystems als „Variante unklarer Signifikanz“ (VUS) klassifiziert, da sie die Kriterien einer „wahrscheinlich pathogenen“ Variante nicht hinreichend erfüllt (Richards et al., 2015). Möglicherweise handelt es sich bei der betroffenen Proteinregion jedoch um einen Mutations-*Hotspot*, was die Klassifikation der Variante als „wahrscheinlich pathogen“ ermöglichen würde, da hiermit ein weiteres Kriterium des ACMG-Klassifizierungssystems erfüllt wäre. Die Variante liegt innerhalb einer phylogenetisch hochkonservierten Region, direkt neben der pathogenen Variante c.2176G>A (p.Ala726Thr) (Y. Z. Chen et al., 2012) und im Abstand von sieben Aminosäuren zur Variante p.Leu720Pro (D. H. Chen et al., 2015). Die erste Variante wurde in einer großen Familie mit dem Krankheitsbild familiäre Dyskinesie und faziale Myokymie (FDFM) identifiziert, das durch distal betonte choreatiforme oder dystone Bewegungen und faziale Myoklonien gekennzeichnet ist (Y. Z. Chen et al., 2012; Fernandez et al., 2001; Raskind et al., 2009). Dabei besteht eine gewisse klinische Überschneidung zu der in dieser Arbeit identifizierten benachbarten Variante, da ein Patient der FDFM-Familie einen Kopftremor aufwies (Fernandez et al., 2001). Die pathogene Signifikanz von c.2176G>A (p.Ala726Thr) ist durch die Replikation in zwei Familien (D. H. Chen et al., 2015; Tunc et al., 2017) und durch die Ergebnisse funktioneller Studien belegt (Y. Z. Chen et al., 2014). Die weiter entfernte Variante p.Leu720Pro wurde bei einem Patienten mit Dystonie, Myoklonus, Dysarthrie und axialer Hypotonie beschrieben (D. H. Chen et al., 2015). Die Verteilung der Dystonie wurde nicht ferner spezifiziert und die klinische Signifikanz der Variante von den Autoren insgesamt als VUS klassifiziert (D. H. Chen et al., 2015). Für die Bestätigung einer möglichen *Hotspot*-Region werden ergänzende funktionelle Studien und die Identifikation zusätzlicher Varianten nötig sein.

4.2.3 HRMA von *ADCY5* in 243 Patienten mit IFSD

Mit dem Ziel, weitere Varianten in *ADCY5* zu identifizieren, die mit dem Phänotyp einer IFSD assoziiert sind, erfolgte ein Screening mittels HRMA in der IFSD-Kohorte dieser Arbeit. Dabei konnte die seltene Variante c.1400A>G (p.Asn467Ser) bei einer Patientin mit zervikaler Dystonie und dystonem Kopftremor identifiziert werden (Zech et al., 2017). Die Variante wird nach dem ACMG-Klassifizierungssystem als VUS klassifiziert

(Richards et al., 2015). Zusammengefasst betrug die Nachweisfrequenz seltener *ADCY5*-Varianten in der IFSD-Kohorte 0,8% (2/263) und korrespondierte mit den Nachweisfrequenzen von seltenen *TOR1A*- und *ANO3*-Varianten (jeweils 0,4%).

Insgesamt sind in der Literatur überwiegend Fälle mit komplexen hyperkinetischen Bewegungsstörungen (darunter variable Manifestationen von Chorea, Myoklonus, Dystonie und weiteren neurologischen Symptomen) molekulargenetisch auf das Vorhandensein seltener *ADCY5*-Varianten evaluiert worden (Carapito et al., 2015; Chang et al., 2016; D. H. Chen et al., 2015). Dieser Umstand legt nahe, dass der Phänotyp einer IFSD aufgrund der Priorisierung komplexer Fälle mit weiteren Bewegungsstörungen zuvor nicht mit Varianten in *ADCY5* assoziiert werden konnte. Dabei sind in Zusammenschau der klinischen Merkmale der publizierten *ADCY5*-Fälle unterschiedliche Ausprägungen der Dystonie, inklusive der zervikalen Dystonie, Teil der phänotypischen Präsentation (Carapito et al., 2015; Chang et al., 2016; D. H. Chen et al., 2015). Zudem wurden auch zwei Fälle mit einem horizontalen Kopftremor beschrieben: Eine Patientin mit choreatiformen Bewegungen der oberen Extremitäten, fazialen Dyskinesien und intermittierendem Kopftremor (Y. Z. Chen et al., 2012; Fernandez et al., 2001) und eine Patientin mit Kopftremor, choreatiformen Dyskinesien und Dystonie der Schulterregion und der Arme (Douglas et al., 2017). Am stärksten wird die kausale Rolle von *ADCY5* in der Entstehung einer isolierten Dystonie durch Untersuchungen aus unserem Institut bekräftigt: Im Rahmen der Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit konnten in einer zusätzlichen IFSD-Kohorte insgesamt drei weitere seltene Varianten in *ADCY5* identifiziert werden (Zech et al., 2017). Bemerkenswerterweise lag auch bei diesen Patienten eine zervikale Dystonie mit dystonem Kopftremor vor (Zech et al., 2017). Obwohl weiterführende klinische und funktionelle Studien für ein besseres Verständnis der ätiologischen Relevanz von *ADCY5* in der Pathogenese der IFSD essenziell sind, lässt der homogene Phänotyp der identifizierten Fälle und die familiäre Segregation der Variante (Zech et al., 2017) auf eine kausale Rolle von *ADCY5* schließen. Die Beobachtung von Rubio-Agusti et al. (2013) sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen zudem auf eine wichtige Rolle genetischer Faktoren in der Pathogenese der zervikalen Dystonie mit dystonem Kopftremor schließen. Möglicherweise konnte im Rahmen dieser Arbeit mit der Erweiterung des phänotypischen Spektrums von *ADCY5* eine weitere monogene Ursache der IFSD mit dystonem Kopftremor aufgeklärt werden.

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit in 33,3 % (2/6) der Fälle mit generalisierter Dystonie und in 1,5 % der Fälle mit IFSD (4/263) klinisch relevante Varianten identifiziert werden. Während dieses Ergebnis den hohen Anteil monogener Formen innerhalb der generalisierten Dystonien unterstreicht, spiegelt es die ätiologische Heterogenität der IFSD wider. Die Diskrepanz zwischen dem geringen Anteil identifizierter monogener Formen und dem hohen Anteil familiärer Fälle deutet dabei auf eine vorwiegend multifaktorielle Genese der IFSD hin. Die in dieser Arbeit ausführlich phänotypisch und genotypisch charakterisierte Kohorte kann einen wichtigen Beitrag leisten, um die multifaktorielle Basis der IFSD in weiterführenden Studien zu bestimmen.

5 Zusammenfassung

Im Zentrum dieser Arbeit stand die systematische phänotypische und genotypische Charakterisierung einer neu rekrutierten Patientenkohorte (n = 269) mit Dystonie.

Durch die Analyse der klinischen Merkmale der Patienten mit isolierter fokaler bzw. segmentaler Dystonie (IFSD) konnten Unterschiede im Erkrankungsalter der verschiedenen IFSD-Subtypen aufgezeigt werden. Dabei konnte die Assoziation zwischen dem Erkrankungsalter und der Region der Erstmanifestation der Dystonie bestätigt werden. Des Weiteren wurden Unterschiede innerhalb der einzelnen IFSD-Subtypen zwischen Männern und Frauen sowie zwischen Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese betrachtet. Das Verhältnis von Frauen zu Männern variierte dabei zwischen den einzelnen Subtypen, wobei mit Ausnahme des Schreibkrampfes, an dem gleich viele Männer wie Frauen erkrankt waren, eine weibliche Prädominanz vorlag. Während beide Geschlechter jeweils ungefähr im gleichen Alter an einer fokalen zervikalen Dystonie, einem Blepharospasmus und einem Schreibkrampf erkrankten, manifestierten sich die beiden segmentalen Subtypen bei Männern durchschnittlich 8,6 bzw. 12,9 Jahre früher als bei Frauen. Insgesamt 20,9 % der Indexpatienten mit IFSD hatten eine positive Familienanamnese für eine Dystonie oder einen isolierten Kopftremor. Die größten Anteile an familiären Fällen fanden sich beim Schreibkrampf (33,3%) sowie bei der fokalen und segmentalen zervikalen Dystonie (29,2% und 29,7%). Verglichen mit Patienten mit negativer Familienanamnese, erkrankten Patienten mit positiver Familienanamnese durchschnittlich 13,7 Jahre früher an einem Blepharospasmus und 6,4 Jahre früher an einer fokalen zervikalen Dystonie. Bei etwa einem Drittel der Patienten mit zervikaler Dystonie bestand zusätzlich ein dystoner Kopftremor. Für die zervikale Dystonie mit dystonem Kopftremor konnte ferner gezeigt werden, dass diese Form signifikant häufiger mit einer positiven Familienanamnese assoziiert war als die zervikale Dystonie ohne Kopftremor. Dieses Ergebnis bekräftigt einerseits den Kopftremor als charakteristisches Merkmal der zervikalen Dystonie und deutet gleichzeitig auf einen wichtigen Beitrag genetischer Faktoren in der Pathogenese dieses Phänotyps hin.

