



UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

- KLINIK UND POLIKLINIK FÜR NEUROLOGIE -
DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. A. STORCH

Screening auf Mutationen in Dystonie-assoziierten Genen im Rahmen des Deutschen Netzwerks zur translationalen Erforschung und Behandlung dystoner Erkrankungen (DysTract)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Katrin Marth

geboren am 08.08.1994 in Itzehoe

Rostock, 2023



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0
International Lizenz.

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

Themenvergebender Betreuer: PD Dr. med. Christoph Kamm

Gutachter:

PD Dr. med. Christoph Kamm, Universität Rostock, Klinik und Poliklinik für Neurologie

Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling, Universität Rostock, Oscar Langendorff Institut für Physiologie

Prof. Dr. Thomas Gasser, Universitätsklinikum Tübingen, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

Hinweis: Der Begriff Patient wird in dieser Arbeit geschlechtsneutral verwendet. Diese Schreibweise dient der besseren Lesbarkeit und gilt im Sinne der Gleichbehandlung grundsätzlich für alle Geschlechter. Die verkürzte Sprachform beinhaltet keine Wertung.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Definition und Klassifikation der Dystonie	1
1.2. Klinische Einteilung der Dystonie	2
1.3. Ätiologie der Dystonie	5
1.4. Genetik der Dystonien	6
1.4.1. <i>TOR1A</i> -Dystonie	9
1.4.2. <i>THAP1</i> -Dystonie	10
1.4.3. <i>GNAL</i> -Dystonie	11
1.4.4. <i>PRKRA</i> -Dystonie	12
1.4.5. <i>KMT2B</i> -Dystonie	13
1.5. Diagnosestellung einer Dystonie	15
1.6. Therapieoptionen bei Dystonie	16
1.6.1. Botulinumtoxin	17
1.6.2. Tiefe Hirnstimulation	18
2. Zielsetzung der Studie	19
3. Patienten, Materialien und Methoden	21
3.1. Patienten	21
3.1.1. Studienprofil DysTract	21
3.2. Materialien und Methoden	23
3.2.1. Geräte und Software	23
3.2.2. Verbrauchsmaterialien	24
3.2.3. Next-Generation Sequencing basierte Panel-Sequenzierung	24
3.2.4. Filterschritte genetischer Varianten	25
3.2.5. Polymerasekettenreaktion	26
3.2.6. Gelelektrophorese	33
3.2.7. ExoFast-Aufreinigung	34
3.2.8. Sanger-Sequenzierung	36
4. Ergebnisse	39
4.1. Epidemiologische Daten der DysTract-Studie	39

4.2. Ergebnisse der DNA-Sequenzierung	40
4.2.1. Übersicht der gesamten identifizierten genetischen Varianten	40
4.2.2. Übersicht pathogener genetischer Varianten	43
4.3. Übersicht neuer genetischer Varianten	48
4.4. Genspezifische Darstellung pathogener Varianten	49
4.4.1. Pathogene Varianten im <i>TOR1A</i> -Gen	49
4.4.2. Pathogene Varianten im <i>THAP1</i> -Gen	52
4.4.3. Pathogene Varianten im <i>GNAL</i> -Gen	57
4.4.4. Pathogene Varianten im <i>PRKRA</i> -Gen	61
4.4.5. Pathogene Varianten im <i>KMT2B</i> -Gen	62
5. Diskussion	65
5.1. Epidemiologische Daten	65
5.2. Pathogene Varianten in Dystonie-Genen	68
5.2.1. Varianten im Gen <i>TOR1A</i>	68
5.2.2. Varianten im Gen <i>THAP1</i>	70
5.2.3. Varianten im Gen <i>GNAL</i>	72
5.2.4. Varianten im Gen <i>PRKRA</i>	75
5.2.5. Varianten im Gen <i>KMT2B</i>	76
5.3. Weiterführende Literatur	77
5.4. Einschränkungen und Fehleranalyse	78
5.5. Ausblick auf mögliche weitere Studien	80
6. Zusammenfassung	81
7. Thesen	83
Abkürzungsverzeichnis	85
Literaturverzeichnis	89
A. Anhang	99
A.1. Übersicht bekannter Dystonie-Gene	99
A.2. Klinische Daten der DysTract-Patienten aus Rostock	101
A.3. Patho-Scoring	111
A.3.1. Patho-Scoring mittels der MDSGene-Kriterien	111
A.3.2. Patho-Scoring mittels der ACMG-Kriterien	112
A.4. DysTract-Patienteninformation	114
A.5. DysTract-Einwilligungserklärung	121
A.6. DysTract-Pseudonymisierungsblatt	124
A.7. DysTract-Anamnesebogen	125
A.8. DysTract-Videoprotokoll	139
A.9. DysTract-Selbsteinschätzungsbögen	142

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Neues Klassifikationssystem der Dystonie (2013) - Achse I: klinische Charakterisierung	3
1.2.	Neues Klassifikationssystem der Dystonie (2013) - Achse II: Ätiologie	5
1.3.	Geschichtliche Einordnung der Entwicklung in der Genetik der Dystonien	7
3.1.	Beispiel Gelelektrophorese des Gens <i>KMT2B</i> (Exon 5, Exon 27 und Exon 37)	35
4.1.	Dystonieformen der Träger pathogener Varianten	43
4.2.	Lokalisation des Gens <i>TOR1A</i>	49
4.3.	Lokalisation des Gens <i>THAP1</i>	52
4.4.	Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.71+2T>C im Ex.1 des Gens <i>THAP1</i>	53
4.5.	Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.61T>G im Ex.1 des Gens <i>THAP1</i>	54
4.6.	Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.292G>T im Ex.3 des Gens <i>THAP1</i>	55
4.7.	Lokalisation des Gens <i>GNAL</i>	57
4.8.	Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.1115T>G im Ex.10 des Gens <i>GNAL</i>	58
4.9.	Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.1264dupT im Ex.12 des Gens <i>GNAL</i>	59
4.10.	Lokalisation des Gens <i>PRKRA</i>	61
4.11.	Lokalisation des Gens <i>KMT2B</i>	63
5.1.	Häufigkeitsverteilung Dystonieformen der DysTract-Studie in Rostock	66
5.2.	Häufigkeitsverteilung der Dystonieformen im Vergleich: DysTract vs. Literatur .	68

Tabellenverzeichnis

1.1. Einteilung der Dystonie anhand der Körperregion	4
1.2. Häufige Manifestationsorte einer Dystonie	4
1.3. Übersicht klinischer und genetischer Merkmale der analysierten Dystonie-Gene	8
1.4. Klinische Diagnosekriterien einer Dystonie	16
3.1. Geräteübersicht	23
3.2. Software	23
3.3. Verbrauchsmaterialien	24
3.4. Übersicht der durch Centogene AG sequenzierten Genpanel	25
3.5. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer	27
3.6. PCR-Programm „35x“ im Cycler	29
3.7. PCR-Programm „GC-Rich“ im Cycler	29
3.8. PCR-Ansätze <i>TOR1A</i>	30
3.9. PCR-Ansätze <i>GNAL</i>	30
3.10. PCR-Ansätze <i>PRKRA</i>	31
3.11. PCR-Ansätze <i>KMT2B</i>	32
3.12. Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers und Agarose-Gels	33
3.13. ExoFast-Aufbereitungsprogramm	34
3.14. Sequenzansatz und Cycler-Programm	37
4.1. Übersicht der DysTract-Studienteilnehmer	40
4.2. Klinische Daten der Studienteilnehmenden mit genetischen Varianten	42
4.3. Übersicht der pathogenen genetischen Varianten	44
4.4. Daten der pathogenen genetischen Varianten der Kontrollgruppe	45
4.5. Daten der pathogenen genetischen Varianten in der Dystonie-Gruppe	46
4.6. Übersicht klinischer Daten von Dystonie-Patienten mit genetischen Varianten	47
4.7. Mutationsform der neu identifizierten pathogenen genetischen Varianten	48
4.8. Tabellarische Übersicht pathogener <i>TOR1A</i> -Varianten	51
4.9. Tabellarische Übersicht pathogener <i>THAP1</i> -Varianten	56
4.10. Tabellarische Übersicht pathogener <i>GNAL</i> -Varianten	60
4.11. Tabellarische Übersicht pathogener <i>PRKRA</i> -Varianten	62
4.12. Tabellarische Übersicht pathogener <i>KMT2B</i> -Varianten	63
A.1. Liste bekannter Dystonie-Gene	99
A.2. Liste der 75 DysTract-Patienten aus Rostock	101

1. Einleitung

1.1. Definition und Klassifikation der Dystonie

Die Dystonien sind eine Gruppe seltener und klinisch heterogener Bewegungsstörungen. Sie sind charakterisiert durch anhaltende oder zwischenzeitlich auftretende unwillkürliche Muskelkontraktionen, welche unnatürliche Bewegungen, Positionen oder beides hervorrufen. Hiervon können auch wichtige Körperfunktionen wie das Sehen, Sprechen und Schlucken beeinträchtigt werden. Dystonische Bewegungsstörungen folgen typischerweise Mustern und können zu „verdrehenden“ Bewegungen führen und auch Komponenten von Tremor beinhalten (Albanese et al., 2013). Wegen dieser häufig im Alltag körperlich stark einschränkenden Symptome besteht ein großes Interesse, die Ätiologie und Pathophysiologie der Dystonien genauer zu entschlüsseln. Mit Hilfe neuer Erkenntnisse könnten ursachenspezifische Therapien entwickelt und auf diesem Wege die Lebensqualität der Betroffenen verbessert werden.

Dystonien sind die dritt-häufigste Bewegungsstörung weltweit (Breakefield et al., 2008). Die Prävalenz wird auf 30.85:100.000 geschätzt (Medina et al., 2022). Die Erstbeschreibung des Begriffs der Dystonie erfolgte 1911 durch Dr. Oppenheim (Oppenheim, 1911; Klein and Fahn, 2013). Er beschrieb das Krankheitsbild der Dystonie anhand von vier Patienten, bei denen die Extremitäten und der Rumpf von Muskelpasmen betroffen waren. Die Muskelpasmen resultierten in unnatürlichen und stark einschränkenden Positionen, die sich bei Bewegung verschlechterten. Je nach Aktivität trat ein Wechsel zwischen Hypo- und Hypertonie der Muskeln auf. Die Symptome konnten zu verdrehenden bis hin zu starren Körperpositionen führen. Den unnatürlichen Körperhaltungen entsprechend prägte Oppenheim die Bezeichnung *Dystonia muscularum deformans* für das dystone Krankheitsbild (Klein and Fahn, 2013). Im Jahre 1984 erfolgte eine Definition durch ein Expertenkomitee der Dystonia Medical Research Foundation. Dystonien wurden beschrieben als *syndrome of involuntary, sustained muscle contractions affecting one or more sites of the body, frequently causing twisting and repetitive movements, or abnormal postures* (Syndrom mit unwillkürlichen und anhaltenden Muskelkontraktionen, welche eine oder mehr Körperstellen betreffen und oftmals zu verdrehenden und wiederholten Bewegungen oder unnatürlichen Körperhaltungen führen) (LeDoux, 2012). In den letzten Jahrzehnten wurden die Dystonien stetig weiter erforscht. 2013 folgte eine neue überarbeitete Definition und Klassifikation der Dystonie. In dieser im internationalen Konsensus führender Dystonie-Experten entstandenen Definition wird Dystonie definiert als *a movement disorder characterized by sustained or intermittent muscle contractions causing abnormal, often repetitive, movements, postures, or both. Dystonic movements are typically patterned and twisting, and may be tremulous. Dystonia is often initiated or worsened by voluntary action and associated with overflow muscle activation* (Albanese et al., 2013).

Dystonien können jede Körperregion betreffen und sich im Verlauf über mehrere Regionen ausbreiten. Auch die Stimmbänder und das Gesicht können beeinträchtigt sein. Im Gesicht sind insbesondere die Augenlider und die oromandibuläre Region betroffen. Das Manifestationsalter reicht von früher Kindheit bis hin zum späten Erwachsenenalter. Als Ursache der Dystonie werden verschiedenste Gründe diskutiert. Eine Rolle spielen sowohl genetische Veränderungen als auch das Zusammenspiel mit Umweltfaktoren bzw. anderen Erkrankungen. Ein Großteil der Dystonien tritt allerdings idiopathisch auf (Albanese et al., 2013). Dystonien weisen somit klinisch und ätiologisch eine große Heterogenität auf.

Zur Systematisierung dieser heterogenen Gruppe von Bewegungsstörungen werden deskriptive, ätiologische und genetische Kriterien genutzt. Die deskriptive Einteilung erfolgt entweder nach dem Erkrankungsalter oder der betroffenen Körperregion (Albanese et al., 2013). Es gibt verschiedene Manifestationsformen von Dystonien: isolierte (ausschließlich Dystonie-Symptome), kombinierte (mit zusätzlichen Symptomen anderer Bewegungsstörungen) und sogenannte komplexe Dystonien; letztere sind Erkrankungen, bei denen Dystonie als ein, häufig weniger prominentes Symptom gemeinsam mit weiteren auftritt (Lohmann and Klein, 2017). Ätiologisch unterschied man ursprünglich zwischen primären Dystonien (Dystonie-Symptome als einzige klinisch-neurologische Manifestation), Dystonie-Plus-Syndromen (mit zusätzlichen Symptomen anderer Bewegungsstörungen), sekundären Dystonie (als Folge einer anderen Erkrankung oder eindeutigen Ursachen, beispielsweise eines Apoplex, eines Traumas oder durch Medikamente) oder heredodegenerativen Dystonien (Dystonie sowohl als prominentes als auch als Nebensymptom vorhanden) unterscheiden (Fahn, 2011). Diese Klassifikation wurde jedoch durch die neue Einteilung von 2013 abgelöst (Albanese et al., 2013). Nach dieser werden Dystonien nun nach zwei Achsen eingeteilt, der klinischen Charakterisierung (s. Abbildung 1.1) und der Ätiologie (s. Abbildung 1.2).

Durch Fortschritte im Bereich der Molekulargenetik konnten in den letzten 30 Jahren über 200 Gene als mögliche Ursachen von Dystonien identifiziert werden (Lohmann and Klein, 2017; Lange et al., 2022). Die genetische Einteilung richtet sich nach dem ursächlichen Gen, dem genetischen Lokus und dem Vererbungsmodus. Auch durch die Weiterentwicklung klinischer und genetischer Analysen und Erforschung der Pathophysiologie der Dystonien unterliegt die Einteilung der Dystonie einem stetigen Wandel.

1.2. Klinische Einteilung der Dystonie

Klinisch werden Dystonien nach dem Klassifikationssystem von 2013 nach dem Erkrankungsalter, der betroffenen Körperregion und dem zeitlichen Verlauf charakterisiert (Albanese et al., 2013).

Das Erkrankungsalter wird in einen frühen (early-onset) und späten Beginn (late-onset) unterteilt. Als früher Beginn wird das erste Auftreten von Symptomen vor dem 30sten Lebensjahr bezeichnet. Treten Symptome erst danach auf, handelt es sich um einen späten Beginn. Abhängig von den Symptomen werden Dystonien in isolierte und kombinierte Formen eingeteilt (Abbildung 1.1).

Erkrankungsalter	Kleinkindalter (Geburt- 2 Jahre)
	Kindheit (3- 12 Jahre)
	Adoleszenz (13- 20 Jahre)
	Frühes Erwachsenenalter (21- 40 Jahre)
	Spätes Erwachsenenalter (>40 Jahre)
Betroffene Körperregionen	Fokal
	Multifokal
	Segmental
	Hemidystonie
	Generalisiert
Zeitliches Muster	Krankheitsverlauf
	Stagnierend
	Progredient
Variabilität	Persistierend
	Belastungsabhängig
	Tageszeitabhängig
	Paroxysmal
Assoziierte Merkmale	Isolierte Dystonie
	Kombinierte Dystonie (mit einer anderen Bewegungsstörung/en kombiniert)
	Weitere begleitende neurologische oder systemische Erkrankungen

Abbildung 1.1.: Neues Klassifikationssystem der Dystonie (2013) - Achse I: klinische Charakterisierung

Übersicht der klinischen Charakterisierung der Dystonie, modifiziert nach dem 2013 im Konsensus entwickelten neuen Klassifikationssystem (Albanese et al., 2013).

Isolierte, idiopathische Dystonien (früher Primäre Dystonien/ PTD= primary torsion dystonia) stellen dabei die größte Untergruppe der Dystonien dar. Sie umfasst ungefähr 75% der Dystonie-Fälle und zeigt ein breites klinisches Spektrum, von in der Kindheit beginnender generalisierter Dystonie bis hin zu einer im Erwachsenenalter auftretenden fokalen Dystonie. Als isolierte Dystonie wird die Dystonie bezeichnet, wenn ausschließlich dystone Symptome vorliegen, mit Ausnahme von Tremor, welcher ebenfalls Teil einer isolierten Dystonie sein kann (Albanese et al., 2013). Treten neben Dystonie auch Symptome anderer Bewegungsstörungen auf, wie ein Parkinson-Syndrom oder Myoklonien, handelt es sich um eine kombinierte Dystonie (Albanese et al., 2013). Auch für kombinierte Dystonie konnten in den letzten Jahren vermehrt genetische Ursachen nachgewiesen werden (Balint and Bhatia, 2015; Zech et al., 2017a).

In einigen Arbeiten wird noch eine dritte und klinisch heterogenste Form der Dystonie benannt. Es handelt sich dabei um die komplexe Dystonie, bei der dystone Symptome gemeinsam mit anderen neurologischen und nicht-neurologischen Symptomen auftreten. Diese Form wurde erstmals 2016 beschrieben (Marras et al., 2016) und ist nicht in der 2013 publizierten Konsensus-Klassifikation von Dystonie enthalten (Albanese et al., 2016).

Symptome einer Dystonie können sich in jeder Körperregion manifestieren und auch gleichzeitig in mehreren Körperregionen vorkommen. Dementsprechend erfolgt eine Einteilung in fünf Kategorien: fokal, multifokal, segmental, generalisiert und Hemidystonie (s. Tabelle 1.1) (Albanese et al., 2013; Balint et al., 2018).

Tabelle 1.1.: Einteilung der Dystonie anhand der Körperregion

Fokal:	eine einzelne Körperregion ist betroffen (z.B. Schreibkrampf, Blepharospasmus)
Multifokal:	mehrere nicht aneinander angrenzende Körperregionen sind betroffen (z.B. obere und untere Extremitäten; kranial und untere Extremitäten)
Segmental:	mehrere aneinander grenzende Körperregionen sind betroffen (z.B. kranial und zervikal; zervikal und obere Extremität)
Generalisiert:	der Rumpf und mindestens zwei weitere Körperregionen sind betroffen
Hemidystonie:	eine Körperhälfte ist betroffen (meist sekundär durch eine Läsion in den kontralateralen Basalganglien)

Treten Symptome von Dystonie nur in kurzen Episoden mit zwischenzeitlich symptomfreien Intervallen auf, werden diese Formen von Dystonie als paroxysmale Dystonie bezeichnet. Oft werden die Symptome durch bestimmte Triggerfaktoren, z.B. Belastung der Körperregion, ausgelöst (Albanese et al., 2013; Charlesworth et al., 2013).

Häufige Lokalisationen einer Dystonie werden in der folgenden Tabelle 1.2 dargestellt (Balint et al., 2018; Albanese et al., 2013).

Tabelle 1.2.: Häufige Manifestationsorte einer Dystonie

Cervikale Dystonie:	die Dystonie betrifft die Hals- und Nackenmuskulatur und führt zu unnatürlichen Haltungen des Kopfes; Subtypen: Torticollis (der Kopf dreht sich zu einer Seite), Laterocollis (der Kopf kippt zu einer Seite), Retrocollis (Extension des Kopfes nach hinten) und Anterocollis (Flexion des Kopfes nach vorne)
Craniale Dystonie:	die Dystonie betrifft das Gesicht oder die Stimme; Subtypen: Laryngeale Dystonie, Blepharospasmus, oromandibuläre Dystonie, Meige-Syndrom (Blepharospasmus + oromandibuläre Dystonie)
Laryngeale Dystonie:	auch spasmodische Dysphonie genannt. Die Dystonie betrifft die Stimmbänder; Subtypen: Adduktor-Typ („gewürgte“, „raue“ Stimme mit häufig wechselnden Tonhöhen), Abduktor-Typ („flüsternde“, „gehauchte“ Stimme)
Blepharospasmus:	charakterisiert durch die Augen schließende Muskelkontraktionen
Oromandibuläre Dystonie:	die Dystonie betrifft die Mund- und /oder Kiefermuskulatur und führt zu unfreiwilligen perioralen Bewegungen, wie Mundöffnung oder Mundschluss
Schreibkrampf:	fokal, tätigkeitsspezifisch, die Hand oder den Unterarm betreffend; verstärkt sich durch Schreiben
Musikerdystonie:	tätigkeitsspezifisch, Manifestation in der Körperregion, die zum Spielen eines Instrumentes genutzt wird
Paroxysmale Dystonie:	tritt intermittierend unter bestimmten Triggerfaktoren auf, zum Beispiel belastungsabhängig
Bewegungs-induzierte Dystonie:	die Dystonie manifestiert sich nach andauernden Übungen als selbst-limitierende Episoden in der trainierten Extremität
Paroxysmale kinesogene Dystonie:	die Dystonie manifestiert sich als kurze selbst-limitierende Episoden, z.T. mit unwillkürlicher Körperhaltungen, die durch plötzliche Bewegungen ausgelöst werden

1.3. Ätiologie der Dystonie

Die Kontrolle willkürlicher Bewegungen wird durch neuronale Interaktionen im Gehirn gesteuert. Ausschlaggebend sind dabei die Interaktionen zwischen den Basalganglien, dem sensorischen Kortex, dem Kleinhirn und dem Thalamus. Eine Störung dieser Interaktionen oder Hirnareale kann zu unterschiedlichen Formen von Bewegungsstörungen führen (Meyer et al., 2017). Zu den Erkrankungen des Nervensystems zählen dabei vor allem neurodegenerative Erkrankungen und strukturelle Läsionen, wodurch die neuronalen Interaktionen geschädigt und eine Dystonie hervorgerufen werden kann. Wurde als Ursache der Dystonie eine definierte neurologische Erkrankung, wie eine perinatale Hirnschädigung, Neoplasie, Intoxikation, Infektion oder vaskulär bedingte Veränderungen identifiziert, handelt es sich um eine erworbene Dystonie. Auslöser einer erworbenen Dystonie können darüber hinaus Medikamente sein, die durch ihre Wirkung das Nervensystem beeinflussen (Charlesworth et al., 2013; Balint et al., 2018).

Die zweite Achse der Klassifikation der Dystonien befasst sich mit der Ätiologie der Dystonie. Nach dem neuen Klassifikationssystem (2013) werden hinsichtlich der Ursachen anatomisch feststellbare Pathologien des Nervensystems und vererbte oder erworbene Formen unterschieden (Albanese et al., 2013). In Abbildung 1.2 ist diese aktuelle Klassifikation der Ätiologie dargestellt.

Erkrankungen des Nervensystems	Degeneration	
	Strukturelle Läsion	
	Kein Hinweis auf eine Pathologie	
Erblich oder erworben	Erblich	Autosomal dominant
		Autosomal rezessiv
		X-linked
		Mitochondrial
	Erworben	Perinatale Hirnschädigung
		Infektion
		Medikamentös
		Toxisch
		Vaskulär
		Neoplastisch
		Hirnschädigung
		Psychogen
Idiopathisch		Sporadisch
		Familiär

Abbildung 1.2.: Neues Klassifikationssystem der Dystonie (2013) - Achse II: Ätiologie
Übersicht der Ätiologie der Dystonie, modifiziert nach dem 2013 im Konsensus entwickelten neuen Klassifikationssystem (Albanese et al., 2013)

1.4. Genetik der Dystonien

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts wurden große Fortschritte in der Erforschung des menschlichen Genoms erzielt. Durch das Humangenomprojekt (1990-2003) konnte das menschliche Genom entschlüsselt und hierdurch genetische Ursachen vieler Erkrankungen besser verstanden werden (Moraes and Góes, 2016). Durch die Weiterentwicklung und Beschleunigung genetischer Analysen mittels des Next-Generation Sequencing (NGS) ergaben sich auch im Bereich der Genetik der Dystonien viele neue Erkenntnisse. In den letzten 30 Jahren wurden auf diesem Wege über 200 Gene mit der Pathogenese der Dystonien in Verbindung gebracht, wovon bei einigen Genen bereits ein direkter Zusammenhang zwischen Genvarianten und Ursachen der Dystonie nachgewiesen werden konnte (Lohmann and Klein, 2017; Steel et al., 2020). Mit Hilfe des NGS konnten nicht nur neue pathogene genetische Varianten in Dystonie-assoziierten Genen identifiziert, sondern auch das Verständnis der Ätiologie und Pathogenese der Dystonien verbessert werden. Durch das wachsende Verständnis folgte eine neue Klassifikation und die Bezeichnung verschiedener Dystonieformen konnte spezifiziert werden (Domingo et al., 2016; Marras et al., 2016).

Die Erstellung einer einheitlichen Liste ist nur schwer möglich, da immer wieder neue Erkenntnisse bekannt oder eine Assoziation mit Dystonie für einige dieser Gene in Frage gestellt werden, da eine Pathogenität nicht sicher nachgewiesen werden konnte (Jinnah and Sun, 2019; Lange et al., 2022). Bisherige Erkenntnisse deuten insgesamt jedoch auf eine hohe Relevanz genetischer Ursachen in der Pathogenese vieler Formen von Dystonie hin. Eine positive Familienanamnese und ein früher Beginn stehen häufig in Verbindung mit einer monogenetisch vererbten Form der Dystonie (Charlesworth et al., 2013). Bisher konnten von den mit Dystonie in Verbindung gebrachten Genen über 30 Gene sicher als Ursache einer Dystonie nachgewiesen werden (Lohmann and Klein, 2013; Balint et al., 2018). Eine Liste bekannter Dystonie-Gene mit den Genloci und dem Vererbungsmodus ist im Anhang in der Tabelle A.1 aufgeführt. Der Fokus der Tabelle liegt auf den Genen, die mit isolierte und kombinierte Formen von Dystonie sowie Dystonie-Parkinsonismus assoziiert sind. Die Nomenklatur (DYT1, DYT2, usw.) geht ursprünglich auf die historische Reihenfolge der „Entdeckung“ neuer, mit Dystonie assoziierter Genloci zurück, ohne den genauen Pathomechanismus oder die klinische Ausprägung zu betrachten. Mittlerweile sind die jeweiligen Gene zum größten Teil identifiziert, und eine alleinige Nomenklatur anhand der Genloci wird von dem *Human Genome Organisation (HUGO)-Gene Nomenclature Committee* nicht mehr empfohlen. Dem Prefix „DYT“ folgt nun der Name des entsprechenden Gens (Marras et al., 2016). Im Fall von DYT1 wird beispielsweise die Bezeichnung „DYT-TOR1A“ genutzt.

In Abbildung 1.3 ist eine Übersicht bedeutsamer Entwicklungen in der Genetik der Dystonien dargestellt. Der Fokus liegt dabei auf den für diese Arbeit relevanten Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B*. Da im weiteren Forschungsverlauf nach Abschluss des praktischen Teils dieser Arbeit drei weitere mit einer isolierten Dystonie assoziierte Gene nachgewiesen werden konnten, wurden diese ebenfalls der Vollständigkeit halber mit in Abbildung 1.3 aufgenommen. Es handelt sich dabei um die Gene *VPS16*, *EIF2AK2* und *AOPEP*. Eine detailliertere Beschreibung dieser Gene sind in dem Paper Thomsen et al., 2023 zusammengefasst.

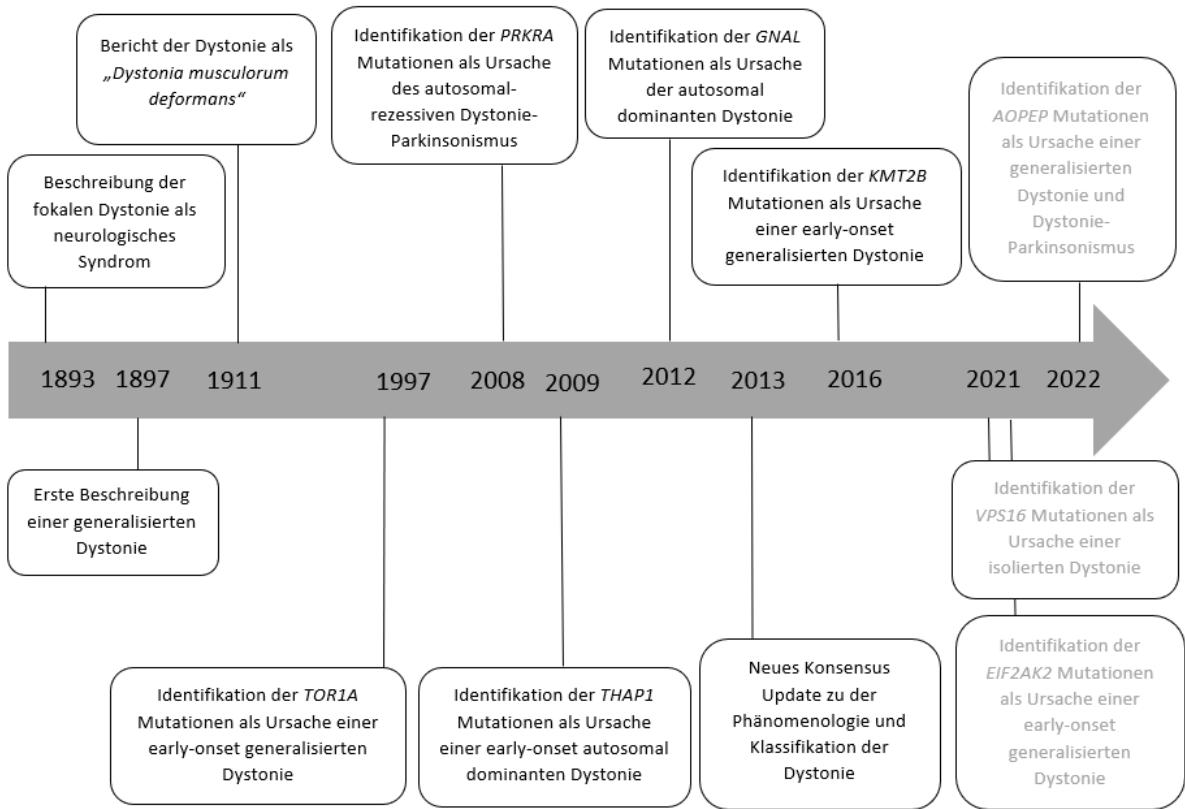


Abbildung 1.3.: Geschichtliche Einordnung bedeutsamer Entwicklungen der Genetik von Dystonien
Die Abbildung stellt einige bedeutsame Meilensteine in der Erforschung genetischer Ursachen der Dystonien dar. Es handelt sich hierbei um eine Auswahl mit dem Schwerpunkt auf den in dieser Studie untersuchten Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B*. Eine umfassendere Darstellung ist bei Balint et al. (2018) zu finden.

Die nach Abschluss der praktischen Durchführung dieser Studie neu identifizierten und mit der Dystonie assoziierten Gene *VPS16*, *EIF2AK2* und *AOPEP* wurden zur Übersicht ebenfalls dargestellt und in hellgrau hinterlegt (Thomsen et al., 2023).

Während die Pathogenität vieler Dystonie-Gene bereits fest etabliert ist, werden weiterhin neue zusätzliche genetische Varianten bzw. Mutationen in diesen Genen nachgewiesen oder weitere Gene mit in die Pathogenese der Dystonie einbezogen. Im Fokus dieser Arbeit stehen pathogene Varianten in den Dystonie-Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B*, welche zu meist zu einer isolierten Dystonie führen (Lange et al., 2021). In Tabelle 1.3 sind die klinischen und genetischen Merkmale dieser Gene dargestellt und werden in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.

Tabelle 1.3.: Zusammenfassung klinischer und genetischer Merkmale der analysierten Dystonie-Gene
Es handelt sich in dieser Tabelle um eine Auswahl bedeutender monogenetischer Formen einer isolierten analysierten Dystonie-Gene. Eine ausführlichere Übersicht ist in den Arbeiten (Balint et al., 2018; Charlesw Lange et al., 2021) enthalten.

Gen	Chromosom	Bezeichnung	Funktion	Klinische Charakteristika:	Ausbreitung	zusätzliche Symptome:
TOR1A 9q34	DYT1	DYT1-Dystonie, early-onset	ER-Kernhülle- Membran-Transport, Chaperon	Transkriptionsfaktor, assoziiert mit Apoptose, Zellteilung	Adoleszenz bis frühes Erwachsenenalter	PRKRA GNAL 18p11.21 DYT16
DYT1-Dystonie, adolescent-onset	DYT6	dystonia AD	ER-Kernhülle- Membran-Transport, Chaperon	Geruchssinn, Signaltransduktion im Dopamin-Stoffwechsel	mittleres Erwachsenenalter meist zervikal	DYT16-Dystonie, adult-onset
generalised dystonia AD	THAP1	Gαolf	Transkriptionsfaktor, assoziiert mit Apoptose, Zellteilung	Adoleszenz bis frühes Erwachsenenalter	Extremitäten (OE > UE), Larynx	DYT25-Dystonie, adolescent-onset
TorsinA		AR		adolescent und generalisierte Form häufig	Generalisierung	DYT25-Dystonie, early-onset
		PRKRA		segmental dystonia AD	Parkinsonismus, Hyperreflexie	generalized dystonia AD / de novo
				mit frühem Beginn AR		Lysin- spezifische Histon Methyltransferase 2B
						epigenetischer Regulator der Genexpression

AD = autosomal dominant, AR = autosomal recessiv, ER = Endoplasmatisches Retikulum, THAPI = Thanatos-associated-protein domain containing, apoptosis associated protein 1, PRKRA = protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator, GNAL = guanine nucleotide-binding protein subunit alpha L, KMT2B = Lysinspezifische Histon-Methyltransferase 2B, OE = Obere Extremität, UE = Untere Extremität

1.4.1. Mutationen im Gen **TOR1A** als Ursache einer Dystonie

DYT-TOR1A ist eine Form von Dystonie, für die als erstes ein Genlocus identifiziert wurde. Das DYT1-Gen **TOR1A** liegt auf Chromosom 9 (9q34) und ist mit einer autosomal-dominant vererbten, meist früh beginnenden generalisierten Dystonie (frühere Bezeichnung: Torsionsdystonie) assoziiert (Ozelius et al., 1997). Das mittlere Alter bei Beginn der Symptome liegt bei 13 Jahren (Lange et al., 2021).

Klinisch manifestiert sich die DYT-TOR1A-Dystonie meist mit einem Beginn in den Extremitäten. Innerhalb von fünf Jahren kommt es typischerweise zu einer Ausbreitung der Symptome unter Einbeziehung des Rumpfes oder weiterer Extremitäten, selten auch des Kopfes bis hin zu einer Generalisierung in etwa 50% der Fälle. Mutationsträger, welche bis zum Alter von 27 Jahren noch keine Symptome zeigen, werden als *nonmanifesting carrier* bezeichnet, da das Ausbilden von Symptomen bei diesen Patienten meistens ausbleibt (Weisheit et al., 2018). Ungefähr zwei Drittel der Variantenträger bilden lebenslang keine Symptome einer Dystonie aus. Mutationen im Gen **TOR1A** zeigen somit eine reduzierte Penetranz von ca. 30% (Zirn et al., 2008; Lohmann and Klein, 2017).

Therapeutisch ist neben der lokalen Applikation von Botulinumtoxin die Tiefe Hirnstimulation (THS) eine effektive Möglichkeit der Symptomreduktion (Lohmann and Klein, 2017).

Das Gen **TOR1A** (torsin family 1 member A) auf Chromosom 9q34 kodiert für das Protein Torsin A, das zur AAA+-Superfamilie gehört. Die Bezeichnung AAA+ steht für *ATPases associated with a variety of cellular activities* und beschreibt die Eigenschaft dieser ATPasen, an verschiedenen Prozessen des Zellstoffwechsels beteiligt zu sein.

TorsinA ist überwiegend im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem perinukleären Raum bzw. der Kernhülle lokalisiert (Lohmann and Klein, 2017). Als ATPase wirkt TorsinA in einer Vielzahl zellulärer Aktivitäten wie der Remodellierung von Proteinen und Aminosäuren und dem Proteinabbau mit (Demircioglu et al., 2019). Es kann zusätzlich als Chaperon fungieren; der Anteil von TorsinA innerhalb der Zelle, der im ER bzw. der Kernhülle lokalisiert ist, benötigt zur Aktivierung die Bindung an LAP1 (lamina-associated protein) oder LULL1 (luminal domain like LAP1). Wird diese Bindung durch Mutationen, wie beispielsweise die GAG-Deletion c.907_909delGAG p.Glu303del beeinträchtigt, kommt es zu Störungen der Zellfunktion (Sosa et al., 2014).

Diese GAG-Deletion ist die erste fest etablierte Mutation. Die Deletion von den drei Basenpaaren führt zu dem Verlust der Aminosäure Glutaminsäure des Proteins Torsin A und ist nach derzeitigem Stand für mehr als die Hälfte aller Fälle einer isolierten, früh beginnenden Dystonie verantwortlich (Charlesworth et al., 2013; Ozelius et al., 1997). Durch ausführliche molekulargenetische Analysen in verschiedenen Populationen wurde diese Mutation wiederkehrend in diversen Studien bei Patienten mit einer früh beginnenden Dystonie nachgewiesen (Klein et al., 1998; Hettich et al., 2014; Lohmann and Klein, 2017; Ma et al., 2018).

Neben der GAG-Deletion wurden weitere genetische Varianten im Gen **TOR1A** identifiziert. Die Missense-Variante c.863G>A p.Arg288Gln (Zirn et al., 2008; Iqbal et al., 2019) und die In-frame Deletion c.40_45 delGCGCCG p.Ala14_Pro15del (Vulinovic et al., 2014) gelten ebenfalls als wahrscheinlich pathogene Varianten, die mit einer Dystonie assoziiert sind. Zusätzlich zu

den bestätigten genetischen Varianten bzw. Mutationen werden durch die steigende Zahl der Genanalysen weitere seltene, z.T. nicht wiederholt auffindbare genetische Varianten bei Patienten mit Dystonie nachgewiesen. Für eine eindeutige Beurteilung der Pathogenität dieser Varianten sind weitere Kontrollen und funktionelle Untersuchungen zur eventuell eingeschränkten Funktion von TorsinA notwendig (Lohmann and Klein, 2017).

1.4.2. Mutationen im Gen *THAP1* als Ursache einer Dystonie

Mutationen in dem Gen *THAP1* wurden 2009 als zweite monogenetische Ursache primärer isolierter Dystonie identifiziert (Fuchs et al., 2009). Diese werden unabhängig vom Geschlecht autosomal-dominant mit einer Penetranz von ungefähr 60% vererbt (Fuchs et al., 2009; Lohmann and Klein, 2017). Einem signifikanten Anteil der familiär auftretenden, früh beginnenden Dystonien liegen Mutationen im Gen *THAP1* zugrunde (Bressman et al., 2009; Lange et al., 2021).

Das Gen *THAP1* liegt auf Chromosom 8 (8p11.21) und kodiert für den Transkriptionsfaktor THAP1 (thanatos associated protein domain containing, apoptosis-associated protein 1) (Siokas et al., 2019). Dieser ist ein atypisches Zink-Finger-Protein, charakterisiert durch eine DNA-bindende Domäne am N-Terminus, eine Prolin-reichen Sequenz, eine Coiled-Coil-Sequenz, die Protein-Interaktion vermittelt, und eine Kernlokalisierungssequenz (nuclear localization signal, NLS) am C-Terminus (Lohmann and Klein, 2017). THAP1 ist ein nuklearer proapoptotischer Faktor und interagiert u.a. mit dem Prostate-apoptosis-response Protein 4 (PAR-4), das als Regulator an der Apoptose beteiligt ist (Charlesworth et al., 2013). Eine Veränderung in dem Aufbau von *THAP1* kann zu einem Funktionsverlust der DNA-bindenden Domäne und somit zu einer Störung der Regulation der Expression anderer Gene führen. Zu den durch THAP1 regulierten Genen gehören Schlüsselgene des Zellzyklus sowie die Hemmung der Expression von *TOR1A*. Mittlerweile sind über 100 verschiedene Mutationen, inklusive Missense-, Nonsense- und Frameshift-Mutationen bekannt (Lohmann and Klein, 2017; Fuchs et al., 2009; Djarmati et al., 2009). Mutationen in diesem Gen wurden in genetisch verschiedenen Populationen weltweit gefunden. Die meisten genetischen Varianten liegen in heterozygoter Form vor, wobei in Einzelfällen auch homozygote Mutationen beschrieben sind (Charlesworth et al., 2013). Patienten mit homozygoten Mutationen haben häufig einen früheren Symptombeginn mit größerer Tendenz zur Generalisierung und häufigerer Beteiligung brachialer, facialer und oromandibulärer Muskeln (Bressman et al., 2009). Der Symptomverstärkung liegt zu ungefähr 70% ein Verlust der DNA-Bindung in Folge einer Mutation und struktureller Veränderung des Transkriptionsfaktors THAP1 und folglich einer Dysregulation der Transkription regulierter Gene zugrunde (Fuchs et al., 2009; Lohmann et al., 2012). Eine Mutation im Gen *THAP1* könnte somit durch die bedeutsamen Funktionen des Transkriptionsfaktors THAP1 zu neurohistologischen und neurochemischen Veränderungen führen und hierdurch die Entwicklung einer Dystonie begünstigen (Siokas et al., 2019)

DYT-THAP1-Dystonien sind charakterisiert durch einen frühen Beginn der Symptome in der Jugend oder im jungen Erwachsenenalter (adolescent-onset) mit gemischem Phänotyp. Die Symptome sind häufig beginnend in den cranio-cervikalen Muskeln oder als fokale Dystonie

der oberen Extremität, z.B. in Form eines Schreibkrampfes. Eine oromandibuläre Manifestation und laryngeale Dystonie sind ebenfalls häufige Erstsymptome (Charlesworth et al., 2013). Oftmals kommt es im Verlauf zur segmentalen Ausbreitung oder Generalisierung der Symptome mit kraniozervikalem Schwerpunkt und häufigem Auftreten einer Sprachstörung im Sinne einer spastischen Dysphonie (Kamm, 2009; Lohmann and Klein, 2017). Insgesamt tritt eine sich auf mehrere Körperregionen ausbreitende segmentale/multifokale oder generalisierte Form der Dystonie häufiger auf als eine fokale Dystonie (Lange et al., 2021). Allerdings kann der Phänotyp sehr unterschiedlich ausgebildet sein. Selbst innerhalb einer Familie mit Trägern derselben Mutation kann das Spektrum von Symptomen von asymptatisch bis hin zu einer generalisierten Dystonie reichen (Lohmann et al., 2012). Durchschnittlich erkranken die Patienten mit ca. 16 Jahren (Fuchs et al., 2009). Die Tiefe Hirnstimulation wird als Therapieoption genutzt, wobei das Ansprechen auf diese Therapie interindividuell sehr unterschiedlich ist und zum Teil nur eine wenig beständige Symptomlinderung ermöglicht (Lohmann and Klein, 2017).

1.4.3. Mutationen im Gen **GNAL** als Ursache einer Dystonie

Mit dem auf dem Chromosom 18 (18p11.21) gelegenen Gen **GNAL** assoziierte Dystonien wurden erstmals 2012 beschrieben (Fuchs et al., 2013). Erste Hinweise auf die Bedeutung des Gens **GNAL** in der Pathogenese primärer Dystonien fanden sich in klinischen Beschreibungen von Patienten mit einer Chromosom 18p-Deletion (Klein et al., 1998; Tezzon et al., 1998; Fuchs et al., 2013; Weisheit et al., 2018).

Das Gen **GNAL** kodiert für die stimulatorische α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins ($\text{G}\alpha\text{olf}$). Dies ist ein GTP-bindendes G-Protein, das nach der Funktion in der Übermittlung von Signalen des Geruchssinns in olfaktorischen Epithelzellen benannt wurde (Morgante and Klein, 2013). Neben dem Vorkommen in olfaktorischen Epithelzellen wird $\text{G}\alpha\text{olf}$ in höherer Konzentration im Striatum und Nucleus accumbens exprimiert. Dort verbindet es D1-Dopamin- (D1R) und A2A Adenosin-Rezeptoren (A2AR) mit nachfolgenden Effektormolekülen in striatalen Neuronen (Lohmann and Klein, 2017) und ist somit an der Aktivierung von Adenylylzyklasen, wie der Adenylylzyklase Typ5 (AC5), beteiligt. Funktionelle Analysen homozygoter **GNAL**-Mutationen zeigten eine verminderte Bindung von $\text{G}\alpha\text{olf}$ an D1-Rezeptoren (Masuho et al., 2016). Mutationen im Gen **ADCY5**, das für die Adenylylzyklase (AC5) kodiert, wurden ebenfalls als Ursache von Bewegungsstörungen, z.T. in Form von Dystonien, beschrieben. Dies stützt die Hypothese, dass das Protein $\text{G}\alpha\text{olf}$ eine Rolle in der Pathogenese von genetisch bedingten Dystonien spielt (Siokas et al., 2019). Des Weiteren wurden in immunhistochemischen Studien eine hohe Expression des G-Proteins $\text{G}\alpha\text{olf}$ in zerebellären Purkinje-Zellen und eine Beteiligung von $\text{G}\alpha\text{olf}$ an der Phosphorylierung von Histonen H3 nachgewiesen. $\text{G}\alpha\text{olf}$ besitzt somit eine Schlüsselfunktion in der Signalübertragung innerhalb des olfaktorischen Neuroepitheliums und der Basalganglien (Vemula et al., 2013).

Mutationen im Gen **GNAL** scheinen zu den am häufigsten dokumentierten Ursachen einer im Erwachsenenalter beginnenden segmentalen Dystonie zu gehören (Lohmann and Klein, 2013). DYT-GNAL wird autosomal-dominant vererbt. Somit kann es zu familiären Häufungen

kommen. Des Weiteren wird zusätzlich von einem sporadischen Auftreten auf Grund von de novo-Mutationen berichtet (Masuho et al., 2016). In verschiedenen Studien wurden sowohl Missense- als auch Nonsense- Mutationen des Gens *GNAL* im Zusammenhang mit einer Dystonie beschrieben. Mittlerweile wurden mehr als 30 verschiedene pathogene genetische Varianten des Gens *GNAL* mit der Entwicklung einer Dystonie assoziiert (Fuchs et al., 2013; Vemula et al., 2013; Kumar et al., 2014; Siokas et al., 2019). Heterozygote Mutationen des Gens *GNAL* begünstigen bzw. verursachen die Entwicklung einer im Erwachsenenalter beginnenden fokalen (zervikal, kranial, laryngeal) und sich teilweise auch auf weitere Körperregionen ausbreitende Dystonie mit einem durchschnittlichen Beginn im dritten Lebensjahrzehnt (Lohmann and Klein, 2017). Es wird eine Penetranz von ungefähr 50% angenommen (Jinnah and Sun, 2019). Homozygote Mutationen wie z.B. die Mutation c.1216 C>T, wurden ebenfalls beschrieben. Der assoziierte Phänotyp war eine in der Kindheit (childhood-onset) beginnende generalisierte Dystonie (Masuho et al., 2016). Die beide Allele betreffende Mutation führt zu einem stärkeren Funktionsverlust des G-Proteins $\text{G}\alpha\text{olf}$ und somit zu einer früheren Ausbildung der Symptome. In Studien waren beide asymptomaticischen Elternteile und nicht betroffene Kinder heterozygote Träger dieser Variante. Es ist wahrscheinlich, dass trotz Beeinträchtigung der Bindung von $\text{G}\alpha\text{olf}$ an den Dopamin-D1-Rezeptor, bei heterozygoten Trägern dieser Variante ausreichend funktionsfähiges Protein vorhanden ist, um eine adäquate biologische Aktivität zu erreichen. Im Verlauf entwickelten die Träger der homozygoten Mutation eine generalisierte Dystonie. Dies führt zu der Annahme, dass neben der autosomal-dominanten Vererbung oder dem sporadischen de novo Auftreten einer heterozygoten Mutation für DYT-*GNAL* auch eine autosomal-rezessive Vererbung bei homozygoter Mutation möglich ist (Masuho et al., 2016). Obwohl das durch *GNAL* kodierte G-Protein $\text{G}\alpha\text{olf}$ eine Rolle im Dopaminstoffwechsel spielt, ist eine L-DOPA Therapie nur initial hilfreich. Vermutet wird, dass sich zu Beginn der Therapie die Expression von $\text{G}\alpha\text{olf}$ vorübergehend normalisiert. Im weiteren Verlauf der Therapie kommt es jedoch zu einer Hochregulation und somit einem erhöhten Expressionslevel von $\text{G}\alpha\text{olf}$. Für eine langfristige Symptomverbesserung einer DYT-*GNAL*-Dystonie ist eine L-DOPA-Therapie somit nicht geeignet (Weisheit et al., 2018).

1.4.4. Mutationen im Gen *PRKRA* als Ursache einer Dystonie

Das Gen *PRKRA* liegt auf dem Chromosom 2 (2q31.2). Die ersten biallelischen Mutationen in *PRKRA* (protein activator of interferon-induced protein kinase EIF2AK2) wurden 2008 als Ursache eines autosomal-rezessiv vererbten Dystonie-Parkinsonismus identifiziert. Autosomal-rezessiv vererbte isolierte Dystonien sind viel seltener als autosomal-dominant vererbte Formen von Dystonien (Balint et al., 2018). Es handelt sich bei DYT-*PRKRA* um ein isolierte Dystonie (Morgante and Klein, 2013).

Das Gen *PRKRA* (protein activator of interferon-induced protein kinase EIF2AK2) kodiert für ein Proteinkinase-Aktivator-Protein (protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator, PKR-activator protein; PACT). Als Folge von extrazellulärem Stress führt eine Interaktion zwischen PACT und einer interferon-induced double-stranded RNA-activated Proteinkinase (PKR) zur Autophosphorylierung der PKR. Die enzymatisch reaktive

PKR aktiviert daraufhin den Translations-Initiationsfaktors eIF2 α . Dieser inhibiert die Proteinsynthese und fördert die Apoptose (Camargos et al., 2008). Zellulärer Stress beeinflusst somit durch diese Interaktionen die Signalübertragung, Zelldifferenzierung, antivirale Reaktionen und Apoptose der Zelle (Camargos et al., 2008; Charlesworth et al., 2013).

Kombinierte Dystonien (frühere Bezeichnung: Dystonie-Plus) sind eine heterogene Gruppe, in der die Dystonie von weiteren neurologischen Symptomen, wie z.B. einem Parkinson-Syndrom, begleitet werden. DYT-PRKRA wird als früh beginnende (early-onset) generalisierte Dystonie mit Parkinsonismus beschrieben (Morgante and Klein, 2013). Kennzeichnend für DYT-PRKRA ist ein Symptombeginn im Kindesalter an verschiedenen Körperregionen und eine Ausbreitung der Symptome bis hin zur Generalisierung (Charlesworth et al., 2013). Meist entwickeln die Patienten u.a. auch eine laryngeale Dystonie, eine Beteiligung der oromandibulären Muskulatur, eine Dysphagie oder eine cervikale Dystonie mit u.a. Retropcollis. Darüber hinaus können sich zusätzlich Symptome eines Parkinson-Syndroms zeigen, die nicht auf eine Therapie mit L-Dopa ansprechen (Lohmann and Klein, 2017). Eine leichte und nur kurz anhaltende Symptomlinderung kann mittels oraler Therapie mit Anticholinergika, Clonazepam, Baclofen oder Zolpidem erreicht werden. Für eine langfristige Reduktion der Symptome ist eine Therapie mit oralen Medikamenten jedoch nicht geeignet (Quadri et al., 2016). Ein Screening auf Mutationen in PRKRA scheint bei Patienten mit einem frühen Beginn einer generalisierten Dystonie und zusätzlichem Parkinsonismus sinnvoll (Quadri et al., 2016), wenngleich Mutationen selten zu sein scheinen, zumindest außerhalb von Brasilien (Lange et al., 2021). Im PRKRA-Gen wurde bisher nur die homozygote Missense-Mutation c.665C>T p.Pro222Leu als ursächlich für eine früh beginnende generalisierte Dystonie beschrieben (Lohmann and Klein, 2017; Dos Santos et al., 2018; Lange et al., 2021). Der genaue Pathomechanismus dieser homozygoten Mutation ist noch nicht vollständig geklärt (Camargos et al., 2008). Funktionelle Studien lassen vermuten, dass die Mutation c.665C>T p.Pro222Leu die Affinität von PACT zu PKR verändert und somit unter zellulärem Stress zu einer verlängerten Aktivität des Translations-Initiationsfaktors eIF2 α führt. Durch die länger andauernde Aktivität kommt es zu einer verstärkten intrazellulären Antwort und einer Erhöhung der Apoptose-Rate (Dos Santos et al., 2018). Dieser Pathomechanismus wurde für die homozygote Form der Mutation c.665C>T p.Pro222Leu beschrieben. Interessanterweise konnten auch pathogene Varianten in einem eIF2alpha-Gen (EIF2AK2) kürzlich mit der Entstehung einer Dystonie in Zusammenhang gebracht werden, was die Bedeutung dieses Signalweges unterstreicht (Kuijpers et al., 2021).

1.4.5. Mutationen im Gen *KMT2B* als Ursache einer Dystonie

Erst seit wenigen Jahren werden Mutationen im Gen *KMT2B* mit der Pathogenese der Dystonie assoziiert. *KMT2B* liegt auf Chromosom 19 (19q13) und ist ein großes Gen mit 37 Exons. Dementsprechend sind viele genetische Varianten in *KMT2B* bekannt. Nicht alle dieser Varianten spielen eine Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen, sondern zählen größtenteils zu den natürlich vorkommenden Polymorphismen. Um die Penetranz und deren Auswirkungen auf die Pathogenese *KMT2B*-assoziierter Erkrankungen beurteilen zu können, sind weitere

Studien notwendig (Zech et al., 2017b; Mirza-Schreiber et al., 2022).

Das Gen *KMT2B* wird ubiquitär im Gehirn exprimiert mit Anreicherung im Zerebellum (Abela and Kurian, 2018). *KMT2B* kodiert für die Lysin-spezifische Histon-Methyltransferase 2B. Diese katalysiert die Methylierung der vierten Aminosäure (Lysin) des Histons H3 (H3K4). H3K4 ist ein wichtiger epigenetischer Regulator mit einer Schlüsselrolle in der Genexpression und Aktivierung der Transkription (Gorman et al., 2018). Im Zentralen Nervensystem (ZNS) steuert H3K4 durch die Modulation der DNA-Zugänglichkeit die Aktivierung von Genen, die bedeutsam sind für die Entwicklung und regelrechte neuronale Funktion. Eine Dysregulation von H3K4 wurde entsprechend dieser Schlüsselrolle in der ZNS Entwicklung mit verschiedenen Entwicklungsstörungen und neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS assoziiert (Zech et al., 2016). Des Weiteren wurde eine reduzierte Expression von Dopamin2-Rezeptoren in der Cerebrospinalflüssigkeit bei Trägern einer *KMT2B*-Mutation nachgewiesen (Balint et al., 2018). Weitere Studien ergaben Hinweise darauf, dass einige Varianten im Gen *KMT2B* zu einer geringeren Transkription sowohl des Gens *TOR1A* als auch *THAP1* führten (Gorman et al., 2018). Die reduzierten Level dieser Gene lassen vermuten, dass es sich bei *KMT2B* um einen vorgesetzten Regulator weiterer Dystonie-Gene, wie *TOR1A* und *THAP1*, handelt (Balint et al., 2018).

Im Jahr 2016 wurden erstmals Mutationen in *KMT2B* als Ursache einer früh beginnenden generalisierten Dystonie (early-onset generalized dystonia) identifiziert. Der Phänotyp von Patienten mit Mutationen im Gen *KMT2B* wird von einer in der Kindheit beginnenden und im Verlauf generalisierten Dystonie dominiert, meist mit Beginn an einer unteren Extremität (Balint et al., 2018; Meyer et al., 2017; Zech et al., 2016). Klinisch zeigen sich häufig zusätzliche systemische Symptome, wie geistiger Behinderung, Mikrozephalie, psychiatrische Auffälligkeiten, Dysmorphie oder Hautveränderungen im Sinne einer komplexen Dystonie. *KMT2B*-Mutationen scheinen dem heutigen Kenntnisstand entsprechend für ungefähr 10% der Fälle einer früh beginnenden generalisierten Dystonie ursächlich zu sein (Lohmann and Klein, 2017). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Patienten mit einem *KMT2B*-involvierenden Mikrodeletionssyndrom des Chromosoms 19 oder des Abschnitts 19q13 dystone Symptome aufwiesen (Zech et al., 2016; Abela and Kurian, 2018). Eine DYT-KMT2B-Dystonie manifestiert sich meist erstmalig in der ersten bis zweiten Lebensdekade in den Extremitäten, von wo aus sich die Symptome über weitere Bereiche des Körpers ausbreiten. Das mittlere Erkrankungsalter bei Erstmanifestation liegt bei 7 Jahren (Abela and Kurian, 2018). Orale Medikationen und L-Dopa haben nur einen minimalen bis gar keinen Nutzen bei Patienten mit einer *KMT2B*-Dystonie (Gorman et al., 2018). Eine Symptomverbesserung war bei einigen Patienten durch eine operative Therapie in Form einer tiefen Hirnstimulation des Globus pallidus internus (GPI) festzustellen (Meyer et al., 2017).

Bei den als pathogen eingestuften genetischen Varianten im Gen *KMT2B* handelt es sich überwiegend um genverkürzende Varianten. Zusätzlich wurden auch *In-frame Deletionen*, *Frameshift*-, *Spleißstellen*-, *Nonsense*- und *Missense-Mutationen* beschrieben (MDSGene, 2020). Die Mutationen werden autosomal-dominant vererbt mit reduzierter Penetranz, wobei die Mehrzahl der Mutationen im Gen *KMT2B* de novo auftreten (Gorman et al., 2018). 2018 lag die

Verteilung bei ungefähr 84% de novo und 16% vererbter *KMT2B*-Varianten, wobei auch intrafamiliär eine klinische Variabilität mit reduzierter Penetranz auftrat (Abela and Kurian, 2018). Bis heute wurden bereits mehr als 50 pathogene genetische Varianten im *KMT2B*-Gen identifiziert. Die Mehrzahl dieser Varianten trat in heterozygoter Form auf (Meyer et al., 2017).

1.5. Diagnosestellung einer Dystonie

Dystonien werden vorrangig anhand des klinischen Bildes diagnostiziert, da eine Diagnostik anhand definierter Biomarker nicht möglich ist. Das Auftreten einer Dystonie zusammen mit anderen Formen von Bewegungsstörungen erschwert die Diagnosestellung. Als Kriterien werden die typischen klinischen Charakteristika und Bewegungsmuster der einzelnen Dystonie-Formen genutzt (Balint et al., 2018). Der Phänotyp einer Dystonie ist eine Mischung aus körperlichen Merkmalen, inklusive eines Tremors. Eine genaue neurologische Untersuchung ist notwendig, um dystone Bewegungen von anderen unwillkürlichen Bewegungen abzugrenzen (Albanese et al., 2019). Allgemeingültige Kriterien für die Diagnosestellung einer Dystonie stehen noch nicht zur Verfügung. Zur Diagnosestellung werden die Symptome meist nach fünf Charakteristika analysiert, welche in Tabelle 1.4 dargestellt sind. Diese Symptome treten bei den meisten Patienten mit einer Dystonie auf. Aufgrund der vielgestaltigen und teilweise nur leichten Ausprägung der Symptome werden dystone Bewegungsstörungen in der Gruppe der Bewegungsstörungen häufig übersehen oder fehldiagnostiziert (Albanese et al., 2019).

Nach der klinischen Diagnose sollten weitere Untersuchungen folgen, um die Ätiologie zu ermitteln und eine genauere Einordnung des Krankheitsbildes zu ermöglichen. Ein vermehrtes familiäres Auftreten gilt als Hinweis auf eine genetische Ursache der Dystonie und kann mithilfe genetischer Analysen untersucht werden. Genauere Angaben zur Ätiologie können außerdem Hinweise auf die Prognose und mögliche Therapieoptionen vermitteln (Balint et al., 2018). Eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Kopfes oder Bluttests sind generell bei einer primären Dystonie zum Stellen der Diagnose nicht hilfreich, da nur sehr selten Veränderungen nachweisbar sind, die auf eine Dystonie hinweisen könnten. Zum Nachweis bzw. Ausschluss einer anderen Grunderkrankung und somit einer sekundären Dystonie sind diese Methoden dennoch hilfreich. Eine MRT des Kopfes könnte z.B. Hinweise auf eine sekundäre Dystonie durch den Nachweis einer Hirnblutung, eines Tumors oder anderer struktureller Hirnveränderungen liefern. Mithilfe eines Bluttests können Stoffwechselerkrankungen wie beispielsweise ein Morbus Wilson oder eine Niemann-Pick-Krankheit Typ C nachgewiesen werden. Diese können eine sekundäre Dystonie bedingen und sollten daher ausgeschlossen bzw. behandelt werden, um die dystonen Symptome zu reduzieren (Balint et al., 2018). Eine Liquordiagnostik könnte ebenfalls hilfreich sein, da diese z.B. Hinweise auf eine dopa-responsive Dystonie geben könnte (Weissbach et al., 2022). Auch eine medikamentös induzierte Dystonie in Form einer akuten dystonen Reaktion oder tardiven Dystonie gilt es zu erkennen, um die Exposition mit den entsprechenden Medikamenten zu minimieren. Auslöser einer medikamentös induzierten Dystonie sind beispielsweise Neuroleptika, die zu einer Blockade der Dopaminrezeptoren führen (Frei et al., 2018).

Tabelle 1.4.: Klinische Diagnosekriterien einer Dystonie

Diese Tabelle stellt die fünf klinischen Charakteristika zur Diagnosestellung einer Dystonie dar, modifiziert nach den Diagnosekriterien von Albanese et al. (2019).

Körperliche Symtome	Beschreibung
Dystone Haltung	Muskelkontraktionen führen zu anhaltenden Positionen: (ausgenommen Blepharospasmus und laryngeale Dystonie) - Beugung oder Drehung eines Körperteils entlang der longitudinalen Achse - Verlangsamung, Steifheit und Schwerfälligkeit der Motorik
Dystone Bewegung	Ausdruck vieler Bewegungsstörungen (Tremor, Tic, Chorea oder Myoklonus) Tremor: Merkmal dystoner Bewegung, auch als isolierter Tremor - Mit schnellem oder langsamem Charakter - Repetitiv, drehend und Mustern folgend - Drehung oder Ziehen in eine bestimmte Richtung/Position (meist entgegen der Bewegungsrichtung)
Gestes antagonistes ("Tricks")	Willkürliche antagonistisierende Bewegungen der Patienten mit dem Ziel der Reduktion der unnatürlichen Haltung/Bewegung - Natürliche und sanfte Bewegungen oder Berührungen - Kein kraftvoller Druck oder Zug in eine Richtung - Meist baldige Symptomlinderung nach Berührung und erneutes Auftreten nach Beendigung der Geste
Spiegeldystonie	Unwillkürliches Auftreten gleicher Bewegungen in der nicht oder schwächer betroffenen Körperpartie - Während repetitiver Bewegungen - unabhängig von der Geschwindigkeit z.B. Fingerbewegungen, beim Schreiben oder Klavierspielen
Überlaufende Dystonie	Unwillkürliche Muskelkontraktion anatomisch angrenzender Regionen - Können sowohl ipsi- als auch kontralateral auftreten

1.6. Therapieoptionen bei Dystonie

In den letzten Jahren konnten in der Erforschung der Pathophysiologie und der Ätiologie der Dystonien große Fortschritte verzeichnet werden. Es wurden neue Erkenntnisse zu genetischen Ursachen und Mechanismen auf zellulärer Ebene gewonnen. Dennoch konnte bis jetzt keine kausale Therapie gefunden werden. Derzeit gibt es nur symptomatische Therapien mit dem Ziel einer Symptomreduktion und Verbesserung der Lebensqualität (Thenganatt and Jankovic, 2014).

Als Therapiemöglichkeiten stehen orale Medikation, Injektionen mit Botulinumtoxin, chirurgische Therapieansätze und Bewegungs- und Physiotherapie zur Verfügung. Bei der Auswahl der Therapie sollten das Lebensalter, die Verteilung der Symptome, die Ätiologie der Dystonie, die Lebensqualität und das Ziel der Behandlung berücksichtigt werden (Thenganatt and Jankovic, 2014; Skogseid, 2014). Die Therapie erster Wahl unterscheidet sich somit bei verschiedenen Formen der Dystonie, wobei Bewegungs- und Physiotherapie bei allen Formen unterstützend angewendet werden können. Als orale Medikation stehen beispielsweise Anti-

cholinergika, Dopamin-Rezeptor-Antagonisten, Muskelrelaxantien, Benzodiazepine, Levodopa oder Baclofen zur Verfügung (Jinnah, 2020). Da sie häufig zu systemischen Nebenwirkungen führen können, werden sie bei einer starken Ausprägung der Dystonie, wie z.B. bei der segmentalen oder generalisierten Dystonie, bevorzugt angewendet. Bei einer fokalen Dystonie ist die Injektion von Botulinumtoxin (BoNT) in aller Regel die Therapie der ersten Wahl. Um bei unzureichendem Ansprechen auf BoNT die Symptome weiter zu reduzieren, kann eine zusätzliche orale Medikation erwogen werden. Bei einer sowohl auf Botulinumtoxin als auch auf orale Medikation refraktären Dystonie gibt es die Möglichkeit einer chirurgischen Therapie, um die Lebensqualität zu verbessern. Die größte Bedeutung hat hierbei die Tiefe Hirnstimulation (DBS, Deep brain stimulation) des Globus pallidus internus (GPi). Bei Patienten mit Spastik und Dystonie der unteren Extremitäten kann eine intrathekale Baclofentherapie zur Symptomlinderung genutzt werden. Des Weiteren gibt es chirurgische Interventionen, wie Myektomien, plastische Operationen oder eine periphere Denervierung, die direkt an den betroffenen Muskelgruppen ansetzen, jedoch mittlerweile nur noch selten durchgeführt werden (Thenganatt and Jankovic, 2014). Insgesamt erfolgt die Therapie bei fokaler Dystonie meistens mittels Botulinumtoxin und bei schweren Formen von Dystonien nach gründlicher Prüfung der Indikation mittels der Tiefen Hirnstimulation.

1.6.1. Botulinumtoxin

1989 wurde Botulinumtoxin durch die Food and Drug Administration (FDA) zur Therapie bei Blepharospasmus zugelassen. Im Jahr 2000 folgte die Zulassung für zervikale Dystonien und nachfolgend für weitere Formen von Dystonie. Nach Steigerung der Effizienz und Sicherheit findet die Botulinumtoxin-Therapie mittlerweile weltweit Anwendung und ist heutzutage Therapie der ersten Wahl bei einer fokalen Dystonie (Skogseid, 2014; Balint et al., 2018).

Botulinumtoxin wird von dem Bakterium Clostridium botulinum gebildet und hemmt die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin und somit die Muskelkontraktion. Dieser Mechanismus stellt eine effektive Therapie u.a. bei Blepharospasmus, zervikaler, oromandibulärer, laryngealer und fokaler Dystonie der Extremitäten dar. Darüber hinaus kann Botulinumtoxin auch bei Bruxismus eingesetzt werden (Thenganatt and Jankovic, 2014; Morgante and Klein, 2013). Der Wirkeintritt des Botulinumtoxins beginnt meist zwischen dem ersten bis siebten Tag nach der Injektion, und die Wirkung erreicht ihren Höhepunkt nach sechs bis acht Wochen. Der therapeutische Nutzen einer Injektion hält meist ungefähr zwölf Wochen an. Anschließend kann eine erneute Injektion erfolgen (Morgante and Klein, 2013). Der empfohlene Abstand zwischen den Botulinumtoxin-Injektionen liegt bei mindestens 12 Wochen, um das Risiko eines durch Antikörper vermittelten sekundären Therapieversagens zu reduzieren (Skogseid, 2014). Als mögliche Nebenwirkungen kann es zu lokalen Reaktionen an der Einstichstelle, grippeähnlichen Symptomen oder einer überschießenden bzw. verlängerten Schwächung der behandelten oder angrenzender Muskelgruppen kommen. Diese Nebenwirkungen treten jedoch insgesamt nur sehr selten auf. Botulinumtoxin ist ein sehr wirksames Mittel, um die Symptome insbesondere bei einer fokalen oder segmentalen Dystonie zu lindern und die Lebensqualität zu verbessern (Thenganatt and Jankovic, 2014).

1.6.2. Tiefe Hirnstimulation

Die Tiefe Hirnstimulation (THS) ist einer der wichtigsten chirurgischen Therapieansätze bei der Behandlung von Bewegungsstörungen. 1977 wurde erstmals bei zervikaler Dystonie eine Behandlung mittels Tiefer Hirnstimulation im Thalamus beschrieben. Heutzutage werden bei der Behandlung von Dystonien mittels THS als wichtigste Zielgebiete der Globus pallidus internus (GPi) und in ausgewählten Fällen auch der Nucleus subthalamicus (STN) verwendet. Die Therapie ausgeprägter Dystonien mittels THS ist von der FDA und Europäischen Arzneimittel Agentur (EMA) zugelassen (Balint et al., 2018; Thenganatt and Jankovic, 2014).

Bei der THS handelt es sich um eine neurochirurgische Therapie, bei der Elektroden in den GPi, STN oder anderen Hirnarealen implantiert werden. Mittels eines subklavikulär implantierten Schrittmachers werden elektrische Impulse in das entsprechende Hirnareal appliziert und somit die Aktivität neuronaler Zellen beeinflusst, was zu einer Linderung von Symptomen führen kann (Benninger and Schüpbach, 2018).

Das Ausmaß des Nutzens der THS ist von der Ätiologie und der klinischen Ausprägung der Dystonie abhängig. So spielen Ausprägung, Erkrankungsdauer, Patientenalter und Begleitsymptome eine entscheidende Rolle (Jinnah, 2020). Die THS ist bei medikamentöser und Botulinumtoxin-refraktärer Dystonie der effektivste Therapieansatz. Patienten mit stark einschränkenden Formen von Dystonie, wie z.B. generalisierte und ausgeprägte segmentale oder fokale Dystonie, profitieren ebenfalls häufig von einer THS (Balint et al., 2018). Ein großer Nutzen zeigt sich auch bei einigen genetisch definierten Formen von früh beginnender Dystonie, wie z.B. *TOR1A*- oder *KMT2B*-Dystonie (Breakefield et al., 2008; Balint et al., 2018). Insgesamt zeigt die THS bei primären bzw. isolierten Dystonien eine höhere Effizienz als bei sekundären Dystonien (Thenganatt and Jankovic, 2014).

Die THS kann zu Nebenwirkungen wie Infektionen, Sprachstörungen oder Verletzung anderer Hirnareale führen. Dennoch handelt es sich bei der THS bei sorgfältiger Prüfung der Indikation und technisch korrekter Durchführung um eine sichere und effiziente langfristige Therapiemöglichkeit, die zu einer Reduktion der krankheitsbedingten Einschränkungen und Verbesserung der Beweglichkeit führt (Park et al., 2016; Ostrem et al., 2017).

2. Zielsetzung der Studie

Durch den Einsatz des Next-Generation Sequencings (NGS) konnten in den letzten Jahrzehnten verschiedene Gene als Ursache monogenetisch bedingter isolierter Dystonie bestimmt und pathophysiologisch bedeutsame Mutationen identifiziert werden (McKusick, 2020). Um präzisere und neue Therapieansätze zu ermöglichen, ist weiterhin eine genauere Analyse der assoziierten Gene notwendig. Der Hauptfokus dieser Studie lag auf der Gewinnung neuer Erkenntnisse zur Inzidenz, zum phänotypischen Spektrum und zur pathogenetischen Bedeutung von Mutationen in den Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B*, die als ursächlich für eine isolierte Dystonie diskutiert werden.

Mittels Darstellungen des klinischen Krankheitsbildes kombiniert mit genetischer Analysen könnten bisher unbekannte Mutationen entdeckt und der mit der Mutation assoziierte Phänotyp beschrieben werden. Zusätzlich könnte mittels neuer Erkenntnisse zu den zugrundeliegenden Einflüssen genetischer Veränderungen in den oben genannten Dystonie-Genen ein genaueres Verständnis der Pathophysiologie der Dystonie ermöglicht werden.

1. Welche Häufigkeiten, welche Mutationsspektren und assoziierten Phänotypen bezüglich einer Dystonie gibt es in den Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B*?
2. Welchen Einfluss haben diese genetischen Varianten auf die Pathogenese der Dystonie?

3. Patienten, Materialien und Methoden

Diese Studie gliederte sich in zwei Abschnitte:

- 1.) Die Patientenrekrutierung fand von Februar bis Juli 2018 im Rahmen des Deutschen Dystonie-Registers DysTract (Dystonia Translational Research and Therapy Consortium) in der Poliklinik der Klinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock im Forschungsbereich „Neurogenetik“ unter PD Dr. Christoph Kamm statt.
- 2.) Die darauf folgende genetische Analyse inklusive DNA-Extraktion, PCR-Amplifikation und Sanger-Sequenzierung erfolgte im Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck in der Arbeitsgruppe „Genetik seltener Erkrankungen“ unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann.

Die Ethikkommission der Universität Rostock bewilligte die Studie am 11.04.2017 (Reg.-Nr.: A 2017-0051).

3.1. Patienten

3.1.1. Studienprofil DysTract

DysTract ist ein deutschlandweiter Zusammenschluss verschiedener Zentren, um die Erforschung und Behandlung von Dystonien zu fördern. Da genetisch bedingte Formen von Dystonien eine Gruppe seltener Erkrankungen ist, stellt die Rekrutierung größerer Zahlen von Patienten mit ausführlichen klinischen Daten und Bio-Materialien eine Herausforderung dar. Aus diesem Grund ist DysTract als deutschlandweites Dystonie-Register mit integrierter Daten- und Biobank konzipiert. Dadurch kann eine große Anzahl von Patienten mit isolierter und kombinierter Dystonie gesammelt und in ein Register eingeschlossen werden. DysTract wurde von der „interdisziplinären Biomaterial- und Datenbank Würzburg“ unterstützt und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert (Deutsches Dystonie-Register, 2020). Für den Einschluss eines Patienten in diese Studie waren das Ausfüllen eines Fragebogens, eine Videoaufnahme nach einheitlichem Protokoll und eine Blutentnahme erforderlich. Der Fragebogen erfasste Krankheitsverlauf und -ausprägung, genetische Vorbefunde und die Familienanamnese hinsichtlich Dystonien und weiteren Bewegungsstörungen. Anhand der Videoaufnahme nach standardisiertem Protokoll wurden zwei validierte Skalen, die *Global Dystonia Rating Scale* und die *Fahn-Marsden Dystonia Scale*, ermittelt. Nach einer Blutentnahme wurde am Institut für Neurogenetik an der Universität zu Lübeck die DNA extrahiert und mittels „Next-Generation Sequencing“ (NGS)-basierter Panel-Diagnostik auf Mutationen in Dystonie-assoziierten Genen untersucht. Der Fragebogen und das Protokoll der Videoaufnahme sind dem Anhang A.7 und A.8 zu entnehmen.

Studienteilnehmende

Zwischen Februar 2018 und Juli 2018 wurden 75 Patientinnen und Patienten mit Dystonie in der Poliklinik der Klinik für Neurologie an der Universitätsmedizin in Rostock im Rahmen ihrer regelmäßigen ärztlichen Konsultationen in das Deutsche Dystonie-Register aufgenommen. Die Dystonie manifestierte sich bei den Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern zu 84% als fokale, zu 9,3% als multifokale, zu 5,3% als segmentale und zu 1,3% als generalisierte Dystonie.

Fragebögen

Nach ausführlicher Aufklärung der Patienten über Inhalt und Zielsetzung der Studie sowie schriftlicher Einverständniserklärung wurde mit den Patienten anhand eines standardisierten Anamnesebogens („Intake Form“) ein strukturiertes Interview durchgeführt. Dabei wurden systematisch klinische Daten zur Epidemiologie, familiären Prädisposition, dem Verlauf der Dystonie und Komorbiditäten erhoben. Zusätzlich wurde von den Patienten ein Selbsteinschätzungsfragebogen über ihren psychischen Gesundheitszustand ausgefüllt. Der Selbsteinschätzungsfragebogen enthielt mehrere validierte Fragebögen: *Quality of Life Scale, Hospital Anxiety Depression Scale, Beck Depression Inventory II, Liebowitz Social Anxiety Scale, Patient Health Questionnaire 9* und *EQ-5D-3L Gesundheitsfragebogen*.

Die Patienteninformation, Einverständniserklärung und die Anamnese- und Selbsteinschätzungsfragebögen sind dem Anhang A.4 - A.9 zu entnehmen.

Venöse Blutentnahme

Bei allen Patienten wurde am Ende der Konsultation venös 18 ml EDTA Blut und 7,5 ml Blutserum abgenommen. Diese Bioproben wurden im Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck weiter aufgearbeitet. Nach der DNA-Extraktion aus dem EDTA-Blut wurde mit der isolierten DNA eine Mutationsanalyse zunächst mittels NGS-basierter Genpanel-Sequenzierung und dann mittels PCR und Sanger-Sequenzierung zur Validierung durchgeführt. Serumproben wurden für spätere Protein-Untersuchung, z.B. auf Antikörper gegen Botulinumtoxin bei -80 °C aliquotiert eingelagert.

Erfassung in der Datenbank

Um eine gemeinsame Auswertung der deutschlandweit erhobenen klinischen Daten und weitere klinische Studien zu ermöglichen, wurden die lokal erhobenen Daten pseudonymisiert in das Deutsche Dystonie-Register der DysTract-Studie eingetragen.

Biobank

Für das Screening auf Mutationen in Dystonie-verursachenden Genen wurden Bioproben der Biobank des Institutes für Neurogenetik der Universität zu Lübeck genutzt. Es handelt sich dabei um isolierte DNA sowohl von Dystonie- als auch von Parkinson-Patienten, die hier als

Vergleichskohorte (nicht-Dystonie-Patienten) verwendet wurden. Die Proben der Parkinson-Patienten sowie weiterer Dystonie-Patienten wurden im Rahmen verschiedener Studien von Patienten weltweit gesammelt. In dieser Studie wurde das genetische Material von 1115 Patienten mit Dystonie und 900 Patienten mit Parkinson auf Mutationen in den bekannten Dystonie-Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* analysiert.

3.2. Materialien und Methoden

3.2.1. Geräte und Software

Für die genetischen Untersuchungen im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die Laborausstattung des Instituts für Neurogenetik der Universität zu Lübeck genutzt. Eine Übersicht der genutzten Geräte und Software ist den Tabellen 3.1 und 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.1.: Geräteübersicht

Gerät	Typ	Hersteller
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf D-Hamburg
	Mini-Zentrifuge/Vortex Combi Spin	Biosan
	Mini Plate Spinner MPS 1000	Labnet
Thermocycler	Mastercyler	Eppendorf D-Hamburg
	Biometra TAadvanced	Analytik Jena AG
	PTC-200 Pltier Thermal Cycler	MJ Research
	FlexCycler	Analytik Jena AG
Geldokumentationssystem	Dark Hood DH-50	biostep GmbH
Gelelektrophorese	Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
Sequencer	3130XL Genetic Analyzer	Applied Biosystems
	3500XL Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Multikanalpipette (8-Kanal)	Eppendorf Research Plus	Eppendorf D-Hamburg
Heiz-/Kühlblockthermostat	Digital heating/cooling block heater	VWR GmbH
Pipetten	0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl	Eppendorf D-Hamburg
	10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf D-Hamburg

Tabelle 3.2.: Software der verwendeten Geräte

Gerät	Software
Dark Hood DH-50	BioDocAnalyze
3130XL Genetic Analyzer	Foundation Data Collection Version 3.0 Sequencing Analysis 5.3.1
3500XL Genetic Analyzer	3500 Data Collection Software Sequencing Analysis V5.4
Analyse-Programme	GeneRunner Mutation Surveyor Local V3.25 BioEdit Chromas

3.2.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.3.: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
EDTA-Monovette (9,0 ml)	Sarstedt
Serum-Monovette (7,5 ml)	Sarstedt
Eppendorf Tubes (0,5 ml)	Eppendorf
Eppendorf Tubes (1,5 ml)	Eppendorf
PCR 8er-SoftStripes (0,2 ml)	Sarstedt
PCR 8er CapStripes, flach	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Safety-Mutifly-Kanüle	Sarstedt
96 Multiply-PCR-Platte natur	Sarstedt
PCR-Mini Cooler	Brand GmbH +Co KG
Plate Septa 96 Well	Applied Biosystems
Adhesive Verschlussfolie	Sarstedt

3.2.3. Next-Generation Sequencing basierte Panel-Sequenzierung

Das Next Generation Sequencing (NGS) ist eine etablierte Methode der DNA-Sequenzierung. Mittels Gesamt-Genom-Sequenzierung können durch das NGS sowohl kodierende (Exons), als auch nicht-kodierende (Introns) Abschnitte des Genoms analysiert werden (Behjati and Tarpey, 2013). Durch technischen Fortschritt und den Einsatz von Genpanels mit einer großen Probenanzahl und parallel durchführbarer Sequenzierungen ist ein hoher Durchsatz an genetischen Analysen möglich.

Die Firma *Centogene AG* aus Rostock analysierte mit der NGS-basierten Panel-Sequenzierung die in dieser Studie ausgewerteten 2015 DNA-Proben (1115 DNA-Proben von Dystonie- und 900 DNA-Proben von Parkinson-Patienten). Die Proben wurden in vier unterschiedliche Batches, Genpanel 1-4, aufgeteilt. Eine Übersicht der Probenanzahl pro Genpanel ist in Tabelle 3.4 dargestellt. Während bei Genpanel 1 alle Proben einzeln sequenziert wurden, wurden ab Genpanel 2 jeweils drei Proben von Patienten gepoolt und gemeinsam untersucht, was zu einer Reduktion der Sequenzierkosten um zwei Drittel führte. Die drei Proben eines Pools wurden dann nach Detektion einer Variante für das entsprechende Exon noch einmal mittels Sanger-Sequenzierung einzeln nachsequenziert, um so die mutierte einzelne Probe zu identifizieren. Zur Bestätigung der detektierten Varianten in Genpanel 1 wurden diese ebenfalls mittels der Methode nach Sanger nachsequenziert. Zum Ausschluss möglicher Artefakte oder einer fehlerhaften Sequenzierung, die während der NGS-basierten Panel-Sequenzierung aufgetreten sein könnten, wurden die in einem Genpanel gehäuft vorkommenden Varianten stichprobenartig nachsequenziert. Der Trennwert (Cut-Off) für eine Nachsequenzierung wurde auf eine Prävalenz einer Variante von >1% innerhalb eines Genpanels festgelegt. Bei einer Prävalenz >1,5% wurden die Varianten als Artefakt gewertet und es erfolgte keine Kontroll-Sequenzierung. Befand sich die Prävalenz im Bereich um die 1% (0.5-1.5%), wurde ein Dreier-Pool mit dieser

Variante als Stichprobe nachsequenziert. Wurde diese hierbei nachgewiesen, wurden die anderen Dreier-Pools mit dieser genetischen Variante ebenfalls nachsequenziert. Konnte die Variante in der Stichprobe nicht nachgewiesen werden, wurde sie als Artefakt eingestuft und es erfolgte keine weitere Nachsequenzierung. Alle genetischen Varianten <0,5% wurden als wahrscheinlich echt eingestuft und wie oben beschrieben weiter analysiert.

Die Nach-Sequenzierung der Bioproben im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde von Januar bis März 2019 an dem Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck durchgeführt. Für die Nachsequenzierung wurden die Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), der Agarose-Gelektrophorese und der Sanger-Sequenzierung angewendet.

Tabelle 3.4.: Übersicht der durch Centogene AG sequenzierten Genpanel

Die NSG-basierte Panel-Sequenzierung der Studienteilnehmenden erfolgte auf vier unterschiedliche Batches verteilt. Die Tabelle stellt die Anzahl der Studienteilnehmenden und den Zeitpunkt der Sequenzierung dar.

	Datum	Parkinson-Patienten	Dystonie-Patienten
Genpanel 1	Mai 2016	322	159
Genpanel 2	April 2017	212	531
Genpanel 3	August 2017	66	149
Genpanel 4	Juni 2018	300	276
Insgesamt		900	1115

3.2.4. Filterschritte genetischer Varianten

Ein wichtiger Teil der Auswertung genetischer Analysen liegt in der Abgrenzung der natürlich vorkommenden Polymorphismen von potentiell krankheitsrelevanten genetischen Varianten (Mutationen). Ein Hilfsmittel zur Beurteilung der Wahrscheinlichkeit einer Pathogenität genetischer Varianten ist der CADD-Score. CADD steht für *Combined Annotation Dependent Depletion* und ist als Score ein Hilfsmittel, um die Pathogenität sowohl einer Einzelnukleotid-Variante als auch einer Deletion oder Insertion spezifischer beurteilen zu können. Er priorisiert den pathogenen Einfluss einer Einzelnukleotid-Variante und kurzer Insertionen und Deletionen im humanen Genom (Kircher et al., 2020). Die Einteilung des Scores ist auf über 60 genetischen Eigenschaften aufgebaut und nutzt ein maschinell erlerntes Modell mit einer Unterscheidung zwischen simulierten *de novo* Varianten und Varianten, die bereits seit der Abspaltung der Menschen von den Schimpansen im humanen Genom vorhanden sind. Die in die Analyse einfließenden genetischen Eigenschaften setzen sich aus diversen genetischen Merkmalen, evolutiönen und epigenetischen Zusammenhängen, Genlokalisierungen und der Funktion des Gens zusammen (Rentzsch et al., 2019). Ein Score von ≥ 10 zeigt an, dass diese Variante innerhalb der oberen 10% der vorhergesagten gesundheitsschädlichen genetischen Veränderungen liegt. Liegt der Score bei ≥ 20 , befindet sich die Variante bereits unter den 1% der am wahrscheinlich schadhaftesten Mutationen. Bei einem Score über ≥ 30 sind nur noch die 0,1% der Mutationen eingeschlossen, bei welchen man von einer stark ausgeprägten Pathogenität ausgehen kann (Kircher et al., 2020). Zur Berechnung des Scores wurde der CADD-Score-Rechner aus

der Zusammenarbeit der University of Washington, des Hudson-Alpha-Institute for Biotechnology und dem Berlin Institute of Health angewendet (<https://cadd.gs.washington.edu/>). Zur weiteren Beurteilung der Pathogenität der in dieser Studie detektierten genetischen Varianten wurden zwei weitere publizierte Scoring-Systeme verwendet, der Score von MDSGene (MDSGene, 2020) und die Empfehlungen des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards et al., 2015). Diese Scores wurden genutzt, um alle detektierten Varianten in pathogen und in nicht sicher pathogen (*variant of uncertain significance*, VUS) einzuteilen. Als pathogen galten die Varianten, die in MDSGene die Kriterien für *definitely pathogenic* oder *probably pathogenic* und nach den Empfehlungen des ACMG für *pathogenic* oder *likely pathogenic* erfüllten. Die Kriterien beinhalteten familiäre Dispositionen, den CADD-Score, Nachweise über funktionale Studien, Art der Mutation und die Häufigkeit der Variante (siehe Anhang: A.3). Die Einteilung nach der Häufigkeit basierte auf den Angaben der Datenbank *genome aggregation database* (gnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org/>). Diese Datenbank wurde von einem internationalen Zusammenschluss entwickelt, um eine umfangreiche Vielfalt an Daten zu sammeln, die bei der Exom- und Genom-Sequenzierung weltweit entstehen und für weitere Sequenzierungs- und Forschungsprojekte zur Verfügung zu stellen (gnomAD, 2020).