Die molekulargenetische Analyse der Patientenkohorte mit IFSD (n = 263) mittels Sanger-Sequenzierung von *TOR1A*, *THAP1* und *COL6A3* und hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (HRMA) von *GNAL* und *ANO3* ermöglichte die Identifikation von insgesamt fünf seltenen heterozygoten Missense-Varianten: Eine bekannte Variante in *TOR1A* (1/263; 0,4%), eine neue sowie zwei bekannte Varianten in *COL6A3* (3/263; 1,1%) und eine neue Variante in *ANO3* (1/263; 0,4%). Die identifizierten Varianten in *COL6A3* besitzen aufgrund des fehlenden Nachweises biallelischer Varianten keine klinische Relevanz. Die *ANO3*-Variante c.1387G>A (p.Val463Met) wurde bei einer Patientin mit Blepharospasmus nachgewiesen und entsprechend des ACMG (*American College of Medical Genetics*) – Klassifizierungssystems als „Variante unklarer Signifikanz“ (VUS) klassifiziert. Von besonderem Interesse ist die non- Δ GAG-Variante c.962C>T (p.Thr321Met) in *TOR1A* bei einem Patienten mit zervikaler und oromandibulärer Dystonie, da sie bereits in zwei Fällen mit familiärer IFSD beschrieben wurde und die Replikation im Rahmen dieser Arbeit die Pathogenität der Variante bekräftigt. Ihre klinische Signifikanz wurde als „wahrscheinlich pathogen“ bewertet.

Ausgewählte Patienten (n = 26) mit einer hohen a-priori-Wahrscheinlichkeit für eine genetische Ätiologie der Dystonie wurden mittels Exom-Sequenzierung (WES) analysiert. Insgesamt konnte bei zwei Patienten mit generalisierter Dystonie je eine Missense-Variante in *ANO3* und bei einer Patientin mit IFSD eine Missense-Variante in *ADCY5* nachgewiesen werden. Mit der Identifikation von c.1969G>A (p.Ala657Thr) in *ANO3* gelang erstmals die unabhängige Replikation einer Dystonie-assoziierten *ANO3*-Variante, was die kausale Relevanz des Gens in der Pathogenese der Erkrankungen entscheidend bekräftigen konnte. Die zweite *ANO3*-Variante c.1528G>A (p.Glu510Lys) stellte die erste Beschreibung einer klinisch relevanten de-novo-Variante in *ANO3* dar. Durch den Phänotyp beider Patienten mit generalisierter Dystonie konnte darüber hinaus das klinische Manifestationsspektrum von *ANO3* erweitert werden. Zusammengefasst wurde die klinische Signifikanz von c.1969G>A (p.Ala657Thr) als „pathogen“ und von c.1528G>A (p.Glu510Lys) als „wahrscheinlich pathogen“ klassifiziert. Die Variante c.2180G>A (p.Ala726Thr) in *ADCY5* wurde bei einer Patientin mit familiärer zervikaler Dystonie und dystonem Kopftremor nachgewiesen. Da das Gen zuvor nicht mit dem Phänotyp einer IFSD assoziiert worden war, erfolgte ein molekulargenetisches Screening von *ADCY5* in IFSD-Patienten dieser Kohorte (n = 243) mittels HRMA. Dabei konnte eine weitere seltene *ADCY5*-Variante bei einer Patientin

mit zervikaler Dystonie und dystonem Kopftremor nachgewiesen werden. Da beide Varianten formal die Kriterien einer „wahrscheinlich pathogenen“ Variante des ACMG-Klassifizierungssystems nicht hinreichend erfüllten, wurden sie als VUS klassifiziert. Dabei bekräftigt der identische Phänotyp der Patienten mit seltenen *ADCY5*-Varianten sowie die familiäre Segregation der Variante mit der Erkrankung innerhalb der identifizierten Familie die kausale Rolle von *ADCY5* in der Pathogenese der IFSD.

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit in 33,3 % (2/6) der generalisierten Dystonien und 1,5 % der IFSD (4/263) Varianten mit klinischer Relevanz identifiziert werden. Dies unterstreicht den hohen Anteil monogener Formen innerhalb der generalisierten Dystonien und spiegelt die ätiologische Heterogenität der IFSD wider. Die Diskrepanz zwischen dem geringen Anteil identifizierter monogener Formen und dem hohen Anteil familiärer Fälle innerhalb der IFSD deutet dabei auf eine vorwiegend multifaktorielle Genese des Phänotyps hin. Die in dieser Arbeit ausführlich phänotypisch und genotypisch charakterisierte Kohorte kann einen wichtigen Beitrag leisten, um die multifaktorielle Basis der IFSD in weiterführenden Studien zu bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4), 248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
- Albanese, A., Bhatia, K., Bressman, S. B., DeLong, M. R., Fahn, S., Fung, V. S., Hallett, M., Jankovic, J., Jinnah, H. A., Klein, C., Lang, A. E., Mink, J. W., Teller, J. K. (2013). Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord*, 28(7), 863-873. doi:10.1002/mds.25475
- Albanese, A., Di Giovanni, M., Lalli, S. (2018). Dystonia: diagnosis and management. *Eur J Neurol*. doi:10.1111/ene.13762
- Albanese, A., Lalli, S. (2009). Is this dystonia? *Mov Disord*, 24(12), 1725-1731. doi:10.1002/mds.22597
- Bain, P. G., Findley, L. J., Thompson, P. D., Gresty, M. A., Rothwell, J. C., Harding, A. E., Marsden, C. D. (1994). A study of hereditary essential tremor. *Brain*, 117 (Pt 4), 805-824.
- Balint, B., Antelmi, E., Mencacci, N. E., Batla, A., Eriksson, S. H., Walker, M. C., Bronstein, A. M., Bhatia, K. P. (2018). Oculomotor apraxia and disrupted sleep with nocturnal ballistic bouts in ADCY5-related disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 54, 103-106. doi:10.1016/j.parkreldis.2018.04.011
- Balint, B., Bhatia, K. P. (2015). Isolated and combined dystonia syndromes - an update on new genes and their phenotypes. *Eur J Neurol*, 22(4), 610-617. doi:10.1111/ene.12650
- Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*, 12(11), 745-755. doi:10.1038/nrg3031
- Barrett, M. J., Williams, E. S., Chambers, C., Dhamija, R. (2017). Autosomal recessive inheritance of ADCY5-related generalized dystonia and myoclonus. *Neurol Genet*, 3(5), 193. doi:10.1212/NXG.0000000000000193
- Bhatia, K. P., Bain, P., Bajaj, N., Elble, R. J., Hallett, M., Louis, E. D., Raethjen, J., Stamelou, M., Testa, C. M., Deuschl, G., Tremor Task Force of the International, P., Movement Disorder, S. (2018). Consensus Statement on the classification of tremors. from the task force on tremor of the International Parkinson and Movement Disorder Society. *Mov Disord*, 33(1), 75-87. doi:10.1002/mds.27121
- Blanchard, A., Ea, V., Roubertie, A., Martin, M., Coquart, C., Claustres, M., Beroud, C., Collod-Beroud, G. (2011). DYT6 dystonia: review of the literature and creation of the UMD Locus-Specific Database (LSDB) for mutations in the THAP1 gene. *Hum Mutat*, 32(11), 1213-1224. doi:10.1002/humu.21564