Zusätzliche Filterkriterien für *KMT2B*

Bei dem Dystonie-Gen *KMT2B* handelt es sich um ein sehr großes Gen. So war zu erwarten, dass bei der Sequenzierung viele natürliche Polymorphismen, also wahrscheinlich nicht krankheitsverursachende missense-Varianten gefunden werden. In dieser Studie wurde die Auswahl der zu untersuchenden genetischen Varianten vor der Nachsequenzierung unter Verwendung des CADD-Scores eingeschränkt. Zum Eingrenzen der vermutlich pathogenen genetischen Varianten des Gens *KMT2B* wurde ein Cut-Off bei Varianten mit einem CADD-Score ≥ 20 gelegt. Dadurch wurden nur die genetischen Varianten, die in den oberen 1% der wahrscheinlich pathogenen Mutationen liegen, in die Analyse eingeschlossen. Einige Varianten von *KMT2B* wurden bereits schon vor dieser Studie in dem Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck nachsequenziert und besaßen zum Teil einen CADD-Score von unter 20. Diese Proben wurden trotzdem mit in die Auswertung dieser Arbeit einbezogen.

3.2.5. Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion, im weiteren nach dem Englischen *polymerase chain reaction* (PCR) abgekürzt, handelt es sich um ein enzymabhängiges Verfahren, dass der exponentiellen Amplifikation bestimmter Gen-Sequenzen innerhalb einer DNA-Probe dient. Die Methode der PCR basiert auf dem Prinzip von Kary B. Mullis aus dem Jahre 1983 (Mullis and Faloona, 1987; Wu, 1987). Als Reagenzien werden eine einzel- oder doppelsträngige DNA-Kette, zwei spezifische Primer-Oligonukleotide (1x forward = f-primer, 1x reverse = r-primer), die an eine bekannte Sequenz der DNA binden können, Nukleosidtriphosphat-Moleküle (dNTP) im Überschuss und als Enzym die hitzestabile Taq-Polymerase genutzt. Taq steht für das Bakterium *Thermus aquaticus*, aus welchem die hitzestabile Polymerase für die PCR gewonnen werden

kann (Saiki et al., 1988). Eine detaillierte Übersicht der verwendeten Reagenzien finden sich in den jeweiligen PCR-Ansätzen der einzelnen Gene im Verlauf dieser Arbeit.

Synthetische Oligonukleotide

Für die PCR der zu sequenzierenden Exons der Gene *TOR1A* (NM_000113.2), *GNAL* (NM_182978), *PRKRA* (NM_003690) und *KMT2B* (NM_014727) wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotid-Primer als Startpunkt für die DNA-Replikation genutzt. Es wurde pro Exon ein forward (F-) und ein reverse (R-) Primer für die Synthese des Leit- beziehungsweise Folgestrangs verwendet. Die verwendeten Primer, von der Firma Eurofins Medigenomix GmbH in Ebersberg hergestellt, wurden mit HPLC-reinem Wasser nach dem Protokoll der Firma Eurofins auf eine Konzentration von 100 pmol/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert. In Tabelle 3.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer nach Gen sortiert aufgelistet.

Tabelle 3.5.: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer

Darstellung der nach Genen sortierten exonspezifische F- und R-Primer mit Basenfolge und Annealing-Temperatur.

Gen	Exon	Forward-Primer (5' → 3')	Reverse-Primer (5' → 3')	At in °C
TOR1A	Ex 2	CCGTGCAGGGAGCGTGAG	TCTCACGCTCTCCCTGCACGG	62
	Ex 3	GCCTCAGTTCCTCATCTG	GTCTTCCCTCTGCTTTCCAC	60
	Ex 4	AGCCTCTGAGCTCCAGG	GATGCTGACAGTGACC	60
	Ex 5	CGGGACTGCATTCCSCTC	CCTGGAATACAAACACCTA	62
KMT2B	Ex 28.2	TGGGAGCTGCTGGTAACAC	CACAGGGAAGTGGATGTAG	60
	Ex 1_neu	TCTCACGGTGCCAAGATG	CAGCTGCCAAAAGGATC	58
	Ex 1	GGCGCTGGTTGTTGTCGT	TCCAGAGGCCCTTCCCC	59
	Ex 1_Katrin	GCGTCGGACTACATTAA	AGCTACCCGCACTTTCG	59
	Ex 3neu m	GGCGTGGAGGGACAGTCAAG	CGGTGGAGGGATGGTAG	62
	Ex 3.1	GGCGATTATGGATGAAGAC	AAGAGGAGGAGGAGTAAGCAC	60
	Ex 3neu v	CTCCCCACAACATTCTCC	TGACCTTGACCTGATTG	58
	Ex 3neu h	CCACCTGAAGATCTACGAATC	GCAATGCTGGAAAGTGT	58
	Ex 3_Katrin	ACAAGGAGGGAGAAGAGAAGGAAG	CAGGTGGGGAGGTGGTAATG	60
	Ex 03	CTTCGACATCTCCTCCAC	TCTTCTCAGGGAGTGGAAC	59
	Ex 5	CCCACACACACTCCGATTTC	CCCACACACACTCCGATTTC	59
	Ex 16	CGCTGCTATGAAGACAAAC	CCACTCACACACAGACTTG	58
	Ex 27	GAGGCATACTGGCTCAGGAT	GGGAGGGTTGGTGTACCAG	60
	Ex 37	GGACAGAGCACCTGATCTCC	ACAAATGGGAAGACCACCTC	60
GNAL	Ex 1*	CTCTGGGCGTTAGCAAGTG	CAGTCCCGGGATTCAAGGAG	60
	Ex 3-4	ATGTCTGGGGGTTGATACTG	GCATTTAGAGAGCTGGATTTCG	55
	Ex 12	CATTCTGCCTCTAAGTGC	ACTGTGTTTCTCCCCATCTAC	57
PRKRA	Ex 1	CCTCGCTGGAGCAACGCAAG	GGCACGGCTTACCCAGAATG	57
	Ex 2 (neu)	TCTAAAGACCTCGCTCAC	TGAGAGGTCTCAGTTTCAG	57
	Ex 4	GAATGACAAGAGCAAAGAC	ATTAATTCCCTGTGTTAGCC	55
	Ex 7	AATGTTGTCTGTTAAATTG	TACTATCCACAAGAATGGG	55
	Ex 8	GGTGTAGTATACCATGGAG	GAGTGTGATGGAATCTATG	55

Abkürzungen: At = Annealing-Temperatur, Ex = Exon

PCR-Ansätze

Der Prozess der PCR folgt immer den gleichen Zyklus-Schritten, die sich aus initialer DNA-Denaturierung, Primer-Annealing und Synthese des komplementären DNA-Stranges zusammensetzen. Dadurch kann der Genabschnitt exponentiell vervielfacht werden. Die PCR-Ansätze unterscheiden sich je nach Gen-Sequenz, abhängig von den zu untersuchenden Exons und Eigenschaften der genutzten Primer. Bei Sequenzen mit einem hohen Gesamtanteil von den Basen Guanin (G) und Cytosin (C), auch „GC-reiche“ Sequenzen genannt, wurde zur Verbesserung der Amplifikation das „GC-RICH-PCR-System“ der Firma Qiagen genutzt. Dies beinhaltet mit Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) und Dimethylsulfoxid (DMSO) angereicherte Puffer und ermöglicht damit eine verbesserte Amplifikation GC-reicher DNA-Sequenzen (Henke et al., 1997). Zusätzlich wird das PCR-Programm und das Verhältnis von Trägersubstanz zu DNA angepasst.

Um bei der PCR die Anlagerung der Primer zu ermöglichen, wird der DNA-Doppelstrang initial bei 95 °C für fünf Minuten erhitzt und zu zwei DNA-Einzelsträngen denaturiert (Zyklus-Schritt: Initiale Denaturierung). Dies ermöglicht die Anlagerung der F- und R-Primer an die spezifische Sequenz der Einzelstränge und die anschließende Replikation des Genabschnittes. Das Primer-Annealing und somit die Anlagerung der Primer an die nach der Denaturierung als Einzelstränge vorliegende DNA erfolgt meist bei 55 °C - 65 °C für 30 Sekunden. Die Wahl der Annealing-Temperatur ist, wie die Zusammenstellung des PCR-Ansatzes, von den Eigenschaften des genutzten Primers abhängig (siehe Tabelle 3.5). Die Elongation findet bei 72 °C in 5'-3'- Richtung durch die hitzestabile Taq-Polymerase statt. Dabei werden die in den PCR-Ansatz gegebenen Nukleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs) an das 3'-Ende des Primers angeheftet und der komplementäre Strang synthetisiert (Zyklus-Schritt: Elongation). Durch die Hitzestabilität des Enzyms kann dieser Prozess bei 72 °C ablaufen. Dies verhindert eine vorzeitige Kombination der DNA-Einzelstränge zu einer Doppelhelix. Als diese würde das Template nicht mehr frei vorliegen und könnte nicht als Vorlage für die Synthese eines komplementären Strangs dienen. Im Verlauf einer PCR wird dieser Zyklus ca. 35 mal durchlaufen, um eine ausreichende Menge des PCR-Produktes für weitere genetische Untersuchungen zu erlangen. Die Anzahl der Zyklen hängt dabei von den zu untersuchenden Genen/Exons, den genutzten Primern und der gewünschten DNA-Menge ab. Im letzten Schritt findet die finale Elongation statt. Dabei wird der PCR-Ansatz noch einmal für 10 Minuten auf einer Temperatur von 72 °C gehalten (Zyklus-Schritt: Finale Elongation). Zur Aufbewahrung wird das PCR-Produkt im Anschluss auf 8 °C heruntergekühlt (Zyklus-Schritt: Ende).

In der Tabelle 3.6 ist das PCR-Programm „35x“ für das Exon 2 des Gens *TOR1A* mit optimalen Anlagerungsbedingungen bei 62 °C exemplarisch dargestellt. „35x“ beschreibt die Anzahl der durchlaufene Zyklen während der PCR. Das für GC-reiche Sequenzen angepasste PCR-Programm „GC-Rich“ ist exemplarisch für das Exon 1* des Gens *GNAL* in Tabelle 3.7 dargestellt. Die optimale Primer-Annealing-Temperatur lag dabei bei 60 °C.

Tabelle 3.6.: PCR-Programm „35x“ im CyclerBeispiel für das PCR-Programm von *TOR1A* Exon 2

Schritt „Ende“ dient lediglich zum Herunterkühlen und zur Aufbewahrung des Produktes und ist zeitlich nicht begrenzt.

Zyklus-Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95.0	5 min	1
Denaturierung	95.0	30 sec	
Primer Annealing	62.0	30 sec	
Elongation	72.0	30 sec	
Finale Elongation	72.0	10 min	1
Ende	8.0	∞	
Laufzeit:	01h 28m 56s		

Abkürzungen: min = Minuten, sec = Sekunden

Tabelle 3.7.: PCR-Programm „GC-Rich“ im CyclerBeispiel für das PCR-Programm von *GNAL* Exon 1*

Dieses Programm enthält ebenfalls 35 Zyklen, wobei sich die letzten 25 Zyklen bei der Elongation von der Zeit her unterscheiden. Die optimale Annealing-Temperatur liegt bei 60 °C.

Schritt „Ende“ dient lediglich zum Herunterkühlen und zur Aufbewahrung des Produktes und ist zeitlich nicht begrenzt.

Zyklus-Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95.0	3 min	1
Denaturierung	95.0	30 sec	
Primer Annealing	60.0	30 sec	
Elongation	72.0	30 sec	
Denaturierung	95.0	30 sec	
Primer Annealing	60.0	30 sec	
Elongation	72.0	45 sec	
Finale Elongation	72.0	7 min	1
Ende	8.0	∞	
Laufzeit:	01h 32m 11s		

Abkürzungen: min = Minuten, sec = Sekunden

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit genutzten PCR-Ansätze nach Gen und Exon spezifisch aufgelistet.

Tabelle 3.8.: PCR-Ansätze TOR1A

Diese Tabelle beinhaltet eine Übersicht über die verwendeten PCR-Ansätze für die Exons 2-5 des Gens *TOR1A*. Das PCR-Programm „35x“ entspricht dem in Tabelle 3.6 dargestellten Programm.

Die Annealing-Temperatur ist in °C angegeben. Alle Maßangaben sind in µl angegeben.

Reagenz \ Exon:	2	3	4	5
Programm	35x	35x	35x	35x
Annealing-Temperatur	62	60	60	62
HPLC-Wasser	10,375	7,0	10,375	10,375
dNTPs	5,0	4,0	5,0	5,0
Taq-Puffer	2,5	2,0	2,5	2,5
F-Primer	1,0	0,8	1,0	1,0
R-Primer	1,0	0,8	1,0	1,0
Taq-Polymerase	0,125	0,1	0,125	0,125
Enzym-Mix (GC-Rich)	/	/	/	/
DNA	5,0	5,0	5,0	5,0
Betaine	/	/	/	/
DMSO	/	0,8	/	/
GC-resol sol	/	/	/	/
MgCl ₂	/	/	/	/
Verhältnis Träger:DNA	20:5	15:5	20:5	20:5

Tabelle 3.9.: PCR-Ansätze GNAL

Diese Tabelle beinhaltet eine Übersicht über die verwendeten PCR-Ansätze der Exons des Gens *GNAL*. Als Programm wurde entweder das in Tabelle 3.6 dargestellte und hier als „35 x“ abgekürztes Programm oder das GC-Rich-Programm, siehe Tabelle 3.7, verwendet.

Die Annealing-Temperatur ist in °C angegeben. Alle Maßangaben sind in µl angegeben.

Reagenz \ Exon:	1*	3-4	12
Programm	GC-Rich	35x	35x
Annealing-Temperatur	60	55	57
HPLC-Wasser	2,5	0,95	0,95
dNTPs	0,2	2,0	2,0
Taq-Puffer	2,0	1,0	1,0
F-Primer	0,4	0,5	0,5
R-Primer	0,4	0,5	0,5
Taq-Polymerase	/	0,05	0,05
Enzym-Mix (GC-Rich)	0,1	/	/
DNA	3,0	5,0	5,0
Betaine	/	/	/
DMSO	/	/	/
GC-resol sol	1,0	/	/
MgCl ₂	0,4	/	/
Verhältnis Träger:DNA	7:3	5:5	5:5

Tabelle 3.10: PCR-Ansätze PRKRA

Diese Tabelle beinhaltet eine Übersicht über die verwendeten PCR-Ansätze der Exons des Gens *PRKRA*. Als Programm wurde entweder das in Tabelle 3.6 dargestellte und hier als „35x“ abgekürztes Programm oder das GC-Rich-Programm, siehe Tabelle 3.7, verwendet.

Die Annealing-Temperatur ist in °C angegeben. Alle Maßangaben sind in µl angegeben.

Reagenz \ Exon:	1	2 neu	4	7	8
Programm	GC-Rich	GC-Rich	35x	35x	35x
Annealing-Temperatur	57	57	55	55	55
HPLC-Wasser	2,5	2,5	4,4	4,4	4,4
dNTPs	0,2	0,2	3,0	3,0	3,0
Taq-Puffer	2,0	2,0	1,5	1,5	1,5
F-Primer	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
R-Primer	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
Taq-Polymerase	/	/	0,1	0,1	0,1
Enzym-Mix (GC-Rich)	0,1	0,1	/	/	/
DNA	3,0	3,0	5,0	5,0	5,0
Betaine	/	/	/	/	/
DMSO	/	/	/	/	/
GC-resol sol	1,0	1,0	/	/	/
MgCl ₂	0,4	/	/	/	/
Verhältnis Träger:DNA	7:3	7:3	10:5	10:5	10:5

Tabelle 3.11.: PCR-Ansätze KMT2B

Diese Tabelle beinhaltet eine Übersicht über die verwendeten PCR-Ansätze der Exons des Gens KMT2B. Als Programm wurde entweder das in Tabelle 3.6 dargestellte und hier als „35x“ abgekürztes Programm oder das GC-Rich-Programm, siehe Tabelle 3.7, verwendet. Die Annealing-Temperatur ist in °C angegeben. Alle Maßangaben sind in µl angegeben.

Reagenz \ Exon:	1	1_Katrin	1 neu	3 neu v	3 neu m	3 neu h	3.1	3_Katrin	5	16	27	28.2	37
Programm	GC-Rich	GC-Rich	GC-Rich	35	GC-Rich	35x	GC-Rich	35x	35x	35x	35x	35x	35x
Annealing-Temperatur	58	59	58	58	62	58	60	59	58	60	60	60	60
HPLC-Wasser	2,5	2,5	2,5	4,23	2,5	4,23	2,5	2,5	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23
dNTPs	0,2	0,2	0,2	3,0	0,2	3,0	0,2	0,2	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Taq-Puffer	2,0	2,0	2,0	1,5	2,0	1,5	2,0	2,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
F-Primer	0,4	0,4	0,4	0,6	0,4	0,6	0,4	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
R-Primer	0,4	0,4	0,4	0,6	0,4	0,6	0,4	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Taq-Polymerase	/	/	/	0,07	/	0,07	/	/	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Enzym-Mix (GC-Rich)	0,1	0,1	0,1	/	0,1	/	0,1	0,1	/	/	/	/	/
DNA	3,0	3	3,0	5,0	3,0	5,0	3,0	3,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Betaine	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DMSO	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
GC-resol sol	1,0	1,0	1,0	/	1,0	/	1,0	1,0	/	/	/	/	/
MgCl ₂	0,4	0,4	0,4	/	0,4	/	0,4	0,4	/	/	/	/	/
Verhältnis Träger:DNA	7,3	7,3	7,3	10,5	7,3	10,5	7,3	7,3	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5

3.2.6. Gelelektrophorese

Die Reinheit des PCR-Produktes wird mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Mit dieser Methode kann überprüft werden, ob die Anlagerung der Primer funktionierte und die Größe des PCR-Produkts mit der erwarteten Größe der vervielfältigten DNA-Sequenz übereinstimmt. Dabei werden die Nukleinsäureabschnitte nach ihrer Größe aufgetrennt und mit einem Standard verglichen.

Das Gel kann aus verschiedenen Substanzen gebildet werden. Bei dieser Arbeit wurde das Gel aus Agarose und einem Elektrophoresepuffer hergestellt. Bei der Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid, das beim Verhärten aus der Schmelze ein fest verzweigtes Gel bildet. Je höher die Agarose-Konzentration ist, desto kleiner sind die Poren. Meistens werden Konzentrationen zwischen 0,5% und 3% gewählt. In dieser Arbeit wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel genutzt. Bei dem Elektrophoresepuffer handelt es sich um einen in einfacher Konzentration vorliegenden TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer). Dieser bestand aus den Komponenten TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), Borat (Anion der Borsäure) und EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und diente sowohl für die Herstellung des Agarose-Gels als auch als Puffer in der Agarose-Gelelektrophorese. Für die Markierung der DNA im Agarose-Gel wurden zusätzlich 5 µl des DNA-Farbstoffs *Midori Green Advance* pro 100 ml Agarose-TBE-Puffer hinzugefügt. Eine genaue Zusammensetzung der Puffer und des Gels sind der Tabelle 3.12 zu entnehmen.

Tabelle 3.12.: Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers und Agarose-Gels

In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers TBE und des Agarose-Gels beschrieben.

Puffer	Zusammensetzung
1xTBE-Puffer	10,8 g (89 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$) TRIS 5,5 g (89 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$) Borsäure 0,7 g (2 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$) EDTA-Na ₂ -Salz
Agarose-Gel (1,5%iges Gel)	300 ml 1xTBE-Puffer 4,5 g Agarosepulver Standard 15 µl Midori Green Advance DNA Farbstoff

Abkürzungen: TBE = Tris-Borat-EDTA, TRIS = Tris-hydroxymethyl-aminomethan, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, mmol = Millimol, L = Liter

Am oberen Rand des Agarose-Gels wurden beim Guss des Gels Taschen eingefügt, die später mit dem angefärbten PCR-Produkt beladen werden konnten. Zum Anfärben des PCR-Produktes wurde 3 µl des Ladepuffers *Bromphenolblau* zu 3 µl PCR-Produkt gegeben. Das PCR-Produkt wurde im Anschluss mit Hilfe des elektrischen Feldes in der Agarose-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Dabei wurden eine Spannung von 120 V und eine Stromstärke von 400 mA für 20 Minuten angelegt. Durch die negativ geladenen Phosphatgruppen wandern die Nukleinsäure-Ketten durch das Agarose-Gel zur positiv geladenen Anode. Die Geschwindigkeit hängt dabei von der Größe und der Ladung der Ketten ab. Je kleiner die DNA-Kette, desto schneller und dadurch weiter wandern sie durch das Gel. Das Verhältnis zwischen Größe und Ladung ist dabei aufgrund einer negativen Phosphatgruppe pro Base direkt proportional. Zum Beurteilen der Größe der DNA-Ketten läuft in der ersten Tasche eines

Gels immer ein Standard aus DNA-Fragmenten bekannter unterschiedlicher Länge mit. Der in dieser Arbeit verwendete Standard war eine DNA-„Leiter“ mit Banden in Größenschritten von 100 Basenpaaren (bp). Anhand dieser konnte somit auf die Größe der PCR-Produkte geschlossen und dadurch deren „Reinheit“ kontrolliert werden. Zur Auswertung des Gels wurden die DNA-Banden unter UV-Licht dargestellt und mit den Banden der DNA-Leiter verglichen. Zur bildlichen Darstellung wurde das Computerprogramm *BioDocAnalyze* genutzt.

In Abbildung 3.1 ist ein Gel zur Kontrolle der PCR-Produkte von Exon 5, Exon 27 und Exon 37 des Gens *KMT2B* beispielhaft dargestellt. Die PCR-Produkte von Exon 5, 27 und 37 sind deutlich sichtbar und haben jeweils die gleiche Bandenlänge. Dies spricht für ein „reines“ PCR-Produkt und einer ausreichenden Menge von Material, das in der anschließenden Sequenzierung genauer auf genetische Varianten analysiert werden kann. Die Wasser-Kontrollproben („WK“) enthalten den reinen PCR-Ansatz ohne DNA-Zusatz und dienen dazu, auf eine mögliche Verunreinigung des PCR-Ansatzes mit Fremd-DNA-Spuren zu kontrollieren. Hier sollten somit keine DNA-Banden sichtbar sein.

3.2.7. ExoFast-Aufreinigung

Im Anschluss an die Agarose-Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt mit Hilfe von Exonukleasen für die Sequenzierung aufbereitet. Für diese Aufbereitung wurde die Enzymmischung *ExoFast* aus Exonuklease I (Exo I) und der thermosensitiven Alkalischen Phosphatase (FastAP) genutzt. Die Exonuklease ist bei diesem Vorgang für den Abbau der Primer und fehlerhaft eingebauter Nukleotidbasen verantwortlich, und die Alkalische Phosphatase sorgt für die Dephosphorylierung der verbliebenen dNTPs im PCR-Produkt. Das verwendete *ExoFast*-Gemisch bestand aus 15 µl PCR-Produkt und aus 1.5 µl Exo-Fast (Verhältnis Exo I 1:2 FastAP). Im Thermocycler wurde folgendes Programm für die Aufreinigung des PCR-Produktes genutzt:

Tabelle 3.13.: ExoFast-Aufreinigungsprogramm im Cycler

Die Tabelle stellt die einzelnen Zyklusschritte zur Aufbereitung des PCR-Produktes dar. Schritt 3 dient lediglich zum Herunterkühlen und zur Aufbewahrung des Produktes und ist zeitlich nicht bestimmt.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklen
1	37.0	15 min	1
2	85.0	15 min	1
3	8,0	∞	
Programmlaufzeit:			34 min 05 sec

Nach der Aufbereitung des PCR-Produktes erfolgte die Herstellung eines Sequenzansatzes für die Sanger-Sequenzierung.

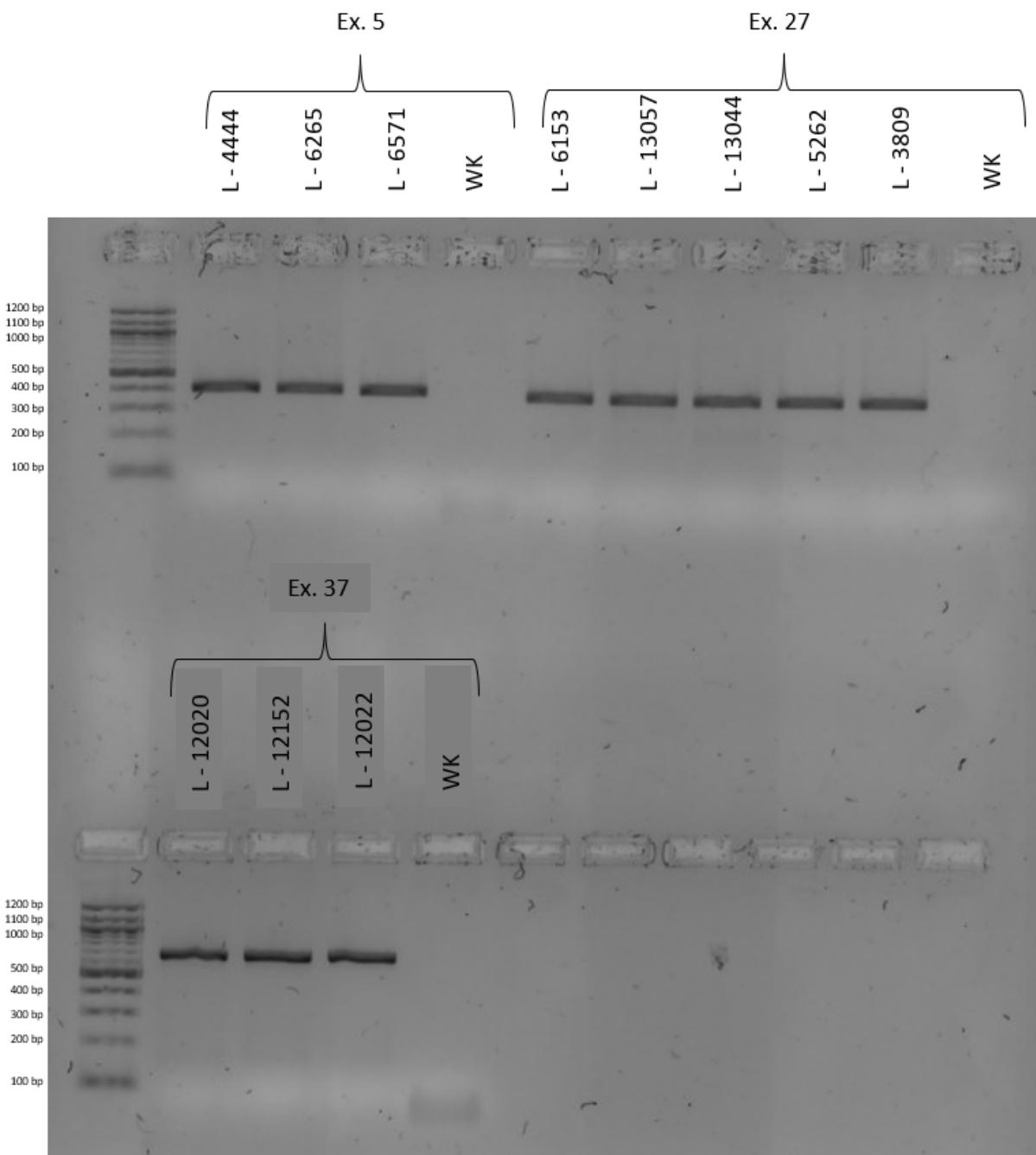


Abbildung 3.1.: Beispiel Gelelektrophorese der Exons 5, 27 und 37 des Gens KMT2B

Beispielhafte Darstellung eines Agarose-Gels zur Kontrolle des PCR-Produkt für Exon 5, 27 und 37 des Gens KMT2B. Die Laufrichtung der Nukleinsäure-Ketten ist nach unten.

In der linken Gel-Tasche befinden sich jeweils in der oberen und unteren Probenreihe die DNA-„Leiter“ des Standards mit Banden in Größenschritten von 100 Basenpaaren. In der oberen Reihe befinden sich das PCR-Produkt von drei Bioproben von Exon 5 und von fünf Bioproben von Exon 27. In der zweiten Reihe befinden sich drei Proben mit PCR-Produkten von Exon 37. Die Gel-Taschen mit der Bezeichnung „WK“ enthalten jeweils lediglich den PCR-Ansatz ohne DNA als Wasser-Kontrollprobe.

Abkürzungen: Ex. = Exon, WK = Wasser-Kontrollprobe, bp= Basenpaare

3.2.8. Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung. Diese basiert auf der 1977 entwickelten Didesoxymethode von F. Sanger und ermöglicht die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge der DNA (Sanger et al., 1977).

Der Mechanismus beruht auf einer *in vitro* Replikation von kurzen DNA-Abschnitten, die durch die verwendeten Primer vordefiniert wird. Hierbei werden zusätzlich zu den vier natürlich vorkommenden Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) der Basen Adenosin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) die zweifach desoxygenierten artifiziellen 2',3'-Didesoxybasen (ddNTPs) ohne 3'-OH-Ende hinzugefügt. Die ddNTPs werden in geringerer Konzentration zu den dNTPs, den Bausteinen der DNA-Replikation, in den Sequenzansatz gegeben. Beide Basentypen können von der DNA-Polymerase gebunden werden und konkurrieren um diese. Dadurch werden die Basen nach dem Zufallsprinzip in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Da die DNA-Polymerase zur Elongation der Nukleotidketten ein 3'-OH-Ende am Nukleotid braucht, bricht nach dem Einbau eines ddNTPs die Synthese ab und es entstehen Nukleotidketten unterschiedlicher Länge. Aus diesem Grund wird die Sanger-Sequenzierung auch Kettenabbruch-Methode genannt.

Die ddNTPs besitzen eine markierte letzte Base, um im Rahmen der Auswertung die Basenabfolge ablesen zu können. Sie werden heutzutage, wie auch in dieser Arbeit, mit Fluoreszenzmarkern (rot, grün, schwarz und blau) markiert. Auch eine radioaktive Markierung ist möglich, was früher häufiger verwendet wurde. Im Anschluss folgt die Auftrennung der Nukleotidketten mittels Kapillarelektrophorese und Anregung zur Fluoreszenz mit Hilfe eines Lasers. Ein Detektor kann anschließend die Sequenzen vergleichen und die Reihenfolge der Nukleotide und damit die Basensequenzfolge anhand der Fluoreszenzmarker bestimmen (Smith et al., 1986).

In dieser Arbeit wurde für den Sequenzansatz bei allen sequenzierten PCR-Produkten das gleiche Protokoll verwendet. Für den Ansatz wurden 2 µl des *ExoFast*-Produktes mit 8 µl einer Lösung aus verschiedenen Reagenzien gemischt. Diese Lösung setzte sich aus einem Sequenz-Puffer, dem *Terminator-Mix* 3.1 des *BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kits*, den Exon-spezifischen Primern und HPLC-reinem Wasser zusammen. Der Puffer bestand aus Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl) und MgCl₂. Durch den Puffer konnte der pH-Wert optimiert und ausreichend Mg²⁺ für die Reaktion zur Verfügung gestellt werden. Der *Terminatormix* 3.1 enthält die vier verschiedenen, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs und die DNA-Polymerase. Das genaue Schema zum Sequenzansatz ist in Tabelle 3.14 dargestellt. Als Primer wird im Sequenzansatz im Gegensatz zum PCR-Ansatz nur entweder der F- oder der R- Primer genutzt. Für die Sequenzierung sind in der Regel beide Primer frei wählbar. In einigen Fällen wurden zwei Sequenzansätze (jeweils F- und R- Primer) genutzt um die komplementären Nukleinsäurestrände einzeln darstellen und vergleichen zu können.

Der Sequenzansatz wurde in einem Thermocycler zur Reaktion gebracht. Dabei wurde das Gemisch für eine Minute auf 96 °C erhitzt, um die DNA initial in ihre Einzelstrände aufzuteilen. Im Anschluss wiederholt sich 25 mal der gleiche Zyklus mit Denaturierung und Aufspaltung

Tabelle 3.14.: Sequenzansatz und Cycler-Programm

In der linken Tabellenspalte ist die Zusammensetzung des genutzten Sequenzansatzes dargestellt. Für die F- und R- Primer ist jeweils ein Ansatz notwendig. Die rechte Tabellenspalte stellt eine Übersicht für das Programm im Thermocycler dar.

Sequenzansatz:	in µl	Cycler-Programm:	Temperatur in °C	Zeit	Zyklen
Exo-Fast-Produkt	2,0	Zyklus-Schritt			
Sequenz-Puffer	1,5	Initiale Denaturierung	96,0	1 min	1
Primer (F oder R)	0,5	Denaturierung	96,0	10 sec	
Terminatormix 3.1	0,5	Elongation	60,0	1 min 20 sec	
HPLC-Wasser	5,5	Ende	8,0	∞	
PCR-Produkt : Lösung	2 : 8	Laufzeit:	53 min 20 sec		

der DNA und der darauf folgenden Elongation mit Anlagerung der ddNTPs. Durch den in den Zyklen wiederholten Ablauf der Denaturierung und Anlagerung der Basen entsteht ein Gemisch aus verschiedenen langen Nukleinsäureketten, das zur Auftrennung in das Sequenzier-Gerät gegeben wird.

4. Ergebnisse

4.1. Epidemiologische Daten der im Studienzentrum Rostock rekrutierten Patienten der DysTract-Studie

Zwischen Februar und Juli 2018 wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit 75 Patientinnen und Patienten mit dem Krankheitsbild einer Dystonie an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock in die DysTract Studie eingeschlossen und in das Deutsche Dystonie-Register aufgenommen. In Tabelle A.2 im Anhang befindet sich eine Übersicht der klinischen Daten dieser Patienten.

Die Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer waren 53 Frauen und 22 Männer und stammten aus Mecklenburg-Vorpommern (69), Schleswig-Holstein (4), Brandenburg (1) und Bayern (1). Das Durchschnittsalter lag bei Aufnahme in das Deutsche Dystonie-Register bei 59 (± 12) Jahren und die Symptome traten durchschnittlich erstmals im Alter von 45 (± 15) Jahren auf. Es wurden Personen mit isolierter fokaler, multifokaler, segmentaler oder generalisierter Dystonie in das Register aufgenommen. Die fokale Dystonie machte mit 84% den größten und die generalisierte Dystonie mit 1,3% den kleinsten Anteil aus. Diese Verteilung entspricht prinzipiell der bisher ermittelten Häufigkeit der einzelnen Dystonie-Formen (Deutsche Dystonie Gesellschaft e.V., 2019). Von den Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern gaben 17 eine positive Familienanamnese an. Bei dieser kann davon ausgegangen werden, dass mindestens ein Angehöriger ersten oder zweiten Grades ebenfalls an einer diagnostizierten oder klinisch gesicherten Dystonie erkrankt ist. Die klinische Diagnosestellung erfolgte anhand eines standardisierten Fragebogens oder einer klinischen Untersuchung in einer Fachklinik.

Bei fünf der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer wurde vor Studieneinschluss bereits eine molekulargenetische Untersuchung hinsichtlich Dystonie durchgeführt, von der vier negativ ausfielen. Bei einer 49-Jährigen Patientin, die seit dem 36sten Lebensjahr an einer fokalen zervikalalen Dystonie erkrankt ist, wurde durch diese Untersuchung bereits die Frameshift-Mutation c.166_167insA im Dystonie-Gen *GNAL* festgestellt (Ziegan et al., 2014). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden bei dieser Patientin keine weitere pathogenen Varianten in den anderen oben genannten Dystonie-Genen festgestellt.

Eine Übersicht der klinischen Daten der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer ist in der Tabelle 4.1 dargestellt. Die Daten sind nach Geschlecht, Alter bei Symptombeginn und Studieneinschluss, Dystonieform und Familienanamnese aufgeteilt.

Tabelle 4.1.: Übersicht der klinischen Daten der Studienteilnehmenden von DysTract

Diese Tabelle stellt die klinischen Daten der DysTract-Studienteilnehmenden nach Dystonie-Form aufgeteilt dar. Alle Altersangaben sind in Jahren angegeben.

Dystonie-Form:	Patientenzahl (männlich/weiblich)	Durchschnittsalter bei Studieneinschluss ± SD (Altersbereich)	Durchschnittsalter bei Symptombeginn ± SD (Altersbereich)	Familien- anamnese (pos/neg)
Fokal:				
Blepharospasmus	4 (0/4)	62 ± 9 (55-75)	51 ± 9 (45-63)	0/4
Meige-Syndrom	5 (0/5)	74 ± 6 (67-81)	62 ± 3 (58-66)	1/4
Zervikal	50 (19/31)	59 ± 13 (30-81)	45 ± 14 (22-72)	13/37
Gliederdystonie (Schreibkrampf, Fuß- dystonie)	4 (0/4)	55 ± 5 (48-58)	43 ± 5 (38-48)	0/4
fokal gesamt:	63 (19/44)	60 ± 12 (30-81)	47 ± 13 (22-72)	14/49
Multifokal				
zervikal und obere Extremität	4 (1/3)	57 ± 7 (48-63)	31 ± 29 (6-56)	1/3
cranial und zervikal	1 (0/1)	54	14	1/0
zervikal und Rumpf	1 (1/0)	58	47	0/1
Zervikal, Rumpf, un- tere Extremität	1 (0/1)	61	27	1/0
multifokal gesamt:	7 (2/5)	57 ± 6 (48-63)	30 ± 23 (6-56)	3/4
Segmental:				
Generalisiert:	4 (1/3)	56 ± 19 (40-82)	39 ± 17 (26-62)	0/4
Gesamt:	1 (0/1)	38	37	0/1
Gesamt:	75 (22/53)	59 ± 12 (30-82)	45 ± 15 (6-72)	17/58

Abkürzungen: SD = Standardabweichung, UE = Untere Extremität, OE = obere Extremität, pos = positiv, neg = negativ

4.2. Ergebnisse der DNA-Sequenzierung

Nach der Aufnahme der klinischen Daten oben genannter Studienteilnehmenden in das Deutsche Dystonie-Register wurde das genetische Material dieser isoliert. Zusammen mit weiteren genetischen Proben aus der Biobank des Institutes für Neurogenetik der Universität zu Lübeck wurden insgesamt 2015 Bioproben mittels DNA-Sequenzierung auf genetische Varianten untersucht. Von diesen dienten 900 DNA-Proben von Parkinson (PD)-Patienten als Kontrollgruppe.

4.2.1. Übersicht der gesamten identifizierten genetischen Varianten

Durch die Nachsequenzierung nach Sanger wurde bei 100 Studienteilnehmenden eine genetische Variante mit einem möglichen Einfluss auf die Proteinsequenz in den Dystonie-Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* nachgewiesen. Da mehrere Varianten mehrmals vorkamen, konnten insgesamt 80 verschiedene genetische Varianten identifiziert werden. Keiner der Studienteilnehmenden war Träger mehrerer in dieser Studie nachgewiesenen Varianten. Die gefundenen Varianten lagen alle in heterozygoter Form vor. Mittels der Bewertungskriterien des ACMG und der Pathogenitätsskala von MDSGene wurden die genetischen Varianten

in Varianten ohne sicher einstufbare Pathogenität (*variant of uncertain significance*, VUS) und in Varianten mit einem sehr wahrscheinlichen Einfluss auf die Funktionalität und eine damit einhergehende Pathogenität (*pathogenic*) eingeteilt. Als *variant of uncertain significance* wurden 66 Varianten eingestuft, da eine Pathogenität dieser Mutationen ohne weitere funktionelle Studien nicht sicher eingeschätzt werden konnte. Die restlichen 14 genetischen Varianten wurden als wahrscheinlich pathogene Mutationen eingestuft.

Von den insgesamt 100 Studienteilnehmenden mit genetischen Varianten waren 58 Patienten an einer Dystonie erkrankt (Dyt-Patienten), davon 26 (44,8%) Frauen und 32 (55,2%) Männer. Die Dystonie-Patienten hatten bei Studieneinschluss ein Durchschnittsalter von 46,3 (± 17) Jahren und bei Symptombeginn ein Durchschnittsalter von 16,1 (± 9) Jahren. In der Dystonie-Patientengruppe stellte die fokale Dystonie mit 39,7% den größten Anteil dar. Den geringsten Anteil machte mit 1,7% die multifokale Dystonie aus. Des Weiteren lagen zu 15,5% eine segmentale Dystonie und zu 27,6% eine generalisierte Dystonie vor. Die anderen 42 Variantenträgerinnen und -träger waren Patienten mit Parkinson-Syndrom, davon 18 (42,9%) Frauen und 24 (57,1%) Männer. Die Parkinson-Patienten zeigten keine Symptome einer Dystonie. Sie dienten als Kontrollgruppe, um spezifisch mit Dystonie assoziierte genetische Varianten von den bei anderen neurologischen Bewegungsstörungen vorkommenden Varianten abzugrenzen. Die PD-Patienten hatten zu Studienbeginn ein Durchschnittsalter von 63,5 (± 11) Jahren und zeigten einen Symptombeginn im Alter von durchschnittlich 38,7 (± 21) Jahren. Von den in der Kontrollgruppe nachgewiesenen Varianten der oben genannten Dystonie-Genen wurden außer vier Varianten alle als VUS eingestuft. Bei den vier Varianten handelt es sich um wahrscheinlich pathogene Varianten.

Eine Übersicht der klinischen Daten der 100 Studienteilnehmenden mit genetischen Varianten ist in der Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2.: Übersicht klinischer Daten der Studienteilnehmenden mit genetischen Varianten
 Es sind die klinischen Daten der Studienteilnehmenden mit genetischen Varianten in den Dystonie-Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* dargestellt.
 Alle Altersangaben sind in Jahren angegeben.

	Herkunft	Anzahl (Geschlecht) (m/f/n.a.)	Durchschnittsalter Studieneinschluss ± SD (Altersbereich)	Durchschnittsalter Sympтомbeginн ± SD (Altersbereich)	Dystonie-Form (fok/mfok/seg/gen/n.a.)	Familien- anamnese (pos/neg/n.a.)
Dystonie	GER	51 (26/25/0)	49 ± 16	30 ± 16	21/1/8/14/7	4/25/22
	ESP	6 (5/1)	39 ± 21	13 ± 3	2/0/1/3/0	2/4/0
	KOR	1 (1/0)	45	n.a.	0/0/0/0/1	0/0/1
gesamt:		58 (32/26)	48 ± 16	28 ± 16	23/1/9/17/8	6/29/23
Parkinson- Syndrom	GER	42 (24/18)	69 ± 11	59 ± 13	n.a.	1 / 19 / 22

Abkürzungen: GER = Germany, ESP = Spanien, KOR = Südkorea, SD = Standardabweichung, fok = fokal, mfok = multifokal, seg = segmental, gen = generalisiert,
 n.a. = not applicable

4.2.2. Übersicht pathogener genetischer Varianten

Von den insgesamt 80 in dieser Studie identifizierten genetischen Varianten konnten nach der ACMG-Einteilung 14 als pathogen eingestuft werden. Drei der pathogenen Varianten wurden im Dystonie-Gen *TOR1A*, sechs im Gen *THAP1*, drei im Gen *GNAL* und je eine Variante in den Genen *PRKRA* und *KMT2B* gefunden. Bei diesen Varianten handelt es sich um drei Frameshift-Mutationen, zwei In-frame Deletionen, sieben Missense-Mutationen und jeweils eine Nonsense- bzw. eine Spleißstellen-Mutation.

Fünf dieser als pathogen eingestuften Varianten wurden bei mehreren Patienten gefunden, sodass die 14 Varianten insgesamt bei 27 Teilnehmenden auftraten. Dabei gab es keinen Patienten, der von mehr als einer dieser pathogenen Varianten betroffen war. Bei 23 der Variantenträger lag eine Dystonie vor. Das entspricht 2,1% (23/1115) der teilnehmenden Dystonie-Patienten. In der Kontrollgruppe wurden vier als pathogen eingestufte Varianten bei Patienten mit Parkinson-Syndrom gefunden. Das entspricht 0,4% (4/900) der Gesamtzahl der Parkinson-Patienten. Zwei dieser Varianten wurden ausschließlich bei Patienten mit Parkinson-Syndrom gefunden. Die anderen beiden Varianten wurden sowohl bei Dystonie- als auch bei Parkinson-Patienten nachgewiesen. Eine Übersicht der pathogenen genetischen Varianten mit Diagnose der Variantenträger und weiteren genetischen Daten sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

Die 27 Träger pathogener Varianten hatten zu Beginn der Studie ein Durchschnittsalter von 49 (± 17) Jahren und bei Symptombeginn von 20 (± 14) Jahren. Davon waren 12 Personen weiblich und 15 männlich. Von den 23 Patientinnen und Patienten mit Dystonie dieser Gruppe hatte die Mehrheit mit 52,2% eine generalisierte Dystonie (12 Patienten). Des Weiteren hatten 21,8% (5 Patienten) eine fokale und 13% (3 Patienten) eine segmentale Dystonie. Bei den verbleibenden 13% (3 Patienten) lagen keine klinischen Daten zu der Dystonieform vor. Dies lag entweder daran, dass einige Fragen in der Anamnese nicht sicher beantwortet werden konnten oder Patienten im Rahmen einer anderen Studie aufgenommen wurden und sich dort der Fragenkatalog unterschied oder nicht vollständig ausgefüllt werden konnte. Eine Übersicht der Dystonieformen befindet sich in Abbildung 4.1.

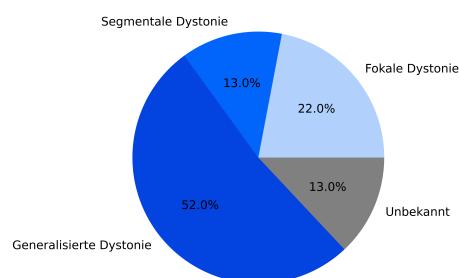


Abbildung 4.1.: Dystonieformen der Träger pathogener Varianten

Darstellung der Verteilung der verschiedenen Dystonieformen von den Dystonie-Patienten mit dem Nachweis einer pathogener Variante.

Tabelle 4.3.: Übersicht der pathogenen genetischen Varianten

Die Tabelle stellt die gefundenen pathogenen genetischen Varianten dar, sowie Diagnose, das Patho-Scoring und den CADD-Score. In rot sind die in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Varianten markiert. Alle hier aufgelisteten Varianten liegen in heterozygoter Form vor. Die Vererbung erfolgt autosomal-dominant. Eine Ausnahme bildet das Gen *PRKRA*. Dort erfolgt die Vererbung autosomal-rezessiv.

Gen	Patienten-ID	Mutationsform	Mutation	Anzahl	Diagnose	CADD-Score	ACMG	MDSGene
TOR1A	L-4004, L-11062, L-11584, L-11627, L-3837, L-4591, L-7404, L-11542, L-11514	In-frame Deletion	c.907_909delGAG	p.Glu303del	9	Dyt	22,4	LP DeP
	L-10850 L-4286	Missense In-frame Deletion	c.863G>A c.40_45 delGGCCG	p.Arg288Gln p.Ala14_Pro15del	1 1	PD Dyt	23,3 22,6	LP PrP PrP
<i>THAP1</i>	L-11557, L-11640	Nonsense	c.292G>T	p.Glu98*	2	Dyt	37,0	P PrP
	L-11577	Missense	c.61T>G	p.Ser21Ala	1	Dyt	30,0	LP Pop
	L-2257	Frameshift	c.474delA	p.Lys158Asnfs*23	1	Dyt	34,0	P PrP
	L-3841	Missense	c.70A>G	p.Lys24Glu	1	Dyt	32,0	LP PrP
	L-4155	Missense	c.68A>C	p.His23Pro	1	Dyt	29,4	LP PrP
	L-7807	Spleißstelle	c.71+2T>C		1	PD	33,0	P PrP
GNAL	L-7606 = L-8259, L-11929	Missense	c.1115T>G	p.Ile372Ser	2	Dyt	31,0	VUS PrP
	L-8257, L-12018	Missense	c.313AA>C	p.Ile105Leu	2	Dyt+ PD	24,7	VUS PrP
	L-12521	Frameshift	c.1264dupT	p.Tyr422fs	1	Dyt	35,0	P PrP
<i>PRKRA</i>	L-4372, L-6265, L-6008	Missense	c.665C>T	p.Pro222Leu	3	Dyt(2), PD (1)	21,6	LP DeP
<i>KMT2B</i>	L-8941	Frameshift	c.3568_3577 delCTGAGTGTGC	p.Leu1190fs	1	Dyt	35,0	P PrP

Abkürzungen: Dyt = Dystonie, PD = Parkinson's Disease, ACMG-Kriterien: P = pathogenic, LP = likely pathogenic, VUS = variant of uncertain significance;
MDSGene-Patho-Scoring: DeP = definitely pathogenic, PrP = probably pathogenic, PoP = possible pathogenic

Eine genaue tabellarische Darstellung der erhobenen Daten zu den Trägern pathogener Varianten ist nach Studienteilnehmenden mit Dystonie und Parkinson-Syndrom getrennt dargestellt. Von der Kontrollgruppe mit Parkinson-Patienten sind die genetischen und die klinischen Daten in Tabelle 4.4 dargestellt. Detaillierte Angaben zur Variantenfrequenz und dem Patho-Scoring von Dystonie-Patienten finden sich in Tabelle 4.5. Die dazugehörigen klinischen Daten sind in Tabelle 4.6 aufgelistet.

Tabelle 4.4.: Daten der pathogenen genetischen Varianten der Kontrollgruppe mit Parkinson-Syndrom

Diese Tabelle beinhaltet klinische und genetische Daten zu den pathogenen Varianten in der Kontrollgruppe mit Parkinson-Patienten. Alle Studienteilnehmer in dieser Tabelle kommen aus Deutschland. Die Daten sind nach Gen und zugehöriger genetischer Variante sortiert. Im oberen Abschnitt der Tabelle sind die Daten zur Pathogenität und Häufigkeit der Variante dargestellt. Der untere Abschnitt enthält Angaben zur Klinik der Indexpatienten. Die Altersangaben sind in Jahren.

Patienten-ID	L-10850	L-7807	L-12018	L-6008
Gene	TOR1A	THAP1	GNAL	PRKRA
cDNA Variante	c.863G>A	c.71+2T>C	c.313A>C	c.665C>T
Protein Variante	p.Arg288Gln	.	p.Ile105Leu	p.Pro222Leu
CADD-Score	23,3	33,0	24,7	21,6
GnomAD frequency (total)	0,00009191	n.a.	0,00003207	0,00009905
GnomAD frequency	EUR 0,0001316	n.a.	EUR 0,000065	EUR 0,0001085
Patho-Scoring (ACMG)	LP	P	VUS	LP
Patho-Scoring (MDSGene)	PrP	PrP	PrP	DeP
Alter (Studienbeginn)	74	56	53	71
Alter (Symptombeginn)	63	30	23	n.a.
Geschlecht (m/f)	m	f	f	f
Familienanamnese	negativ	negativ	n.a.	negativ

Abkürzungen: EAS = East Asian, EUR = non-Finnish European, VUS = variant of unknown significance, LP = likely pathogenic, PoP = possibly pathogenic, PrP = probably pathogenic, DeP = definitely pathogenic, P = pathogenic, n.a. = not applicable, f = weiblich, m = männlich

Tabelle 4.5.: Daten der pathogenen genetischen Varianten bei den Studienteilnehmenden mit Dystonie
 Diese Tabelle stellt die Daten zur Varianten-Inzidenz und dem Patho-Scoring der Studienteilnehmenden mit genetischen Varianten in den Dystonie-Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* dar.

Gen	Patienten-ID	cDNA Variante	Protein Variante	CADD-Score	GnomAD frequency (total)	GnomAD frequency	Patho-Scoring (ACMG)	Patho-Scoring (MDSGene)
TOR1A	L-4004	c.907_909delGAG	p.Glu303del	22,4	0,0001061	EUR 0,00006192	LP	DeP
	L-11062	c.907_909delGAG	p.Glu303del	22,4	0,0001061	EAS 0,00005013	LP	DeP
	L-11584	c.907_909delGAG	p.Glu303del	22,4	0,0001061	EUR 0,00006192	LP	DeP
	L-11627	c.907_909delGAG	p.Glu303del	22,4	0,0001061	EUR 0,00006192	LP	DeP
	L-3837	c.907_909delGAG	p.Glu303del	22,4	0,0001061	EUR 0,00006192	LP	DeP
	L-4591	c.907_909delGAG	p.Glu303del	22,4	0,0001061	EUR 0,00006192	LP	DeP
	L-7404	c.907_909delGAG	p.Glu303del	22,4	0,0001061	EUR 0,00006192	LP	DeP
	L-11542	c.907_909delGAG	p.Glu303del	22,4	0,0001061	EUR 0,00006192	LP	DeP
	L-11514	c.907_909delGAG	p.Glu303del	22,4	0,0001061	EUR 0,00006192	LP	DeP
	L-4286	c.40_45delGCCCG	p.Ala14_Pro15del	22,6	n.a.	n.a.	P	PrP
THAP1	L-11557	c.292G>T	p.Glu98*	37,0	n.a.	n.a.	P	PrP
	L-11640	c.292G>T	p.Glu98*	37,0	n.a.	n.a.	P	PrP
	L-11577	c.61T>G	p.Ser21Ala	30,0	n.a.	n.a.	LP	Pop
	L-2257	c.474delA	p.Lys158Asnfs*23	34,0	n.a.	n.a.	P	PrP
	L-3841	c.70A>G	p.Lys24Glu	32,0	n.a.	n.a.	LP	PrP
	L-4155	c.68A>C	p.His23Pro	29,4	n.a.	n.a.	LP	PrP
GNAL	L-7606=L-8259	c.1115T>G	p.Ile372Ser	31,0	n.a.	n.a.	VUS	PrP
	L-11929	c.1115T>G	p.Ile372Ser	31,0	n.a.	n.a.	VUS	PrP
	L-8257	c.313A>C	p.Ile105Leu	24,7	0,00003207	EUR 0,000065	VUS	PrP
	L-12521	c.1264dupT	p.Tyr422fs	35,0	n.a.	n.a.	P	PrP
PRKRA	L-4372	c.665C>T	p.Pro222Leu	21,6	0,00009905	EUR 0,0001085	LP	DeP
	L-6265	c.665C>T	p.Pro222Leu	21,6	0,00009905	EUR 0,0001085	LP	DeP
KMT2B	L-8941	c.3568_3577delCTGACTGTGTC	p.Leu1190fs	35,0	n.a.	n.a.	P	PrP

Abkürzungen: EAS= East Asian, EUR= non-Finnish European, VUS= variant of unknown significance, LP= likely pathogenic, PoP= possibly pathogenic, PrP= probably pathogenic, DeP= definitely pathogenic, P= pathogenic, n.a.= not applicable

Tabelle 4.6: Übersicht der klinischen Daten von Dystonie-Patienten mit pathogenen genetischen Varianten
 Diese Tabelle stellt die klinischen Daten der Studienteilnehmenden mit genetischen Varianten in den Dystonie-Genen *TOR1A*, *THAPI*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* dar. Alle Altersangaben sind in Jahren angegeben.

Gen	Patienten-ID	Herkunft	Alter (Studienbeginn)	Alter (Symptombeginn)	Geschlecht	Familienanamnese	Dystoniform	Lokalisation der Symptome	weiteres
<i>TOR1A</i>	L-4004	GER	40	7	m	negativ	generalisiert	Nacken, Rumpf, Extremität bds.	Arm/ Hand re., Bein li
	L-11062	KOR	25	9	m	negativ	generalisiert	n.a.	
	L-11584	ESP	22	10	m	positiv	fokal	US rechts	Schwester: Schreibkrampf, Vater: cervical
	L-11627	ESP	24	12	m	negativ	generalisiert	Beginn US rechts	
	L-3837	GER	43	n.a.	m	negativ	generalisiert	n.a.	
	L-4591	GER	35	16	f	positiv	fokal		
	L-7404	GER	23	10	f	negativ	generalisiert	n.a.	
	L-11542	GER	53	11	m	negativ	generalisiert	n.a.	D-B-CHAR-0034
	L-11514	GER	57	25	m	negativ	generalisiert	n.a.	D-B-CHAR-0035
	L-4286	GER	80	30	f	positiv	fokal	Torticollis, Kopftremor	
<i>THAPI</i>	L-11557	ESP	77	10	m	positiv	generalisiert	n.a.	Bruder: generalisierte Dystonie
	L-11640	ESP	51	15	f	negativ	segmental	oromandibulär	
	L-11577	ESP	26	16	m	negativ	generalisiert	cervikal	D-HL-JK-0029
	L-22257	GER	78	8	m	negativ	generalisiert	n.a.	
	L-3841	GER	42	n.a.	f	n.a.	fokal	Hand	
	L-4155	GER	43	9	m	positiv	fokal	Hand	
	<i>GNAL</i>	L-7606=L-8259	GER	50	39	m	n.a.	segmental	n.a.
	L-11929	GER	63	n.a.	f	n.a.	generalisiert	n.a.	
	L-8257	GER	53	23	f	negativ	segmental	Cervikal, Gesicht	
	L-12521	GER	52	16	m	n.a.	fokal	cervikal	
<i>PRKRA</i>	L-4372	GER	36	n.a.	f	negativ	fokal	Musikerdystonie	
	L-6265	GER	37	n.a.	m	n.a.	generalisiert	n.a.	
<i>KMT2B</i>	L-8941	GER	33	7	f	negativ	generalisiert	Untere Extremitäten, Rumpf	Dysarthrie

Abkürzung: GER = Germany, ESP = Spanien, KOR = Südkorea, f = female, m = männlich, n.a. = not applicable, re = rechts, li = links, US = Unterschenkel, bds = beidseits

4.3. Übersicht neuer genetischer Varianten

Die meisten nachgewiesenen und als pathogen eingestuften Varianten wurden bereits in früheren Studien beschrieben (Klein et al., 1998; Iqbal et al., 2019; Vulinovic et al., 2014; Lohmann et al., 2012; Djarmati et al., 2009; Dos Santos et al., 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf bisher noch nicht in öffentlichen Datenbanken (gnomAD Browser, MDSGene, HGMD) registrierte Varianten in kodierenden Genabschnitten nachgewiesen. Dabei handelt es sich um drei wahrscheinlich pathogene Varianten im Gen *THAP1* und zwei im Gen *GNAL*.

- *THAP1*: c.292G>T p.Glu98*, c.61T>G p.Ser21Ala, c.71+2T>C
- *GNAL*: c.1264dupT p.Tyr422fs, c.1115T>G p.Ile372Ser

In Tabelle 4.7 sind die neu nachgewiesenen, vermutlich pathogenen genetischen Varianten nach Gen sortiert aufgelistet und als Übersicht dargestellt. Ebenfalls in dieser Tabelle enthalten sind das Patho-Scoring, die Mutationsform und die Diagnose der jeweiligen Patienten. In die beiden angewendeten Scoring-Systeme fließen jeweils leicht unterschiedliche Kriterien ein. Daher kommt es zum Teil zu einer unterschiedlichen Bewertung der genetischen Variante. Dies illustriert, dass es sich bei der Einstufung um eine Prädiktion und nicht um einen sicheren Beweis handelt. Eine detaillierte Beschreibung inklusive klinischer Fallbeschreibungen der neu nachgewiesenen, wahrscheinlich pathogenen genetischen Varianten findet sich im Abschnitt 4.4 im Absatz zu dem jeweiligen Gen.

Tabelle 4.7.: Übersicht der neu identifizierten pathogenen genetischen Varianten
Das Alter zu Beginn der Studie und der Symptome ist jeweils in Jahren angegeben.

Gen	<i>THAP1</i>				<i>GNAL</i>		
Patienten-ID	L-11640	L-11557	L-11577	L-7807	L-12521	L-7606	L-11929
Mutation	c.292G>T	c.292G>T	c.61T>G	c.71+2T>C	c.1264dupT	c.1115T>G	c.1115T>G
	p.Glu98*	p.Glu98*	p.Ser21Ala	.	p.Tyr422fs	p.Ile372Ser	p.Ile372Ser
Mutationsform	Nonsense	Nonsense	Missense	Spleißstelle	Frameshift	Missense	Missense
Diagnose	DYT	DYT	DYT	PD	DYT	DYT	DYT
Dystonieform	segmental	generalisiert	generalisiert		fokal	segmental	generalisiert
CADD-Score	37	37	30	33	35	31	31
Patho-Scoring (ACMG)	P	P	LP	P	P	VUS	VUS
Patho-Scoring (MDSGene)	PrP	PrP	PoP	PrP	PrP	PrP	PrP
Herkunft	ESP	ESP	ESP	GER	GER	GER	GER
Studienbeginn	51	77	26	56	52	50	63
Symptombeginn	15	10	16	30	16	39	n.a.
Geschlecht	f	m	m	f	m	m	f
FA	negativ	positiv	negativ	negativ	n.a.	n.a.	n.a.

Abkürzungen: Dyt = Dystonie, PD = Parkinson's Disease, VUS= variant of unknown significance, LP= likely pathogenic, PoP= possibly pathogenic, PrP= probably pathogenic, P= pathogenic, FA= Familienanamnese, ESP= Spanien, GER= Deutschland, f= weiblich, m= männlich

4.4. Genspezifische Darstellung pathogener Varianten

4.4.1. Pathogene Varianten im *TOR1A*-Gen

Das Gen *TOR1A* gehört zu der Genfamilie *torsin family 1, member A (torsin A)* und liegt auf dem Chromosom 9 an dem Genort 9q34.11. Schon vor über 20 Jahren wurde dieses als ursächlich für eine früh beginnende Dystonie (Early-onset dystonia) identifiziert, durch den Nachweis pathogener Mutationen (Ozelius et al., 1997).

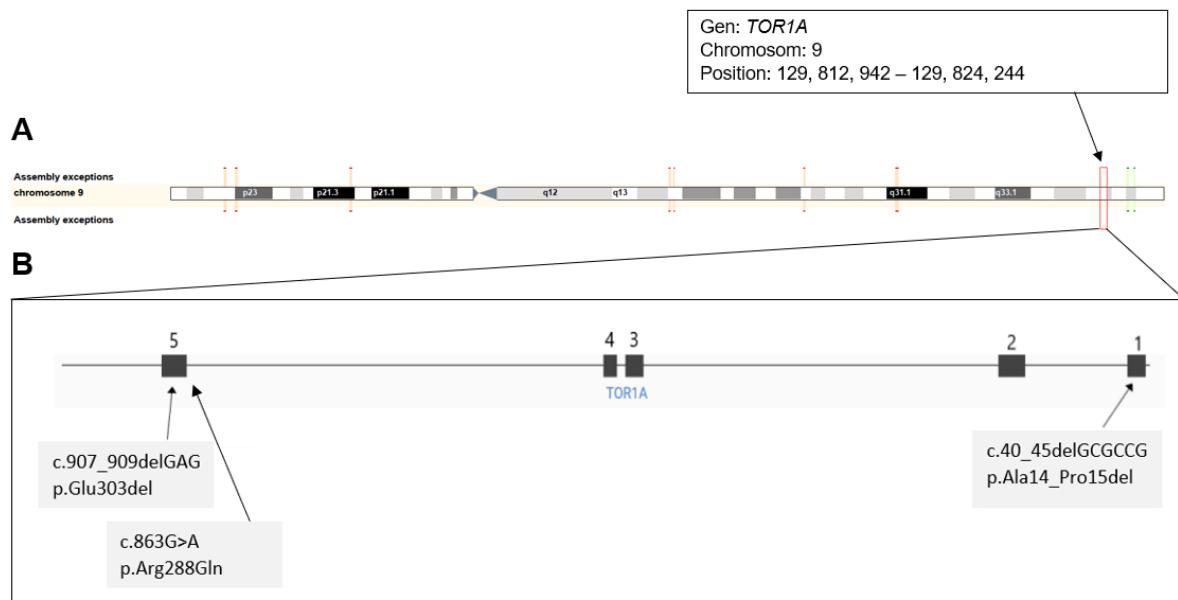


Abbildung 4.2.: Lokalisation des Gens *TOR1A* mit pathogenen Varianten

Schematische Darstellung der Lokalisation des Dystonie-Gens *TOR1A* auf Chromosom 9. Die Position bezieht sich dabei auf die Referenzsequenz Human GRCh38/hg38 (Bild A). In Bild B sind die pathogenen Varianten im Gen den einzelnen Exons zugeordnet.

www.gnomad.broadinstitute.org; <https://useast.ensembl.org>

In dieser Studie wurden drei als pathogen eingestufte Varianten im *TOR1A* Gen identifiziert. Diese Varianten sind in Abbildung 4.2 mit ihrer genetischen Lokalisation dargestellt. Hierbei handelt es sich um zwei In-frame Deletionen: c.907_909delGAG p.Glu303del und c.40_45 delGCGCCG p.Ala14_Pro15del sowie um eine Missense-Mutation: c.863G>A p.Arg288Gln. Der CADD-Score und die Einstufung der Pathogenität dieser genetischen Varianten sind der Tabelle 4.3 zu entnehmen. Die In-frame Deletionen wurden ausschließlich bei Patienten mit Dystonie und die Missense-Variante in der Kontrollgruppe nachgewiesen.

Die Mutation c.907_909delGAG p.Glu303del ist eine der ersten identifizierten Mutationen mit Einfluss auf die Pathogenese von Dystonie. Sie wurde in dieser Arbeit bei neun Patienten nachgewiesen und wurde zuvor bereits mehrfach in anderen Studien zu genetischen Ursachen von Dystonie in verschiedenen Populationen weltweit publiziert (Ozelius et al., 1997; Lange et al., 2021; MDSGene, 2020). Die zweite Inframe-Deletion, c.40_45 delGCGCCG p.Ala14_Pro15del, wurde ebenfalls bereits in einer früheren Studie nachgewiesen und beschrieben (Vulinovic et al., 2014) Es handelte sich dabei um den selben Patienten wie in dieser Studie. Bei der dritten

genetischen Variante, c.863G>A p.Arg288Gln, handelt es sich um eine Missense-Variante, die bei einem Patienten mit Parkinson-Syndrom identifiziert wurde. In anderen Studien wurde diese genetische Variante bereits bei Patienten, die an einer Dystonie erkrankt sind, nachgewiesen (Zirn et al., 2008; Iqbal et al., 2019). Da diese Variante sowohl bei Patienten mit Dystonie als auch bei einem Patienten mit Parkinson-Syndrom nachgewiesen wurden, sollte anhand von weiteren funktionellen Studien eine Dystonie-spezifische Pathogenität genauer untersucht werden. In Tabelle 4.8 sind die genetischen *TOR1A*-Varianten und die klinischen Daten der Patienten dargestellt.

Tabelle 4.8.: Übersicht der pathogenen *TOR1A*-Varianten mit klinischen Daten

In dieser Tabelle ist eine Übersicht über die klinischen Daten der Studienteilnehmenden mit pathogenen *TOR1A*-Varianten dargestellt.

	L-4004	L-11062	L-11584	L-11627
Patient	1	2	3	4
Mutation	c.907_909delGAG p.Glu303del	c.907_909delGAG p.Glu303del	c.907_909delGAG p.Glu303del	c.907_909delGAG p.Glu303del
Diagnose	Dyt	Dyt	Dyt	Dyt
Alter (Studienbeg.)	40	25	22	24
Alter (Symptombeg.)	7	9	10	12
Geschlecht	m	m	m	m
Dystonieform	generalisiert	generalisiert	fokal	generalisiert
Lokalisation der Symptome	Nacken, Schulter, Becken, Arm/ Hand re., Rumpf, Bein li., beide Füße	n.a.	US re.	US re.
Familienanamnese	negativ	negativ	positiv	negativ
Herkunft	Deutschland	Südkorea	Spanien	Spanien
Weiteres			Schwester: Schreibkrampf Vater: zervikal	
	L-3837	L-4591	L-7404	L-11542
Patient	5	6	7	8
Mutation	c.907_909delGAG p.Glu303del	c.907_909delGAG p.Glu303del	c.907_909delGAG p.Glu303del	c.907_909delGAG p.Glu303del
Diagnose	Dyt	Dyt	Dyt	Dyt
Alter (Studienbeg.)	53	35	23	53
Alter (Symptombeg.)	n.a.	16	10	11
Geschlecht	m	f	f	m
Dystonieform	generalisiert	fokal	generalisiert	generalisiert
Lokalisation der Symptome	n.a.	Hand	n.a.	n.a.
Familienanamnese	negativ	positiv	negativ	negativ
Herkunft	Deutschland	Deutschland	Deutschland	Deutschland
	L-11514	L-10850	L-4286	
Patient	9	10	11	
Mutation	c.907_909delGAG p.Glu303del	c.863G>A p.Arg288Gln	c.40_45delGCGCCG p.Ala14_Pro15del	
Diagnose	Dyt	PD	Dyt	
Alter (Studienbeg.)	57	74	80	
Alter (Symptombeg.)	25	63	30	
Geschlecht	m	m	f	
Dystonieform	generalisiert	PD	fokal	
Lokalisation der Symptome	n.a.	PD	Torticollis, Kopftremor	
Familienanamnese	negativ	negativ	positiv	
Herkunft	Deutschland	Deutschland	Deutschland	

Abkürzungen: beg. = Beginn, Dyt = Dystonie, PD = Parkinson's Disease, m = male, f = female, US = Unterschenkel, li = links, re = rechts, n.a. = not applicable

4.4.2. Pathogene Varianten im *THAP1*-Gen

Im Gen *THAP1* (DYT6) wurden sechs als pathogen eingestufte genetische Varianten identifiziert. Darunter waren drei Missense-Mutationen: c.61T>G p.Ser21Ala, c.70A>G p.Lys24Glu, c.68A>C p.His23Pro, eine Nonsense-Mutation: c.292G>T p.Glu98*, eine Frameshift-Mutation: c.474delA p.Lys158Asnfs*23 und eine Spleißstellen-Mutation c.71+2T>C. Die Abbildung 4.3 zeigt die Lokalisation dieser Mutationen in dem jeweiligen Exon.

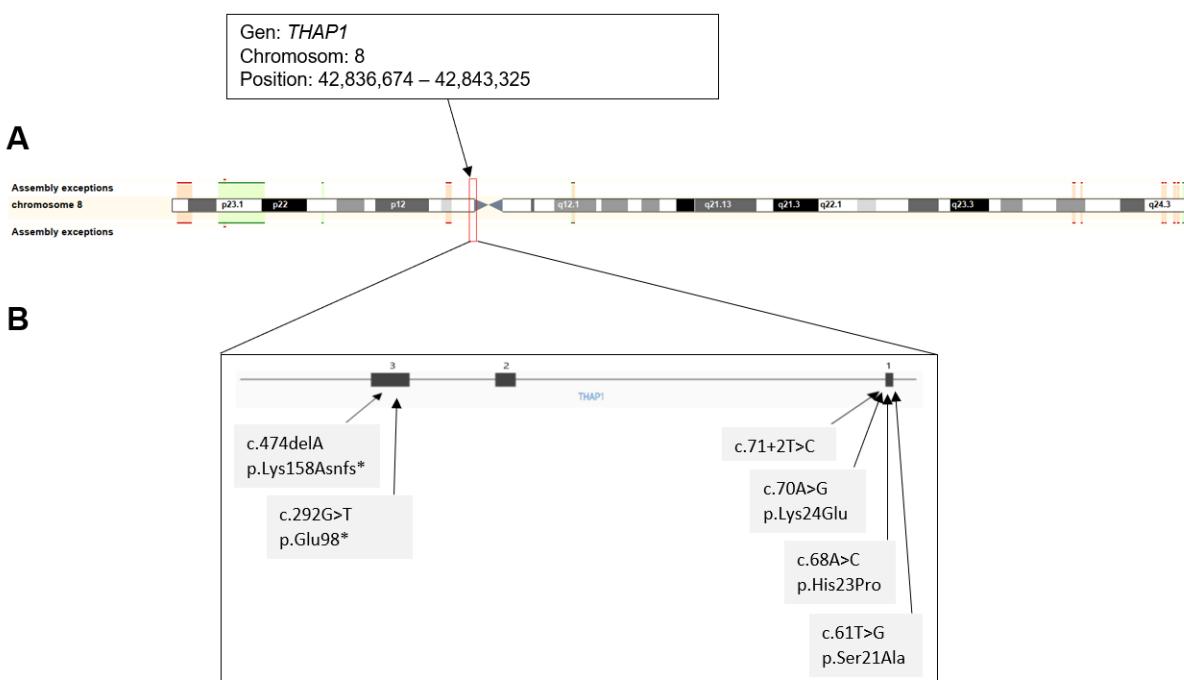


Abbildung 4.3.: Lokalisation des Gens *THAP1* mit den pathogenen Varianten

Schematische Darstellung der Lokalisation des Dystonie-Gens *THAP1* auf Chromosom 8. Die Position bezieht sich dabei auf die Referenzsequenz *Human GRCh38/hg38* (Bild A). In Bild B sind die pathogenen Varianten im Gen den einzelnen Exons zugeordnet.

www.gnomad.broadinstitute.org; <https://useast.ensembl.org>

Die Spleißstellen-Mutation c.71+2T>C im Gen *THAP1* wurde in der Kontrollgruppe mit Parkinson-Patienten gefunden. Die Kriterien des ACMG und die Einteilung nach MDSGene klassifizieren diese Variante als *pathogenic* beziehungsweise *probably pathogenic*. In bisherigen Studien wurde diese genetische Variante weder für Erkrankungen mit Dystonie noch mit Parkinson-Syndrom beschrieben.

Diese Mutation, c.71+2T>C, wurde im Bereich der Spleißstelle des Exons 1 nachgewiesen. Bei der Trägerin dieser Variante, Patientin L-7404, erfolgte der Nachweis im Alter von 57 Jahren. Diese Patientin gab an, im Alter von 30 Jahren erste Symptome des Parkinson-Syndroms entwickelt zu haben. Weitere erkrankte Familienangehörige sind nicht bekannt. Das Chromatogramm in Abbildung 4.4 zeigt den Ausschnitt der DNA-Sequenz im Bereich der Mutation. Es handelt sich in der Darstellung um die DNA-Sequenz in der Reverse-Richtung mit Basenaustausch von Adenin zu Guanin.

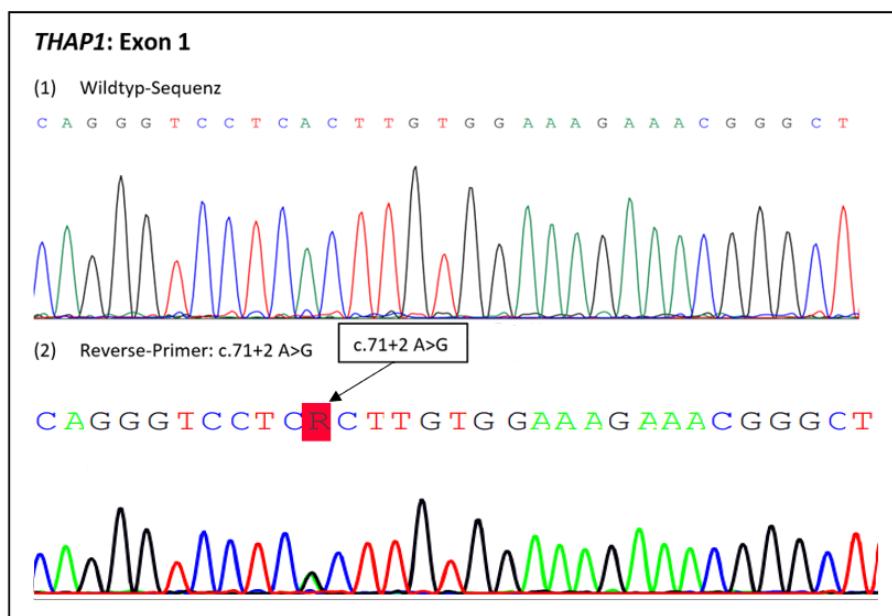


Abbildung 4.4.: Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.71+2T>C im Gen *THAP1*
Ausschnitt des Chromatogramms der *THAP1*-Wildtypsequenz (1) und mit der Mutation c.71+2T>C in der Reverse-Richtung (2) in Exon 1 des Gens *THAP1*

Die anderen im Gen *THAP1* gefundenen Varianten wurden bei Patienten mit Dystonie nachgewiesen und zum Teil bereits in vorherigen Studien beschrieben. Die Frameshift-Mutation c.474delA p.Lys158Asnfs*23 wurde bereits 2009 in einer Screening-Studie zu genetischen Varianten im Gen *THAP1* bei mehreren Patienten mit generalisierter Dystonie beschrieben (Djarmati et al., 2009). Bei einem dieser Patienten wurde die Variante c.474delA p.Lys158Asnfs*23 im Rahmen dieser Arbeit erneut nachgewiesen und somit bestätigt. Die beiden Missense-Mutationen c.70A>G p.Lys24Glu und c.68A>C p.His23Pro wurden 2012 in einer weiteren Screening-Studie zu genetischen Varianten im Gen *THAP1* identifiziert und auch hier handelt es sich um die selben Patienten wie in dieser Arbeit (Lohmann et al., 2012).

Die beiden folgenden genetischen Varianten wurden bislang noch nicht beschrieben. Die Missense-Mutation c.61T>G p.Ser21Ala in Exon 1 des Gens *THAP1* wurde bei einem Patienten mit generalisierter Dystonie nachgewiesen. Dieser Patient gab an, dass die ersten Symptome im Alter von 16 Jahren zervikal aufgetreten seien. Die Symptome breiteten sich im Verlauf weiter aus, sodass bei Studienbeginn im Alter von 26 Jahren eine generalisierte Form von Dystonie vorlag. Die Familienanamnese zeigt sich negativ; es ist kein direkter Familienangehöriger mit einer diagnostizierten Dystonie bekannt. Dieser Fall entspricht mit frühem Beginn der Dystonie und Generalisierung der Symptome im Verlauf dem bereits öfters beschriebenen klinischen Bild einer durch eine genetische Variante im Gen *THAP1* verursachten Dystonie (Charlesworth et al., 2013). Obwohl das Patho-Scoring nach MDSGene nur für eine Einschätzung als *possibly pathogenic* spricht, wurde diese Missense-Variante aufgrund der Einstufung als *likely pathogenic* nach den ACMG-Kriterien und einem CADD-Score von 30 insgesamt als pathogen eingestuft. Ein weiterer Grund für diese Einstufung ist, dass an dieser Position bereits andere pathogene Missense-Mutationen nachgewiesen wurden und dies einen Einfluss

auf die Pathogenese der Dystonie sehr wahrscheinlich macht (Bressman et al., 2009). Das folgende Chromatogramm in Abbildung 4.5 zeigt den Ausschnitt der DNA-Sequenz im Bereich der Mutation c.61T>G p.Ser21Ala. In dieser Darstellung handelt es sich um die Sequenz in der Reverse-Richtung mit Basenaustausch von Adenin zu Cytosin.

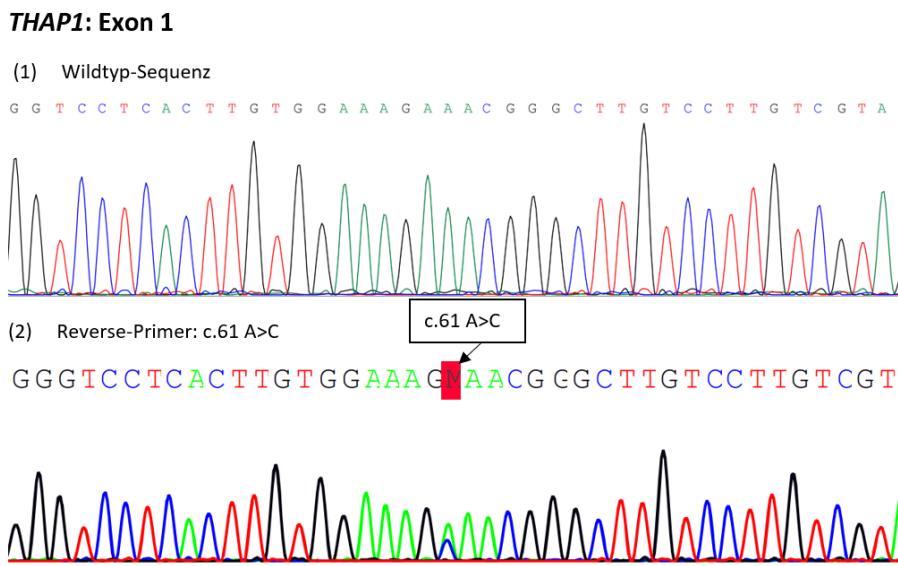


Abbildung 4.5.: Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.61T>G p.Ser21Ala im Gen THAP1
Ausschnitt des Chromatogramms der THAP1-Wildtypsequenz (1) und mit der Mutation c.61T>G p.Ser21Ala in der Reverse-Richtung (2) in Exon 1 des Gens THAP1

Die ebenfalls neu identifizierte Nonsense-Mutation c.292G>T p.Glu98* wurde bei zwei scheinbar nicht miteinander verwandten Patienten mit Dystonie nachgewiesen. Beide Patienten stammten aus Spanien und sind an einer Dystonie erkrankt. Bei Patientin L-11640 traten im Alter von 15 Jahren erste dystone Symptome oromandibulär auf. Mit Ausbreitung der Symptome in angrenzende Körperbereiche entwickelte sich im Verlauf eine segmentale Dystonie. Im Alter von 51 Jahren wurde bei dieser Patientin im Rahmen dieser Studie die oben genannte Mutation im THAP1-Gen nachgewiesen werden. Ein familiäres Auftreten von Dystonie wurde von der Patientin verneint. Bei Patient L-11557 traten die ersten Symptome im Alter von 10 Jahren in der rechten oberen Extremität auf und generalisierten im Verlauf. Das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der genetischen Analyse lag bei 77 Jahren. Bei diesem Patienten liegt eine familiäre Belastung vor. Der Bruder erkrankte ebenfalls an einer generalisierten Dystonie. Ob noch weitere Familienmitglieder an einer Dystonie erkrankten, ist nicht bekannt.

Beide Patienten weisen einen frühen Beginn der Erkrankung mit fortschreitender Ausbreitung auf weitere Körperregionen auf. Eine Ausbreitung dystoner Symptome bis hin zur Generalisierung ist typisch für den bekannten Phänotyp, der mit Mutationen im Gen THAP1 assoziiert ist. Dies stützt den bereits bekannten Einfluss genetischer Varianten im Gen THAP1 auf die Entwicklung einer Dystonie (Fuchs et al., 2009). Darüber hinaus untermauert die Auswirkung der Nonsense-Mutation c.292G>T p.Glu98* auf die Aminosäuresequenz die wahrscheinliche Pathogenität. Der Basenaustausch von G zu T an Position 292 der DNA-Sequenz führt zum Einbau eines Stop-Codons und damit zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese.

Das Chromatogramm in Abbildung 4.6 zeigt den Ausschnitt der DNA-Sequenz im Bereich der Mutation c.292G>T p.Glu98* in der Reverse-Richtung mit Basenaustausch von Cytosin zu Adenin.

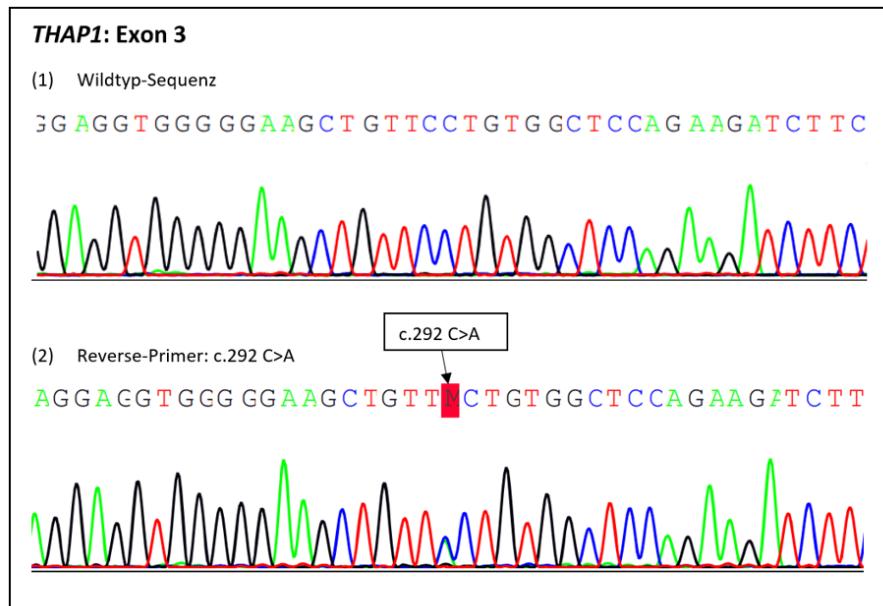


Abbildung 4.6.: Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.292G>T p.Glu98* im Gen **THAP1**. Ausschnitt des Chromatogramms der *THAP1*-Wildtypsequenz (1) und mit der Mutation c.292G>T p.Glu98* in der Reverse-Richtung (2) in Exon 3 des Gens *THAP1*.

Durch den Einbau des Stop-Codons kommt es unter anderem zum Fehlen des Kernlokalisierungssignals und dadurch zu einem sicheren Funktionsverlust des resultierenden trunkierten *THAP1*-Proteins als Transkriptionsfaktor. Der durch diese Nonsense-Mutation resultierende Funktionsverlust der synthetisierten Polypeptidkette und der hohe CADD-Score von 37 machen eine Pathogenität dieser Mutation sehr wahrscheinlich. Auch die Kategorisierung in *pathogenic* durch die Kriterien des ACMG und die Einstufung als *probably pathogenic* unterstützen diese Vermutung.

In Tabelle 4.9 ist eine Übersicht der klinischen Daten der *THAP1*-Variantenträger dargestellt.

Tabelle 4.9.: Übersicht der pathogenen *THAP1*-Varianten mit klinischen Daten

In dieser Tabelle ist eine Übersicht über die klinischen Daten der Studienteilnehmenden mit pathogenen *THAP1*-Varianten dargestellt. Die neu beschriebenen Varianten sind mit rot gekennzeichnet.

	L-11640	L-11557	L-11577	L-2257 D-HL-UK-0029
Patient	1	2	3	4
Mutation	c.292G>T p.Glu98*	c.292G>T p.Glu98*	c.61T>G p.Ser21Ala	c.474delA p.Lys158Asnfs*23
Diagnose	Dyt	Dyt	Dyt	Dyt
Alter (Studienbeginn)	51	77	26	78
Alter (Symptombeginn)	15	10	16	8
Geschlecht	f	m	m	m
Dystonieform	segmental	generalisiert	generalisiert	generalisiert
Lokalisation der Symptome	oromandibulär	n.a.	zervikal	Hand, Larynx
Familienanamnese	negativ	positiv	negativ	negativ
Herkunft	Spanien	Spanien	Spanien	Deutschland
others	Bruder: generalisierte Dystonie			
	L-3841	L-4155	L-7807	
Patient	5	6	7	
Mutation	c.70A>G p.Lys24Glu	c.68A>C p.His23Pro	c.71+2T>C	
Diagnose	Dyt	Dyt	PD	
Alter (Studienbeginn)	42	43	56	
Alter (Symptombeginn)	n.a.	9	30	
Geschlecht	f	m	f	
Dystonieform	fokal	segmental	PD	
Lokalisation der Symptome	Hand	Arm	PD	
Familienanamnese	n.a.	positiv	negativ	
Herkunft	Deutschland	Deutschland	Deutschland	
others				

Abkürzungen: Dyt = Dystonie, PD = Parkinson´s Disease, m = male, f = female, n.a. = not applicable

4.4.3. Pathogene Varianten im *GNAL*-Gen

Im kodierenden Bereich des Dystonie-Gens *GNAL* wurden drei verschiedene genetische Varianten gefunden. Es handelt sich dabei um die zwei Missense-Varianten c.1115T>G p.Ile372Ser und c.313A>C p.Ile105Leu sowie um eine Frameshift-Mutation c.1264dupT p.Tyr422fs. Der CADD-Score, die assoziierten klinischen Phänotypen und die Einschätzung der Pathogenität sind der Tabelle 4.3 zu entnehmen. Die Abbildung 4.7 zeigt die Lokalisation der einzelnen Mutationen in dem jeweiligen Exon.