- Botstein, D., Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*, 33 Suppl, 228-237. doi:10.1038/ng1090
- Bressman, S. (2006). Genetics of dystonia. *J Neural Transm Suppl*(70), 489-495. doi:10.1007/978-3-211-45295-0_73
- Bressman, S., de Leon, D., Brin, M. F., Risch, N., Burke, R. E., Greene, P. E., Shale, H., Fahn, S. (1989). Idiopathic dystonia among Ashkenazi Jews: evidence for autosomal dominant inheritance. *Ann Neurol*, 26(5), 612-620. doi:10.1002/ana.410260505
- Bressman, S., Raymond, D., Fuchs, T., Heiman, G. A., Ozelius, L. J., Saunders-Pullman, R. (2009). Mutations in THAP1 (DYT6) in early-onset dystonia: a genetic screening study. *Lancet Neurol*, 8(5), 441-446. doi:10.1016/S1474-4422(09)70081-X
- Bressman, S., Sabatti, C., Raymond, D., de Leon, D., Klein, C., Kramer, P. L., Brin, M. F., Fahn, S., Breakefield, X., Ozelius, L. J., Risch, N. J. (2000). The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology*, 54(9), 1746-1752.
- Calakos, N., Patel, V. D., Gottron, M., Wang, G., Tran-Viet, K. N., Brewington, D., Beyer, J. L., Steffens, D. C., Krishnan, R. R., Zuchner, S. (2010). Functional evidence implicating a novel TOR1A mutation in idiopathic, late-onset focal dystonia. *J Med Genet*, 47(9), 646-650. doi:10.1136/jmg.2009.072082
- Camargo, C. H., Camargos, S. T., Becker, N., Munhoz, R. P., Raskin, S., Cardoso, F. E., Teive, H. A. (2014a). Cervical dystonia: about familial and sporadic cases in 88 patients. *Arq Neuropsiquiatr*, 72(2), 107-113. doi:10.1590/0004-282X20130225
- Camargo, C. H., Camargos, S. T., Raskin, S., Cardoso, F. E., Teive, H. A. (2014b). Genetic evaluation for TOR1-A (DYT1) in Brazilian patients with dystonia. *Arq Neuropsiquiatr*, 72(10), 753-756.
- Carapito, R., Paul, N., Untrau, M., Le Gentil, M., Ott, L., Alsaleh, G., Jochem, P., Radosavljevic, M., Le Caignec, C., David, A., Damier, P., Isidor, B., Bahram, S. (2015). A de novo ADCY5 mutation causes early-onset autosomal dominant chorea and dystonia. *Mov Disord*, 30(3), 423-427. doi:10.1002/mds.26115
- Chan, J., Brin, M. F., Fahn, S. (1991). Idiopathic cervical dystonia: clinical characteristics. *Mov Disord*, 6(2), 119-126. doi:10.1002/mds.870060206
- Chang, F. C., Westenberger, A., Dale, R. C., Smith, M., Pall, H. S., Perez-Duenas, B., Grattan-Smith, P., Ouvrier, R. A., Mahant, N., Hanna, B. C., Hunter, M., Lawson, J. A., Max, C., Sachdev, R., Meyer, E., Crimmins, D., Pryor, D., Morris, J. G., Munchau, A., Grozeva, D., Carss, K. J., Raymond, L., Kurian, M. A., Klein, C., Fung, V. S. (2016). Phenotypic insights into ADCY5-associated disease. *Mov Disord*, 31(7), 1033-1040. doi:10.1002/mds.26598

- Charlesworth, G., Angelova, P. R., Bartolome-Robledo, F., Ryten, M., Trabzuni, D., Stamelou, M., Abramov, A. Y., Bhatia, K. P., Wood, N. W. (2015). Mutations in HPCA cause autosomal-recessive primary isolated dystonia. *Am J Hum Genet*, 96(4), 657-665. doi:10.1016/j.ajhg.2015.02.007
- Charlesworth, G., Bhatia, K. P., Wood, N. W. (2013). The genetics of dystonia: new twists in an old tale. *Brain*, 136(Pt 7), 2017-2037. doi:10.1093/brain/awt138
- Charlesworth, G., Bhatia, K. P., Wood, N. W. (2014). No pathogenic GNAL mutations in 192 sporadic and familial cases of cervical dystonia. *Mov Disord*, 29(1), 154-155. doi:10.1002/mds.25713
- Charlesworth, G., Plagnol, V., Holmstrom, K. M., Bras, J., Sheerin, U. M., Preza, E., Rubio-Agusti, I., Ryten, M., Schneider, S. A., Stamelou, M., Trabzuni, D., Abramov, A. Y., Bhatia, K. P., Wood, N. W. (2012). Mutations in ANO3 cause dominant craniocervical dystonia: ion channel implicated in pathogenesis. *Am J Hum Genet*, 91(6), 1041-1050. doi:10.1016/j.ajhg.2012.10.024
- Chen, D. H., Meneret, A., Friedman, J. R., Korvatska, O., Gad, A., Bonkowski, E. S., Stessman, H. A., Doummar, D., Mignot, C., Anheim, M., Bernes, S., Davis, M. Y., Damon-Perriere, N., Degos, B., Grabli, D., Gras, D., Hisama, F. M., Mackenzie, K. M., Swanson, P. D., Tranchant, C., Vidailhet, M., Winesett, S., Trouillard, O., Amendola, L. M., Dorschner, M. O., Weiss, M., Eichler, E. E., Torkamani, A., Roze, E., Bird, T. D., Raskind, W. H. (2015). ADCY5-related dyskinesia: Broader spectrum and genotype-phenotype correlations. *Neurology*, 85(23), 2026-2035. doi:10.1212/WNL.0000000000002058
- Chen, W., Hopfner, F., Szymczak, S., Granert, O., Muller, S. H., Kuhlenbaumer, G., Deuschl, G. (2017). Topography of essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*, 40, 58-63. doi:10.1016/j.parkreldis.2017.04.012
- Chen, Y. Z., Friedman, J. R., Chen, D. H., Chan, G. C., Bloss, C. S., Hisama, F. M., Topol, S. E., Carson, A. R., Pham, P. H., Bonkowski, E. S., Scott, E. R., Lee, J. K., Zhang, G., Oliveira, G., Xu, J., Scott-Van Zeeland, A. A., Chen, Q., Levy, S., Topol, E. J., Storm, D., Swanson, P. D., Bird, T. D., Schork, N. J., Raskind, W. H., Torkamani, A. (2014). Gain-of-function ADCY5 mutations in familial dyskinesia with facial myokymia. *Ann Neurol*, 75(4), 542-549. doi:10.1002/ana.24119
- Chen, Y. Z., Matsushita, M. M., Robertson, P., Rieder, M., Girirajan, S., Antonacci, F., Lipe, H., Eichler, E. E., Nickerson, D. A., Bird, T. D., Raskind, W. H. (2012). Autosomal dominant familial dyskinesia and facial myokymia: single exome sequencing identifies a mutation in adenylyl cyclase 5. *Arch Neurol*, 69(5), 630-635. doi:10.1001/archneurol.2012.54
- Cheng, F. B., Feng, J. C., Ma, L. Y., Miao, J., Ott, T., Wan, X. H., Grundmann, K. (2014). Combined occurrence of a novel TOR1A and a THAP1 mutation in primary dystonia. *Mov Disord*, 29(8), 1079-1083. doi:10.1002/mds.25921

- Chong, J. X., Buckingham, K. J., Jhangiani, S. N., Boehm, C., Sobreira, N., Smith, J. D., Harrell, T. M., McMillin, M. J., Wiszniewski, W., Gambin, T., Coban Akdemir, Z. H., Doheny, K., Scott, A. F., Avramopoulos, D., Chakravarti, A., Hoover-Fong, J., Mathews, D., Witmer, P. D., Ling, H., Hetrick, K., Watkins, L., Patterson, K. E., Reinier, F., Blue, E., Muzny, D., Kircher, M., Bilguvar, K., Lopez-Giraldez, F., Sutton, V. R., Tabor, H. K., Leal, S. M., Gunel, M., Mane, S., Gibbs, R. A., Boerwinkle, E., Hamosh, A., Shendure, J., Lupski, J. R., Lifton, R. P., Valle, D., Nickerson, D. A., Centers for Mendelian, G., Bamshad, M. J. (2015). The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet*, 97(2), 199-215. doi:10.1016/j.ajhg.2015.06.009
- Defazio, G., Abbruzzese, G., Girlanda, P., Liguori, R., Santoro, L., Tinazzi, M., Berardelli, A. (2012). Phenotypic overlap in familial and sporadic primary adult-onset extracranial dystonia. *J Neurol*, 259(11), 2414-2418. doi:10.1007/s00415-012-6514-6
- Defazio, G., Abbruzzese, G., Girlanda, P., Vacca, L., Curra, A., Marchese, R., Martino, D., Masi, G., Majorana, G., Mazzella, L., Livrea, P., Berardelli, A. (2003a). Does sex influence age at onset in cranial-cervical and upper limb dystonia? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74(2), 265-267.
- Defazio, G., Aniello, M. S., Masi, G., Lucchese, V., De Candia, D., Martino, D. (2003b). Frequency of familial aggregation in primary adult-onset cranial cervical dystonia. *Neurol Sci*, 24(3), 168-169. doi:10.1007/s10072-003-0113-3
- Defazio, G., Gigante, A. F., Abbruzzese, G., Bentivoglio, A. R., Colosimo, C., Esposito, M., Fabbrini, G., Guidubaldi, A., Girlanda, P., Liguori, R., Marinelli, L., Morgante, F., Santoro, L., Tinazzi, M., Livrea, P., Berardelli, A. (2013). Tremor in primary adult-onset dystonia: prevalence and associated clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84(4), 404-408. doi:10.1136/jnnp-2012-303782
- Delaneau, O., Howie, B., Cox, A. J., Zagury, J. F., Marchini, J. (2013). Haplotype estimation using sequencing reads. *Am J Hum Genet*, 93(4), 687-696. doi:10.1016/j.ajhg.2013.09.002
- Djarmati, A., Schneider, S. A., Lohmann, K., Winkler, S., Pawlack, H., Hagenah, J., Bruggemann, N., Zittel, S., Fuchs, T., Rakovic, A., Schmidt, A., Jabusch, H. C., Wilcox, R., Kostic, V. S., Siebner, H., Altenmuller, E., Munchau, A., Ozelius, L. J., Klein, C. (2009). Mutations in THAP1 (DYT6) and generalised dystonia with prominent spasmodic dysphonia: a genetic screening study. *Lancet Neurol*, 8(5), 447-452. doi:10.1016/S1474-4422(09)70083-3
- Dobricic, V., Kresojevic, N., Zarkovic, M., Tomic, A., Marjanovic, A., Westenberger, A., Cvetkovic, D., Svetel, M., Novakovic, I., Kostic, V. S. (2015). Phenotype of non-c.907_909delGAG mutations in TOR1A: DYT1 dystonia revisited. *Parkinsonism Relat Disord*, 21(10), 1256-1259. doi:10.1016/j.parkreldis.2015.08.001
- Douglas, A. G., Androletti, G., Talbot, K., Hammans, S. R., Singh, J., Whitney, A., Ennis, S., Foulds, N. C. (2017). ADCY5-related dyskinesia presenting as familial