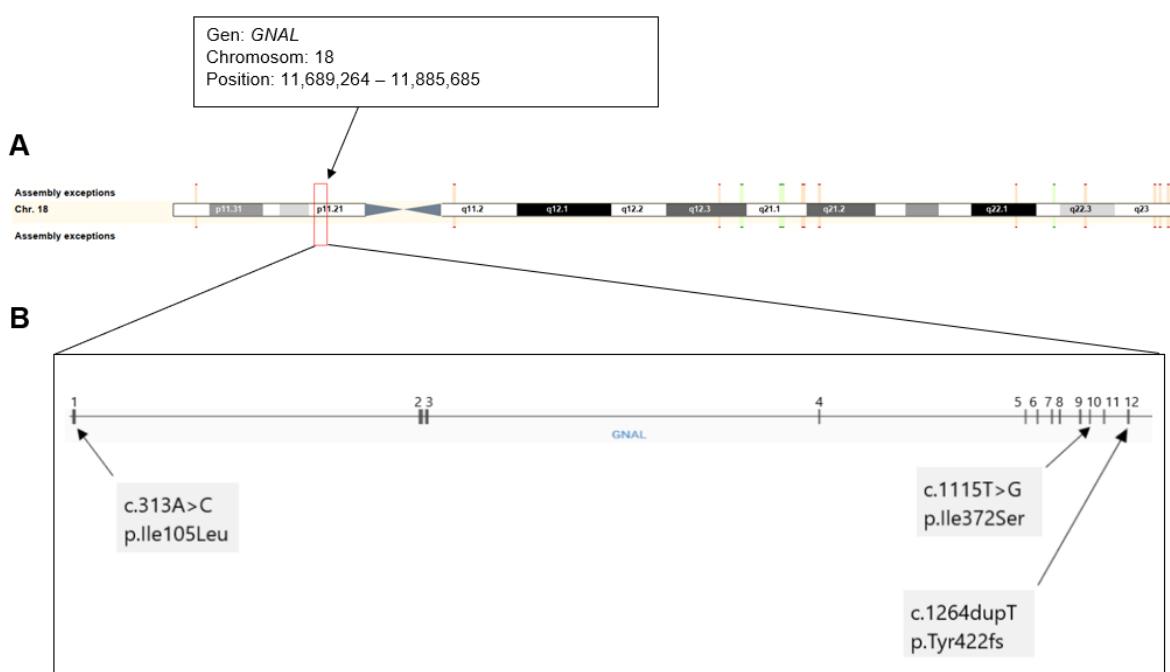


Abbildung 4.7.: Lokalisation des Gens *GNAL* mit den pathogenen Varianten

Schematische Darstellung der Lokalisation des Dystonie-Gens *GNAL* auf Chromosom 18. Die Position bezieht sich dabei auf die Referenzsequenz Human GRCh38/hg38 (Bild A). In Bild B sind die pathogenen Varianten im Gen den einzelnen Exons zugeordnet.

www.gnomad.broadinstitute.org; <https://useast.ensembl.org>

Die Missense-Mutation c.313A>C p.Ile105Leu wurde bei jeweils einem Patienten mit Dystonie und einem mit Parkinson-Syndrom nachgewiesen. Eingestuft wurde diese Mutation als *variant of uncertain significance* (ACMG) und als *probably pathogenic* (MDSGene). In der Datenbank gnomAD wurde diese genetische Variante bereits einmal, ebenfalls in heterozygoter Form in der Population *European (non-Finnish)* erfasst (gnomAD, 2020). Da diese Variante in dieser Arbeit sowohl bei einem Patienten mit Dystonie als auch in der Kontrollgruppe bei einem Patienten mit Parkinson-Syndrom gefunden wurde, ist eine genauere Einschätzung der krankheitsspezifischen Pathogenität durch weitere Studien notwendig.

Im kodierenden Bereich des Gens *GNAL* wurde in Exon 10 die Missense-Mutation c.1115T>G p.Ile372Ser gefunden, die bislang noch nicht beschrieben wurde. Die Mutation wurde bei zwei aus Deutschland stammenden Patienten mit Dystonie nachgewiesen. Patient L-7606 war zum Zeitpunkt der genetischen Analyse 50 Jahre alt und gab an, seit dem 39. Lebensjahr an Dystonie erkrankt zu sein. Bei diesem Patienten wurde anhand einer klinisch-

neurologischen Untersuchung eine segmentale Dystonie inklusive eines Tremors diagnostiziert. Die genaue Lokalisation der Symptome und die Familienanamnese sind aus den zur Verfügung stehenden Daten nicht zu ermitteln. Bei Patientin L-11929 wurde mit 63 Jahren ebenfalls die oben genannte Mutation nachgewiesen. Sie erkrankte an einem generalisierten dyston-choreatischen Syndrom. Über den Beginn der Symptome, der Lokalisation und der Familienanamnese sind keine weiteren Angaben bekannt. Häufig treten bei einer *GNAL*-Dystonie erste Symptome in der Adoleszenz oder im mittleren Lebensalter auf. Die Symptome sind zu Beginn meist craniocervical lokalisiert und breiten sich im Verlauf der Erkrankung auf weitere Körperregionen bis hin zur Generalisierung aus (Fuchs et al., 2013; Charlesworth et al., 2013). Auf einen ähnlichen Krankheitsverlauf deuten auch die uns vorliegenden klinischen Angaben der oben genannten Patienten hin. Obwohl die Pathogenität dieser Variante den Kriterien des ACMG folgend nicht genau eingeschätzt werden konnte, sondern als *variant of uncertain significance* eingestuft wurde, ist in der Zusammenschau trotzdem von einer Pathogenität auszugehen. Gründe dafür sind die Einteilung in *probably pathogenic* nach MDSGene und der CADD-Score von 31. Das folgende Chromatogramm in Abbildung 4.8 zeigt den Ausschnitt der DNA-Sequenz im Bereich der Mutation c.1115T>G p.Ile372Ser in Exon 10. Es handelt sich in der Darstellung um die Sequenz in der Forward- und Reverse-Richtung.

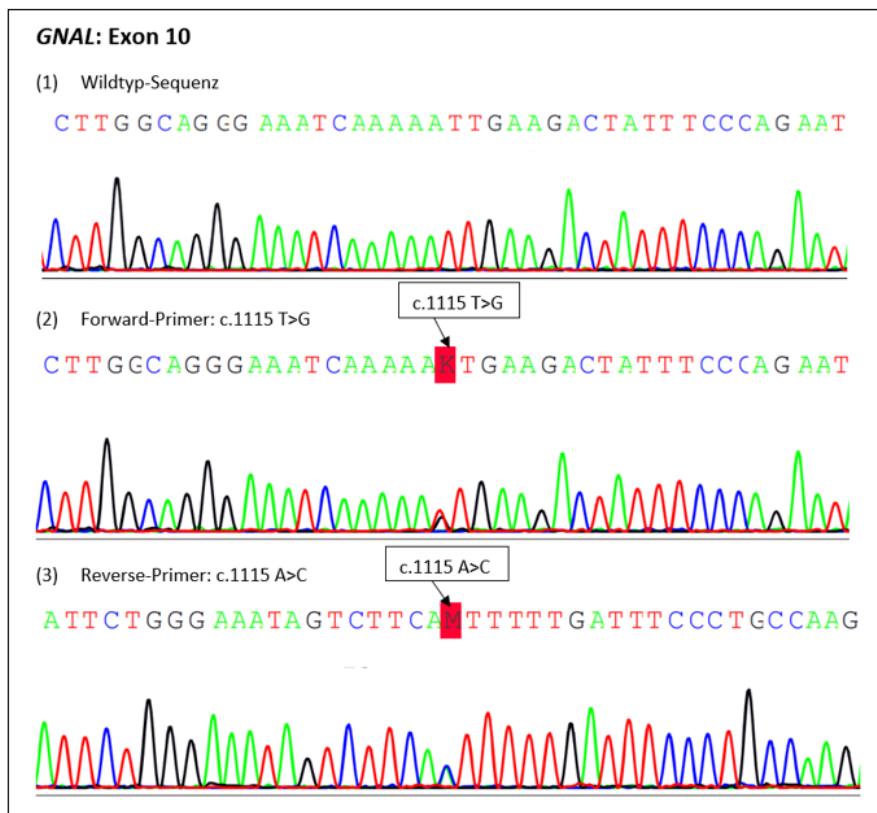


Abbildung 4.8.: Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.1115T>G p.Ile372Ser im Gen *GNAL*. Ausschnitt des Chromatogramms der *GNAL*-Wildtypsequenz (1), mit der Mutation c.1115T>G p.Ile372Ser in der Forward- (2) und Reverse-Richtung (3) in Exon 10 des Gens *GNAL*.

Die bislang noch nicht beschriebene Frameshift-Mutation c.1264dupT p.Tyr422fs in Exon 12 wurde bei einem aus Deutschland stammenden Patienten nachgewiesen werden. Dieser Patient L-12521 entwickelte mit 16 Jahren zervikal erste Symptome einer Dystonie. Diese Symptome breiteten sich bis zur genetischen Analyse im Alter von 52 Jahren nicht weiter aus, sodass es bei einer fokalen Form der Dystonie blieb. Ob weitere Familienangehörige ebenfalls an einer Dystonie erkrankt sind, ist nicht bekannt. Diese Frameshift-Mutation entstand durch eine Duplikation der Base Thymin an Stelle 1264 der kodierenden DNA-Sequenz und führt zu einem verschobenen Leseraster des genetischen Codes. Die Verschiebung des Leserasters ist in folgendem Chromatogramm in Abbildung 4.9 dargestellt. Es zeigt den Ausschnitt der DNA-Sequenz im Bereich der Mutation c.1264dupT p.Tyr422fs in Exon 12 und den dadurch folgenden Versatz der Basen. Es handelt sich in der Darstellung um die Sequenz in der Forward- und Reverse-Richtung. Der Versatz der Basen führt zu einer veränderten Abfolge der Aminosäuren in der Proteinbiosynthese und lässt vermuten, dass es so zu einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust des synthetisierten Proteins kommt. Durch diese Einschränkung in der Proteinsynthese und dem hohen CADD-Score von 35 erhielt diese Frameshift-Mutation die Einstufung *pathogenic* nach den Kriterien des ACMG und die Einstufung *probably pathogenic* nach MDSGene. Diese Einstufung und der Einfluss auf die Proteinbiosynthese machen einen Einfluss auf die Pathogenese einer Dystonie wahrscheinlich.

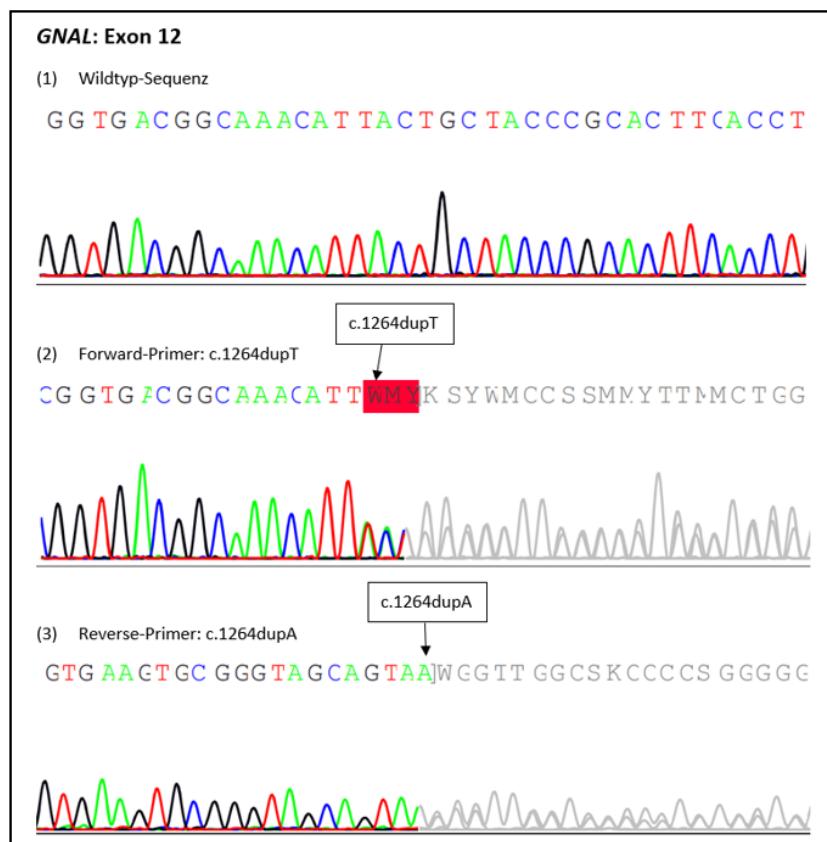


Abbildung 4.9.: Ausschnitt des Chromatogramms zur Variante c.1264dupT p.Tyr422fs im Gen *GNAL*. Ausschnitt des Chromatogramms der *GNAL*-Wildtypsequenz (1), mit der Mutation c.1264dupT p.Tyr422fs in der Forward- (2) und Reverse-Richtung (3) in Exon 12 des Gens *GNAL*.

In Tabelle 4.10 sind die klinischen Daten der *GNAL*-Variantenträger zusammengefasst und tabellarisch dargestellt.

Tabelle 4.10.: Übersicht der pathogenen *GNAL*-Varianten mit klinischen Daten

In dieser Tabelle ist eine Übersicht über die klinischen Daten der Studienteilnehmenden mit pathogenen *GNAL*-Varianten dargestellt. Die neu beschriebenen Varianten sind mit rot gekennzeichnet.

	L-7606=L-8259 Patient	1	2	3	4	5
Mutation		c.1115T>G p.Ile372Ser	c.1115T>G p.Ile372Ser	c.313A>C p.Ile105Leu	c.313A>C p.Ile105Leu	c.1264dupT p.Tyr422fs
Diagnose	Dyt	Dyt	Dyt	PD	Dyt	
Alter (Studienbeginn)	50	63	53	53	52	
Alter (Symptombeginn)	39	n.a.	23	23	16	
Geschlecht	m	f	f	f	m	
Dystonieform	segmental	generalisiert	segmental	PD	fokal	
Lokalisation der Symptome	n.a.	n.a.	Cervikal, Gesicht	PD	zervikal	
Familienanamnese	n.a.	n.a.	negativ	n.a.	n.a.	
Herkunft	Deutschland	Deutschland	Deutschland	Deutschland	Deutschland	
Others	zusätzlich Tremor	dyston- choreatisches Syndrom				

Abkürzungen: Dyt = Dystonie, PD = Parkinson´s Disease, m = male, f = female, n.a. = not available

4.4.4. Pathogene Varianten im *PRKRA*-Gen

Im kodierenden Bereich des Dystonie-Gens *PRKRA* wurde in Exon 7 die Missense-Mutation c.665C>T p.Pro222Leu gefunden. Genaue Daten zu dem Patho-Scoring und CADD-Score sind der Tabelle 4.3 zu entnehmen. Die Lokalisation und genaue Position der Mutation sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

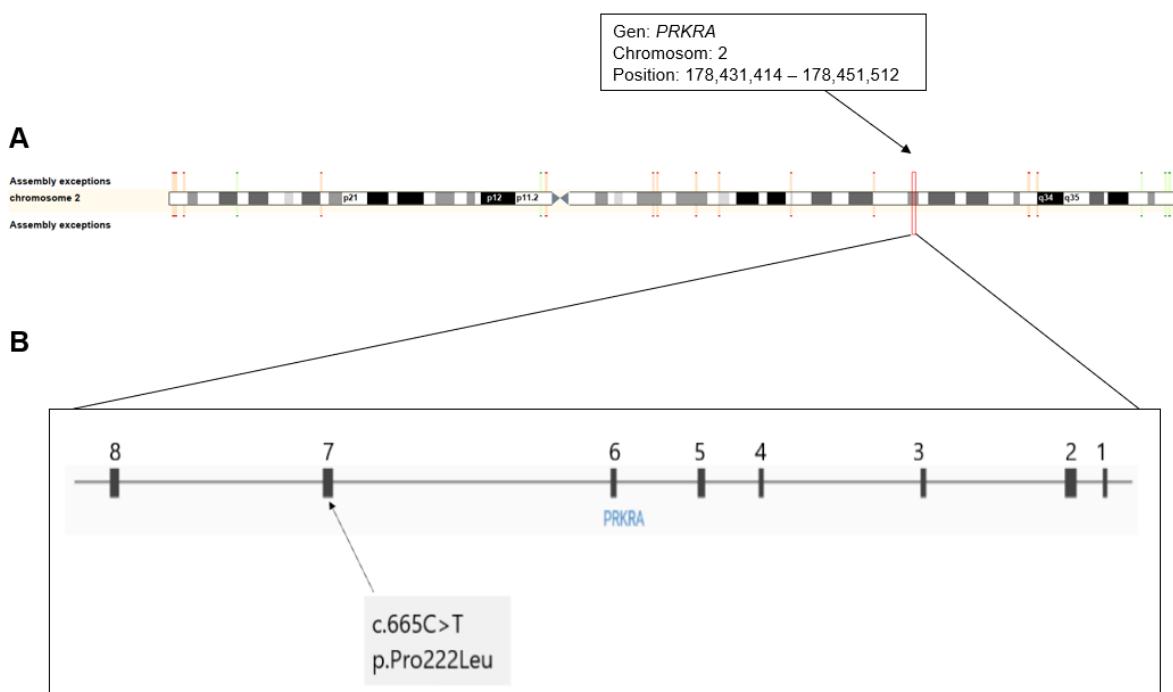


Abbildung 4.10.: Lokalisation des Gens *PRKRA* mit der pathogenen Variante

Schematische Darstellung der Lokalisation des Dystonie-Gens *TOR1A* auf Chromosom 2. Die Position bezieht sich dabei auf die Referenzsequenz *Human GRCh38/hg38* (Bild A). In Bild B sind die pathogenen Varianten im Gen den einzelnen Exons zugeordnet.
www.gnomad.broadinstitute.org; <https://useast.ensembl.org>

Durch die in dieser Arbeit angewendeten Scoring-Systeme wurde diese Variante als *likely pathogenic* (ACMG) und *definitely pathogenic* (MDSGene) eingestuft und somit insgesamt als pathogen bewertet. Die Missense-Mutation c.665C>T p.Pro222Leu wurde bei zwei Patienten mit Dystonie und bei einem Patienten mit Parkinson-Syndrom nachgewiesen und lag bei allen Patienten in heterozygoter Form vor. Die genetische Variante c.665C>T p.Pro222Leu wurde bereits mehrfach sowohl in homozygoter als auch in heterozygoter Form in früheren Studien zu genetischen Ursachen von Dystonie beschrieben. Heterozygote sind meist gesund. Wenn sie jedoch noch eine zweite pathogene Variante tragen, also compound-heterozygot sind, kann dies ursächlich für eine Dystonie sein (Quadri et al., 2016; Dos Santos et al., 2018; MDSGene, 2020). Ursprünglich wurde sie in Verbindung mit einem Dystonie-Parkinsonismus beschrieben (Camargos et al., 2008). Da in dieser Arbeit die Variante c.665C>T p.Pro222Leu sowohl bei Patienten mit Dystonie als auch in der Kontrollgruppe bei einem Patienten mit Parkinson-Syndrom nachgewiesen wurde, ist ein Einfluss dieser Mutation auf verschiedene Bewegungsstörungen anzunehmen. Weitere Studien sind für eine genauere Differenzierung notwendig, insbesonde-

re auch hinsichtlich der Auswirkung dieser Variante auf die molekulare Pathophysiologie in heterozygoter versus homozygoter Form. Eine Übersicht der klinischen Daten der Patienten ist in Tabelle 4.11 enthalten.

Tabelle 4.11.: Übersicht der pathogenen *PRKRA*-Varianten mit klinischen Daten

In dieser Tabelle ist eine Übersicht über die klinischen Daten der Studienteilnehmenden mit pathogenen *PRKRA*-Varianten dargestellt.

	L-4372	L-6265	L-6008
Patient	1	2	3
Mutation	c.665C>T p.Pro222Leu	c.665C>T p.Pro222Leu	c.665C>T p.Pro222Leu
Diagnose	Dyt	Dyt	PD
Alter (Studienbeginn)	36	37	71
Alter (Symptombeginn)	n.a.	n.a.	n.a.
Geschlecht	f	m	f
Dystonieform	fokal	generalized	PD
Lokalisation der Symptome	Musikerdystonie	n.a.	PD
Familienanamnese	n.a.	n.a.	negativ
Herkunft	Deutschland	Deutschland	Deutschland

Abkürzungen: Dyt = Dystonie, PD = Parkinson's Disease, m = male, f = female

4.4.5. Pathogene Varianten im *KMT2B*-Gen

Im kodierenden Bereich des Dystonie-Gens *KMT2B* wurde eine als pathogen eingestufte genetische Variante gefunden. Dabei handelt es sich um die Frameshift-Mutation c.3568_3577delCTGAGTGTGC p.Leu1190fs in Exon 11, die bei einem Patienten mit Dystonie nachgewiesen wurde. Die Daten des Patho-Scorings und CADD-Scores sind der Tabelle 4.3 zu entnehmen. Eine Darstellung der genauen Lokalisation befindet sich in der folgenden Abbildung 4.11.

Die Frameshift-Mutation c.3568_3577delCTGAGTGTGC p.Leu1190fs wurde 2019 erstmals als de novo- Mutation bei einer Patientin mit einer generalisierten Dystonie nachgewiesen und beschrieben (Klein et al., 2019). Es handelt sich dabei um die selbe Patientin wie in dieser Arbeit. Die Deletion der Basenabfolge CTGAGTGTGC führt zu einer Veränderung der Aminosäure-Abfolge und hat damit einen starken Einfluss auf die Proteinbiosynthese und die Funktionalität des Genproduktes. Als Frameshift-Mutation und bei einem hohen CADD-Score von 35 ist ein Einfluss auf die Pathogenese der Dystonie als wahrscheinlich anzusehen. Zusätzlich ergab sich nach den Kriterien des ACMG die Einstufung als *pathogenic* und nach den Kriterien des MDSGene als *probably pathogenic*, was diese Vermutung unterstützt.

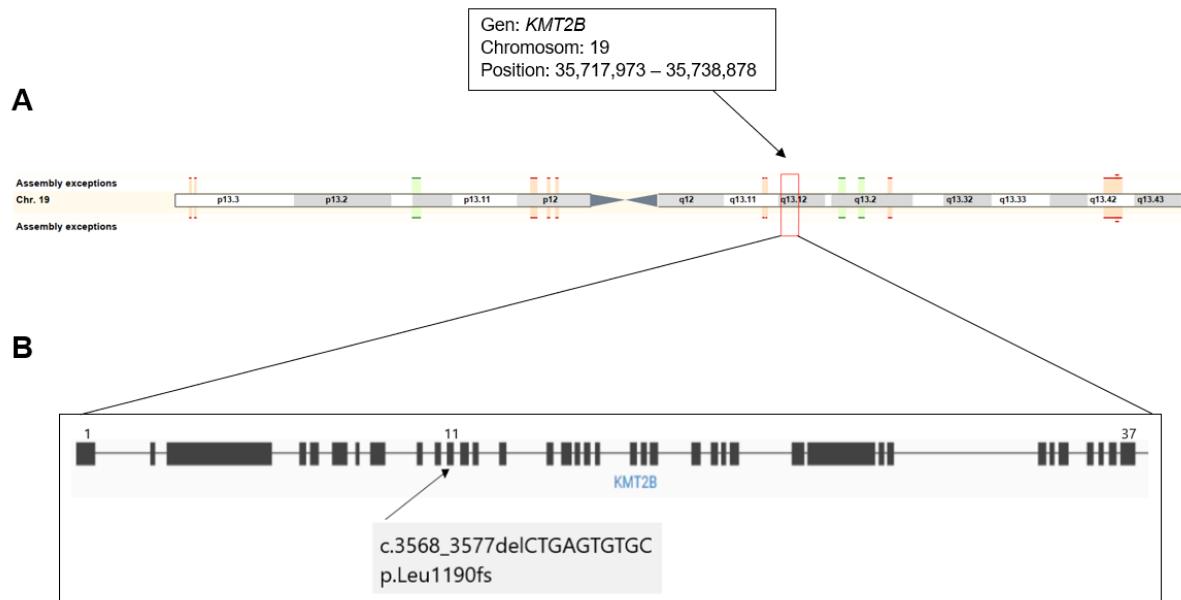


Abbildung 4.11.: Lokalisation des Gens *KMT2B* mit der pathogenen Variante

Schematische Darstellung der Lokalisation des Dystonie-Gens *KMT2B* auf Chromosom 19. Die Position bezieht sich dabei auf die Referenzsequenz Human GRCh38/hg38 (Bild A). In Bild B sind die pathogenen Varianten im Gen den einzelnen Exons zugeordnet.

www.gnomad.broadinstitute.org; <https://useast.ensembl.org>

Tabelle 4.12.: Übersicht der pathogenen *KMT2B*-Variante mit klinischen Daten

In dieser Tabelle sind die klinischen Daten des Studienteilnehmenden mit der pathogenen *KMT2B*-Variante dargestellt.

L-8941	
Patient	1
Mutation	c.3568_3577delCTGAGTGTGC p.Leu1190fs
Diagnose	Dyt
Alter (Studienbeginn)	33
Alter (Symptombeginn)	7
Geschlecht	f
Dystonieform	generalisiert
Lokalisation der Symptome	Untere Extremitäten, Rumpf, Dysarthrie
Familienanamnese	negativ
Herkunft	Deutschland

Abkürzungen: Dyt = Dystonie, f = female

Insgesamt stellt die *Next Generation Sequencing*-basierte Genpanel-Analyse mit anschließender Validierung mittels PCR und Sanger-Sequenzierung eine bewährte Methode dar, um in kurzer Zeit eine hohe Zahl an genetischen Varianten nachzuweisen. Auf diesen Weg können, wie in dieser Studie, weitere neue pathogene Varianten identifiziert, aber auch bereits bekannte Varianten bestätigt oder gegebenenfalls neu beurteilt werden.

5. Diskussion

Diese Studie befasste sich damit Phänotypen von Patienten mit Dystonie genauer zu beschreiben und mittels Sanger-Sequenzierung den dazugehörigen Genotypen zu ermitteln und beide in Verbindung zu setzen.

Zu Beginn der Diskussion werden die epidemiologischen Daten der im Rahmen der DysTract-Studie in Rostock eingeschlossenen Patienten im Kontext der Dystonie-Erkrankung erläutert. Danach liegt der Fokus auf den als pathogen eingestuften genetischen Varianten. Diskutiert werden somit die 14 verschiedenen heterozygoten Varianten, die im Rahmen dieser Arbeit in den Dystonie-Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* nachgewiesen und als pathogen eingestuft wurden. Diese setzen sich aus sieben Missense-Mutationen, drei Frameshift-Mutationen, zwei In-frame Deletionen, einer Spleißstellen-Mutation und einer Nonsense-Mutation zusammen. Sie wurden zu 72% bei Patienten mit Dystonie und zu 14% bei Patienten mit Parkinson-Syndrom nachgewiesen. Die restlichen pathogenen Varianten (14%) kamen sowohl bei Patienten mit Dystonie als auch bei Patienten mit Parkinson-Syndrom vor.

5.1. Epidemiologische Daten

Die genaue Prävalenz der Dystonien ist bisher nicht bekannt, da es große Unterschiede in den durch epidemiologische Studien ermittelten Prävalenzangaben gibt. Dies liegt zum einen an methodischen Unterschieden, wie Studiendesign, Zeit und Ort der Datenerhebung, den jeweiligen Diagnosekriterien oder auch an der variierenden Prävalenz innerhalb verschiedener Regionen und Bevölkerungsgruppen weltweit. Weitere Faktoren sind das jeweilige Gesundheitssystem und das Fachwissen in der Diagnostik einer Dystonie (Dressler et al., 2022). Geschätzt wird die weltweite Prävalenz der gesamten Subtypen einer idiopathischen oder vererbten isolierten Dystonie auf 30,85 pro 100 000 Einwohner (Medina et al., 2022). Es werden jedoch auch Punktprävalenzen von bis zu 60,11 pro 100 000 Einwohner beschrieben (Dressler et al., 2022). Gesichert ist, dass die Prävalenz mit zunehmendem Lebensalter steigt und die im Erwachsenenalter (adult-onset) beginnende fokale Dystonie sehr viel häufiger als die bereits im Kindesalter (early-onset) auftretenden Dystonie-Formen vorkommt. Auf der Basis von klinischen Studien wurde die geschätzte Prävalenz für die im Erwachsenenalter beginnende fokale Dystonie mit ungefähr 16 pro 100 000 Individuen angegeben (Balint et al., 2018), wobei die Prävalenz der früh beginnenden Dystonie bei ungefähr 7,6 pro 100 000 Individuen lag (Balint et al., 2018). In der Tabelle 4.1 in dem Abschnitt „Ergebnisse“ ist die Verteilung der Dystonieformen innerhalb der Patientenpopulation der 75 Rostocker Patienten der DysTract-Studie und das jeweilige Durchschnittsalter bei Studieneinschluss und Symptombeginn dargestellt. Alle Studienteilnehmer waren Patienten des Universitätsklinikums Rostock und dort zum Teil bereits seit

mehreren Jahren in Behandlung. In der folgenden Abbildung 5.1 ist die Verteilung der Dystonieformen innerhalb dieser Patientenpopulation graphisch dargestellt.

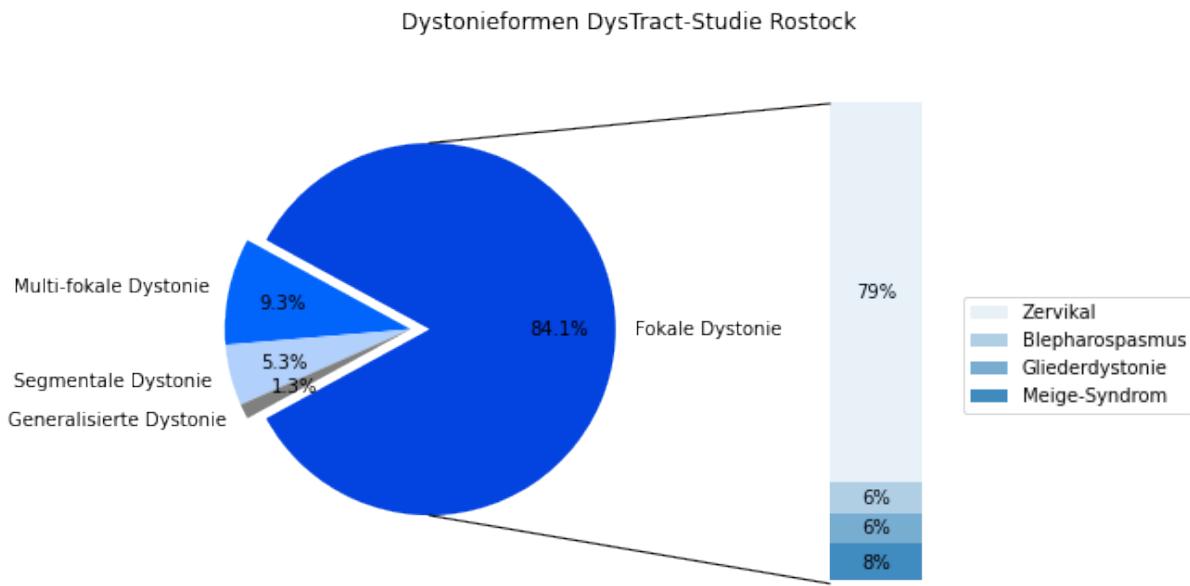


Abbildung 5.1.: Häufigkeitsverteilung der Dystonieformen in der Patientenpopulation der DysTract-Studie in Rostock

In diesem Diagramm ist die Verteilung der verschiedenen Dystonieformen dargestellt. Die linke Abbildung zeigt die Verteilung der Hauptformen der Dystonie innerhalb der Patientenpopulation der DysTract-Studie in Rostock. Auf der rechten Seite sind die fokalen Dystonie noch einmal genauer in ihre Unterformen aufgeteilt und mit dem prozentualen Anteil angegeben.

Unter den 75 Patienten waren 63 mit der Diagnose einer fokalen Dystonie, die im Erwachsenenalter (adult-onset) zum ersten Mal aufgetreten ist. Die Deutsche Dystonie Gesellschaft e.V. deklariert die im Erwachsenenalter beginnende fokale Dystonie als die mit Abstand am häufigste auftretende Form der Dystonie (Deutsche Dystonie Gesellschaft e.V., 2019). Dies konnte durch verschiedene epidemiologische Studien bestätigt werden (Lohmann and Klein, 2017; Balint et al., 2018). Mit 84% der Studienteilnehmer nimmt die im Erwachsenenalter beginnende fokale Dystonie auch in dieser Studie den größten Anteil ein und folgt damit der bisher beschriebenen Häufigkeitsverteilung einer fokalen Dystonie. Meist wird das Erkrankungsalter um das 50. Lebensjahr angegeben. In dieser Patientenpopulation liegt das Durchschnittsalter aller Patienten mit einer fokalen Dystonie zu Symptombeginn bei 47 ± 13 Jahren. Auch dies stimmt mit den bisher bekannten epidemiologischen Daten überein. Innerhalb der fokalen Dystonien ist die zervikale Dystonie die häufigste Form und beginnt meist zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2021; Lohmann and Klein, 2017). Auch innerhalb der fokalen Dystonien bei den 75 Studienteilnehmern und -teilnehmerinnen dieser Studie belegte die zervikale Manifestation mit 80% den größten Anteil und bestätigt mit einem Durchschnittsalter von 45 ± 14 bei Symptombeginn die bislang bekannten Altersangaben.

Die Ergebnisse bezüglich des Blepharospasmus und Meige-Syndroms spiegeln ebenfalls die bisherigen Erkenntnisse zu der Häufigkeit diesen Erkrankungsformen wider (Lohmann and Klein, 2017). Zusammengefasst bilden beide mit 14% den zweitgrößten Anteil fokaler Dystonien. Da sich das Meige-Syndrom meist aus einem Blepharospasmus mit später einsetzender

oromandibulärer Beteiligung entwickelt, wurden sie hier in der Häufigkeit als eine Gruppe zusammengefasst (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2021). Wie aus Tabelle 4.1 zu entnehmen ist, manifestieren sich der Blepharospasmus und die oromandibuläre Dystonie häufiger bei Frauen als bei Männern. Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei den Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern lag bei 51 (Blepharospasmus) bzw. 62 (Meige-Syndrom) Jahren. Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen früherer Studien (Balint et al., 2018). Die fokale Dystonie der Extremitäten tritt insgesamt wesentlich seltener auf und ist häufig aufgaben- oder actionsspezifisch. Da häufig ein Zusammenhang mit repetitiver Belastung der betroffenen Körperregion und dem Auftreten einer Dystonie besteht, bilden sich die Symptome meist abhängig von der Beanspruchung erst im Erwachsenenalter aus (Jinnah et al., 2013). Dies konnte auch durch die klinischen Angaben der Studienteilnehmer bestätigt werden.

Die generalisierte Dystonie ist die schwerste Form der Dystonie und betrifft den gesamten Körper. Sie tritt meist bereits im frühen Kindesalter auf und wird häufig mit genetischen Ursachen assoziiert (Jinnah and Sun, 2019). Innerhalb der 75 Studienteilnehmerinnen- und teilnehmer trat die generalisierte Dystonie sehr selten (1,3%, nur bei einer Teilnehmerin) auf. Obwohl früh beginnende, generalisierte Dystonien häufig monogenetisch bedingt sind, war bei dieser Patientin die Familienanamnese negativ, und mittels molekulargenetischer Diagnostik keine Mutation in einem bekannten Dystonie-Gen nachweisbar. Das ist allerdings nicht ungewöhnlich, da bis jetzt in vielen Fällen auch bei früh beginnender Dystonie die genaue Ursache der Dystonie nicht ermittelt werden kann. In einer anderen Studie wurde die Aufklärungsquote für die Ursache einer generalisierten Dystonie mittels molekulargenetischer Diagnostik mit 38% angegeben (Zech et al., 2019). In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass die Aufklärungsquote sehr vom klinischen Bild abhängt und z.B. bei komplexen Dystonien am höchsten ist (Zech et al., 2019). Dies zeigt, dass dem Fortschritt und der Weiterentwicklung der Exom- bzw. Genomsequenzierung weiterhin noch eine große Rolle in der Aufklärung genetischer Ursachen zukommen könnten. Innerhalb der genetischen Analyse des Probenpools mit weltweit gewonnenen DNA-Proben konnten die in Abschnitt 4 bereits beschriebenen genetischen Varianten in den Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* nachgewiesen und somit eine genetische Komponente der Dystonie analysiert werden. Die ermittelten Daten und das klinische Bild der Dystonie-Erkrankungen der Patientenpopulation der DysTract-Studie in Rostock entsprechen ungefähr den bisher bekannten Häufigkeitsverteilungen der Dystonie-Formen. In Abbildung 5.2 sind die in dieser Studie und in der Literatur (Bezerra et al., 2018) ermittelten Häufigkeiten graphisch dargestellt. In der Literatur und der Studie unterscheiden sich die Häufigkeiten der einzelnen Formen zwar zum Teil, jedoch wird deutlich, dass es sich bei der fokalen Dystonie mit Abstand um die größte Gruppe der Dystonien handelt. Ebenfalls zeigt sich, dass die generalisierte Dystonie die seltenste Form darstellt. Die Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung wie zum Beispiel bei der segmentalen Dystonie könnten an der relativ kleinen Patientenpopulation der in Rostock in die DysTract-Studie eingeschlossenen Patienten liegen. Insgesamt ist jedoch ersichtlich, dass die epidemiologischen Ergebnisse der Studie gut mit denen bereits in früheren Studien beschriebenen Ergebnissen vereinbar sind.

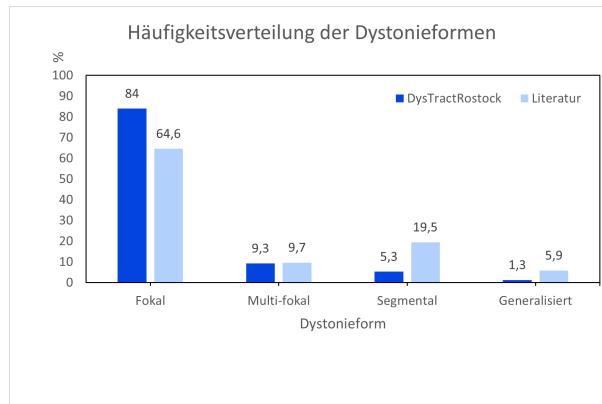


Abbildung 5.2.: Häufigkeitsverteilung der Dystonieformen im Vergleich zwischen der DysTract-Studie und Literatur

Schematische Darstellung der Häufigkeitsverteilung einzelner Dystonieformen im Vergleich zwischen den Ergebnissen der DysTract-Studie in Rostock und der Literatur (Bezerra et al., 2018).

Alle Angaben sind in Prozent angegeben.

5.2. Pathogene Varianten in Dystonie-Genen

Die Pathogenese der Bewegungsstörung Dystonie ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es sind bereits einige Gene bekannt, die als Ursache oder als genetische Prädisposition mit Dystonie in Verbindung gebracht werden. Unterschieden wird dabei zwischen den monogenetischen Formen, bei denen je nach Penetranz entweder alle oder nur ein bestimmter Prozentsatz von Trägern einer Mutation den Phänotypen ausbilden, und der häufigeren nicht-monogenetischen Formen, wobei die Penetranz oft niedrig ist und ein bestimmter Phänotyp bei den Trägern eines bestimmten Genotyps nur vereinzelt ausgebildet wird (Lohmann and Klein, 2013). Meist ist hierbei eine genaue Bestimmung der Penetranz nicht möglich, und auch genomweite Assoziationsstudien haben bislang kaum eindeutig klare Ergebnisse erbracht. Nichtsdestotrotz können einige Gene mit bestimmten Dystonie-Formen eindeutig assoziiert werden. Bei monogenetischen Dystonien wird u.a. zwischen isolierten und kombinierten Dystonien, welche Anteile weiterer Bewegungsstörungen umfassen, unterschieden. Durch die verbesserten Möglichkeiten und Weiterentwicklungen molekulargenetischer Analysen, wie dem Next-Generation Sequencing, können immer detaillierter genetische Ursachen oder Risikofaktoren von Krankheiten erforscht werden. Auf diesem Weg wurden in der gesamten DysTract-Kohorte genetischen Untersuchungen von >1000 Dystonie-Patienten durchgeführt.

Die in dieser Studie untersuchten Dystonie-Gene *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* sind als monogenetische Faktoren isolierter bzw. komplexer Formen von Dystonie bekannt (Lange et al., 2021). Bis auf *PRKRA* mit einem in den meisten Fällen autosomal-rezessiven Erbgang werden Mutationen in den übrigen oben genannten Genen autosomal-dominant vererbt oder treten als de novo-Mutationen auf (Lohmann and Klein, 2013; Lange et al., 2021).

5.2.1. Varianten im Gen *TOR1A*

Mutationen im Gen *TOR1A* (torsin family 1 member A) waren eine der ersten genetischen Veränderungen, die mit Dystonie in Verbindung gebracht wurden (Ozelius et al., 1997). *TOR1A*

kodiert die ATPase TorsinA, die an einer Vielzahl zellulärer Aktivitäten, wie der Remodellierung von Proteinen und Aminosäuren, dem Proteinabbau und weiteren Funktionen beteiligt (Demircioglu et al., 2019). Wegen dieser im Zellstoffwechsel wichtigen Funktion ist eine Veränderung oder ein Ausfall der Funktion des Proteins TorsinA als wichtiger Faktor in der Pathogenese verschiedener Krankheiten prädestiniert.

Als erste mit Dystonie-assoziierte genetische Variante wurde eine Deletion von drei Basenpaaren, c.907_909delGAG p.Glu303del, als Ursache früh beginnender (early-onset) generalisierter Dystonie identifiziert. Die Vererbung ist autosomal-dominant mit reduzierter Penetranz (Zirn et al., 2008). Die GAG-Deletion wurde bei Patienten mit früh beginnender (early-onset) Dystonie unabhängig von der ethnischen Herkunft gefunden (Ozelius et al., 1997). Diese Mutation wurde später auch bei weiteren Dystonie-Patienten mit früh beginnender und im Verlauf generalisierten Dystonie beschrieben (Klein et al., 1998; Hettich et al., 2014; Lohmann and Klein, 2017; Ma et al., 2018). Auch in der vorliegenden Studie wurde die GAG-Deletion an Position c.907_909 bei neun Patienten gefunden. Sechs der neun Patienten erkrankten ebenfalls an einer generalisierten Dystonie mit fruhem Symptombeginn, zwischen sieben und 25 Jahren. Bislang wurden insgesamt über 680 Dystonie-Patienten mit der Mutation c.907_909delGAG p.Glu303del in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben (MDSGene, 2020). Die funktionale Relevanz der GAG-Deletion wurde zusätzlich in funktionellen Studien bewiesen (Hettich et al., 2014; Torres et al., 2004; MDSGene, 2020).

Neben der GAG-Deletion wurden im weiteren Verlauf mittels molekulargenetischer Analysen neue genetische Varianten des Gens *TOR1A* im Zusammenhang mit verschiedenen Formen von Dystonie beschrieben. Die Missense-Mutation c.863G>A p.Arg288Gln wurde 2008 erstmals als neue Mutation im *TOR1A*-Gen beschrieben (Zirn et al., 2008). Durch Transition der Base G durch A resultiert ein Austausch von Arginin (Arg) zu Glutamin (Gln) an Position 288 der Aminosäuresequenz in der Subdomäne α 5 von *TOR1A*. Der Indexpatient war an einer generalisierten Dystonie erkrankt, die bereits im Kindesalter begann. Auch bei der asymptotischen Mutter dieser Patientin wurde dieselbe genetische Variante nachgewiesen, was von den Autoren damit erklärt wurde, dass diese Variante mit reduzierter Penetranz vererbt wird. Mit der Frage nach der pathogenetischen Relevanz der Variante wurden in verschiedenen Studien mögliche Auswirkungen der Mutation auf die Funktion des Proteins untersucht und die wahrscheinliche Pathogenität unterstützt (Hettich et al., 2014; Zirn et al., 2008). 2019 wurde die Missense-Variante, c.863G>A p.Arg288Gln, bei einem weiteren Patienten mit generalisierte Dystonie beschrieben. Die Symptome begannen im 16. Lebensjahr und generalisierten innerhalb von zwei Jahren. Beide Elternteile wurden negativ auf diese Variante getestet (Iqbal et al., 2019). In der Patientenpopulation dieser Studie wurde hingegen diese Missense-Variante c.863G>A p.Arg288Gln bei einem Patienten mit einem Parkinson-Syndrom nachgewiesen. Dieser entwickelte mit 63 Jahren erste Symptome eines Parkinson-Syndroms ohne Anzeichen einer Dystonie. Dies wirft die Frage auf, ob die genetische Variante c.863G>A p.Arg288Gln nur in der Pathogenese der Dystonie eine Rolle spielt oder durch mögliche Auswirkungen auf die Funktion von *TOR1A* mit verschiedenen Formen von Bewegungsstörungen assoziiert ist. Bislang wurde diese Variante weltweit bei ca. 26 Individuen nachgewiesen (gnomAD, 2020).