- myoclonus-dystonia. *Neurogenetics*, 18(2), 111-117. doi:10.1007/s10048-017-0510-z
- Edwards, M., Stamelou, M., Quinn, N., Bhatia, K. P. (2016). *Parkinson's Disease and Other Movement Disorders*: Oxford University Press.
- Edwards, M., Wood, N., Bhatia, K. (2003). Unusual phenotypes in DYT1 dystonia: a report of five cases and a review of the literature. *Mov Disord*, 18(6), 706-711. doi:10.1002/mds.10411
- Elia, A. E., Filippini, G., Bentivoglio, A. R., Fasano, A., Ialongo, T., Albanese, A. (2006). Onset and progression of primary torsion dystonia in sporadic and familial cases. *Eur J Neurol*, 13(10), 1083-1088. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01387.x
- European Commission. (2020). Rare diseases. Retrieved from https://ec.europa.eu/health/non_communicable_diseases/rare_diseases_en
- Fahn, S., Jankovic, J., Hallett, M. (2011). *Principles and Practice of Movement Disorders E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Falzone, M. E., Malvezzi, M., Lee, B.-C., Accardi, A. (2018). Known structures and unknown mechanisms of TMEM16 scramblases and channels. *The Journal of General Physiology*, 150(7), 933-947. doi:10.1085/jgp.201711957
- Fernandez, M., Raskind, W., Wolff, J., Matsushita, M., Yuen, E., Graf, W., Lipe, H., Bird, T. (2001). Familial dyskinesia and facial myokymia (FDFM): a novel movement disorder. *Ann Neurol*, 49(4), 486-492.
- Friedman, J. R., Meneret, A., Chen, D. H., Trouillard, O., Vidailhet, M., Raskind, W. H., Roze, E. (2016). ADCY5 mutation carriers display pleiotropic paroxysmal day and nighttime dyskinesias. *Mov Disord*, 31(1), 147-148. doi:10.1002/mds.26494
- Fuchs, T., Gavarini, S., Saunders-Pullman, R., Raymond, D., Ehrlich, M. E., Bressman, S. B., Ozelius, L. J. (2009). Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nat Genet*, 41(3), 286-288. doi:10.1038/ng.304
- Fuchs, T., Saunders-Pullman, R., Masuho, I., Luciano, M. S., Raymond, D., Factor, S., Lang, A. E., Liang, T. W., Trosch, R. M., White, S., Ainehsazan, E., Herve, D., Sharma, N., Ehrlich, M. E., Martemyanov, K. A., Bressman, S. B., Ozelius, L. J. (2013). Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nat Genet*, 45(1), 88-92. doi:10.1038/ng.2496
- Gambaran, M., Valente, E. M., Liberini, P., Barrano, G., Bonizzato, A., Padovani, A., Moretto, G., Fiorio, M., Dallapiccola, B., Smania, N., Fiaschi, A., Tinazzi, M. (2006). Atypical phenotypes and clinical variability in a large Italian family with DYT1-primary torsion dystonia. *Mov Disord*, 21(10), 1782-1784. doi:10.1002/mds.21056
- Gasser, T., Windgassen, K., Bereznai, B., Kabus, C., Ludolph, A. C. (1998). Phenotypic expression of the DYT1 mutation: a family with writer's cramp of juvenile onset. *Ann Neurol*, 44(1), 126-128. doi:10.1002/ana.410440119

- Groen, J. L., Andrade, A., Ritz, K., Jalalzadeh, H., Haagmans, M., Bradley, T. E., Jongejan, A., Verbeek, D. S., Nurnberg, P., Denome, S., Hennekam, R. C., Lipscombe, D., Baas, F., Tijssen, M. A. (2015a). CACNA1B mutation is linked to unique myoclonus-dystonia syndrome. *Hum Mol Genet*, 24(4), 987-993. doi:10.1093/hmg/ddu513
- Groen, J. L., Kallen, M. C., van de Warrenburg, B. P., Speelman, J. D., van Hilten, J. J., Aramideh, M., Boon, A. J., Klein, C., Koelman, J. H., Langeveld, T. P., Baas, F., Tijssen, M. A. (2012). Phenotypes and genetic architecture of focal primary torsion dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(10), 1006-1011. doi:10.1136/jnnp-2012-302729
- Groen, J. L., Ritz, K., Jalalzadeh, H., van der Salm, S. M., Jongejan, A., Mook, O. R., Haagmans, M. A., Zwinderman, A. H., Motazacker, M. M., Hennekam, R. C., Baas, F., Tijssen, M. A. (2015b). RELN rare variants in myoclonus-dystonia. *Mov Disord*, 30(3), 415-419. doi:10.1002/mds.26070
- Grundmann, K., Laubis-Herrmann, U., Bauer, I., Dressler, D., Vollmer-Haase, J., Bauer, P., Stuhmann, M., Schulte, T., Schols, L., Topka, H., Riess, O. (2003). Frequency and phenotypic variability of the GAG deletion of the DYT1 gene in an unselected group of patients with dystonia. *Arch Neurol*, 60(9), 1266-1270. doi:10.1001/archneur.60.9.1266
- Gyobu, S., Ishihara, K., Suzuki, J., Segawa, K., Nagata, S. (2017). Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(24), 6274-6279. doi:10.1073/pnas.1703391114
- Hjermind, L. E., Werdelin, L. M., Sorensen, S. A. (2002). Inherited and de novo mutations in sporadic cases of DYT1-dystonia. *Eur J Hum Genet*, 10(3), 213-216. doi:10.1038/sj.ejhg.5200782
- Houlden, H., Schneider, S. A., Paudel, R., Melchers, A., Schwingenschuh, P., Edwards, M., Hardy, J., Bhatia, K. P. (2010). THAP1 mutations (DYT6) are an additional cause of early-onset dystonia. *Neurology*, 74(10), 846-850. doi:10.1212/WNL.0b013e3181d5276d
- Huang, F., Wang, X., Ostertag, E. M., Nuwal, T., Huang, B., Jan, Y.-N., Basbaum, A. I., Jan, L. Y. (2013). TMEM16C facilitates Na(+)-activated K+ currents in rat sensory neurons and regulates pain processing. *Nature neuroscience*, 16(9), 1284-1290. doi:10.1038/nn.3468
- Jankovic, J., Leder, S., Warner, D., Schwartz, K. (1991). Cervical dystonia. *Clinical findings and associated movement disorders*, 41(7), 1088-1088. doi:10.1212/wnl.41.7.1088
- Jochim, A., Zech, M., Gora-Stahlberg, G., Winkelmann, J., Haslinger, B. (2016). The clinical phenotype of early-onset isolated dystonia caused by recessive COL6A3 mutations (DYT27). *Mov Disord*, 31(5), 747-750. doi:10.1002/mds.26501