Des Weiteren wurde die In-frame Deletion c.40_45 delGCGCCG p.Ala14_Pro15del in Exon 1 des Gens *TOR1A* in dieser Studie bei einer 80 Jährigen Patientin mit fokaler cervikaler Dystonie nachgewiesen. Sie entwickelte mit 30 Jahren erste Symptome und gab eine positive Familienanamnese an. Diese wahrscheinlich pathogene Variante wurde bereits in früheren Studien beschrieben. 2014 wurde diese Deletion bei einer 76-Jährigen Patientin mit cervicaler Dystonie nachgewiesen. Die ersten Symptome begannen bei dieser Patientin im Alter von 31 Jahren. In der damaligen Studie konnte durch die Veränderung im Gen *TOR1A* an der Stelle c.40_45 eine erhöhte Aktivität des autophago-lysosomalen Abbaus beobachtet werden (Vulinovic et al., 2014). Dies hat Auswirkungen auf die Proteinstabilität von TorsinA und macht einen Einfluss der Variante c.40_45 delGCGCCG p.Ala14_Pro15del in der Pathogenese von Dystonien wahrscheinlich.

5.2.2. Varianten im Gen *THAP1*

Das Gen *THAP1* liegt auf Chromosom 8p11.21 und kodiert den Transkriptionsfaktor THAP1 (Siokas et al., 2019). Das Protein THAP1 ist ein atypisches Zink-Finger-Protein mit einer DNA-bindende Domäne und einer Kernlokalisierungssequenz (Lohmann and Klein, 2017). Eine Veränderung und ein damit einhergehender Funktionsverlust in DNA-bindenden Domäne könnte die Regulation der Transkription verschiedener Gene stören. Zu den regulierten Genen gehören Schlüsselgene des Zellzyklus sowie die Hemmung der Expression von *TOR1A*. Eine Mutation im Gen *THAP1* könnte somit zu einer Überexpression und damit zu neurohistologischen und neurochemischen Veränderungen führen (Siokas et al., 2019). Diese Dysregulation könnte eine Erklärung für das erhöhte Risiko sein, an einer generalisierten Dystonie zu erkranken.

In dieser Studie wurden sechs genetische Varianten im Gen *THAP1* gefunden werden, drei bereits identifizierte (c.474delA p.Lys158Asnfs*23, c.70A>G p.Lys24Glu, c.68A>C p.His23Pro) und drei neue genetische Varianten (c.292G>T p.Glu98*, c.61T>G p.Ser21Ala, c.71+2T>C). Bei den Patienten mit bereits beschriebenen Varianten handelt es sich um die selben Patienten, die in dieser Arbeit erneut analysiert wurden. Der erneute Nachweis und die Bestätigung dieser genetischen Varianten bei Patienten aus früheren Studien unterstreicht die Sensitivität und Qualität der Panel-Untersuchungen.

Die Frameshift-Mutation c.474delA p.Lys158Asnfs*23 in Exon 3 wurde 2009 bei einem 68-jährigen Patienten identifiziert und in dieser Arbeit beim selben Patienten erneut nachgewiesen. Der Index-Patient entwickelte mit 10 Jahren einen Schreibkrampf und eine laryngeale Dystonie. Im Verlauf der Erkrankung bildeten sich zusätzlich dystone Symptome in der Nacken-, Arm- und Beinmuskulatur aus (Djarmati et al., 2009). Eine Deletion der Base A tritt in einer Sequenz mit fünf aufeinander folgenden Adenosin-Nukleotiden auf und befindet sich in einer Region, die für die Kernlokalisationsdomäne kodiert. Die Verschiebung des Leserasters der DNA als Folge der Deletion führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz und einem vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese, wodurch der Transport des THAP1-Proteins in den Nukleus der Zelle wahrscheinlich erschwert wird. Hierdurch könnte die DNA-Bindung von THAP1 eingeschränkt und damit auch die Transkription anderer Gene beeinträchtigt sein. Dies macht eine Pathogenität dieser Mutation sehr wahrscheinlich (Fuchs et al., 2009; Loh-

mann et al., 2012) und stützt die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen Mutationen im Gen *THAP1* und der Entwicklung einer generalisierten Dystonie mit Symptomen einer spasmodischen Dysphonie (Djarmati et al., 2009).

Die beiden Missense-Mutationen c.68A>C p.His23Pro und c.70A>G p.Lys24Glu im Gen *THAP1* wurden bereits 2012 beschrieben (Lohmann et al., 2012). Es handelt sich bei den Patienten ebenfalls um dieselben wie in dieser Studie. Die Auswirkungen dieser Mutationen wurde damals mit Hilfe verschiedener Scores, welche die Pathogenität einer genetischen Variante einschätzen und vorhersagen, und einem *luciferase reporter gene-Assay* beurteilt. Bei den Patienten lagen früh beginnende, überwiegend cervikale und laryngeale Symptome vor, mit einer Generalisierung im Verlauf. Der Patient mit der genetischen Variante c.68A>C p.His23Pro erkrankte im Alter von 9 Jahren und gab eine positive Familienanamnese an. Die Symptome begannen im Arm und breiteten sich zu einer segmentalen Dystonie aus. Die Trägerin der dritten erneut nachgewiesenen Variante c.70A>G p.Lys24Glu bildete ebenfalls in der Kindheit, im Alter von 8 Jahren, erste Symptome einer Dystonie aus. Die Symptome begannen im Nacken und generalisierten im Verlauf. Die Familienanamnese dieser Patientin war negativ. Dieser Phänotyp bestätigt die bisherigen klinischen Beobachtungen für eine DYT-*THAP1*. Beide genetische Varianten liegen in einem Bereich, der für die THAP-Domäne (Zink Finger) kodiert und könnten somit durch die veränderte Aminosäuresequenz die Funktion des Proteins *THAP1* beeinträchtigen. Die Lokalisation der Varianten, die hohen CADD-Scores und die Befunde der Reporter-Gen-Assays stützen die Hypothese einer pathogenetischen Relevanz der beiden genetischen Varianten c.68A>C p.His23Pro und c.70A>G p.Lys24Glu im Gen *THAP1*.

Neben den oben beschriebenen genetischen Varianten wurden drei weitere Varianten im Gen *THAP1* erstmals nachgewiesen: die Missense-Variante c.61T>G p.Ser21Ala und die Spleißstellen-Variante c.71+2T>C in Exon 1 sowie die Nonsense-Variante c.292G>T p.Glu98* in Exon 3.

Die Variante c.61T>G p.Ser21Ala wurde bei einem 26 Jährigen, aus Spanien stammenden Patienten mit einer generalisierten Dystonie nachgewiesen. Die Symptome manifestierten sich im Alter von 16 Jahren im zervikalen Bereich und breiteten sich im Verlauf auf weitere Körperregionen aus. Diese Variante wurde bislang noch nicht beschrieben. Es wurde jedoch eine wahrscheinlich pathogene Missense-Variante c.61T>A p.Ser21Thr bereits 2009 an derselben Position der DNA-Sequenz beschrieben (Bressman et al., 2009). Bei der neu identifizierten genetischen Variante führte ein Basenaustausch von T zu G zu der Synthese der Aminosäure Alanin anstelle von Serin. Dieser Aminosäureaustausch liegt in einem Bereich, der für die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors *THAP1* kodiert, und kann somit zu einer Funktionseinschränkung dieses Bereiches des Proteins führen. Wegen dieser Position der Variante und der bereits als pathogen identifizierten genetischen Variante an gleicher Stelle ist eine pathogenetische Relevanz der neuen Variante c.61T>G p.Ser21Ala für die Entwicklung einer Dystonie sehr wahrscheinlich. Für eine genaueres Verständnis des pathogenetischen Mechanismus sind weitere funktionelle Studien notwendig.

Die ebenfalls neu identifizierte Nonsense-Variante c.292G>T p.Glu98* wurde bei zwei nicht miteinander verwandten Patienten mit Dystonie nachgewiesen. Beide aus Spanien stammen-

den Patienten erkrankten in ihrer Jugend und entwickelten im Verlauf eine segmentale (Patientin L-11640) und generalisierte Dystonie (Patient L-11557). In früheren Studien wurde in unmittelbarer Nähe der DNA-Sequenz ebenfalls eine Nonsense-Mutation ($c.289C>T$ p.Gln97*) im Gen *THAP1* bei sieben brasilianischen Patienten mit Dystonie identifiziert werden (da Silva-Junior et al., 2014; Camargo et al., 2014). Bei beiden Varianten resultiert der Basenaustausch in einem Stop-Codon und vorzeitigem Abbruch der Translation. Ein vorzeitiges Beenden der Translation an Position 98 der Aminosäuresequenz führt zu einem truncierten Protein mit Verlust der Prolin-reichen Region, der Coiled-Coil-Domäne und der Kernlokalisationssequenz. Das resultierende Protein kann somit nicht mehr als Transkriptionsfaktor in den Kern transportiert werden und nur eingeschränkt mit anderen Proteinen interagieren (Osmanovic et al., 2011). Die Störung der physiologischen Lokalisation und ein Verlust oder Einschränkung der Funktion des Transkriptionsfaktor *THAP1*, lassen Störungen im Zellstoffwechsel vermuten, wodurch die Entwicklung einer Dystonie begünstigt oder verursacht sein könnte. Aus diesen Gründen wurde diese genetische Variante nach den Kriterien des ACMGs als *pathogen* und nach MDSGene als *wahrscheinlich pathogen* eingestuft. Einen weiteren Hinweis auf die Pathogenität bietet die weiter oben in Abschnitt 5.2.2 beschriebene genetische Variante $c.474\text{delA}$ p.Lys158Asnfs*23. Dass diese bereits bekannte Frameshift-Mutation in der DNA-Sequenz hinter der Nonsense-Mutation $c.292G>T$ p.Glu98* positioniert ist und bereits als pathogen beschrieben wurde (Djarmati et al., 2009), unterstützt somit zusätzlich die pathogenetische Relevanz der neu beschriebenen Nonsense-Variante $c.292G>T$ p.Glu98*.

Bei der dritten, neu identifizierten genetischen Variante, $c.71+2T>C$, handelt es sich um eine Spleißstellen-Variante. Diese wurde in der Kontrollgruppe mit Patienten mit Parkinson-Syndrom gefunden. Die zum Zeitpunkt der Analyse 56-jährige Index-Patientin erkrankte mit 30 Jahren an einem Parkinson-Syndrom. Eine positive Familienanamnese wurde verneint. Die Pathogenität der Variante $c.71+2T>C$ wurde als *pathogen* (ACMG-Kriterien) und als *wahrscheinlich pathogen* (MDSGene-Patho-Scoring) eingestuft. Ob das Auftreten dieser Variante in der Kontrollgruppe dafür spricht, dass Varianten im Gen *THAP1* einen Einfluss auf die Pathogenese auch anderer neurologischer Erkrankungen, wie z.B. eines Parkinson-Syndroms haben können, ist anhand der vorliegenden Daten nicht ausreichend zu beurteilen. Hierfür sind weitere Studien erforderlich.

5.2.3. Varianten im Gen *GNAL*

Das Gen *GNAL* (guanine nucleotide-binding protein subunit alpha L) kodiert für die stimulierende α -Untereinheit des G-Proteins $\text{G}\alpha\text{olf}$. Dieses vermittelt u.a. Signale des Geruchssinns in olfaktorischen Epithelzellen und ist im Striatum und Nucleus accumbens angereichert, wo es Effektmoleküle striataler Neurone verbindet (Lohmann and Klein, 2017; Fuchs et al., 2013). Zusätzlich wurde in immunhistochemischen Studien eine hohe Expression des G-Proteins $\text{G}\alpha\text{olf}$ in zerebellären Purkinje-Zellen nachgewiesen (Vemula et al., 2013).

Im Jahre 2013 wurden erstmals Mutationen im Gen *GNAL* als eine Ursache isolierter primärer Dystonie mit kraniozervikalem Symptombeginn identifiziert (Fuchs et al., 2013). Die Symptome breiten sich bei einer DYT-*GNAL* größtenteils im Verlauf auf andere Körperteile weiter aus.

Auch die Sprache ist bei einigen Patienten betroffen (Morgante and Klein, 2013). Seit 2013 wurden mehr als 30 verschiedene pathogene genetische Varianten des Gens *GNAL* bei Dystonie-Patienten gefunden (Lohmann and Klein, 2017). Varianten im Gen *GNAL* scheinen die bisher am häufigsten und besten beschriebene Ursache einer im Erwachsenenalter beginnenden (adult-onset) segmentalen Dystonie zu sein (Lohmann and Klein, 2013). *GNAL* steht mit dem Dopamin-Signalweg in Verbindung, da es die stimulierende α -Untereinheit $\text{G}\alpha\text{o}\text{l}\text{f}$ des an den Dopamin Typ1-Rezeptor koppelnden G-Proteins bildet (Lohmann and Klein, 2013). Funktionelle Studien zu Mutationen im Gen *GNAL* zeigten nach einer D1R-Stimulation Defizite in der Aktivierung des veränderten G-Proteins $\text{G}\alpha\text{o}\text{l}\text{f}$ (Masuho et al., 2016). Somit ist es dafür prädestiniert, durch Funktionseinschränkungen die Entwicklung neurologischer Bewegungsstörungen zu beeinflussen (Lohmann and Klein, 2013). Anhand von funktionellen Untersuchungen wie zum Beispiel in Form eines Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer-Assays (engl. Bioluminescence resonance energy transfer assay, kurz BRET) kann die Pathogenität einer genetischen Variante genauer gemessen werden. Dabei wird während der Interaktion verschiedener Effektormoleküle die Energieübertragung dieser zwischen einander gemessen. Durch diese Technik können die Wechselwirkungen oder auch gestörte Interaktionen auf molekularer Ebene in lebenden Zellen festgestellt werden (Harikumar et al., 2017). BRET-Assays wurden bereits in Bezug auf die Auswirkungen einer Funktionseinschränkung des G-Proteins $\text{G}\alpha\text{o}\text{l}\text{f}$ angewendet, wobei sich bei genetischen Varianten, die in Bezug auf eine Dystonie analysiert wurden, eine abgeschwächte Interaktion des durch die Mutation veränderten Proteins ergab. Dies bestätigt die Vermutung, dass genetische Varianten im *GNAL*-Gen das Auftreten einer Dystonie hervorrufen oder fördern können (Fuchs et al., 2013).

In dieser Arbeit wurden die drei genetischen Varianten c.313A>C p.Ile105Leu, c.1115T>G p.Ile372Ser und c.1264dupT p.Tyr422fs im Gen *GNAL* nachgewiesen. Diese lagen alle im heterozygoten Zustand vor. Die Missense-Mutation c.313A>C p.Ile105Leu in Exon 1 liegt im Bereich der α -Helix Domäne und wurde bereits in der Datenbank gnomAD beschrieben (Masuho et al., 2018). In der europäischen Population *European (non-Finnish)* wurde diese Variante in heterozygoter Form bei einem Individuum im Alter zwischen 50 und 55 Jahren nachgewiesen. Die Allelfrequenz in dieser Population wird mit 0.0065% angegeben (gnomAD, 2020). In dieser Arbeit wurde die Variante c.313A>C p.Ile105Leu bei zwei Studienteilnehmerinnen nachgewiesen, sowohl bei einer Patientin mit Dystonie als auch bei einer Patientin mit Parkinson-Syndrom. Die PD-Patientin war bei Studienbeginn 53 alt und seit dem Alter von 23 Jahren an einem Parkinson-Syndrom erkrankt. Die Index-Patientin mit Dystonie war zum Zeitpunkt der Genanalyse 54 Jahre alt. Über das Erkrankungsalter und die Dystonieform sind keine genaueren Angaben bekannt. Ein Auftreten von genetischen Varianten im Gen *GNAL* sowohl bei Patienten mit Dystonie als auch mit Parkinson-Syndrom ist aus pathophysiologischer Sicht denkbar, da das G-Protein $\text{G}\alpha\text{o}\text{l}\text{f}$ auch in den cholinergen Interneuronen des Striatums zu finden ist. Die cholinergen Neurone des Striatums spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Parkinson-Syndroms und eine Dysregulation striataler Neurone beeinträchtigt somit einen gemeinsamen Teil der Pathogenese verschiedener Formen von Bewegungsstörungen wie Parkinson-Syndrom und Dystonie (Jinnah and Sun, 2019).

Dies könnte das Vorkommen der Variante c.313A>C p.Ile105Leu sowohl bei Patienten mit Dystonie als auch mit Parkinson-Syndrom erklären.

Neben der oben beschriebenen Mutation wurden zwei weitere bisher noch nicht beschriebene genetische Varianten im Gen *GNAL* identifiziert. Nachgewiesen wurden die Missense-Mutation c.1115T>G p.Ile372Ser in Exon 10 und die Frameshift-Mutation c.1264dupT p.Tyr422fs in Exon 12.

Die Variante c.1115T>G p.Ile372Ser wurde bei zwei nicht miteinander verwandten Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern mit Dystonie nachgewiesen. Beide stammten aus Deutschland. Ein Patient (L-7606) war zu Beginn der Studie 50 Jahre alt und gab den Beginn der Symptome mit 39 Jahren an. Er erkrankte an einer segmentalen Dystonie mit Tremor. Bei der anderen Patientin (L-11929) wurde die Genanalyse mit 63 Jahren durchgeführt. Sie erkrankte an einem generalisierten dyston-choreatischen Syndrom. Über das Erkrankungsalter lagen keine Daten vor. Bei der Missense- Mutation c.1115T>G p.Ile372Ser liegt ein Basenaustausch von T zu G an Position 1115 der Basensequenz vor. Dieser Austausch führt zu dem Einbau der Aminosäure Serin anstelle der Aminosäure Isoleucin in der Aminosäuresequenz der G-Proteins $\text{G}\alpha\text{olf}$. Nach der Klassifikation von MDSGene wurde diese genetische Variante als *probably pathogenic* eingestuft. Sie besitzt einen CADD-Score von 31 und liegt im Bereich der funktionell wichtigen GTPase (Ras-like) Domäne, was eine Pathogenität wahrscheinlich macht (Masuho et al., 2018). Da diese Variante ausschließlich bei Patienten mit Dystonie und nicht in der Kontrollgruppe identifiziert wurde, ist zu vermuten, dass diese neu entdeckte Variante in Bezug auf Bewegungsstörungen hauptsächlich einen Einfluss auf die Pathogenese einer Dystonie hat.

Die zweite neu entdeckte Variante c.1264dupT p.Tyr422fs ist eine Frameshift-Mutation und wurde bei einem Patienten (L-12521) mit einer fokalen Dystonie nachgewiesen. Im Alter von 16 Jahren manifestierten sich die Symptome im zervikalen Bereich. Eingestuft wurde diese genetische Variante nach den Kriterien des ACMG als *pathogenic* und nach der Kategorisierung von MDSGene als *probably pathogenic*. Zusätzlich hat diese Frameshift-Mutation einen hohen CADD-Score von 35, was eine pathogene Wirkung dieser Mutation wahrscheinlich macht. Durch die Duplikation der Base T an Position 1264 der Basensequenz verschiebt sich das Leseraster der Basentriplets der DNA. Als Folge werden ab dem Punkt der Mutation bei der Translation zu Protein andere Aminosäuren verwendet und es entsteht eine veränderte Aminosäuresequenz bis hin zu einem Abbruch der Translation durch ein frühzeitig auftretendes Stoppcodon. Frameshift-Mutationen haben generell einen großen Einfluss auf die Proteinbiosynthese und die Funktionalität des synthetisierten Proteins. In früheren Studien wurde ein vorzeitiger Abbruch der Translation oder eine starke Veränderung der Aminosäuresequenz im Gen *GNAL* bereits als Pathogenitätsfaktor beschrieben. Entfernte oder veränderte essentielle funktionelle Regionen des G-Proteins $\text{G}\alpha\text{olf}$ resultieren folglich in einem Loss-of-Function-Phänotyp (Fuchs et al., 2013). Die genetische Variante c.1264dupT p.Tyr422fs liegt in der GTPase (Ras-like)-Domäne und hat dadurch Auswirkungen auf eine für die Funktion des Proteins bedeutsame Genregion (Masuho et al., 2018). Des Weiteren wurde diese Variante nur bei Patienten mit Dystonie und nicht in der Kontrollgruppe der Patienten mit Parkinson-Syndrom gefunden. Aus den oben genannten Gründen ist es äußerst wahrscheinlich, dass die

Frameshift-Mutation c.1264dupT p.Tyr422fs im Gen *GNAL* mit der Pathogenese der Dystonie in Verbindung steht.

Um diese Hypothese und den Einfluss der neu identifizierten genetischen Varianten c.1115T>G p.Ile372Ser und c.1264dupT p.Tyr422fs auf die Pathogenese einer Dystonie zu untermauern, sind weitere funktionelle Studien mit diesen Varianten erforderlich. Insbesondere bei der Missense-Variante c.1115T>G p.Ile372Ser, die lediglich zum Austausch einer einzelnen Aminosäure führt, sind die dadurch bedingten funktionellen Einschränkungen des G-Proteins Gaolf schwerer zu beurteilen. Hier würde sich eine genauere Untersuchung mittels eines BRET-Assays anbieten, welcher durch die Analyse der molekularen Interaktionen die Funktion beziehungsweise den Funktionsverlust durch die Missense-Variante c.1115T>G p.Ile372Ser genauer darstellen und verifizieren könnte.

5.2.4. Varianten im Gen *PRKRA*

Biallelische pathogene Varianten im Gen *PRKRA* sind als Ursache einer monogenetisch bedingten kombinierten Dystonie bereits bekannt. DYT-*PRKRA* wird als früh beginnende (early-onset) generalisierte Dystonie mit Parkinsonismus beschrieben und autosomal-rezessiv vererbt (Morgante and Klein, 2013).

In dieser Arbeit wurde die bereits bekannte genetische Variante c.665C>T p.Pro222Leu in Exon 7 in heterozygoter Form bei drei Patienten gefunden. Zwei erkrankten an einer Dystonie und eine Patientin an einem Parkinson-Syndrom. Eine Dystonie-Patientin (L-4372) war zum Zeitpunkt der Untersuchung 36 Jahre alt und erkrankte an einer fokalen Dystonie (Musikerdystonie). Der andere Patient (L-6265) wurde mit 37 Jahren in diese Studie aufgenommen. Er erkrankte an einer generalisierten Dystonie. Bei beiden Patienten ist der genaue Symptombeginn nicht eruierbar. Bei der an einem Parkinson-Syndrom erkrankten Patientin (L-6008) wurde die genetische Analyse mit 71 Jahren durchgeführt. Eine positive Familienanamnese lag bei dieser Patientin nicht vor. Bei allen drei Patienten konnte keine weitere *PRKRA*-Variante mittels Panel-Sequenzierung nachgewiesen werden. Sie waren somit in Bezug auf das Gen *PRKRA* nicht compound-heterozygot. Ob die Patienten in einem nicht in dieser Studie analysierten Gen eine weitere genetische Variante aufweisen die krankheitsrelevant sein könnte, wurde im Rahmen dieser Studie nicht mit abgebildet.

Im Jahre 2008 wurde die Mutation c.665C>T p.Pro222Leu in homozygoter Form zum ersten Mal in zwei brasilianischen Familien nachgewiesen. Die Patienten erkrankten an einer im Kindesalter beginnenden und sich bis zur Generalisierung progradient ausbreitenden Dystonie mit zusätzlichem Parkinsonismus. Es traten auch eine oromandibuläre und laryngeale Dystonie auf (Camargos et al., 2008). Die Relevanz der homozygot auftretende Mutation c.665C>T p.Pro222Leu im Gen *PRKRA* wurde durch funktionelle Studien bestätigt (Vaughn et al., 2015; Dos Santos et al., 2018; Balint et al., 2018). Die Studie von Vaughn et al.(2015) beschreibt, dass mindestens ein von der PACT-PKR-Interaktion regulierter Mechanismus durch die Variante c.665C>T p.Pro222Leu signifikant verändert wird und in einer deutlichen Veränderung des Überlebens von Zellen als Reaktion auf extrazellulären Stress resultiert. Eine durch die homozygote Mutation c.665C>T p.Pro222Leu zwar verzögerte, aber länger anhal-

tende PACT-PKR-Interaktion führt zu einer gesteigerten Aktivität der Kinase und dem nachgeschalteten Translation-Inhibitionsfaktor eIF2 α . Als Resultat ist die Inhibition der Proteinsynthese und eine Steigerung der Apoptose-Rate in neuronalen Zellen zu beobachten (Vaughn et al., 2015). Dieser Effekt wurde für die homozygote Mutation beschrieben. Die pathogenen Auswirkungen der heterozygoten Varianten, wie sie in dieser Studie gefunden wurden, sind aufgrund der vermutlich geringeren Auswirkung auf die PACT-PKR-Interaktion und dadurch wahrscheinlich nur zum Teil veränderten Funktion dieses Komplexes fraglich. Wie unter „Ergebnissen“ beschrieben, trat die heterozygote Form der Variante c.665C>T p.Pro222Leu sowohl bei Patienten mit Dystonie als auch bei Parkinson-Patienten auf. Da bei Patienten mit der homozygoten Variante gehäuft auch ein Parkinsonismus auftritt, scheint ein Einfluss des Gens PRKRA auf die Pathogenese beider neurologischen Bewegungsstörungen möglich.

5.2.5. Varianten im Gen *KMT2B*

Im Jahr 2016 wurden erstmals Mutationen im Gen *KMT2B* identifiziert und mit der Pathogenese der Dystonie in Verbindung gebracht (Zech et al., 2016; Meyer et al., 2017). Seitdem wurden weitere genetische Varianten in *KMT2B* beschrieben, die in Zusammenhang mit einer früh-beginnenden und im Verlauf häufig generalisierten Dystonie stehen. In den meisten Fällen lagen zusätzlich zu den motorischen Symptomen weitere Symptome vor, wie Entwicklungsverzögerung, Intelligenzminderung, Mikrozephalie und weitere neurologische Symptome (Gorman et al., 2018; Zech et al., 2017b; Kawarai et al., 2018). Insgesamt wurden bis heute bei Dystonie-Patienten mehr als 50 pathogene genetische Varianten im Gen *KMT2B* identifiziert (MDSGene, 2020; Lange et al., 2021). Auch in dem DysTract-Patientenpool dieser Arbeit wurde eine pathogene Variante im Gen *KMT2B* identifiziert. Es handelt sich dabei um die Frameshift-Mutation c.3568_3577delCTGAGTGTGC p.Leu1190fs. Eine Deletion der 10 Basen CTGAGTGTGC in Exon 11 führt zu einer Verschiebung des Leserasters und dadurch bei der Translation zu einer abgeänderten Aminosäuresequenz. Da diese mehr als die Hälfte des Proteins betrifft, kann von einer Einschränkung oder einem Verlust der Proteinfunktion ausgegangen werden. Diese Frameshift-Mutation c.3568_3577delCTGAGTGTGC p.Leu1190fs wurde durch Mitarbeiter des Instituts für Neurogenetik in Lübeck 2019 erstmals bei einer 31-Jährigen Patientin mit einer generalisierten Dystonie nachgewiesen. Diese Patientin entwickelte im Alter von sieben Jahren eine zunehmende Gangstörung, die durch Ausbreitung auf den Rumpf und weitere Körperregionen bis zum fünfzehnten Lebensjahr zu einer generalisierten Dystonie führten (Klein et al., 2019). Bei der Index-Patientin in dieser Arbeit handelt es sich um dieselbe Person wie in der oben genannten Veröffentlichung. Die Patientin ist Teil der DysTract-Kohorte und wurde daher der Vollständigkeit halber auch in diese Arbeit mit aufgenommen. Unterstützt wird der vermutete pathogene Einfluss von dem Gen *KMT2B* durch das Auftreten von dystonen Bewegungsstörungen bei Patienten mit *KMT2B*-involvierenden Mikrodeletions-Syndromen (Zech et al., 2016; Lohmann and Klein, 2017; Meyer et al., 2017; Abela and Kurian, 2018). Die Identifizierung von *loss-of-function*-Mutationen im Gen *KMT2B* mittels genetischer Analysen und die Beschreibung der Phänotypen führte zu einer genaueren Erforschung der *KMT2B*-Dystonie. Durch funktionelle Analysen wurde in der Studie von Zech et al. (2016) zu-

sätzlich eine Haploinsuffizienz von *KMT2B* mit dem Resultat einer früh beginnenden und generalisierenden Dystonie bestätigt.

Ein weiterer Hinweis auf den Einfluss des Gens *KMT2B* auf die Pathogenese der Dystonie zeichnete sich durch vorausgegangene Studien zur Funktionalität und eine ermittelte Interaktion zwischen den Genen *KMT2B*, *THAP1* und *TOR1A* ab. In Fibroblasten von Trägern einer *KMT2B*-Mutation wurden reduzierte Mengen von *THAP1* und *TOR1A* nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass *KMT2B* ein vorgeschalteter Regulator von anderen, mit isolierter Dystonie in Verbindung stehenden Genen ist (Meyer et al., 2017; Balint et al., 2018). Da Mutationen in den Genen *TOR1A* und *THAP1* bereits als Ursache isolierter Dystonie bekannt sind, stützt die Verbindung von *KMT2B* zu diesen Genen die Annahme von *KMT2B* als pathogenetischen Faktor einer Dystonie.

5.3. Weiterführende Literatur

Insgesamt zeigen Ergebnis und Diskussion, dass bereits beschriebene und mit Dystonie assoziierte Varianten bestätigt, aber auch weitere neue genetische und sehr wahrscheinlich an der Pathogenese einer Dystonie beteiligte Varianten nachgewiesen werden können. Die gesammelten Daten dieser Arbeit sind in einem Paper mit geteilter Erstautorenschaft dargestellt und befinden sich aktuell noch in dem Prozess der Veröffentlichung. Die oben genannten genetischen Untersuchungen und die Identifikation von genetischen mit Dystonie assoziierten Varianten können allerdings nicht nur dazu dienen Ursachen der Dystonie zu erforschen, sondern auch Patientensubgruppen zu definieren. Diese Subgruppen können dann wiederum klinisch miteinander verglichen werden. Mit Hilfe der in der DysTract-Studie und als Teil dieser Arbeit erhobenen Daten konnte ein Zusammenhang zwischen Tremor und Dystonie hergestellt werden. Es zeigte sich, dass der Tremor ein Indikator für eine positive Familienanamnese einer Dystonie sein kann. Der Tremor ist demzufolge mit einem höheren Risiko einer familiär auftretenden Dystonie assoziiert (Loens et al., 2023). Des Weiteren lassen die in der DysTract-Studie erhobenen Daten ein erblich bedingtes Dystonie-Tremor-Syndrom vermuten (Loens et al., 2023). Zusammenfassend könnten die Ergebnisse der erhobenen Daten dieser Arbeit zusammen mit der genetischen Analyse als Basis für weitere genetische und auch klinische Studien genutzt werden.

5.4. Einschränkungen und Fehleranalyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden lokal ansässige Patienten in das deutsche Dystonie-Register eingespeist und das gesamte Register genetisch untersucht. Derartige Hochdurchsatzanalysen liefern zwar in kurzer Zeit viele Daten, sind aber nicht frei von Limitationen und teilweise fehleranfällig. Eine große Schwierigkeit genetischer Analysen ist die Einschätzung der Pathogenität einer genetischen Variante. Dem genetischen Code entsprechend können zum Beispiel Punktmutationen ein Basen-Triplet verändern und dennoch in einer unveränderten Translation der gleichen Aminosäure resultieren. Diese synonymen Varianten gelten selten als pathogen, da die Funktionalität des synthetisierten Proteins weiterhin gegeben ist. Frameshift-Mutationen und Nonsense-Mutationen, die zu einer ausgedehnten Änderung der Aminosäuresequenz oder einem Abbruch der Translation und dadurch zu einem *loss-of-function*-Pathomechanismus führen, gelten meist als pathogen, da eine Funktionsänderung oder ein Funktionsverlust des Proteins durch diese gravierenden Veränderungen als sehr wahrscheinlich angesehen werden kann. Die Einschätzung der Auswirkungen von Missense-Mutationen ist am schwierigsten. Diese können durch den Austausch einer Base zu dem Einbau einer anderen Aminosäure führen. Diese Aminosäure kann je nach Lokalisation und funktioneller Gruppe sowohl zu einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion als auch zu einer uneingeschränkten Funktion führen. Die Einschätzung der Pathogenität einer genetischen Variante mittels eines Patho-Scorings gibt somit lediglich Hinweise auf die möglichen Auswirkungen dieser Variante, kann eine Vermutung bezüglich der Pathogenität aber nur stützen und nicht sichern.

Da genetische Analysen sich lediglich auf die Aberration des genetischen Materials beziehen, ist eine Aussage zur Funktionalität des synthetisierten Proteins ohne funktionelle Studien nur stark eingeschränkt möglich. Um die Pathogenität der genetischen Varianten sicher beurteilen zu können, sind folglich varianten-spezifische funktionelle Studien notwendig. Diese sind zum Beispiel für die Gene *THAP1* und *GNAL* sowie auch mit der *Episignature* für *KMT2B* möglich, aber auch sehr aufwändig. Alternativ sind auch Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene möglich, um die Wirkung von trunkierenden und Spleißvarianten nachzuweisen und dadurch eine Aussage zu der verbleibenden Funktionalität zu ermöglichen.

Zusätzlich treten bei Sequenzierung einige Lücken auf. Zum einen sind nicht alle Genabschnitte vollständig bei der Panel-Sequenzierung abgedeckt, Varianten können übersehen werden oder es ergeben sich falsch-positive Varianten. Die Zahl der falsch-positiven Varianten wurde in dieser Studie versucht mittels Nachsequenzierung zu reduzieren. Des Weiteren können *copy number variants* bei der Panel-Sequenzierung nicht zuverlässig detektiert werden. Diese waren nicht Teil der Panelauswertung dieser Arbeit stellen jedoch eine mögliche Fehlerquelle da.

Ein weiterer zu diskutierender Faktor ist die Patientenkohorte. Die meisten genetischen Varianten, die mit der Pathogenese der Dystonie assoziiert werden, werden durch Mutations screenings und dem Vergleich zwischen Patienten mit Dystonie und gesunden bzw. Kontrollpersonen mit anderen Bewegungsstörungen identifiziert. Dies kann zu einem eingeschränkten Nachweis Dystonie-spezifischer genetischer Varianten führen. Unterschiedliche Krankheitsbilder und eine eventuell erst nach der genetischen Analyse beginnende Manifestation von Symptomen sind weitere mögliche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der genetischen Studien.

Zusätzlich könnten dieselben Gene Einfluss auf die Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen haben. Eine eingeschränkte Differenzierung zwischen den verschiedenen und teilweise kombinierten neurogenetischen Erkrankungen und damit assoziierten genetischen Varianten schränkt somit die Spezifität der Studie ein.

5.5. Ausblick auf mögliche weitere Studien

Wie schon unter „Einschränkungen und Fehleranalyse“ erläutert, sind weitere Studien für eine genauere und aussagekräftigere Interpretation der genetischen Analysen notwendig. Mittels des Patho-Scorings können lediglich Vermutungen in Bezug auf die Pathogenität der in dieser Studie untersuchten genetischen Varianten aufgestellt, aber nicht eindeutig gesichert werden. Weitere klinische Studien mit höheren Patientenzahlen, verschiedener Patientenpopulationen oder die Darstellung von Familien mit monogenetisch bedingter Dystonie und genauer klinisch-neurologischer Untersuchung betroffener und anamnestisch nicht betroffener Familienmitglieder (inklusive Eltern, Geschwister und Kindern) wären sinnvoll. Dadurch könnten eindeutigere Aussagen zum Vererbungsmodus, zur Penetranz und der phänotypischen Variabilität getroffen werden. Zusätzlich könnten anhand von weiteren funktionellen Studien und *medium to high throughput-Assays* durch eine Analyse der molekularen Interaktionen die Funktion beziehungsweise ein Funktionsverlust der beteiligten Proteine genauer dargestellt und verifiziert werden. Eine Weiterentwicklung und Verbesserung der *in-silico-Prädiktion* könnte außerdem Möglichkeiten zur genaueren Einschätzung der Pathogenität genetischer Varianten geben, vor allem auch bei Varianten in nicht-kodierenden Abschnitten des Genoms. Um den Einfluss genetischer Varianten besser im klinischen Kontext interpretieren zu können, könnten genetische Analysen von Patientengruppen mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen und ein Vergleich der genetischen Varianten neue Erkenntnisse liefern.

All diese möglichen weiteren Studien könnten dazu beitragen, die Pathogenese der Dystonien und die Pathogenität genetischer Varianten besser verstehen zu können.

6. Zusammenfassung

Genetische Varianten spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Bewegungsstörung Dystonie. Im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren begünstigen oder verursachen diese die Ausbildung und den charakteristischen Phänotyp verschiedener Dystonie-Formen. Dabei muss jedoch zwischen Polymorphismen als natürlich vorkommenden Varianten und den pathogenen genetischen Varianten unterschieden werden. In dieser Arbeit lag der Fokus auf neuen Varianten in den bereits mit Dystonien assoziierten Genen *TOR1A* auf Chromosom 9, *THAP1* (Chromosom 8), *GNAL* (Chromosom 18), *PRKRA* (Chromosom 2) und *KMT2B* (Chromosom 19). Diese Gene stehen in Verbindung mit Formen von isolierter bzw. komplexer Dystonie.

In Mitarbeit im Deutschen Netzwerk zur translationalen Erforschung und Behandlung dystoner Erkrankungen (DysTract) wurde der klinische Phänotyp überwiegend isolierter und hauptsächlich fokaler Dystonien genauer untersucht. Hierzu wurde zunächst bei 75 Dystonie-Patientinnen und -Patienten anhand standardisierter Interviews und nach fest definiertem Protokoll erstellter Videos die Symptomausprägung erfasst. Im Anschluss wurde die DNA der Patienten aus EDTA-Blut extrahiert und anhand der pseudonymisierten Daten eine Datenbank erstellt, welche einen Teil der Grundlage für das Mutations-Screening ergab. Für das Mutations-Screening in den Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* wurden zusätzlich weitere Bioproben sowohl von Dystonie- als auch von Parkinson-Patienten analysiert. Diese Proben wurden im Rahmen verschiedener Studien von Patienten weltweit gesammelt. Die Parkinson-Patienten dienten hier als Vergleichskohorte (nicht-Dystonie-Patienten). Durch eine *Next Generation Sequencing*-basierten Genpanel-Analyse und anschließender Validierung mittels PCR und Sanger-Sequenzierung erfolgte die Analyse des genetischen Materials von 1115 an einer primären/ isolierten Dystonie und von 900 an einem Parkinson-Syndrom erkrankten Patienten.

Insgesamt konnten auf diesem Wege 80 genetische Varianten in den Dystonie-Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* nachgewiesen werden. Alle Varianten lagen in heterozygoter Form vor. Anhand des Patho-Scorings der *Movement Disorder Society* (MDS) und den Kriterien des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) wurden 66 Varianten als benigne oder fraglich pathogen und 14 Varianten als sicher oder wahrscheinlich pathogen eingestuft. Neun dieser als pathogen eingestuften Varianten sind bereits aus früheren Studien bekannt und konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Es handelt sich dabei um die Varianten in den Genen *TOR1A* (c.907_909delGAG p.Glu303del, c.863G>A p.Arg288Gln, c.40_45 delGCGCCG p.Ala14_Pro15del), *GNAL* (c.313A>C p.Ile105Leu), *THAP1* (c.474delA p.Lys158Asnfs*23, c.70A>G p.Lys24Glu, c.68A>C p.His23Pro), *PRKRA* (c.665C>T p.Pro222Leu) und *KMT2B* (c.3568_3577delCTGAGTGTGC p.Leu1190fs).

Die restlichen fünf wahrscheinlich pathogenen Varianten wurden bisher in keiner öffentlichen Datenbank registriert und im Rahmen dieser Arbeit erstmalig in den Genen *THAP1* und *GNAL* identifiziert. Diese Varianten haben nach den Kriterien des Patho-Scorings mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Einfluss in der Pathogenese der Dystonie. Bei den neu identifizierten Varianten handelt es sich um die Varianten c.292G>T p.Glu98* und c.61T>G p.Ser21Ala im Gen *THAP1* und c.1115T>G p.Ile372Ser sowie c.1264dupT p.Tyr422fs im Gen *GNAL*, welche ausschließlich bei Dystonie-Patienten nachgewiesen wurden. Außerdem wurde die Spleißstellen-Mutation c.71+2T>C im Gen *THAP1* in der Kontrollgruppe erstmalig nachgewiesen.

Mit dem Gen *THAP1* assoziierte Dystonien sind charakterisiert durch einen frühen Beginn der Symptome in der Jugend oder im jungen Erwachsenenalter mit gemischem Phänotyp und einer Generalisierung im Verlauf. Die Symptome sind häufig beginnend in den crano-cervikalen Muskeln, als fokale Dystonie der oberen Extremität oder als laryngeale Dystonie. Die Vererbung erfolgt autosomal-dominant und das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ca. 16 Jahren. Auch die Patienten mit den im Rahmen dieser Studie neu identifizierten genetischen Varianten c.292G>T p.Glu98* und c.61T>G p.Ser21Ala im *THAP1*-Gen erkrankten im Jugendalter an einer Dystonie mit zervikalem Beginn und entwickelten im Verlauf eine segmentale bzw. generalisierte Dystonie. Diese klinischen Verläufe sind somit vereinbar mit den bisherigen Beschreibungen einer DYT-*THAP1*. Mutationen in dem Gen *GNAL* werden ebenfalls mit einer im jungen bis mittleren Erwachsenenalter, häufig cranozervikal beginnenden Dystonie assoziiert und folgen einem autosomal-dominanten Vererbungsmodus. Im Verlauf kommt es meist zu einer Ausbreitung der Symptome in Form einer segmentalen Dystonie, zum Teil jedoch auch zu einer Generalisierung. Dieser Phänotyp der DYT-*GNAL* spiegelt sich auch in den Krankheitsverläufen der Träger neu identifizierten Varianten im Gen *GNAL*.

In der Kontrollgruppe wurde die Spleißstellen-Mutation c.71+2T>C im Gen *THAP1* bei einer Patientin mit Parkinson-Syndrom nachgewiesen. Sie erkrankte bereits im Alter von 30 Jahren. Es scheint möglich, dass Varianten im Gen *THAP1* nicht nur einen Einfluss auf die Pathogenese der Dystonie, sondern auch anderer Bewegungsstörungen haben könnten. Um diese Hypothese zu stützen, sind allerdings weitere, u.a. funktionelle Studien erforderlich.

Zusammenfassend konnten mit dieser Studie sowohl bereits nachgewiesene pathogene genetische Varianten bestätigt als auch neue wahrscheinlich pathogene Varianten identifiziert werden. Es wurden jeweils zwei neue, die Pathogenese der Dystonie mit hoher Wahrscheinlichkeit beeinflussende genetische Varianten in den Genen *THAP1* (c.292G>T p.Glu98* und c.61T>G p.Ser21Ala) und *GNAL* (c.1115T>G p.Ile372Ser und c.1264dupT p.Tyr422fs) nachgewiesen und der bisher bekannte assoziierte Phänotyp der genspezifischen Dystonie-Formen bestätigt. Nichtsdestotrotz kann durch die *in silico-Prädiktion* die Vermutung einer Pathogenität nur gestützt, aber nicht gesichert werden. Deswegen sind für ein besseres Verständnis und eine bessere Interpretation der Rolle genetischer Varianten im Rahmen der Dystonie und eine Abgrenzung zu natürlich vorkommenden Polymorphismen weitere Genanalysen und funktionelle Studien erforderlich. Es besteht die Hoffnung, dass sich aus diesen Ergebnissen mittel- und langfristig Ansätze für weitere Therapiemöglichkeiten ergeben.

7. Thesen

1. Genetische Varianten in den Genen *TOR1A*, *THAP1*, *GNAL*, *PRKRA* und *KMT2B* haben einen Einfluss auf die Pathogenese einer Dystonie.
2. Der Genotyp einer genetisch definierten Form von Dystonie hat Auswirkungen auf den Phänotypen und den Verlauf der Erkrankung.
3. Mutationen in dem Gen *TOR1A* führen vermehrt zu einer früh beginnenden und im Verlauf häufig generalisierten Dystonie.
4. Mutationen in dem Gen *THAP1* verursachen häufig eine im Erwachsenenalter beginnende Dystonie und führen nur selten zu einer Generalisierung.
5. Mutationen in dem Gen *GNAL* werden mit einer im Erwachsenenalter beginnenden segmentalen Dystonie in Verbindung gebracht.
6. Mutationen in dem Gen *PRKRA* sind mit einem im jungen Alter beginnenden Dystonie-Parkinsonismus assoziiert.
7. Mutationen in dem Gen *KMT2B* stehen in Verbindung mit einer früh beginnenden generalisierten Dystonie mit zusätzlichen systemischen Merkmalen.
8. Durch molekulargenetische Untersuchungen können Häufigkeiten genetischer Varianten, Mutationsspektren und damit assoziierte Phänotypen einer Dystonie ermittelt werden.
9. Erkenntnisse zu mit Genotypen assoziierten Phänotypen einer Dystonie ermöglichen Fortschritte in der Therapie der Dystonie.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenosin
A2AR	A2A Adenosin Rezeptor
AAA+	ATPases associated with a variety of cellular activities
AC5	Adenylylcyclase 5
ACMG	The American College of Medical Genetics and Genomics
AD	autosomal dominant
ADCY5	Adenylylcyclase 5 - Gen
Ala	Alanin
AR	autosomal rezessiv
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
At	Annealing-Temperatur
ATP	Adenosintriphosphat
BoNT	Botulinum Neurotoxin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CADD	Combined Annotation Dependent Depletion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
D1R	D1-Dopamin-Rezeptor
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBS	Deep brain stimulation
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat

dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	definitely pathogenic
DysTract	Dystonia Translational Research and Therapy Consortium
DYT	Akronym für die Dystonie-Gene
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EMA	Europäischen Arzneimittel Agentur
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ex	Exon
Exo I	Exonuklease I
F	forward
f	female
FastAP	Alkalische Phosphatase
G α olf	stimulierende alpha-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
FDA	Food and drug administration
fs	frame shift
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GNAL-Gen	Gen der Guanine nucleotide-binding protein G α olf subunit alpha L
gnomAD	The Genome Aggregation Database
GPi	Globus Pallidus internus
GRCh38/ hg38	Genome Reference Consortium Human Build 38 Organism: Homo sapiens (human)
GTP	Guanosintriphosphat
H2O	Wasser
H3K4	Aminosäure Lysin 4 des Histons H3
H:mm:ss	Stunden: Minuten: Sekunden

HGMD	The Human Gene Mutation Database
His	Histidin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HUGO	Human Genome Organisation
Ile	Isoleucin
KMT2B-Gen	Gen der lysinspezifischen Histon-Methyltransferase 2B
LAP1	Lamina-associated polypeptide 1
L-Dopa	L-Dopamin
Leu	Leucin
LP	likely pathogenic
LULL1	luminal domain like LAP1
Lys	Lysin
m	male
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
n.a.	not applicable
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Next-Generation Sequencing
NLS	nuclear localization signal
nm	nanometer
p.	Protein-Level
P	pathogenic
PACT	PKR-activator protein
PAR4	Prostate apoptosis response protein 4

PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PD	Parkinson´s disease
pH	pH-Wert
pmol	Pikomol
PKR	interferon-induced double-stranded RNA-activated Proteinkinase
PoP	possible pathogenic
PRKRA-Gen	Gen der Proteinkinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator
Pro	Prolin
PrP	probably pathogenic
PTD	Primary torsion dystonia
R	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
sec	Sekunde
Ser	Serin
STN	Nucleus subthalamicus
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
THAP1-Gen	Gen des Thanatos-associated domain-containing apoptosis-associated protein 1
THS	Tiefe Hirnstimulation
TOR1A-Gen	Torsin 1A-Gen
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$)
Tyr	Tyrosin
U	Units
US	Unterschenkel
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
VUS	Variant of uncertain significance
XR	X-chromosomal rezessiv
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

Deutsche Gesellschaft für Neurologie. 2021. Dystonie –Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/030-039.html>. Online; accessed 2021-06-22.

Abela, L. and M. A. Kurian. 2018. GeneReviews®KMT2B-Related Dystonia. Seattle (WA): University of Washington, Seattle (WA).

Albanese, A., K. Bhatia, S. B. Bressman, M. R. Delong, S. Fahn, V. S. C. Fung, M. Hallett, J. Jankovic, H. A. Jinnah, C. Klein, A. E. Lang, J. W. Mink, and J. K. Teller. 2013. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 28:863–873.

Albanese, A., K. Bhatia, M. R. Delong, S. Fahn, V. S. C. Fung, M. Hallett, J. Jankovic, H. A. Jinnah, J. W. Mink, and J. K. Teller. 2016. "Complex" dystonia is not a category in the new 2013 consensus classification. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 31:1758–1759.

Albanese, A., M. Di Giovanni, and S. Lalli. 2019. Dystonia: diagnosis and management. *European journal of neurology*, 26:5–17.

Balint, B. and K. P. Bhatia. 2015. Isolated and combined dystonia syndromes - an update on new genes and their phenotypes. *European journal of neurology*, 22:610–617.

Balint, B., N. E. Mencacci, E. M. Valente, A. Pisani, J. Rothwell, J. Jankovic, M. Vidailhet, and K. P. Bhatia. 2018. Dystonia. *Nature reviews. Disease primers*, 4:25.

Behjati, S. and P. S. Tarpey. 2013. What is next generation sequencing? *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*, 98:236–238.

Benninger, D. and M. Schüpbach. 2018. Tiefe Hirnstimulation. *Therapeutische Umschau. Revue thérapeutique*, 75:425–431.

Bezerra, T. C., N. Novaretti, A. L. N. Cunha, M. A. P. Pereira, D. S. de Oliveira, M. C. M. Brito, Â. V. Pimentel, and V. Tumas. 2018. Epidemiological and clinical aspects of a sample of Brazilian patients with primary dystonia and the impact of the new classification on their clinical evaluation. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 76:821–826.

Breakefield, X. O., A. J. Blood, Y. Li, M. Hallett, P. I. Hanson, and D. G. Standaert. 2008. The pathophysiological basis of dystonias. *Nature reviews. Neuroscience*, 9:222–234.

- Bressman, S. B., D. Raymond, T. Fuchs, G. A. Heiman, L. J. Ozelius, and R. Saunders-Pullman. 2009. Mutations in THAP1 (DYT6) in early-onset dystonia: a genetic screening study. *The Lancet Neurology*, **8**:441–446.
- Camargo, C. H. F., S. T. Camargos, S. Raskin, F. E. C. Cardoso, and H. A. G. Teive. 2014. DYT6 in Brazil: Genetic Assessment and Clinical Characteristics of Patients. *Tremor and other hyperkinetic movements* (New York, N.Y.), **4**:226.
- Camargos, S., S. Scholz, J. Simón-Sánchez, C. Paisán-Ruiz, P. Lewis, D. Hernandez, J. Ding, J. R. Gibbs, M. R. Cookson, J. Bras, R. Guerreiro, C. R. Oliveira, A. Lees, J. Hardy, F. Cardoso, and A. B. Singleton. 2008. DYT16, a novel young-onset dystonia-parkinsonism disorder: identification of a segregating mutation in the stress-response protein PRKRA. *The Lancet Neurology*, **7**:207–215.
- Charlesworth, G., K. P. Bhatia, and N. W. Wood. 2013. The genetics of dystonia: new twists in an old tale. *Brain : a journal of neurology*, **136**:2017–2037.
- da Silva-Junior, F. P., C. O. Dos Santos, S. M. C. A. Silva, E. R. Barbosa, V. Borges, H. B. Ferraz, J. C. P. Limongi, M. S. G. Rocha, and P. de Carvalho Aguiar. 2014. Novel THAP1 variants in Brazilian patients with idiopathic isolated dystonia. *Journal of the neurological sciences*, **344**:190–192.
- Demircioglu, F. E., W. Zheng, A. J. McQuown, N. K. Maier, N. Watson, I. M. Cheeseman, V. Denic, E. H. Egelman, and T. U. Schwartz. 2019. The AAA + ATPase TorsinA polymerizes into hollow helical tubes with 8.5 subunits per turn. *Nature communications*, **10**:3262.
- Deutsche Dystonie Gesellschaft e.V. 2019. Fokale Formen. <https://www.dystonie.de/krankheitsbilder/fokale-formen/>. Online; accessed 2020-04-09.
- Deutsches Dystonie-Register. 2020. SP2: Deutsches Dystonie-Register. <http://dystract.cio-marburg.de/de/forschung/projekte/dystonie-register>. Online; accessed 2020-03-26.
- Djarmati, A., S. A. Schneider, K. Lohmann, S. Winkler, H. Pawlack, J. Hagenah, N. Brüggemann, S. Zittel, T. Fuchs, A. Raković, A. Schmidt, H.-C. Jabusch, R. Wilcox, V. S. Kostić, H. Siebner, E. Altenmüller, A. Münchau, L. J. Ozelius, and C. Klein. 2009. Mutations in THAP1 (DYT6) and generalised dystonia with prominent spasmodic dysphonia: a genetic screening study. *The Lancet Neurology*, **8**:447–452.
- Domingo, A., R. Erro, and K. Lohmann. 2016. Novel Dystonia Genes: Clues on Disease Mechanisms and the Complexities of High-Throughput Sequencing. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **31**:471–477.
- Dos Santos, C. O., F. P. da Silva-Júnior, R. D. Puga, E. R. Barbosa, S. M. C. Azevedo Silva, V. Borges, J. C. P. Limongi, M. S. G. Rocha, H. B. Ferraz, and P. de Carvalho Aguiar. 2018. The prevalence of PRKRA mutations in idiopathic dystonia. *Parkinsonism & related disorders*, **48**:93–96.

- Dressler, D., E. Altenmüller, R. Giess, J. K. Krauss, and F. Adib Saberi. 2022. The epidemiology of dystonia: the Hannover epidemiology study. *Journal of neurology*, **269**:6483–6493.
- Fahn, S. 2011. Classification of movement disorders. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **26**:947–957.
- Frei, K., D. D. Truong, S. Fahn, J. Jankovic, and R. A. Hauser. 2018. The nosology of tardive syndromes. *Journal of the neurological sciences*, **389**:10–16.
- Fuchs, T., S. Gavarini, R. Saunders-Pullman, D. Raymond, M. E. Ehrlich, S. B. Bressman, and L. J. Ozelius. 2009. Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nature genetics*, **41**:286–288.
- Fuchs, T., R. Saunders-Pullman, I. Masuho, M. S. Luciano, D. Raymond, S. Factor, A. E. Lang, T.-W. Liang, R. M. Trosch, S. White, E. Ainehsazan, D. Hervé, N. Sharma, M. E. Ehrlich, K. A. Martemyanov, S. B. Bressman, and L. J. Ozelius. 2013. Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nature genetics*, **45**:88–92.
- gnomAD. 2020. gnomAD. <https://gnomad.broadinstitute.org/>. Online; accessed 2020-04-03.
- Gorman, K. M., E. Meyer, and M. A. Kurian. 2018. Review of the phenotype of early-onset generalised progressive dystonia due to mutations in KMT2B. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*, **22**:245–256.
- Harikumar, K. G., Y. Yan, T.-H. Xu, K. Melcher, H. E. Xu, and L. J. Miller. 2017. Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Assay for Determination of Molecular Interactions in Living Cells. *Bio-protocol*, **7**.
- Henke, W., K. Herdel, K. Jung, D. Schnorr, and S. A. Loening. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic acids research*, **25**:3957–3958.
- Hettich, J., S. d. Ryan, O. N. de Souza, L. F. Saraiva Macedo Timmers, S. Tsai, N. A. Atai, C. C. da Hora, X. Zhang, R. Kothary, E. Snapp, M. Ericsson, K. Grundmann, X. O. Breakefield, and F. C. Nery. 2014. Biochemical and cellular analysis of human variants of the DYT1 dystonia protein, TorsinA/TOR1A. *Human mutation*, **35**:1101–1113.
- Iqbal, Z., J. Koht, L. Pihlstrøm, S. P. Henriksen, C. Cappelletti, M. B. Russel, O. Norberto de Souza, I. M. Skogseid, and M. Toft. 2019. Missense mutations in DYT-TOR1A dystonia. *Neurology. Genetics*, **5**:e343.
- Jinnah, H. A. 2020. Medical and Surgical Treatments for Dystonia. *Neurologic clinics*, **38**:325–348.
- Jinnah, H. A., A. Berardelli, C. Comella, G. Defazio, M. R. Delong, S. Factor, W. R. Galpern, M. Hallett, C. L. Ludlow, J. S. Perlmutter, and A. R. Rosen. 2013. The focal dystonias: current views and challenges for future research. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **28**:926–943.

- Jinnah, H. A. and Y. V. Sun. 2019. Dystonia genes and their biological pathways. *Neurobiology of disease*, **129**:159–168.
- Kamm, C. 2009. Genetik der Dystonien. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*, **77 Suppl 1**:S32–6.
- Kawarai, T., R. Miyamoto, E. Nakagawa, R. Koichihara, T. Sakamoto, H. Mure, R. Morigaki, H. Koizumi, R. Oki, C. Montecchiani, C. Caltagirone, A. Orlacchio, A. Hattori, H. Mashimo, Y. Izumi, T. Mezaki, S. Kumada, M. Taniguchi, F. Yokochi, S. Saitoh, S. Goto, and R. Kaji. 2018. Phenotype variability and allelic heterogeneity in KMT2B-Associated disease. *Parkinsonism & related disorders*, **52**:55–61.
- Kircher, M., P. Rentzsch, D. M. Witten, G. M. Cooper, and J. Shendure. 2020. CADD - Combined Annotation Dependent Depletion. <https://cadd.gs.washington.edu/>. Online; accessed 2020-04-02.
- Klein, C. 2014. Genetics in dystonia. *Parkinsonism & related disorders*, **20**:S137–S142.
- Klein, C., H. Baumann, L. Olszewski, H. Hanssen, A. Münchau, A. Ferbert, N. Brüggemann, and K. Lohmann. 2019. De-novo KMT2B mutation in a consanguineous family: 15-Year follow-up of an Afghan dystonia patient. *Parkinsonism & related disorders*, **64**:337–339.
- Klein, C., M. F. Brin, D. de Leon, S. A. Limborska, I. A. Ivanova-Smolenskaya, S. B. Bressman, A. Friedman, E. D. Markova, N. J. Risch, X. O. Breakefield, and L. J. Ozelius. 1998. De novo mutations (GAG deletion) in the DYT1 gene in two non-Jewish patients with early-onset dystonia. *Human molecular genetics*, **7**:1133–1136.
- Klein, C. and S. Fahn. 2013. Translation of Oppenheim's 1911 paper on dystonia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **28**:851–862.
- Kuipers, D. J. S., W. Mandemakers, C.-S. Lu, S. Olgiati, G. J. Breedveld, C. Fevgå, V. Tadic, M. Carecchio, B. Osterman, L. Sagi-Dain, Y.-H. Wu-Chou, C. C. Chen, H.-C. Chang, S.-L. Wu, T.-H. Yeh, Y.-H. Weng, A. E. Elia, C. Panteghini, N. Marotta, M. G. Pauly, A. A. Kühn, J. Volkmann, B. Lace, I. A. Meijer, K. Kandaswamy, M. Quadri, B. Garavaglia, K. Lohmann, P. Bauer, N. E. Mencacci, S. J. Lubbe, C. Klein, A. M. Bertoli-Avella, and V. Bonifati. 2021. EIF2AK2 Missense Variants Associated with Early Onset Generalized Dystonia. *Annals of neurology*, **89**:485–497.
- Kumar, K. R., K. Lohmann, I. Masuho, R. Miyamoto, A. Ferbert, T. Lohnau, M. Kasten, J. Hagenah, N. Brüggemann, J. Graf, A. Münchau, V. S. Kostic, C. M. Sue, A. R. Domingo, R. L. Rosales, L. V. Lee, K. Freimann, A. Westenberger, Y. Mukai, T. Kawarai, R. Kaji, C. Klein, K. A. Martemyanov, and A. Schmidt. 2014. Mutations in GNAL: a novel cause of craniocervical dystonia. *JAMA neurology*, **71**:490–494.
- Lange, L. M., P. Gonzalez-Latapi, R. Rajalingam, M. A. J. Tijssen, D. Ebrahimi-Fakhari, C. Gabbert, C. Ganos, R. Ghosh, K. R. Kumar, A. E. Lang, M. Rossi, S. van der Veen, B. van de

- Warrenburg, T. Warner, K. Lohmann, C. Klein, and C. Marras. 2022. Nomenclature of Genetic Movement Disorders: Recommendations of the International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force - An Update. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 37:905–935.
- Lange, L. M., J. Junker, S. Loens, H. Baumann, L. Olschewski, S. Schaake, H. Madoev, S. Petkovic, N. Kuhnke, M. Kasten, A. Westenberger, A. Domingo, C. Marras, I. R. König, S. Camargos, L. J. Ozelius, C. Klein, and K. Lohmann. 2021. Genotype-Phenotype Relations for Isolated Dystonia Genes: MDSGene Systematic Review. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 36:1086–1103.
- LeDoux, M. S. 2012. Dystonia: phenomenology. *Parkinsonism & related disorders*, 18:S162–S164.
- Loens, S., F. Hamami, K. Lohmann, T. Odorfer, C. W. Ip, S. Zittel, K. E. Zeuner, J. Everding, J. Becktepe, K. Marth, F. Borngräber, K. Kollewe, C. Kamm, A. A. Kühn, M. Gelderblom, J. Volkmann, C. Klein, and T. Bäumer. 2023. Tremor is associated with familial clustering of dystonia. *Parkinsonism & related disorders*, 110:105400.
- Lohmann, K. and C. Klein. 2013. Genetics of dystonia: what's known? What's new? What's next? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 28:899–905.
- Lohmann, K. and C. Klein. 2017. Update on the Genetics of Dystonia. *Current neurology and neuroscience reports*, 17:26.
- Lohmann, K., N. Uflacker, A. Erogullari, T. Lohnau, S. Winkler, A. Dendorfer, S. A. Schneider, A. Osmanovic, M. Svetel, A. Ferbert, S. Zittel, A. A. Kühn, A. Schmidt, E. Altenmüller, A. Münchau, C. Kamm, M. Wittstock, A. Kupsch, E. Moro, J. Volkmann, V. Kostic, F. J. Kaiser, C. Klein, and N. Brüggemann. 2012. Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations. *European journal of human genetics : EJHG*, 20:171–175.
- Ma, J., L. Wang, Y.-M. Yang, and X.-H. Wan. 2018. Targeted gene capture sequencing in diagnosis of dystonia patients. *Journal of the neurological sciences*, 390:36–41.
- Marras, C., A. Lang, B. P. van de Warrenburg, C. M. Sue, S. J. Tabrizi, L. Bertram, S. Mercimek-Mahmutoglu, D. Ebrahimi-Fakhari, T. T. Warner, A. Durr, B. Assmann, K. Lohmann, V. Kostic, and C. Klein. 2016. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 31:436–457.
- Masuho, I., S. Chavali, B. S. Muntean, N. K. Skamangas, K. Simonyan, D. N. Patil, G. M. Kramer, L. Ozelius, M. M. Babu, and K. A. Martemyanov. 2018. Molecular Deconvolution Platform to Establish Disease Mechanisms by Surveying GPCR Signaling. *Cell reports*, 24:557–568.e5.
- Masuho, I., M. Fang, C. Geng, J. Zhang, H. Jiang, R. K. Özgül, D. Y. Yılmaz, D. Yalnizoğlu, D. Yüksel, A. Yarrow, A. Myers, S. C. Burn, P. L. Crotwell, S. Padilla-Lopez, A. Dursun, K. A.

- Martemyanov, and M. C. Kruer. 2016. Homozygous GNAL mutation associated with familial childhood-onset generalized dystonia. *Neurology: Genetics*, **2**.
- McKusick, V. A. 2020. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <https://www.omim.org/>. Online; accessed 2020-05-26.
- MDSGene. 2020. MDSGene. <https://www.mdsgene.org/>. Online; accessed 2020-04-03.
- Medina, A., C. Nilles, D. Martino, C. Pelletier, and T. Pringsheim. 2022. The Prevalence of Idiopathic or Inherited Isolated Dystonia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Movement disorders clinical practice*, **9**:860–868.
- Meyer, E., K. J. Carss, J. Rankin, J. M. E. Nichols, D. Grozeva, A. P. Joseph, N. E. Mencacci, A. Papandreou, J. Ng, S. Barral, A. Ngoh, H. Ben-Pazi, M. A. Willemse, D. Arkadir, A. Barnicoat, H. Bergman, S. Bhate, A. Boys, N. Darin, N. Foulds, N. Gutowski, A. Hills, H. Houlden, J. A. Hurst, Z. Israel, M. Kaminska, P. Limousin, D. Lumsden, S. McKee, S. Misra, S. S. Mohammed, V. Nakou, J. Nicolai, M. Nilsson, H. Pall, K. J. Peall, G. B. Peters, P. Prabhakar, M. S. Reuter, P. Rump, R. Segel, M. Sinnema, M. Smith, P. Turnpenny, S. M. White, D. Wieczorek, S. Wiethoff, B. T. Wilson, G. Winter, C. Wragg, S. Pope, S. J. H. Heales, D. Morrogh, A. Pittman, L. J. Carr, B. Perez-Dueñas, J.-P. Lin, A. Reis, W. A. Gahl, C. Toro, K. P. Bhatia, N. W. Wood, E.-J. Kamsteeg, W. K. Chong, P. Gissen, M. Topf, R. C. Dale, J. R. Chubb, F. L. Raymond, and M. A. Kurian. 2017. Mutations in the histone methyltransferase gene KMT2B cause complex early-onset dystonia. *Nature genetics*, **49**:223–237.
- Mirza-Schreiber, N., M. Zech, R. Wilson, T. Brunet, M. Wagner, R. Jech, S. Boesch, M. Škorvánek, J. Necpál, D. Weise, S. Weber, B. Mollenhauer, C. Trenkwalder, E. M. Maier, I. Borggraefe, K. Vill, A. Hackenberg, V. Pilshofer, U. Kotzaeridou, E. M. C. Schwaibold, J. Hoefele, M. Waldenberger, C. Gieger, A. Peters, T. Meitinger, B. Schormair, J. Winkelmann, and K. Oexle. 2022. Blood DNA methylation provides an accurate biomarker of KMT2B-related dystonia and predicts onset. *Brain : a journal of neurology*, **145**:644–654.
- Moraes, F. and A. Góes. 2016. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, **44**:215–223.
- Morgante, F. and C. Klein. 2013. Dystonia. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, **19**:1225–1241.
- Mullis, K. B. and F. A. Falloona. 1987. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In R. Wu, editor, *Recombinant DNA*, volume 155 of *Methods in Enzymology*, pages 335–350. Academic Press, San Diego, Calif.
- Oppenheim, H. 1911. 'Über eine eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica progressiva, Dystonia muscularum deformans)'. *Neurologische Centralblatt*, **30**, pages 1090–107.

- Osmanovic, A., A. Dendorfer, A. Erogullari, N. Uflacker, D. Braunholz, A. Rakovic, G. Vierke, C. Gil-Rodríguez, A. Münchau, M. Albrecht, N. Brüggemann, G. Gillessen-Kaesbach, C. Klein, K. Lohmann, and F. J. Kaiser. 2011. Truncating mutations in THAP1 define the nuclear localization signal. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 26:1565–1567.
- Ostrem, J. L., M. San Luciano, K. A. Dodenhoff, N. Ziman, L. C. Markun, C. A. Racine, C. de Hemptinne, M. M. Volz, S. L. Heath, and P. A. Starr. 2017. Subthalamic nucleus deep brain stimulation in isolated dystonia: A 3-year follow-up study. *Neurology*, 88:25–35.
- Ozelius, L. J., J. W. Hewett, C. E. Page, S. B. Bressman, P. L. Kramer, C. Shalish, D. de Leon, M. F. Brin, D. Raymond, D. P. Corey, S. Fahn, N. J. Risch, A. J. Buckler, J. F. Gusella, and X. O. Breakefield. 1997. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nature genetics*, 17:40–48.
- Park, H. R., J. M. Lee, G. Ehm, H.-J. Yang, I. H. Song, Y. H. Lim, M.-R. Kim, K. R. Kim, W.-W. Lee, Y. E. Kim, J. H. Hwang, C. W. Shin, H. Park, J. W. Kim, H.-J. Kim, C. Kim, D. G. Kim, B. S. Jeon, and S. H. Paek. 2016. Long-Term Clinical Outcome of Internal Globus Pallidus Deep Brain Stimulation for Dystonia. *PloS one*, 11:e0146644.
- Quadri, M., S. Olgiati, M. Sensi, F. Gualandi, E. Groppo, V. Rispoli, J. Graafland, G. J. Breedveld, G. Fabbrini, A. Berardelli, and V. Bonifati. 2016. PRKRA Mutation Causing Early-Onset Generalized Dystonia-Parkinsonism (DYT16) in an Italian Family. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 31:765–767.
- Rentzsch, P., D. Witten, G. M. Cooper, J. Shendure, and M. Kircher. 2019. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic acids research*, 47:D886–D894.
- Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, and H. L. Rehm. 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. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 17:405–424.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239:487–491.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74:5463–5467.
- Siokas, V., A.-M. Aloizou, Z. Tsouris, A. Michalopoulou, A.-F. A. Mentis, and E. Dardiotis. 2019. Risk Factor Genes in Patients with Dystonia: A Comprehensive Review. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements*, 8:559.

- Skogseid, I. M. 2014. Dystonia—new advances in classification, genetics, pathophysiology and treatment. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, pages 13–19.
- Smith, L. M., J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. Kent, and L. E. Hood. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321:674–679.
- Sosa, B. A., F. E. Demircioglu, J. Z. Chen, J. Ingram, H. L. Ploegh, and T. U. Schwartz. 2014. How lamina-associated polypeptide 1 (LAP1) activates Torsin. *eLife*, 3:e03239.
- Steel, D., M. Zech, C. Zhao, K. E. S. Barwick, D. Burke, D. Demailly, K. R. Kumar, G. Zorzi, N. Nardocci, R. Kaiyrzhanov, M. Wagner, A. Iuso, R. Berutti, M. Škorvánek, J. Necpál, R. Davis, S. Wiethoff, K. Mankad, S. Sudhakar, A. Ferrini, S. Sharma, E.-J. Kamsteeg, M. A. Tijssen, C. Verschuuren, M. E. van Egmond, J. M. Flowers, M. McEntagart, A. Tucci, P. Coubes, B. I. Bustos, P. Gonzalez-Latapi, S. Tisch, P. Darveniza, K. M. Gorman, K. J. Peall, K. Bötzler, J. C. Koch, T. Kmiec, B. Plecko, S. Boesch, B. Haslinger, R. Jech, B. Garavaglia, N. Wood, H. Houlden, P. Gissen, S. J. Lubbe, C. M. Sue, L. Cif, N. E. Mencacci, G. Anderson, M. A. Kurian, and J. Winkelmann. 2020. Loss-of-Function Variants in HOPS Complex Genes VPS16 and VPS41 Cause Early Onset Dystonia Associated with Lysosomal Abnormalities. *Annals of neurology*, 88:867–877.
- Tezzon, F., T. Zanoni, M. G. Passarin, and G. Ferrari. 1998. Dystonia in a patient with deletion of 18p. *Italian journal of neurological sciences*, 19:90–93.
- Thenganatt, M. A. and J. Jankovic. 2014. Treatment of dystonia. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 11:139–152.
- Thomsen, M., L. M. Lange, C. Klein, and K. Lohmann. 2023. MDSGene: Extending the List of Isolated Dystonia Genes by VPS16, EIF2AK2, and AOPEP. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 38:507–508.
- Torres, G. E., A. L. Sweeney, J.-M. Beaulieu, P. Shashidharan, and M. G. Caron. 2004. Effect of torsinA on membrane proteins reveals a loss of function and a dominant-negative phenotype of the dystonia-associated DeltaE-torsinA mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:15650–15655.
- Vaughn, L. S., D. C. Bragg, N. Sharma, S. Camargos, F. Cardoso, and R. C. Patel. 2015. Altered activation of protein kinase PKR and enhanced apoptosis in dystonia cells carrying a mutation in PKR activator protein PACT. *The Journal of biological chemistry*, 290:22543–22557.
- Vemula, S. R., A. Puschmann, J. Xiao, Y. Zhao, M. Rudzińska, K. P. Frei, D. D. Truong, Z. K. Wszolek, and M. S. LeDoux. 2013. Role of G α (olf) in familial and sporadic adult-onset primary dystonia. *Human molecular genetics*, 22:2510–2519.
- Vulinovic, F., K. Lohmann, A. Rakovic, P. Capetian, D. Alvarez-Fischer, A. Schmidt, A. Weißbach, A. Erogullari, F. J. Kaiser, K. Wiegers, A. Ferbert, A. Rolfs, C. Klein, and P. Seibler.

2014. Unraveling cellular phenotypes of novel TorsinA/TOR1A mutations. *Human mutation*, **35**:1114–1122.
- Weisheit, C. E., S. S. Pappas, and W. T. Dauer. 2018. Inherited dystonias: clinical features and molecular pathways. *Handbook of clinical neurology*, **147**:241–254.
- Weissbach, A., M. G. Pauly, R. Herzog, L. Hahn, S. Halmans, F. Hamami, C. Bolte, S. Camargos, B. Jeon, M. A. Kurian, T. Opladen, N. Brüggemann, H.-J. Huppertz, I. R. König, C. Klein, and K. Lohmann. 2022. Relationship of Genotype, Phenotype, and Treatment in Dopa-Responsive Dystonia: MDSGene Review. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **37**:237–252.
- Wu, R., editor. 1987. Recombinant DNA, volume 155 of *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Zech, M., S. Boesch, A. Jochim, S. Weber, T. Meindl, B. Schormair, T. Wieland, C. Lunetta, V. Sansone, M. Messner, J. Mueller, A. Ceballos-Baumann, T. M. Strom, R. Colombo, W. Poewe, B. Haslinger, and J. Winkelmann. 2017a. Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **32**:549–559.
- Zech, M., S. Boesch, E. M. Maier, I. Borggraefe, K. Vill, F. Laccone, V. Pilshofer, A. Ceballos-Baumann, B. Alhaddad, R. Berutti, W. Poewe, T. B. Haack, B. Haslinger, T. M. Strom, and J. Winkelmann. 2016. Haploinsufficiency of KMT2B, Encoding the Lysine-Specific Histone Methyltransferase 2B, Results in Early-Onset Generalized Dystonia. *American journal of human genetics*, **99**:1377–1387.
- Zech, M., R. Jech, P. Havráneková, A. Fečíková, R. Berutti, D. Urgošík, D. Kemlink, T. M. Strom, J. Roth, E. Růžička, and J. Winkelmann. 2017b. KMT2B rare missense variants in generalized dystonia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **32**:1087–1091.
- Zech, M., M. Wagner, B. Schormair, K. Oexle, and J. Winkelmann. 2019. Exomdiagnostik in der Neurologie. *Der Nervenarzt*, **90**:131–137.
- Ziegan, J., M. Wittstock, A. Westenberger, V. Dobričić, A. Wolters, R. Benecke, C. Klein, and C. Kamm. 2014. Novel GNAL mutations in two German patients with sporadic dystonia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **29**:1833–1834.
- Zirn, B., K. Grundmann, P. Huppke, J. Putthenparampil, H. Wolburg, O. Riess, and U. Müller. 2008. Novel TOR1A mutation p.Arg288Gln in early-onset dystonia (DYT1). *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **79**:1327–1330.

A. Anhang

A.1. Übersicht bekannter Dystonie-Gene

Tabelle A.1.: Ausschnitt aus der Liste bekannter Dystonie-Gene

Diese Tabelle zeigt einen Ausschnitt der bisher identifizierten Dystonie-Gene mit DYT-Genloci und Vererbungsmodus. Eine genauere Auflistung ist in dem Paper *Genetics in dystonia* (Klein, 2014) und dem Online Katalog von humanen Genen und Erbkrankheiten (OMIM, <https://omim.org>) enthalten.

Diese Liste umfasst die mit einer Isolierten Dystonie (Abschnitt 1), einer Kombinierten Dystonie (Myoklonus-Dystonie) im Abschnitt 2 und dem Dystonie-Parkinsonismus (Abschnitt 3) assoziierten Gene. Die drei Gene im untersten Abschnitt werden zu dem Krankheitsbild einer Paroxysmalen Dyskinesie gezählt. Eine Übersicht und Verweise auf die jeweiligen Studien finden sich bei MDSGene (www.mdsgene.org).

Gensymbol	Dystonie (veraltet)	Genlokus	Vererbung	Dystonieform
<i>TOR1A</i>	DYT1	9q32-q34	AD	Generalisierte Dystonie mit frühem Beginn
<i>HPCA</i>	DYT2	1p35.1	AR	Autosomal rezessive Dystonie
<i>THAP1</i>	DYT6	8p11.1	AD	Adoleszente Dystonie vom gemischten Typ
<i>PRKRA</i>	DYT16	2q31.2	AR	Dystonie(-Parkinson-Syndrom) mit frühem Beginn
<i>ANO3</i>	DYT24	11p	AD	Kranio-zervikale Dystonie mit spätem Beginn
<i>GNAL</i>	DYT25	18p	AD	Kranio-zervikale Dystonie mit spätem Beginn
<i>KMT2B</i>	DYT28	19q13.12	AD	Dystonie mit Beginn im Kindesalter
<i>SGCE</i>	DYT11	7q21.3	AD	Myoklonus Dystonie
<i>KCTD17</i>	DYT26	22q12.3	AD	Myoklonus Dystonie
<i>TAF1</i>	DYT3	Xq13.1	XR	X-linked Dystonie-Parkinson Syndrom (Lubag-Dystonie)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.1 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Gensymbol	Dystonie (veraltet)	Genlokus	Vererbung	Dystonieform
<i>GCH1</i>	DYT5a	14q22.1-22.2	AD	Dopa-responsive Dystonie, Segawa Syndrom
<i>TH</i>	DYT5b	11p15.5	AD	Dopa-responsive Dystonie, Segawa Syndrom
<i>SPR</i>	DYT5b	2p14-p12	AD	Dopa-responsive Dystonie
<i>ATP1A3</i>	DYT12	19q13.2	AD	„Rapid-onset Dystonia- Parkinsonism“
<i>GCH1</i>	DYT14	11p15.5	AD	Dopa-responsive Dystonie, Segawa Syndrom
<i>SLC2A1</i>	DYT9	1p31	AD	Paroxysmale Choreoathetose mit episodischer Ataxie und Spastik
<i>PRRT2</i>	DYT10	16p11.2-q12.1	AD	Paroxysmale kinesiogene Choreoathetose (PKD1)
<i>SLC2A1</i>	DYT18	1p34.2	AD	„Paroxysmal exertion- induced dyskinesia 2“

Abkürzungen: AD = autosomal dominant, AR = autosomal rezessiv, XR = X-chromosomal rezessiv

A.2. Klinische Daten der DysTract-Patienten aus Rostock

Tabelle A.2.: Liste der 75 DysTract-Patienten aus Rostock mit den klinischen Daten
Übersicht der klinischen Daten der Patienten der Universitätsmedizin Rostock, die in die DysTract-Studie eingeschlossen wurden. Das Alter im der Spalte *Lokalisation* bezieht sich auf das Manifestationsalter des Symptoms.

Patienten-ID	Geschlecht	Dystonie-form	Lokalisation (Alter)	Alter (Studien- beginn)	Alter (Symptom- beginn)	Operation	Familien- anamnese	Gentest	Geburts- land	Bundes- land
D-HRO-UM-0001	m	focal	zervikal/ Nacken	39	23	nein	negativ	nein	TH	MV
D-HRO-UM-0002	f	focal	zervikal/ Nacken	75	70	nein	negativ	nein	POL	MV
D-HRO-UM-0003	m	focal	zervikal/ Nacken	59	44	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0004	f	focal	Obere Extremität/ Hand	58	41	nein	negativ	nein	BB	MV
D-HRO-UM-0005	f	segmental	obere und untere Gesichtshälften	48	43	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0006	f	focal	zervikal/ Nacken	54	45	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0007	f	focal	zervikal/ Nacken	50	44	nein	negativ	nein	MV	MV

Tabelle A.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Patienten-ID	Geschlecht	Dystonie-form	Lokalisation (Alter)	Alter (Studienbeginn)	(Symptombeginn)	Operation	Familien-anamnese	Gentest	Geburts-land	Bundes-land
D-HRO-UM-0008	m	focal	zervikal/ Nacken	56	42	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0009	f	multi-focal	Hand (6), Nacken (25)	48	6	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0010	m	focal	zervikal/ Nacken	62	40	nein	positiv	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0011	f	focal	zervikal/ Nacken	57	53	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0012	f	focal	zervikal/ Nacken	35	29	nein	positiv	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0013	m	focal	zervikal/ Nacken	77	72	nein	negativ	nein	SN	MV
D-HRO-UM-0014	m	multi-focal	Hände (57), Nacken (56)	62	56	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0015	f	focal	kranial/ Blepharospasmus	75	63	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM-0016	m	focal	zervikal/ Nacken	62	54	nein	negativ	nein	MV	MV

Tabelle A.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Patienten-ID	Geschlecht	Dystonie-form	Lokalisation (Alter)	Alter (Studienbeginn)	Operation	Familien-anamnese	Gentest	Geburts-land	Bundes-land
D-HRO-UM-0017	f	focal	zervikal/ Nacken	76	37	nein	negativ	nein	POL
D-HRO-UM-0018	f	multi-focal	Hand (6), Nacken (6)	58	6	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM-0019	f	focal	Obere Extremität/ Hand re.	58	48	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM-0020	f	focal	zervikal/ Nacken	31	25	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM-0021	f	focal	zervikal/ Nacken	64	54	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM-0022	f	focal	zervikal/ Nacken	76	64	nein	positiv	nein	CZE
D-HRO-UM-0023	m	focal	zervikal/ Nacken	59	47	nein	positiv	nein	MV
D-HRO-UM-0024	f	focal	zervikal/ Nacken	54	40	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM_0026	f	focal	kranial/ Meige-Syndrom	81	62	ja (Myek- tomie li.)	negativ	nein	POL
						Fortsetzung auf der nächsten Seite			

Tabelle A.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Patienten-ID	Geschlecht	Dystonie-form	Lokalisation (Alter)	Alter (Studienbeginn)	(Symptombeginn)	Operation	Familien-anamnese	Gentest	Geburts-land	Bundes-land
D-HRO-UM_0027	f	focal	zervikal/ Nacken	49	36	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0028	f	focal	zervikal/ Nacken	66	58	nein	positiv	nein	SN	MV
D-HRO-UM_0029	m	focal	zervikal/ Nacken	30	22	nein	negativ	ja (neg.)	MV	MV
D-HRO-UM_0030	m	focal	zervikal/ Nacken	53	29	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0031	m	focal	zervikal/ Nacken	58	45	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0032	f	focal	kranial/ Meige-Syndrom	75	64	ja (Myektomie bds.)	negativ	nein	ST	MV
D-HRO-UM_0033	f	focal	zervikal/ Nacken	76	71	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0034	f	focal	zervikal/ Nacken	59	55	nein	negativ	nein	BE	MV

Tabelle A.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Patienten-ID	Geschlecht	Dystonie-form	Lokalisation (Alter)	Alter (Studienbeginn)	Operation (Symptombeginn)	Familien-anamnese	Gentest	Geburts-land	Bundes-land
D-HRO-UM_0035	f	focal	zervikal / Nacken	48	36	nein	negativ	MV	MV
D-HRO-UM_0036	f	focal	zervikal / Nacken	43	38	nein	negativ	MV	MV
D-HRO-UM_0037	f	multi-focal	Nacken (17), obere (14) & untere (17) Gesichtshälfte	54	14	nein	positiv	nein	BB
D-HRO-UM_0038	f	focal	kranial/ Meige-Syndrom	73	66	nein	negativ	nein	BB
D-HRO-UM_0039	f	focal	kranial/ Meige-Syndrom	67	58	nein	negativ	nein	TH
D-HRO-UM_0040	f	focal	zervikal / Nacken	51	45	nein	negativ	nein	ST
D-HRO-UM_0041	f	segmental	Nacken (64), obere (62) und untere (63) Gesichtshälfte	82	62	nein	negativ	nein	ST
D-HRO-UM_0042	m	focal	zervikal / Nacken	56	32	nein	negativ	nein	MV

Tabelle A.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Tabelle A.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Patienten-ID	Geschlecht	Dystonie-form	Lokalisation (Alter)	Alter (Studienbeginn)	(Symptombeginn)	Operation	Familien-anamnese	Gentest	Geburts-land	Bundes-land
D-HRO-UM_0051	f	multi-focal	Hand re., Nacken	63	56	nein	positiv	nein	BW	MV
D-HRO-UM_0052	f	focal	zervikal/ Nacken	76	47	nein	positiv	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0053	f	focal	zervikal/ Nacken	74	25	nein	positiv	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0054	f	multi-focal	Nacken (28), Rumpf (27), Hüfte (27), Bein li. (27), Fuß li. (27)	61	27	nein	positiv	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0055	f	focal	cranial (Blepharospasmus)	62	50	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0056	f	focal	zervikal/ Nacken	68	45	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0057	m	focal	zervikal/ Nacken	59	49	nein	positiv	nein	MV	MV
D-HRO-UM_0058	f	focal	zervikal/ Nacken	52	30	nein	positiv	nein	MV	MV

Tabelle A.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Patienten-ID	Geschlecht	Dystonie-form	Lokalisation (Alter)	Alter (Studienbeginn)	Operation (Symptombeginn)	Familien-anamnese	Gentest	Geburts-land	Bundes-land
D-HRO-UM_0059	f	focal	zervikal/ Nacken	66	58	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM_0060	f	focal	Obere Extremität/ Hand re.	56	38	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM_0061	f	focal	kranial/ Meige-Syndrom	75	63	nein	positiv	nein	POL
D-HRO-UM_0062	f	focal	zervikal/ Nacken	61	58	nein	positiv	nein	MV
D-HRO-UM_0063	f	focal	zervikal/ Nacken	81	70	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM_0064	m	segmental	Nacken (26), Arm re. (30), Hände bds. (30)	40	26	nein	negativ	ja (neg.)	MV
D-HRO-UM_0065	f	focal	zervikal/ Nacken	70	62	nein	negativ	nein	SN
D-HRO-UM_0066	m	focal	zervikal/ Nacken	60	52	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM_0067	f	focal	zervikal/ Nacken (70), Hand re. (59))	80	59	nein	negativ	nein	MV

Tabelle A.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Patienten-ID	Geschlecht	Dystonie-form	Lokalisation (Alter)	Alter (Studienbeginn)	Operation	Familien-anamnese	Gentest	Geburts-land	Bundes-land
D-HRO-UM_0068	f	focal	zervikal/ Nacken	49	36	nein	negativ	ja (pos., GNAL-Gen [Frameshift-Mutation c.166_167insA])	MV
D-HRO-UM_0069	m	focal	zervikal/ Nacken	57	44	nein	negativ	nein	SH
D-HRO-UM_0070	m	focal	zervikal/ Nacken	62	34	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM_0071	f	focal	Untere Extremität/ Fuß	48	45	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM_0072	f	segmental	Nacken (28), Obere & untere Gesichtshälfte (45)	55	28	nein	negativ	nein	MV
D-HRO-UM_0073	m	focal	zervikal/ Nacken	68	37	nein	negativ	nein	BY
D-HRO-UM_0074	f	focal	zervikal/ Nacken	48	42	nein	negativ	nein	SH

Tabelle A.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Patienten-ID	Geschlecht	Dystonie-form	Lokalisation (Alter)	Alter (Studien- beginn)	Alter (Symptom- beginn)	Operation	Familien- anamnese	Gentest	Geburts- land	Bundes- land
D-HRO- UM_0075	f	focal	zervikal/ Nacken	61	50	nein	negativ	nein	MV	MV
D-HRO- UM_0076	f	focal	zervikal/ Nacken	56	47	nein	negativ	nein	BB	MV

Abkürzungen: m= männlich, f= weiblich, neg.= negativ, pos.= positiv, li.= links, re.= rechts, TH= Thüringen, MV= Mecklenburg-Vorpommern, BB= Brandenburg, SI=N= Sachsen, ST= Sachsen-Anhalt, BE= Berlin, SH= Schleswig-Holstein, RP= Rheinland-Pfalz, BY= Baden-Württemberg, CZ= Bayern, POL= Tschechien, POL= Polen

A.3. Patho-Scoring

A.3.1. Patho-Scoring mittels der MDSGene-Kriterien

Pathogenicity scoring scheme implemented in MDSGene (www.mdsgene.org, 2020)

Pathogenicity scoring

Potential pathogenicity of reported variants is classified as "possible", "probable", or "definite" based on the following criteria: i) co-segregation with disease in the reported pedigrees and/or the number of reported mutation carriers, ii) frequency in ~120,000 ethnically diverse individuals from the gnomAD (Genome Aggregation Database) browser (<http://gnomad.broadinstitute.org/>), iii) CADD ("Combined Annotation Dependent Depletion") score as an in-silico measure of deleteriousness of genetic variants (Kircher *et al.*, 2014, Rentzsch *et al.*, 2018), and iv) reported molecular evidence from in-vivo and/or in-vitro studies. Each evidence domain was divided into four categories each accumulating specific "points", weighted by category (see Table 1). Evidence domains "co-segregation with disease" and "presence of mutation-specific positive functional data" received the strongest weights in the pathogenicity grading. Finally, points were summed across categories and pathogenicity was graded as follows: benign (<5 points), possibly pathogenic (5-9 points), probably pathogenic (10-14 points), definitely pathogenic (>14 points). Reported genetic variants that have been classified as benign using this scoring algorithm are not included in MDSGene.