- Kabakci, K., Hedrich, K., Leung, J. C., Mitterer, M., Vieregge, P., Lencer, R., Hagenah, J., Garrels, J., Witt, K., Klostermann, F., Svetel, M., Friedman, J., Kostic, V., Bressman, S. B., Breakefield, X. O., Ozelius, L. J., Pramstaller, P. P., Klein, C. (2004). Mutations in DYT1: extension of the phenotypic and mutational spectrum. *Neurology*, 62(3), 395-400.
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., Walters, R. K., Tashman, K., Farjoun, Y., Banks, E., Poterba, T., Wang, A., Seed, C., Whiffin, N., Chong, J. X., Samocha, K. E., Pierce-Hoffman, E., Zappala, Z., O'Donnell-Luria, A. H., Minikel, E. V., Weisburd, B., Lek, M., Ware, J. S., Vittal, C., Armean, I. M., Bergelson, L., Cibulskis, K., Connolly, K. M., Covarrubias, M., Donnelly, S., Ferriera, S., Gabriel, S., Gentry, J., Gupta, N., Jeandet, T., Kaplan, D., Llanwarne, C., Munshi, R., Novod, S., Petrillo, N., Roazen, D., Ruano-Rubio, V., Saltzman, A., Schleicher, M., Soto, J., Tibbetts, K., Tolonen, C., Wade, G., Talkowski, M. E., Neale, B. M., Daly, M. J., MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *bioRxiv*, 531210. doi:10.1101/531210
- Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O'Roak, B. J., Cooper, G. M., Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*, 46(3), 310-315. doi:10.1038/ng.2892
- Klein, C. (2014). Genetics in dystonia. *Parkinsonism Relat Disord*, 20 Suppl 1, S137-142. doi:10.1016/S1353-8020(13)70033-6
- Klein, C., Fahn, S. (2013). Translation of Oppenheim's 1911 paper on dystonia. *Mov Disord*, 28(7), 851-862. doi:10.1002/mds.25546
- Klein, C., Friedman, J., Bressman, S., Vieregge, P., Brin, M. F., Pramstaller, P. P., De Leon, D., Hagenah, J., Sieberer, M., Fleet, C., Kiely, R., Xin, W., Breakefield, X. O., Ozelius, L. J., Sims, K. B. (1999). Genetic testing for early-onset torsion dystonia (DYT1): introduction of a simple screening method, experiences from testing of a large patient cohort, and ethical aspects. *Genet Test*, 3(4), 323-328. doi:10.1089/gte.1999.3.323
- Koukouni, V., Martino, D., Arabia, G., Quinn, N. P., Bhatia, K. P. (2007). The entity of young onset primary cervical dystonia. *Mov Disord*, 22(6), 843-847. doi:10.1002/mds.21421
- Kumar, K. R., Martemyanov, K. A., Lohmann, K. (2014). GNAL mutations and dystonia--reply. *JAMA Neurol*, 71(8), 1053-1054. doi:10.1001/jamaneurol.2014.1509
- Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, 4(7), 1073-1081. doi:10.1038/nprot.2009.86

- LeDoux, M. S., Vemula, S. R., Xiao, J., Thompson, M. M., Perlmutter, J. S., Wright, L. J., Jinnah, H. A., Rosen, A. R., Hedera, P., Comella, C. L., Weissbach, A., Junker, J., Jankovic, J., Barbano, R. L., Reich, S. G., Rodriguez, R. L., Berman, B. D., Chouinard, S., Severt, L., Agarwal, P., Stover, N. P. (2016). Clinical and genetic features of cervical dystonia in a large multicenter cohort. *Neurol Genet*, 2(3), e69. doi:10.1212/NXG.0000000000000069
- LeDoux, M. S., Xiao, J., Rudzinska, M., Bastian, R. W., Wszolek, Z. K., Van Gerpen, J. A., Puschmann, A., Momcilovic, D., Vemula, S. R., Zhao, Y. (2012). Genotype-phenotype correlations in THAP1 dystonia: molecular foundations and description of new cases. *Parkinsonism Relat Disord*, 18(5), 414-425. doi:10.1016/j.parkreldis.2012.02.001
- Lee, K. W., Hong, J. H., Choi, I. Y., Che, Y., Lee, J. K., Yang, S. D., Song, C. W., Kang, H. S., Lee, J. H., Noh, J. S., Shin, H. S., Han, P. L. (2002). Impaired D2 dopamine receptor function in mice lacking type 5 adenylyl cyclase. *J Neurosci*, 22(18), 7931-7940.
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A. H., Ware, J. S., Hill, A. J., Cummings, B. B., Tukiainen, T., Birnbaum, D. P., Kosmicki, J. A., Duncan, L. E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., Cooper, D. N., Deflaux, N., DePristo, M., Do, R., Flannick, J., Fromer, M., Gauthier, L., Goldstein, J., Gupta, N., Howrigan, D., Kiezun, A., Kurki, M. I., Moonshine, A. L., Natarajan, P., Orozco, L., Peloso, G. M., Poplin, R., Rivas, M. A., Ruano-Rubio, V., Rose, S. A., Ruderfer, D. M., Shakir, K., Stenson, P. D., Stevens, C., Thomas, B. P., Tiao, G., Tusie-Luna, M. T., Weisburd, B., Won, H. H., Yu, D., Altshuler, D. M., Ardissino, D., Boehnke, M., Danesh, J., Donnelly, S., Elosua, R., Florez, J. C., Gabriel, S. B., Getz, G., Glatt, S. J., Hultman, C. M., Kathiresan, S., Laakso, M., McCarroll, S., McCarthy, M. I., McGovern, D., McPherson, R., Neale, B. M., Palotie, A., Purcell, S. M., Saleheen, D., Scharf, J. M., Sklar, P., Sullivan, P. F., Tuomilehto, J., Tsuang, M. T., Watkins, H. C., Wilson, J. G., Daly, M. J., MacArthur, D. G., Exome Aggregation, C. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291. doi:10.1038/nature19057
- Leube, B., Kessler, K. R., Goecke, T., Auburger, G., Benecke, R. (1997). Frequency of familial inheritance among 488 index patients with idiopathic focal dystonia and clinical variability in a large family. *Mov Disord*, 12(6), 1000-1006. doi:10.1002/mds.870120625
- Leung, J. C., Klein, C., Friedman, J., Vieregge, P., Jacobs, H., Doheny, D., Kamm, C., DeLeon, D., Pramstaller, P. P., Penney, J. B., Eisengart, M., Jankovic, J., Gasser, T., Bressman, S. B., Corey, D. P., Kramer, P., Brin, M. F., Ozelius, L. J., Breakefield, X. O. (2001). Novel mutation in the TOR1A (DYT1) gene in atypical early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. *Neurogenetics*, 3(3), 133-143.
- Lin, J. P., Nardocci, N. (2016). Recognizing the Common Origins of Dystonia and the Development of Human Movement: A Manifesto of Unmet Needs in Isolated Childhood Dystonias. *Front Neurol*, 7, 226. doi:10.3389/fneur.2016.00226

- Lohmann, K., Klein, C. (2017). Update on the Genetics of Dystonia. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17(3), 26. doi:10.1007/s11910-017-0735-0
- Lohmann, K., Schlicht, F., Svetel, M., Hinrichs, F., Zittel, S., Graf, J., Lohnau, T., Schmidt, A., Mir, P., Krause, P., Lang, A. E., Jabusch, H. C., Wolters, A., Kamm, C., Zeuner, K. E., Altenmuller, E., Naz, S., Chung, S. J., Kostic, V. S., Munchau, A., Kuhn, A. A., Bruggemann, N., Klein, C. (2016). The role of mutations in COL6A3 in isolated dystonia. *J Neurol*, 263(4), 730-734. doi:10.1007/s00415-016-8046-y
- Lohmann, K., Uflacker, N., Erogullari, A., Lohnau, T., Winkler, S., Dendorfer, A., Schneider, S. A., Osmanovic, A., Svetel, M., Ferbert, A., Zittel, S., Kuhn, A. A., Schmidt, A., Altenmuller, E., Munchau, A., Kamm, C., Wittstock, M., Kupsch, A., Moro, E., Volkmann, J., Kostic, V., Kaiser, F. J., Klein, C., Bruggemann, N. (2012). Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations. *Eur J Hum Genet*, 20(2), 171-175. doi:10.1038/ejhg.2011.159
- Louis, E. D. (2013). When do essential tremor patients develop head tremor? Influences of age and duration and evidence of a biological clock. *Neuroepidemiology*, 41(2), 110-115. doi:10.1159/000351698
- Louis, E. D., Ferreira, J. J. (2010). How common is the most common adult movement disorder? Update on the worldwide prevalence of essential tremor. *Mov Disord*, 25(5), 534-541. doi:10.1002/mds.22838
- Louis, E. D., Ford, B., Frucht, S., Barnes, L. F., X-Tang, M., Ottman, R. (2001). Risk of tremor and impairment from tremor in relatives of patients with essential tremor: A community-based family study. *Annals of Neurology*, 49(6), 761-769. doi:10.1002/ana.1022
- Louis, E. D., Hernandez, N., Clark, L. N., Ottman, R. (2013). Familial aggregation of cranial tremor in familial essential tremor. *Neuroepidemiology*, 41(1), 48-53. doi:10.1159/000348553
- Lumsden, D. E., Gimeno, H., Elze, M., Tustin, K., Kaminska, M., Lin, J. P. (2016). Progression to musculoskeletal deformity in childhood dystonia. *Eur J Paediatr Neurol*, 20(3), 339-345. doi:10.1016/j.ejpn.2016.02.006
- Ma, L. Y., Wang, L., Yang, Y. M., Feng, T., Wan, X. H. (2015a). Mutations in ANO3 and GNAL gene in thirty-three isolated dystonia families. *Mov Disord*, 30(5), 743-744. doi:10.1002/mds.26190
- Ma, L. Y., Wang, L., Yang, Y. M., Wan, X. H. (2015b). Mutations in GNAL gene in 214 cases with isolated dystonia. *Parkinsonism Relat Disord*, 21(11), 1367-1368. doi:10.1016/j.parkreldis.2015.08.026
- Maniak, S., Sieberer, M., Hagenah, J., Klein, C., Vieregge, P. (2003). Focal and segmental primary dystonia in north-western Germany--a clinico-genetic study. *Acta Neurol Scand*, 107(3), 228-232.

- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*, 24(3), 133-141. doi:10.1016/j.tig.2007.12.007
- Marras, C., Lang, A., van de Warrenburg, B. P., Sue, C. M., Tabrizi, S. J., Bertram, L., Mercimek-Mahmutoglu, S., Ebrahimi-Fakhari, D., Warner, T. T., Durr, A., Assmann, B., Lohmann, K., Kostic, V., Klein, C. (2016). Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov Disord*, 31(4), 436-457. doi:10.1002/mds.26527
- Martino, D., Aniello, M. S., Masi, G., Lamberti, P., Lucchese, V., Lamberti, S., Livrea, P., Berardelli, A., Defazio, G. (2004). Validity of family history data on primary adult-onset dystonia. *Arch Neurol*, 61(10), 1569-1573. doi:10.1001/archneur.61.10.1569
- Mencacci, N. E., Erro, R., Wiethoff, S., Hersheson, J., Ryten, M., Balint, B., Ganos, C., Stamelou, M., Quinn, N., Houlden, H., Wood, N. W., Bhatia, K. P. (2015a). ADCY5 mutations are another cause of benign hereditary chorea. *Neurology*, 85(1), 80-88. doi:10.1212/WNL.0000000000001720
- Mencacci, N. E., Rubio-Agusti, I., Zdebik, A., Asmus, F., Ludtmann, M. H., Ryten, M., Plagnol, V., Hauser, A. K., Bandres-Ciga, S., Bettencourt, C., Forabosco, P., Hughes, D., Soutar, M. M., Peall, K., Morris, H. R., Trabzuni, D., Tekman, M., Stanescu, H. C., Klefa, R., Carecchio, M., Zorzi, G., Nardocci, N., Garavaglia, B., Lohmann, E., Weissbach, A., Klein, C., Hardy, J., Pittman, A. M., Foltynie, T., Abramov, A. Y., Gasser, T., Bhatia, K. P., Wood, N. W. (2015b). A missense mutation in KCTD17 causes autosomal dominant myoclonus-dystonia. *Am J Hum Genet*, 96(6), 938-947. doi:10.1016/j.ajhg.2015.04.008
- Miao, J., Wan, X. H., Sun, Y., Feng, J. C., Cheng, F. B. (2013). Mutation screening of GNAL gene in patients with primary dystonia from Northeast China. *Parkinsonism Relat Disord*, 19(10), 910-912. doi:10.1016/j.parkreldis.2013.05.011
- Miltgen, M., Blanchard, A., Mathieu, H., Kreisler, A., Jean Pierre, D., Salgado, D., Roubertie, A., Barre, L., Rai, G., Blanck, V., Frederic, M., Douay, X., Mazzolenni, R., Charpentier, P., Gonzalez, V., Destee, A., Beroud, C., Collod-Beroud, G. (2016). Novel heterozygous mutation in ANO3 responsible for craniocervical dystonia. *Mov Disord*, 31(8), 1251-1252. doi:10.1002/mds.26717
- Mülhardt, C. (2013). *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics* (7 ed.): Springer Spektrum.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273.
- Munchau, A., Valente, E. M., Davis, M. B., Stinton, V., Wood, N. W., Quinn, N. P., Bhatia, K. P. (2000). A Yorkshire family with adult-onset cranio-cervical primary torsion dystonia. *Mov Disord*, 15(5), 954-959.

- Nelin, S., Hussey, R., Faux, B. M., Rohena, L. (2018). Youngest presenting patient with dystonia 24 and review of the literature. *Clinical case reports*, 6(11), 2070-2074. doi:10.1002/ccr3.1671
- Ng, P. C., Levy, S., Huang, J., Stockwell, T. B., Walenz, B. P., Li, K., Axelrod, N., Busam, D. A., Strausberg, R. L., Venter, J. C. (2008). Genetic variation in an individual human exome. *PLoS Genet*, 4(8), e1000160. doi:10.1371/journal.pgen.1000160
- Ng, S. B., Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Dent, K. M., Huff, C. D., Shannon, P. T., Jabs, E. W., Nickerson, D. A., Shendure, J., Bamshad, M. J. (2010). Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*, 42(1), 30-35. doi:10.1038/ng.499
- Ng, S. B., Turner, E. H., Robertson, P. D., Flygare, S. D., Bigham, A. W., Lee, C., Shaffer, T., Wong, M., Bhattacharjee, A., Eichler, E. E., Bamshad, M., Nickerson, D. A., Shendure, J. (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 461(7261), 272-276. doi:10.1038/nature08250
- O'Riordan, S., Raymond, D., Lynch, T., Saunders-Pullman, R., Bressman, S. B., Daly, L., Hutchinson, M. (2004). Age at onset as a factor in determining the phenotype of primary torsion dystonia. *Neurology*, 63(8), 1423-1426.
- Olgiasi, S., Quadri, M., Bonifati, V. (2016). Genetics of movement disorders in the next-generation sequencing era. *Mov Disord*, 31(4), 458-470. doi:10.1002/mds.26521
- Olschewski, L., Jesus, S., Kim, H. J., Tunc, S., Lons, S., Junker, J., Zeuner, K. E., Kuhn, A. A., Kuhlenbaumer, G., Schaffer, E., Berg, D., Kasten, M., Ferbert, A., Altenmuller, E., Bruggemann, N., Bauer, P., Rolfs, A., Jeon, B., Baumer, T., Mir, P., Klein, C., Lohmann, K. (2019). Role of ANO3 mutations in dystonia: A large-scale mutational screening study. *Parkinsonism Relat Disord*, 62, 196-200. doi:10.1016/j.parkreldis.2018.12.030
- Opal, P., Tintner, R., Jankovic, J., Leung, J., Breakefield, X. O., Friedman, J., Ozelius, L. (2002). Intrafamilial phenotypic variability of the DYT1 dystonia: from asymptomatic TOR1A gene carrier status to dystonic storm. *Mov Disord*, 17(2), 339-345.
- Oppenheim, H. (1911). Über eine eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lorditica progressiva, Dystonia musculorum deformans). *Neurologisches Centralblatt*, 30, 1090 - 1107.
- Ozelius, L. J., Hewett, J. W., Page, C. E., Bressman, S. B., Kramer, P. L., Shalish, C., de Leon, D., Brin, M. F., Raymond, D., Corey, D. P., Fahn, S., Risch, N. J., Buckler, A. J., Gusella, J. F., Breakefield, X. O. (1997). The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet*, 17(1), 40-48. doi:10.1038/ng0997-40

- Pal, P. K., Samii, A., Schulzer, M., Mak, E., Tsui, J. K. (2000). Head tremor in cervical dystonia. *Can J Neurol Sci*, 27(2), 137-142.
- Peckham, E. L., Lopez, G., Shamim, E. A., Richardson, S. P., Sanku, S., Malkani, R., Stacy, M., Mahant, P., Crawley, A., Singleton, A., Hallett, M. (2011). Clinical features of patients with blepharospasm: a report of 240 patients. *Eur J Neurol*, 18(3), 382-386. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03161.x
- Pundir, S., Martin, M. J., O'Donovan, C., UniProt, C. (2016). UniProt Tools. *Curr Protoc Bioinformatics*, 53, 1 29 21-15. doi:10.1002/0471250953.bi0129s53
- Raskind, W. H., Matsushita, M., Peter, B., Biberston, J., Wolff, J., Lipe, H., Burbank, R., Bird, T. D. (2009). Familial dyskinesia and facial myokymia (FDFM): Follow-up of a large family and linkage to chromosome 3p21-3q21. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B(4), 570-574. doi:10.1002/ajmg.b.30879
- Rehm, H. L., Bale, S. J., Bayrak-Toydemir, P., Berg, J. S., Brown, K. K., Deignan, J. L., Friez, M. J., Funke, B. H., Hegde, M. R., Lyon, E., Working Group of the American College of Medical, G., Genomics Laboratory Quality Assurance, C. (2013). ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*, 15(9), 733-747. doi:10.1038/gim.2013.92
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., Committee, A. L. Q. A. (2015). 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*, 17(5), 405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
- Rivest, J., Marsden, C. D. (1990). Trunk and head tremor as isolated manifestations of dystonia. *Mov Disord*, 5(1), 60-65. doi:10.1002/mds.870050115
- Rubio-Agusti, I., Parees, I., Kojovic, M., Stamelou, M., Saifee, T. A., Charlesworth, G., Sheerin, U. M., Edwards, M. J., Bhatia, K. P. (2013). Tremulous cervical dystonia is likely to be familial: clinical characteristics of a large cohort. *Parkinsonism Relat Disord*, 19(6), 634-638. doi:10.1016/j.parkreldis.2013.02.017
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.
- Schaaf, C. P., Zschocke, J. (2018). *Basiswissen Humangenetik*. Berlin: Springer.
- Schneider, S. A., Ramirez, A., Shafiee, K., Kaiser, F. J., Erogullari, A., Bruggemann, N., Winkler, S., Bahman, I., Osmanovic, A., Shafa, M. A., Bhatia, K. P., Najmabadi, H., Klein, C., Lohmann, K. (2011). Homozygous THAP1 mutations

- as cause of early-onset generalized dystonia. *Mov Disord*, 26(5), 858-861. doi:10.1002/mds.23561
- Shang, H., Clerc, N., Lang, D., Kaelin-Lang, A., Burgunder, J. M. (2005). Clinical and molecular genetic evaluation of patients with primary dystonia. *Eur J Neurol*, 12(2), 131-138. doi:10.1111/j.1468-1331.2004.00974.x
- Soland, V. L., Bhatia, K. P., Marsden, C. D. (1996). Sex prevalence of focal dystonias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 60(2), 204-205.
- Stamelou, M., Charlesworth, G., Cordivari, C., Schneider, S. A., Kagi, G., Sheerin, U. M., Rubio-Agusti, I., Batla, A., Houlden, H., Wood, N. W., Bhatia, K. P. (2014). The phenotypic spectrum of DYT24 due to ANO3 mutations. *Mov Disord*, 29(7), 928-934. doi:10.1002/mds.25802
- Steeves, T. D., Day, L., Dykeman, J., Jette, N., Pringsheim, T. (2012). The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*, 27(14), 1789-1796. doi:10.1002/mds.25244
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Evans, K., Hayden, M., Heywood, S., Hussain, M., Phillips, A. D., Cooper, D. N. (2017). The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet*, 136(6), 665-677. doi:10.1007/s00439-017-1779-6
- Stojanovic, M., Cvetkovic, D., Kostic, V. S. (1995). A genetic study of idiopathic focal dystonias. *J Neurol*, 242(8), 508-511.
- Strachan, T., Goodship, J., Chinnery, P. (2014). *Genetics and Genomics in Medicine*: Taylor & Francis Group.
- Strachan, T., Read, A. (2018). *Human Molecular Genetics*: CRC Press.
- Strachan, T., Read, A. P. (2011). *Human Molecular Genetics*: Garland Science.
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., Nagata, S. (2013). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *J Biol Chem*, 288(19), 13305-13316. doi:10.1074/jbc.M113.457937
- Tunc, S., Bruggemann, N., Baaske, M. K., Hartmann, C., Grutz, K., Westenberger, A., Klein, C., Münchau, A., Bäumer, T. (2017). Facial twitches in ADCY5-associated disease - Myokymia or myoclonus? An electromyography study. *Parkinsonism Relat Disord*, 40, 73-75. doi:10.1016/j.parkreldis.2017.04.013
- Tunc, S., Denecke, J., Olschewski, L., Bäumer, T., Münchau, A., Lessel, D., Lohmann, K. (2018). A recurrent de-novo ANO3 mutation causes early-onset generalized dystonia. *Journal of the Neurological Sciences*. doi:10.1016/j.jns.2018.11.024
- UniProt Consortium, T. (2018). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*, 46(5), 2699. doi:10.1093/nar/gky092

- Valente, E. M., Warner, T. T., Jarman, P. R., Mathen, D., Fletcher, N. A., Marsden, C. D., Bhatia, K. P., Wood, N. W. (1998). The role of DYT1 in primary torsion dystonia in Europe. *Brain*, 121 (Pt 12), 2335-2339.
- van Egmond, M. E., Kuiper, A., Eggink, H., Sinke, R. J., Brouwer, O. F., Verschuuren-Bemelmans, C. C., Sival, D. A., Tijssen, M. A., de Koning, T. J. (2015). Dystonia in children and adolescents: a systematic review and a new diagnostic algorithm. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86(7), 774-781. doi:10.1136/jnnp-2014-309106
- van Herwaarden, G. M., Anten, H. W., Hoogduin, C. A., Niewold, J. U., Roos, R. A., Speelman, J. D., van Weerden, T. W., Horstink, M. W. (1994). Idiopathic spasmodic torticollis: a survey of the clinical syndromes and patients' experiences. *Clin Neurol Neurosurg*, 96(3), 222-225.
- Vemula, S. R., Puschmann, A., Xiao, J., Zhao, Y., Rudzinska, M., Frei, K. P., Truong, D. D., Wszolek, Z. K., LeDoux, M. S. (2013). Role of Galpha(olf) in familial and sporadic adult-onset primary dystonia. *Hum Mol Genet*, 22(12), 2510-2519. doi:10.1093/hmg/ddt102
- Vulinovic, F., Lohmann, K., Rakovic, A., Capetian, P., Alvarez-Fischer, D., Schmidt, A., Weissbach, A., Erogullari, A., Kaiser, F. J., Wieggers, K., Ferbert, A., Rolfs, A., Klein, C., Seibler, P. (2014). Unraveling cellular phenotypes of novel TorsinA/TOR1A mutations. *Hum Mutat*, 35(9), 1114-1122. doi:10.1002/humu.22604
- Waalkens, A. J. E., Vansenne, F., van der Hout, A. H., Zutt, R., Mourmans, J., Tolosa, E., de Koning, T. J., Tijssen, M. A. J. (2018). Expanding the ADCY5 phenotype toward spastic paraparesis: A mutation in the M2 domain. *Neurol Genet*, 4(1), e214. doi:10.1212/NXG.0000000000000214
- Waddy, H. M., Fletcher, N. A., Harding, A. E., Marsden, C. D. (1991). A genetic study of idiopathic focal dystonias. *Ann Neurol*, 29(3), 320-324. doi:10.1002/ana.410290315
- Wang, L., Chen, Y., Hu, B., Hu, X. (2016). Late-onset primary dystonia in Zhejiang province of China: a service-based epidemiological study. *Neurol Sci*, 37(1), 111-116. doi:10.1007/s10072-015-2366-z
- Wenning, G. K., Kiechl, S., Seppi, K., Muller, J., Hogg, B., Saletu, M., Rungger, G., Gasperi, A., Willeit, J., Poewe, W. (2005). Prevalence of movement disorders in men and women aged 50-89 years (Bruneck Study cohort): a population-based study. *Lancet Neurol*, 4(12), 815-820. doi:10.1016/S1474-4422(05)70226-X
- Williams, L., McGovern, E., Kimmich, O., Molloy, A., Beiser, I., Butler, J. S., Molloy, F., Logan, P., Healy, D. G., Lynch, T., Walsh, R., Cassidy, L., Moriarty, P., Moore, H., McSwiney, T., Walsh, C., O'Riordan, S., Hutchinson, M. (2017). Epidemiological, clinical and genetic aspects of adult onset isolated focal dystonia in Ireland. *Eur J Neurol*, 24(1), 73-81. doi:10.1111/ene.13133

- Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Pryor, R. J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*, 49(6 Pt 1), 853-860.
- Xiao, J., Bastian, R. W., Perlmutter, J. S., Racette, B. A., Tabbal, S. D., Karimi, M., Paniello, R. C., Blitzer, A., Batish, S. D., Wszolek, Z. K., Uitti, R. J., Hedera, P., Simon, D. K., Tarsy, D., Truong, D. D., Frei, K. P., Pfeiffer, R. F., Gong, S., Zhao, Y., LeDoux, M. S. (2009). High-throughput mutational analysis of TOR1A in primary dystonia. *BMC Med Genet*, 10, 24. doi:10.1186/1471-2350-10-24
- Xiromerisiou, G., Houlden, H., Scarneas, N., Stamelou, M., Kara, E., Hardy, J., Lees, A. J., Korlipara, P., Limousin, P., Paudel, R., Hadjigeorgiou, G. M., Bhatia, K. P. (2012). THAP1 mutations and dystonia phenotypes: Genotype phenotype correlations. *Movement Disorders*, 27(10), 1290-1294. doi:doi:10.1002/mds.25146
- Yanagisawa, N., Goto, A., Narabayashi, H. (1972). Familial dystonia musculorum deformans and tremor. *J Neurol Sci*, 16(2), 125-136.
- Yang, Y. D., Cho, H., Koo, J. Y., Tak, M. H., Cho, Y., Shim, W. S., Park, S. P., Lee, J., Lee, B., Kim, B. M., Raouf, R., Shin, Y. K., Oh, U. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*, 455(7217), 1210-1215. doi:10.1038/nature07313
- Yoo, D., Kim, H. J., Lee, J. S., Lee, S., Kim, S. Y., Choi, M., Chae, J. H., Jeon, B. (2018). Early-onset generalized dystonia starting in the lower extremities in a patient with a novel ANO3 variant. *Parkinsonism Relat Disord*, 50, 124-125. doi:10.1016/j.parkreldis.2018.02.012
- Zech, M., Boesch, S., Jochim, A., Weber, S., Meindl, T., Schormair, B., Wieland, T., Lunetta, C., Sansone, V., Messner, M., Mueller, J., Ceballos-Baumann, A., Strom, T. M., Colombo, R., Poewe, W., Haslinger, B., Winkelmann, J. (2017). Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up. *Mov Disord*, 32(4), 549-559. doi:10.1002/mds.26808
- Zech, M., Boesch, S., Sycha, T., Mueller, J., Poewe, W., Winkelmann, J. (2015a). TOR1A, THAP1, and GNAL mutational screening in Austrian patients with primary isolated dystonia. *Mov Disord*, 30(13), 1853-1854. doi:10.1002/mds.26458
- Zech, M., Gross, N., Jochim, A., Castrop, F., Kaffe, M., Dresel, C., Lichtner, P., Peters, A., Gieger, C., Meitinger, T., Haslinger, B., Winkelmann, J. (2014). Rare sequence variants in ANO3 and GNAL in a primary torsion dystonia series and controls. *Mov Disord*, 29(1), 143-147. doi:10.1002/mds.25715
- Zech, M., Jochim, A., Boesch, S., Weber, S., Meindl, T., Peters, A., Gieger, C., Mueller, J., Messner, M., Ceballos-Baumann, A., Poewe, W., Haslinger, B., Winkelmann, J. (2016). Systematic TOR1A non-c.907_909delGAG variant analysis in isolated dystonia and controls. *Parkinsonism Relat Disord*, 31, 119-123. doi:10.1016/j.parkreldis.2016.07.013

- Zech, M., Lam, D. D., Francescatto, L., Schormair, B., Salminen, A. V., Jochim, A., Wieland, T., Lichtner, P., Peters, A., Gieger, C., Lochmuller, H., Strom, T. M., Haslinger, B., Katsanis, N., Winkelmann, J. (2015b). Recessive mutations in the alpha3 (VI) collagen gene COL6A3 cause early-onset isolated dystonia. *Am J Hum Genet*, 96(6), 883-893. doi:10.1016/j.ajhg.2015.04.010
- Zirn, B., Grundmann, K., Huppke, P., Puthenparampil, J., Wolburg, H., Riess, O., Muller, U. (2008). Novel TOR1A mutation p.Arg288Gln in early-onset dystonia (DYT1). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79(12), 1327-1330. doi:10.1136/jnnp.2008.148270

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Achse I der Dystonie-Klassifikation	4
Abb. 2:	Achse II der Dystonie-Klassifikation	6
Abb. 3:	Einfluss des NGS auf die Identifikation von Dystonie-assoziierten Genen	11
Abb. 4:	Phänotyp-basierte Einteilung Dystonie-assoziiierter Gene	12
Abb. 5:	Data-Set	20
Abb. 6:	HRMA Beispiel 1	35
Abb. 7:	HRMA Beispiel 2	36
Abb. 8:	Variantenfilterung	40
Abb. 9:	Grafische Darstellung der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Subtypen innerhalb der IFSD-Kohorte	48
Abb. 10:	Geschlecht und Erkrankungsalter der Patienten mit IFSD	49
Abb. 11:	Erkrankungsalter der einzelnen IFSD-Subtypen	51
Abb. 12:	Unterschiede zwischen Männern und Frauen innerhalb der IFSD-Subtypen	53
Abb. 13:	Unterschiede zwischen Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese innerhalb der IFSD-Subtypen	55
Abb. 14:	Stammbäume mit Blepharospasmus	56
Abb. 15:	Stammbäume mit gemischten IFSD-Subtypen ohne zervikale Dystonie	57
Abb. 16:	Stammbäume mit zervikaler Dystonie und insgesamt zwei erkrankten Personen	58
Abb. 17:	Stammbäume mit zervikaler Dystonie und insgesamt drei erkrankten Personen	59
Abb. 18:	Stammbäume mit zervikaler Dystonie und dystonem Tremor und insgesamt zwei erkrankten Personen	60
Abb. 19:	Stammbäume mit zervikaler Dystonie und dystonem Tremor und insgesamt drei erkrankten Personen	61

Abb. 20: Stammbäume mit zervikaler Dystonie und dystonem Tremor und insgesamt mindestens vier erkrankten Personen	62
Abb. 21: Unterschiede von Patienten mit und ohne dystonen Kopftremor	64
Abb. 22: Strategie der molekulargenetischen Untersuchungen der Kohorte	66
Abb. 23: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Thr321Met in <i>TOR1A</i>	68
Abb. 24: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Lys3006Arg in <i>COL6A3</i>	69
Abb. 25: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Pro3082Arg in <i>COL6A3</i>	70
Abb. 26: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Val463Met in <i>ANO3</i>	71
Abb. 27: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Glu510Lys in <i>ANO3</i>	75
Abb. 28: Stammbaum des Indexpatienten mit der Variante p.Glu510Lys in <i>ANO3</i>	76
Abb. 29: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Ala657Thr in <i>ANO3</i>	77
Abb. 30: Stammbaum der Indexpatientin mit der Variante p.Ala657Thr in <i>ANO3</i>	78
Abb. 31: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Arg727Lys in <i>ADCY5</i>	79
Abb. 32: Stammbaum der Indexpatientin mit der Variante p.Arg727Lys in <i>ADCY5</i>	80
Abb. 33: Phylogenetische Konservierung an der Position der Variante p.Asn467Ser in <i>ADCY5</i>	83

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Primer für PCR, HRMA und Sanger-Sequenzierung	22
Tab. 2:	Reagenzien und Geräte der PCR	28
Tab. 3:	Standardansatz PCR ohne Zusätze	28
Tab. 4:	Standardansatz PCR mit Q-Solution	29
Tab. 5:	Standardansatz PCR mit Magnesiumchlorid	29
Tab. 6:	Protokoll PCR	30
Tab. 7:	Protokoll Touchdown-PCR	30
Tab. 8:	Standardansatz Sequenzierreaktion	31
Tab. 9:	Protokoll Sequenzierreaktion	32
Tab. 10:	Standardansatz HRMA-PCR	34
Tab. 11:	In der Variantenfilterung verwendete Liste mit 225 Dystonie-assozierten Genen	41
Tab. 12:	Demografische Daten und Verteilungsform der Dystonie	46
Tab. 13:	Klinische Charakteristika der Patienten mit generalisierter Dystonie	47
Tab. 14:	Geschlecht und Erkrankungsalter der Patienten mit IFSD	50
Tab. 15:	Anzahl und Erkrankungsalter von Patienten mit positiver und negativer Familienanamnese innerhalb der IFSD-Subtypen	54
Tab. 16:	Patienten mit zervikaler Dystonie und dystonem Kopftremor	63
Tab. 17:	Patienten mit Kopftremor und positiver Familienanamnese	64
Tab. 18:	Durch Sanger-Sequenzierung von <i>TOR1A</i> , <i>THAP1</i> und <i>COL6A3</i> und HRMA von <i>GNAL</i> und <i>ANO3</i> identifizierte seltene Varianten in 263 Patienten mit IFSD	72
Tab. 19:	WES-Statistik von Patienten mit generalisierter Dystonie	73
Tab. 20:	Durch WES identifizierte und nach Variantenfilterung priorisierte seltene Varianten in 26 ausgewählten Fällen	81

Tab. 21: Durch HRMA identifizierte seltene Varianten in <i>ADCY5</i> in 243 Patienten mit IFSD	84
---	----

9 Danksagung

Mein herausragender Dank gilt Herrn PD Dr. Michael Zech für die exzellente wissenschaftliche Betreuung und kritische Durchsicht meiner Arbeit. Bei allen Fragen und Problemen konnte ich stets auf seine kompetente Hilfe bauen.

Ganz besonders danke ich Frau Prof. Dr. Juliane Winkelmann für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Vergabe des interessanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Bei den ärztlichen Leitern Herrn Prof. Dr. Andrés Ceballos-Baumann und Herrn Prof. Dr. Werner Poewe bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit der Patientenrekrutierung an der Schön Klinik München Schwabing und der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Innsbruck. Für ihre Unterstützung möchte ich mich besonders bei PD Dr. Sylvia Boesch, Dr. Michael Messner, Dr. Christian Löer und Dr. Urban Fietzek bedanken.

Für die professionelle Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken und Hilfe bei der praktischen Umsetzung bedanke ich mich bei Frau Jelena Golic, Frau Veronika Treffer, Frau Sybille Frischholz und Frau Regina Feldmann bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neurogenomik für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

10 Publikationen

Zech, M., Jochim, A., Boesch, S., **Weber, S.**, Meindl, T., Peters, A., Gieger, C., Mueller, J., Messner, M., Ceballos-Baumann, A., Poewe, W., Haslinger, B., Winkelmann, J. (2016).

Systematic TOR1A non-c.907_909delGAG variant analysis in isolated dystonia and controls.

Parkinsonism & Related Disorders, 31, 119-123.

doi:10.1016/j.parkreldis.2016.07.013

Zech, M., Boesch, S., Jochim, A., **Weber, S.**, Meindl, T., Schormair, B., Wieland, T., Lunetta, C., Sansone, V., Messner, M., Mueller, J., Ceballos-Baumann, A., Strom, T. M., Colombo, R., Poewe, W., Haslinger, B., Winkelmann, J. (2017).

Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up.

Movement Disorders, 32, 549-559.

doi:10.1002/mds.26808