Table 1. Pathogenicity scoring scheme implemented in MDSGene:

Evidence	Segregation	Frequency (gnomAD)	In-silico prediction (CADD score)	Functional studies
Least	Only a single heterozygous patient (0 points)	≥0.01 (0 points)	<10 (0 points)	Only negative reports or absence of studies (0 points)
Suggestive	≥1 biallelic patient for recessive or ≥2 single heterozygous patients for dominant genes or 1 family (i.e. ≥2 affected mutation carriers) (2 points)	0.001-0.009 (1 point)	10 to <15 (1 point)	1 positive study (2 points)
Strong	2 families (3 points)	0.0001-0.0009 (2 points)	15 to 20 (3 points)	2 positive studies or null allele (4 points)
Highest	>2 families or ≥1 de novo (6 points)	<0.0001 (3 points)	>20 (5 points)	>2 positive studies (6 points)

Abbreviations/conventions used throughout MDSGene

AAO = age at onset
 comp. het. = compound heterozygous
 het = heterozygous
 hom = homozygous
 N = number
 n.a. = not applicable
 O = other/mixed (ethnicity)
 SD = standard deviation

Note that the full names of the official gene names can be found in the EntrezGene database. In addition, country names have been abbreviated according to the official 3-letter codes recommended by the International Organization for Standardization (ISO).

A.3.2. Patho-Scoring mittels der ACMG-Kriterien

Die folgenden zwei Tabellen zeigen die Interpretation der sequenzierten genetischen Varianten nach den Standards der ACMG-Kriterien nach Richards et al., 2015 auf.

Die Tabelle 3 beinhaltet die Klassifikations-Kriterien, welche die Grundlage zur Einschätzung der Pathogenität in Tabelle 5 darstellen.

Table 3 Criteria for classifying pathogenic variants	
Evidence of pathogenicity	Category
Very strong	<p>PVS1 null variant (nonsense, frameshift, canonical ±1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multixon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease</p> <p>Caveats:</p> <ul style="list-style-type: none"> Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g., GFAP, MYH7) Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact Use caution in the presence of multiple transcripts
Strong	<p>PS1 Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change</p> <p>Example: Val→Leu caused by either G>C or G>T in the same codon</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level</p> <p>PS2 De novo (<i>both</i> maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history</p> <p>Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, and so on, can contribute to nonmaternity.</p> <p>PS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product</p> <p>Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well established.</p> <p>PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls</p> <p>Note 1: Relative risk or OR, as obtained from case-control studies, is >5.0, and the confidence interval around the estimate of relative risk or OR does not include 1.0. See the article for detailed guidance.</p> <p>Note 2: In instances of very rare variants where case-control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.</p>
Moderate	<p>PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation</p> <p>PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (Table 6) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium</p> <p>Caveat: Population data for insertions/deletions may be poorly called by next-generation sequencing.</p> <p>PM3 For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant</p> <p>Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase.</p> <p>PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants</p> <p>PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before</p> <p>Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level.</p> <p>PM6 Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity</p>
Supporting	<p>PP1 Cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease</p> <p>Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data</p> <p>PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease</p> <p>PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many <i>in silico</i> algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology</p> <p>PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p>

LOF, loss of function; OR, odds ratio.

Table 5 Rules for combining criteria to classify sequence variants

Pathogenic	(i) 1 Very strong (PVS1) AND (a) ≥ 1 Strong (PS1–PS4) OR (b) ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) OR (c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) OR (d) ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) (ii) ≥ 2 Strong (PS1–PS4) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND (a) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR (b) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) OR (c) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Likely pathogenic	(i) 1 Very strong (PVS1) AND 1 moderate (PM1–PM6) OR (ii) 1 Strong (PS1–PS4) AND 1–2 moderate (PM1–PM6) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (iv) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR (v) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (vi) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Benign	(i) 1 Stand-alone (BA1) OR (ii) ≥ 2 Strong (BS1–BS4)
Likely benign	(i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) OR (ii) ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)
Uncertain significance	(i) Other criteria shown above are not met OR (ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory

A.4. DysTract-Patienteninformation



Universitätsmedizin Rostock · PF 10 08 88 · 18055 Rostock

Deutsches Netzwerk zur translationalen Erforschung und Behandlung dystoner Erkrankungen - Registerstudie

Patienteninformation

Teilprojekt: Deutsches Dystonieregister: Verlauf, Häufigkeiten, Genetik und Ressource für klinische Studien

Vielen Dank für Ihr Interesse und Ihre Unterstützung unserer wissenschaftlichen Studie zu dystonen Erkrankungen.

Wir planen eine Reihe von Untersuchungen (Interview, klinische Untersuchung mit Videoaufnahme, Blutentnahme und Fragebögen), die wir an einem Termin durchführen möchten. Die geplanten Untersuchungen werden etwa 1 Stunde dauern.

Die Studie wird vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.

Wie äußern sich dystone Erkrankungen?

Dystonien sind durch eine verstärkte, unwillkürliche Muskelaktivität gekennzeichnet. Sie gehen mit abnormalen Bewegungen und Haltungsanomalien von Körperteilen einher. Es existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Ursachen. Bei den meisten Patienten kann jedoch keine eindeutige Ursache festgestellt werden. Erbliche Faktoren tragen nach heutiger Auffassung wesentlich zur Entstehung der Dystonien bei. Die Wahrscheinlichkeit, an einer Dystonie zu erkranken, wird unter anderem durch Mutationen (Veränderungen) in verschiedenen Genen bestimmt.



Klinik und Poliklinik für Neurologie
Klinikdirektor: Prof. Dr. Alexander Storch

Sitz: Gehlsheimer Str. 20
18147 Rostock
Direktion.Neurologie@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9511
Telefax: +49 381 494-9512

Priv.-Doz. Dr. med. C. Kamm
Oberarzt
Tel. +49 381 494-4763
Fax +49 381 494-4762
christoph.kamm@med.uni-rostock.de

Station N1 (Intensivstation und Stroke Unit)
Telefon: +49 381 494-4771
Telefax: +49 381 494-4776

Station N2
Telefon: +49 381 494-4783/-4780
Telefax: +49 381 494-4781

Station N3 Nord
Telefon: +49 381 494-4785
Telefax: +49 381 494-4787

Station N3 Süd
Telefon: +49 381 494-4790
Telefax: +49 381 494-4787

Station N4
Telefon: +49 381 494-4884
Telefax: +49 381 494-4852

Neurologische Notaufnahme
Telefon: +49 381 494-4754
Telefax: +49 381 494-4751

Spezialambulanzen:
Allgemeine Neurologie
Bewegungsstörungen
Dystonie
Tiefe Hirnstimulation
Multiple Sklerose und Neuroimmunologie
Gefäßsprechstunde
Neuromuskuläre Erkrankungen
Motoneuronenerkrankungen
Neurogenetik
Epilepsie
Schmerz
Telefon: +49 381 494-5276
Telefax: +49 381 494-9798

Labore:
Zentrallabor für Liquordiagnostik -9599
Elektrophysiologie-Labor -4746
EEG-Labor -9578
Neurosonologisches Labor -9658/-9625
Experimentelle Neurologie -9629/-9598

Homepage:
www.neurologie.med.uni-rostock.de

Universitätsmedizin Rostock – rechtsfähige Teilkörperschaft der Universität Rostock
Vorstandsvorsitzender: Prof. Dr. med. Christian Schmidt MPH · Aufsichtsratsvorsitzender: Sebastian Schröder
UST-IdNr. DE 246 101 670 · Bankverbindung: Deutsche Bundesbank · IBAN: DE1613000000013001531 · BIC: MARKDEF1130
www.med.uni-rostock.de

Was beabsichtigen wir mit der geplanten Untersuchung?

Durch die Untersuchung einer großen Zahl von Proben von genetischem Material von Patienten und Kontrollpersonen ist es möglich, die der Dystonie zu Grunde liegenden genetischen Zusammenhänge aufzuklären und Erkenntnisse über deren Einfluss auf Therapie, Ausprägung und Verlauf der Krankheit zu gewinnen. Weil erbliche Formen von Dystonie ein seltenes Krankheitsbild sind, könnte dies allerdings Jahrzehnte in Anspruch nehmen, wenn einzelne Wissenschaftler solche Proben sammeln würden.

Unser Ziel ist es daher, gemeinsam mit anderen Forschern des Deutschen Netzwerks zur Erforschung und Behandlung dystoner Erkrankungen ein „Dystonie-Register“ aufzubauen. Zusätzlich wird eine sogenannte Biobank aufgebaut, in der Blutproben verarbeitet und gelagert werden, um für Forschungsprojekte verfügbar zu sein.

Wie soll diese Biobank aussehen?

Zum Aufbau der Biobank möchten wir in den nächsten Jahren deutschlandweit etwa 3000 Proben von Dystonie-Patienten sammeln, hiervon sind 1500 Proben bereits in den Zentren verfügbar. In Lübeck sollen bis 2017 150 zusätzliche Proben gesammelt werden.

Die Untersuchung von menschlichen Biomaterialien und die Analyse der daraus gewonnenen oder zu gewinnenden Daten sind zu einem wichtigen Instrument medizinischer Forschung geworden. So wissen wir heute, dass zum Beispiel die Erbsubstanz (Gene) bei der Entstehung und Behandlung von Krankheiten eine wichtige Rolle spielt. **Deshalb fragen wir unsere Patienten/Probanden*** und daher auch Sie, ob Sie bereit sind, uns bestimmte Körpermaterialien und Daten für die Forschung zur Verfügung zu stellen. Die Körpermaterialien wie z. B. Blut, Urin oder Gewebe sollen in einer so genannten Biobank gesammelt und mit zugehörigen medizinischen Daten verknüpft werden. Diese Biobank wird betrieben von der „interdisziplinären Biomaterial- und Datenbank Würzburg“.

Ihre Teilnahme ist freiwillig. Soweit Sie sich nicht beteiligen möchten oder Ihre Zustimmung später widerrufen möchten, erwachsen Ihnen daraus keine Nachteile.

Im Folgenden informieren wir Sie über die Ziele der Biobank, die Verfahrensweisen und die Maßnahmen zum Schutz Ihrer personenbezogenen Daten, damit Sie sich auf dieser Grundlage Ihre eigene Meinung bilden und eine Entscheidung treffen können.

1. Welche Ziele verfolgt die Biobank?

Die Biobank dient der Förderung der medizinischen Forschung. Dazu sollen die gesammelten Biomaterialien und zugehörige Daten langfristig aufbewahrt werden und der Forschung zur Verfügung stehen, um die Vorbeugung, Erkennung und Behandlung von Erkrankungen zu verbessern. Das Ziel dieser Forschung ist nicht, bei Ihnen oder anderen einzelnen Personen

* Im Rahmen dieses Textes schließt die männliche Bezeichnung stets die weibliche Bezeichnung mit ein.

eine Diagnose zu erstellen oder krankheitsauslösende Veranlagungen nachzuweisen.
Vielmehr sollen bei der vergleichenden Untersuchung von größeren Personengruppen biomedizinische Zusammenhänge ermittelt werden.

2. Um welche Art von Biomaterialien und Daten handelt es sich?

Bei dem Biomaterial handelt es sich um 50ml Blut, die Ihnen zu Forschungszwecken entnommen werden sollen. Die erhobenen Daten umfassen Informationen zu Ihrer Person, insbesondere medizinische Daten. Eventuell soll bei zukünftigen Studienvisiten eine erneute Blutentnahme oder Hautbiopsie durchgeführt werden. Hierfür erfolgt eine gesonderte Aufklärung und Einwilligung.

3. Wie werden die Biomaterialien und Daten verwendet?

Die von Ihnen zur Verfügung gestellten Biomaterialien und Daten werden ausschließlich für die medizinische Forschung bereitgestellt. Sie sollen im Sinne eines breiten Nutzens für die Allgemeinheit für viele verschiedene medizinische Forschungszwecke verwendet werden. Zum aktuellen Zeitpunkt können noch nicht alle zukünftigen medizinischen Forschungsziele beschrieben werden. Diese können sich sowohl auf bestimmte Krankheitsgebiete (z. B. Krebsleiden, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Erkrankungen des Gehirns) als auch auf heute zum Teil noch unbekannte Krankheiten und genetische Defekte beziehen. Es kann also sein, dass Ihre Proben und Daten auch für medizinische Forschungsfragen verwendet werden, die wir heute noch nicht absehen können. **Deshalb werden an Ihren Biomaterialien auch genetische Untersuchungen durchgeführt, und zwar unter Umständen auch eine Untersuchung Ihrer gesamten Erbsubstanz (Genom).** Bei mit Botulinumtoxin behandelten Patienten werden zusätzlich Antikörper bestimmt. Die Biomaterialien und Daten sollen für unbestimmte Zeit aufbewahrt und für die medizinische Forschung bereitgestellt werden.

Aus logistischen Gründen ist es der Biobank nicht möglich, individuelle Eingrenzungen (z.B. Ausschluss bestimmter Forschung, Ausschluss der Weitergabe der Materialien an Dritte) vorzunehmen. Wenn Sie mit der beschriebenen Art und Dauer der Nutzung nicht in vollem Umfang einverstanden sind, sollten Sie Ihre Einwilligung nicht erteilen.

4. Welche Risiken sind mit Ihrer Spende verbunden?

a. Gesundheitliche Risiken

Wir möchten Ihnen 50 ml Blut abnehmen (das entspricht etwa drei bis vier Esslöffeln). Dies ist für Sie nur mit den geringen Risiken einer normalen Blutentnahme verbunden. An der Einstichstelle kann es zu Schmerzen kommen oder es kann ein Bluterguss (blauer Fleck) entstehen. In äußerst seltenen Fällen kann sich auch ein Blutgerinnsel (Thrombose) bilden, eine örtlich begrenzte Entzündung an der Einstichstelle auftreten oder es kann zu

dauerhaften Schädigungen von Blutgefäßen oder Nerven kommen. Im unwahrscheinlichen Falle einer Schädigung haftet die Universitätsmedizin Rostock nach den allgemeinen Haftungsgrundsätzen.

b. Weitere Risiken

Bei jeder Erhebung, Speicherung und Übermittlung von Daten aus Ihren Biomaterialien im Rahmen von Forschungsprojekten bestehen Vertraulichkeitsrisiken (z. B. die Möglichkeit, Sie zu identifizieren), insbesondere im Hinblick auf die Information zu Ihrer Erbsubstanz. Diese Risiken lassen sich nicht völlig ausschließen und steigen, je mehr Daten miteinander verknüpft werden können, insbesondere auch dann, wenn Sie selbst (z. B. zur Ahnenforschung) genetische Daten im Internet veröffentlichen. Unter Punkt 7 „Wer hat Zugang zu Ihren Biomaterialien und Daten?“ erläutern wir Ihnen genauer, wie Ihre Privatsphäre geschützt wird.

5. Welcher Nutzen ergibt sich für Sie persönlich?

Persönlich können Sie für Ihre Gesundheit keinen unmittelbaren Vorteil oder Nutzen aus der Spende Ihrer Proben und Daten erwarten. Deren Auswertung dient ausschließlich Forschungszwecken und nicht dazu, Rückschlüsse auf Ihre Gesundheit zu ziehen. Es ist jedoch im Einzelfall möglich, dass ein Forscher zu der Einschätzung gelangt, dass ein Auswertungsergebnis für Ihre Gesundheit von erheblicher Bedeutung ist. Das ist insbesondere der Fall, wenn sich daraus ein dringender Verdacht auf eine schwerwiegende, bisher möglicherweise nicht erkannte Krankheit ergibt, die behandelt oder deren Ausbruch verhindert werden könnte. In einem solchen Fall kann eine Rückmeldung an Sie erfolgen (siehe unten Punkt 9).

Falls Sie keine Rückmeldung erhalten möchten, streichen Sie bitte die Möglichkeit einer erneuten Kontaktaufnahme (siehe auch unten Punkt 9). Sie können Ihre Entscheidung für oder gegen eine Rückmeldungsmöglichkeit jederzeit durch Mitteilung an uns ändern. Beachten Sie dabei, dass Sie Gesundheitsinformationen, die Sie durch eine solche Rückmeldung erhalten, unter Umständen bei anderen Stellen (z. B. vor Abschluss einer Kranken- oder Lebensversicherung) offenbaren müssen und dadurch Nachteile erleiden können. Da auch Untersuchungen Ihrer Erbsubstanz vorgesehen sind, kann sich der vorstehende Text auch auf Ihre genetische Veranlagung für bestimmte Erkrankungen beziehen. Informationen zu Ihrer Erbsubstanz können auch Bedeutung für Ihre Familienangehörigen und die Familienplanung haben.

Publikationen, die aus den Studiendaten entstehen, sollen über das Internet zugänglich gemacht werden (www.rarediseasesnetwork.org/dystonia und www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez). Die weitere ärztliche Behandlung in unseren Sprechstunden erfolgt unabhängig von der Studienteilnahme (d. h. nicht teilnehmende Patienten werden keinerlei Nachteile haben). Durch die Untersuchung entstehen

teilnehmenden Patienten keine Kosten. Im Rahmen der Studie möglicherweise neu entwickelte diagnostische Tests und Medikamente für Dystonien können zu finanziellem Gewinn führen, an dem teilnehmende Patienten nicht beteiligt werden.

6. Welcher Nutzen ergibt sich für unsere Gesellschaft?

Medizinisch-wissenschaftliche Forschungsvorhaben zielen auf eine Verbesserung unseres Verständnisses der Krankheitsentstehung und der Diagnosestellung und auf dieser Basis auf die Neuentwicklung von verbesserten Behandlungsansätzen. Informationen über die Aktivitäten der Biobank finden Sie unter www.ibdw.ukw.de.

7. Wer hat Zugang zu Ihren Biomaterialien und Daten und wie werden sie geschützt?

- a. Alle unmittelbar Ihre Person identifizierenden Daten (Name, Geburtsdatum, Anschrift etc.) werden unverzüglich nach Gewinnung der Biomaterialien durch einen Identifizierungscode ersetzt (pseudonymisiert). Erst in dieser Form werden die Biomaterialien und Daten für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.
- b. Die Sie unmittelbar identifizierenden Daten bleiben in der Einrichtung, in der die Proben und Daten gewonnen wurden, und werden dort getrennt von den Biomaterialien und medizinischen Daten gespeichert. Die Proben und Daten können deshalb nicht ohne Mitwirkung dieser Einrichtung Ihrer Person zugeordnet werden. Eine solche Zuordnung erfolgt nur, um zusätzliche Daten aus Ihren Krankenunterlagen zu ergänzen oder erneut mit Ihnen in Kontakt zu treten, falls Sie der Kontaktaufnahme zugestimmt haben (siehe unten Punkt 9). **Eine Weitergabe der Ihre Person identifizierenden Daten an Forscher oder andere unberechtigte Dritte, etwa Versicherungsunternehmen oder Arbeitgeber, erfolgt nicht.**
- c. Die kodierten Biomaterialien und medizinischen Daten können für genauer bestimmte medizinische Forschungszwecke nach zuvor festgelegten Kriterien an Universitäten, Forschungsinstitute und forschende Unternehmen, ggf. auch im Ausland, weitergegeben werden. Dabei werden die Daten unter Umständen auch mit medizinischen Daten in anderen Datenbanken verknüpft, sofern die gesetzlichen Voraussetzungen hierfür erfüllt sind. Andere Wissenschaftler des Konsortiums können auf Antrag Untersuchungen an den Proben durchführen, jeder solche Antrag wird vom „Steuerungskomitee“ des Konsortiums und von den zuständigen Ethikkommissionen geprüft.
Biomaterialien und Daten, die an Forscher herausgegeben wurden, dürfen nur für den vorbestimmten Forschungszweck verwendet und vom Empfänger nicht zu anderen Zwecken weitergegeben werden. Nicht verbrauchtes Material wird an die Biobank zurückgegeben oder vernichtet.
- d. Voraussetzung für die Verwendung der Biomaterialien und Daten für ein konkretes medizinisches Forschungsprojekt ist grundsätzlich, dass das Forschungsvorhaben durch eine Ethik-Kommission bewertet wurde.

- e. Wissenschaftliche Veröffentlichungen von Ergebnissen erfolgen ausschließlich anonymisiert, also in einer Form, die keine Rückschlüsse auf Ihre Person zulässt. Eine Veröffentlichung der Gesamtheit Ihrer Erbinformation (Gesamtgenom) ist ohne Ihre ausdrückliche schriftliche Einwilligung ausgeschlossen.

8. Erlangen Sie oder die Biobank einen finanziellen Vorteil aus der Nutzung Ihrer Biomaterialien und Daten?

Für die Überlassung Ihrer Biomaterialien und Daten erhalten Sie kein Entgelt. Sollte aus der Forschung ein kommerzieller Nutzen erzielt werden, werden Sie daran nicht beteiligt.

Mit der Überlassung der Biomaterialien an die „interdisziplinäre Biomaterial- und Datenbank Würzburg“, werden diese Eigentum der „interdisziplinären Biomaterial- und Datenbank Würzburg“. Ferner ermächtigen Sie die „interdisziplinäre Biomaterial- und Datenbank Würzburg“ Ihre Daten zu nutzen. Die Biobank verwendet Ihre Biomaterialien und Daten ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke. Die Proben und Daten werden nicht verkauft. Die Biobank kann jedoch für die Bereitstellung der Biomaterialien und Daten von den Nutzern eine Aufwandsentschädigung erheben.

9. Erfolgt eine erneute Kontaktaufnahme mit Ihnen?

Zur Erhebung von weiteren Verlaufsdaten kann es sinnvoll werden, zu einem späteren Zeitpunkt erneut Kontakt mit Ihnen aufzunehmen, um ergänzende Informationen und/oder Biomaterialien von Ihnen zu erbitten. Zudem kann die erneute Kontaktaufnahme genutzt werden, um z. B. Ihre Einwilligung in die Verknüpfung mit medizinischen Daten aus anderen Datenbanken einzuholen oder Ihnen /Ihrem behandelnden Arzt/Studienarzt/ Ihrem Hausarzt eine Rückmeldung über für Sie gesundheitlich relevante Ergebnisse zu geben (siehe oben Punkt 5). Im Falle einer erneuten Kontaktaufnahme würde sich das die Daten erhebende Institut direkt mit Ihnen in Verbindung setzen. Falls Sie eine erneute Kontaktaufnahme nicht wünschen, kreuzen Sie bitte das entsprechende Kästchen in der Einwilligungserklärung an.

10. Was beinhaltet Ihr Widerrufsrecht?

Sie können Ihre Einwilligung zur Verwendung Ihrer Biomaterialien und Daten jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für Sie widerrufen.

Im Falle des Widerrufs können Sie entscheiden, ob Ihre Biomaterialien vernichtet werden sollen oder in anonymisierter Form für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden dürfen. Anonymisierung bedeutet, dass der Identifizierungscode gelöscht wird, über den ermittelt werden kann, von welcher Person die Probe stammt (siehe oben Punkt 8a/b). Eine solche Anonymisierung Ihrer Biomaterialien kann eine spätere Zuordnung des genetischen Materials zu Ihrer Person über andere Quellen allerdings niemals völlig ausschließen. Ebenso können Sie entscheiden, ob Ihre bereits erhobenen Daten gelöscht werden sollen oder in

anonymisierter Form weiterverwendet werden dürfen. Eine Datenlöschung kann allerdings nur erfolgen, soweit dies mit zumutbarem technischem Aufwand möglich ist. Sobald der Bezug der Biomaterialien und der übrigen Daten zu Ihrer Person gelöscht wurde (Anonymisierung), ist eine Vernichtung nicht mehr möglich. Zudem können Daten aus bereits durchgeföhrten Analysen nicht mehr entfernt werden.

Wenden Sie sich für einen Widerruf bitte an: Jennie Hampf, Institut für Neurogenetik, CBBM, UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck.

11. Wo kann ich weitere Informationen erhalten?

Sollte Ihnen etwas unklar sein, fragen Sie bitte Ihren behandelnden Arzt bzw. Ihren Studienarzt, bevor Sie Ihre Zustimmung erteilen. Sie können sich wegen Rückfragen auch zu einem späteren Zeitpunkt an folgende Personen wenden:

Herr PD Dr. med. Christoph Kamm (Oberarzt der Klinik für Neurologie und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock)

Tel. 0381-494-4769, e-mail: christoph.kamm@med.uni-rostock.de

Frau Susanna Lahgeloh (Studienkoordinatorin)

Tel.: 0451- 3101 8216, e-mail: susanna.langeloh@neuro.uni-luebeck.de

Frau Jennie Hampf (Studienärztin)

Tel.: 0451- 3101 7522, e-mail: jennie.hampf@neuro.uni-luebeck.de

Prof. Dr. med. C. Klein (Direktorin des Instituts für Neurogenetik)

Tel.: 0451- 3101 8200, e-mail: christine.klein@neuro.uni-luebeck.de

Studienplan: Wie läuft die Untersuchung ab?

Patienten, die an der Studie teilnehmen, werden von einem Arzt oder ausgebildetem Studienpersonal untersucht, um das Ausmaß und den Schweregrad der Dystonie festzustellen. Es wird ein standardisiertes Video erstellt, das auch Aufnahmen des Gesichtes beinhaltet. Dadurch ist möglich, dass einzelne Patienten auf der Videoaufnahme von Personen, die Zugang zu den Daten haben, erkannt werden.

Anschließend wird eine Blutprobe entnommen, aus welcher DNA (unsere Erbsubstanz) extrahiert und im Institut für Neurogenetik aufbewahrt sowie Antikörper bestimmt werden. Außerdem werden die klinischen Daten in einer gemeinsamen, deutschlandweiten Datenbank gespeichert. Diese Datenbank wird gemäß aktueller Vorschriften vor unbefugtem Zugriff geschützt. Alle Untersuchungen sowie die Datenspeicherung erfolgen dabei pseudonymisiert gemäß dem Bundesdatenschutzgesetz (§§ 39 – 41 BDSG 254). Dies heißt, dass persönliche Daten verschlüsselt unter Vergabe eines Codes gespeichert werden.

Falls Sie weitere Fragen haben, bitte sprechen Sie uns gern an!

A.5. DysTract-Einwilligungserklärung



Universitätsmedizin Rostock · PF 10 08 88 · 18055 Rostock

**Deutsches Netzwerk zur translationalen
Erforschung und Behandlung dystoner
Erkrankungen - Registerstudie**

Einwilligungserklärung

Patient/Proband (Name, Vorname): _____

Geb.-Datum: _____

Ich willige ein, dass meine Biomaterialien und Daten, wie in der Informationsschrift beschrieben, an die „Interdisziplinäre Biomaterial- und Datenbank Würzburg“ gegeben und für medizinische Forschungszwecke verwendet werden. Ich willige ein, dass die Zwecke wissenschaftlich-medizinischer Forschung, für die meine Biomaterialien und Daten verwendet werden, nicht eingegrenzt werden.

Das Eigentum an den Biomaterialien übertrage ich an die „interdisziplinäre Biomaterial- und Datenbank Würzburg“. Ich habe die Informationsschrift gelesen und hatte die Gelegenheit, Fragen zu stellen. Ich weiß, dass meine Teilnahme freiwillig ist und ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile entstehen.

Ich willige ein, dass ich evtl. zu einem späteren Zeitpunkt erneut kontaktiert werde (falls nicht gewünscht, bitte „nein“ ankreuzen):

**Klinik und Poliklinik für
Neurologie**

Klinikdirektor: Prof. Dr. Alexander Storch

Sitz: Gehlsheimer Str. 20
18147 Rostock

Direktion.Neurologie@med.uni-
rostock.de
Telefon: +49 381 494-9511
Telefax: +49 381 494-9512

Priv.-Doz. Dr. med. C. Kamm
Oberarzt
Tel. +49 381 494-4763
Fax +49 381 494-4762
christoph.kamm@med.uni-rostock.de

Station N1 (Intensivstation und Stroke
Unit)
Telefon: +49 381 494-4771
Telefax: +49 381 494-4776

Station N2
Telefon: +49 381 494-4783/-4780
Telefax: +49 381 494-4781

Station N3 Nord
Telefon: +49 381 494-4785
Telefax: +49 381 494-4787

Station N3 Süd
Telefon: +49 381 494-4790
Telefax: +49 381 494-4787

Station N4
Telefon: +49 381 494-4884
Telefax: +49 381 494-4852

Neurologische Notaufnahme
Telefon: +49 381 494-4754
Telefax: +49 381 494-4751

Spezialambulanzen:
Allgemeine Neurologie
Bewegungsstörungen
Dystonie
Tiefe Hirnstimulation
Multiple Sklerose und Neuroimmunologie
Gefäßspezialstunde
Neuromuskuläre Erkrankungen
Motoneuronerkrankungen
Neurogenetik
Epilepsie
Schmerz
Telefon: +49 381 494-5276
Telefax: +49 381 494-9798

Labore:
Zentrallabor für Liquordiagnostik -9599
Elektrophysiologie-Labor -4746
EEG-Labor -9578
Neurosonologisches Labor -9658/-9625
Experimentelle Neurologie -9629/-9598

Homepage:
www.neurologie.med.uni-rostock.de

- zum Zweck der Gewinnung weiterer Informationen / Biomaterialien, nein
 - zum Zweck der Einholung meiner Einwilligung in die Verknüpfung mit medizinischen Daten aus anderen Datenbanken, nein
 - zum Zweck der Rückmeldung für mich gesundheitsrelevanter Ergebnisse nein
- Diese Rückmeldung soll erfolgen über die Einrichtung, in der meine Biomaterialien / Daten gewonnen wurden oder über folgenden Arzt (falls gewünscht, bitte angeben):

Name und Anschrift des Arztes:

Datenschutzerklärung:

Ich willige ein, dass das *Institut für Neurogenetik des UKSH Campus Lübeck* wie in der Information beschrieben

- personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, von mir erhebt und speichert,
- weitere personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit aus meinen Krankenunterlagen entnimmt,
- und die Daten gemeinsam mit meinen Biomaterialien pseudonymisiert (d.h. kodiert) an die „interdisziplinäre Biomaterial- und Datenbank Würzburg“ für medizinische Forschungsvorhaben zur Verfügung stellt.

Meine Biomaterialien und Daten dürfen unbefristet für medizinische Forschungsvorhaben verwendet werden.

Sie dürfen pseudonymisiert an Universitäten, Forschungsinstitute und forschende Unternehmen zu Zwecken medizinischer Forschung weitergegeben werden. Dies schließt unter Umständen auch die Weitergabe für Forschungsprojekte im Ausland mit möglicherweise niedrigerem Datenschutzniveau ein.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung gegenüber der „interdisziplinären Biomaterial- und Datenbank Würzburg“ ohne Angabe von Gründen jederzeit widerrufen kann. Beim Widerruf werden auf mein Verlangen die verbliebenen Biomaterialien und die erhobenen Daten vernichtet bzw. gelöscht oder anonymisiert. Daten aus bereits durchgeföhrten Analysen können nicht mehr entfernt werden.

Eine Kopie der Patienten-/Probandeninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt bei der Klinik für Neurologie und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock.

Name des Patienten/Probanden in Druckbuchstaben

Ort, Datum (vom Patienten/Probanden einzutragen), Unterschrift des Patienten/Probanden

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Patienten/Probanden eingeholt.

Name der aufklärenden Person in Druckbuchstaben

Ort, Datum, Unterschrift der aufklärenden Person

A.6. DysTract-Pseudonymisierungsblatt



Dystonia Translational Research and
Therapy Consortium

PSEUDONYMIZED DATASHEET

PARTICIPANT DETAILS

Subject Name: Last Name: _____ First Name: _____ Middle Initial: _____

Date of Birth: Month: _____ Day: _____ Year: _____

Participant address: Street: _____

City: _____ State/province: _____

Country: _____ Postal code: _____

Phone number: _____ Email: _____

Register ID

Primärproben-Labeling

LABEL 1 (EDTA-PROBE)

LABEL 2 (EDTA-PROBE)

LABEL 3 (SERUM-PROBE)

A.7. DysTract-Anamnesebogen



Dystonia Translational Research and
Therapy Consortium

INTAKE FORM

Register ID

PART I: PARTICIPANT DETAILS

Age in years: _____

Gender: Female Male

Ethnicity (check one):

- Caucasian
- African - Black
- African - North
- American - Latin
- Asian - West
- Asian - East
- mixed
- other
- unknown

Informed Consent signed on: Month: _____ Day: _____ Year: _____

PART II: BIOREPOSITORY INTAKE

Visit Date: Month: _____ Day: _____ Year: _____

What type of visit is this? Initial Follow-up

Participant is interested in completing follow-up visits: Yes No

Submitting Site: _____ Investigator Name: _____

Current examination data provided by (check one): Neurologist Other: _____

Sample sent to Biobase Würzburg: Yes, date: Month: _____ Day: _____ Year: _____ No

Country of residence: _____ City & State of residence: _____

Country of birth: _____ City & State of birth: _____

Handedness: Left Right Ambidextrous Unknown

Body weight (in kg): _____

Height (in m): _____

PART III: DYSTONIA HISTORY AND OTHER MEDICAL CONDITIONS

Best Clinical Diagnosis for dystonia (Check one):

Focal dystonias:

- Cranial dystonia, blepharospasm only
- Cranial dystonia, upper and lower facial involvement
- Cranial dystonia, oromandibular dystonia
- Cranial dystonia, lingual
- Laryngeal dystonia, adductor type
- Laryngeal dystonia, abductor type
- Laryngeal dystonia, combined adductor and abductor type
- Cervical dystonia
- Limb dystonia: Lower extremity dystonia
- Limb dystonia: Upper extremity dystonia

Segmental dystonia

Hemi-dystonia

- Left
- Right

Multi-focal dystonia

Generalized dystonia

Etiology

Structural brain lesion (Check one): No evidence of degeneration or structural lesion

Static lesions Degeneration

Has genetic testing ever been completed? Yes No Unknown

If inherited: proven genetic origin: Yes No

If yes, what was tested and what was the result? _____

Acquired (Check one): Not known

Vascular (ischemia, haemorrhage, arteriovenous

 malformation)

Infection (eg viral encephalitis)

Neoplastic (brain tumor, paraneoplastic

Drug (eg dopamine receptor blocking

 encephalitis)

 drugs)

Brain injury

Toxic (eg cynide)

Psychogenic (functional)

Idiopathic(Check one): Sporadic

Familial

Received any surgical treatment for dystonia? Yes (mark type below) No Unknown

If yes, then mark all surgical treatments with their required details that have been performed so far.

- | | | | |
|--|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> DBS | <input type="checkbox"/> Gpi | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| | <input type="checkbox"/> Subthalamus | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| | <input type="checkbox"/> Thalamus | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| | <input type="checkbox"/> Other _____ | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| <input type="checkbox"/> Ablation | <input type="checkbox"/> Pallidotomy | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| | <input type="checkbox"/> Subthalamotomy | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| | <input type="checkbox"/> Thalamotomy | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| | <input type="checkbox"/> Other _____ | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| <input type="checkbox"/> Myectomy for blepharospasm or spasmodic dysphonia | | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| <input type="checkbox"/> Laryngeal nerve surgery for spasmodic dysphonia | | <input type="checkbox"/> Left, Date _____ | <input type="checkbox"/> Right, Date _____ |
| <input type="checkbox"/> Selective denervation for cervical dystonia | | Date _____ | |
| <input type="checkbox"/> Other (specify details and date) _____ | | Date _____ | |

Age at onset of dystonia (Years): _____

Site of Dystonia Onset: In all body regions where there is currently evidence of dystonia or where dystonia has been in the past, please indicate age of onset for those body regions. Try to limit initial site of onset to one body part. If bilateral onset, please select left and right for that body part.

Body Region	Left	Right	Age of onset	Initial site of onset?	
				Yes	No
Upper face					
Lower face					
Shoulder					
Upper arm					
Hand					
Upper leg					
Foot					
Tongue					
Jaw					
Neck					
Trunk					
Pelvis					
Larynx					

Other characteristics of dystonia:

1. Task-specific

Yes (If yes is selected, please choose the particular ones from the list below)

- writer's cramp
 - typist's cramp
 - musician's cramp
 - sports related cramp
 - speech related dystonia (spasmodic dysphonia)
 - other _____

Did dystonia have abrupt onset (less than 1 week)?

- Did dystonia have abrupt onset (ie, sudden onset)?

3 Was dystonia fixed at onset?

- Was dyslexia like

4 Is there any useful sensory trick?

- Yes No If yes, please describe

5. Has alcohol relieved the dystonia?

- Yes No Unknown

Medical History: Does the subject have a history of any of the following? (check all that apply. If more than one trauma or surgery to a body part, please record and in the web database enter in additional notes):

- Stroke Yes No
 - Depression Yes No
 - Anxiety-related disorders Yes No
 - Serious trauma or surgery to head Yes No (if yes, give year(s) _____)
 - Serious trauma or surgery to face Yes No (if yes, give year(s) _____)
 - Serious trauma or surgery to neck Yes No (if yes, give year(s) _____)
 - Diagnosis of vocal cord paralysis Yes No (if yes, give year(s) _____)
 - Serious trauma or surgery to limb(s) Yes No (if yes, give year(s) _____)
 - Upper respiratory infection just prior (within 2 weeks)
to onset of dystonia Yes No
 - Tremor Yes No
 - Parkinson disease or parkinsonism Yes No
 - Tics or Tourette Syndrome Yes No
 - Other neurological condition Yes No If yes, specify: _____
 - Other psychiatric condition Yes No If yes, specify: _____

Current psychiatric disorders:

- Yes
 - No

If yes is selected, please choose from the list below (Check all that apply).

- Depression
 - Anxiety-related disorders
 - Other psychiatric condition

Medication

- Did participant receive botulinum toxin (BTX) injections at today's visit? Yes No Unknown
- Did participant receive BTX previously? Yes, date: _____ No Unknown

If yes, then:

- Which preparation was used last time? NeuroBloc Botox Dysport Xeomin
- With which total dose was participant treated last time? _____

If treated with botulinum toxin before:

- How often has participant so far been treated with botulinum toxin? (Check one)
1 – 3 times
3 – 10 times
10 – 50 times
50 – 100 times

- With which interval between the last two botulinum toxin treatments (in weeks) _____
- Has participant been previously treated with various botulinum toxin preparations?

 Yes No Unknown

- Is participant currently on any medication? Yes No Unknown

If yes, list medication here (name only):

1. _____

11. _____

2. _____

12. _____

3. _____

13. _____

4. _____

14. _____

5. _____

15. _____

6. _____

16. _____

7. _____

17. _____

8. _____

18. _____

9. _____

19. _____

10. _____

20. _____

PART IV: EXAMINATION:

Source of data: direct exam video review
Is DBS: On Off N/A

Please indicate which body regions are affected by dystonia and laterality, if applicable. If tremor is present for any body region, please indicate whether the tremor is regular, irregular/jerky, or both. If both, check both boxes on the paper form. If subject has tremor but no dystonia in a particular body region, only check the boxes pertaining to tremor. Do not check the left or right boxes which pertain only to the subject's dystonia.

Body Region	Dystonia		Tremor			
	Left	Right	Left	Right	Left	Right
Upper face						
Lower face						
Shoulder						
Upper arm						
Hand						
Upper leg						
Foot						
Tongue						
Jaw						
Neck						
Trunk						
Pelvis						
Larynx						

Larynx confirmed by nasopharyngoscopy? Yes No Don't know

If any of the tremor boxes are checked, then

- Is this patient's dystonia dominated by tremor more than tonic or twisting movements? Yes No
➤ Did tremor precede onset of dystonia? Yes No
➤ Age of onset of tremor: _____

Does the participant have any other relevant neurological abnormalities? Yes No
If yes, specify:

bradykinesia rigidity rest tremor myoclonus chorea ataxia

PART V: FAMILY HISTORY

➤ **Ethnic category of grandparents: (ancestors' countries of origin):**

Maternal Grandmother	<input type="checkbox"/> Caucasian <input type="checkbox"/> African - Black <input type="checkbox"/> African - North <input type="checkbox"/> American - Latin <input type="checkbox"/> Asian - West <input type="checkbox"/> Asian - East <input type="checkbox"/> mixed <input type="checkbox"/> other <input type="checkbox"/> unknown	Country of Origin
Paternal Grandmother	<input type="checkbox"/> Caucasian <input type="checkbox"/> African - Black <input type="checkbox"/> African - North <input type="checkbox"/> American - Latin <input type="checkbox"/> Asian - West <input type="checkbox"/> Asian - East <input type="checkbox"/> mixed <input type="checkbox"/> other <input type="checkbox"/> unknown	Country of Origin
Maternal Grandfather	<input type="checkbox"/> Caucasian <input type="checkbox"/> African - Black <input type="checkbox"/> African - North <input type="checkbox"/> American - Latin <input type="checkbox"/> Asian - West <input type="checkbox"/> Asian - East <input type="checkbox"/> mixed <input type="checkbox"/> other <input type="checkbox"/> unknown	Country of Origin
Paternal Grandfather	<input type="checkbox"/> Caucasian <input type="checkbox"/> African - Black <input type="checkbox"/> African - North <input type="checkbox"/> American - Latin <input type="checkbox"/> Asian - West <input type="checkbox"/> Asian - East <input type="checkbox"/> mixed <input type="checkbox"/> other <input type="checkbox"/> unknown	Country of Origin

➤ **Dystonia present in any other family members?**

- Yes (Complete two tables below.)
 No (Skip two tables below.) Unknown (Skip two tables below.)

Family members	Age of onset	Type of dystonia (please mark)					Observation or diagnosed (please mark)	
		Focal	Seg-mental	Hemi	Multi-Focal	Gener-alized	observed	diagnosed
Mother								
Father								
Brother(s)								
Sister(s)								
Half-brother (Maternal)								
Half-brother (Paternal)								
Half-sister (Maternal)								
Half-sister (Paternal)								
Son(s)								
Daughter(s)								

Family members	Affected	Unaffected	Unknown
Mother			
Father			
Family members	Numbers affected	Numbers unaffected	Numbers unknown
Brother(s)			
Sister(s)			
Daughter(s)			
Son(s)			

➤ **Family members already collected in this study? (Fill out to your best knowledge)**

Yes Register ID: _____ Relationship to the individual: _____
 No Unknown (for example, subject adopted)

➤ **Has genetic testing ever been completed for a family member with dystonia?**

Yes No Unknown
If yes, what was tested and what was the result? _____

➤ **Does any family member have the diseases listed below? If yes, mark all affected.**

	Mother	Father	Brother(s)	Sister(s)	Sons(s)	Daughter(s)
Parkinson disease or parkinsonism	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown					
Tremor	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown					
Myoclonus	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown					

➤ **Family consanguinity:** Yes No Unknown

➤ **Family pedigree** (Optional): If available, can be uploaded as PDF file.

PART VI: RATING SCALES AND VIDEO TRACKING SHEET

RATING SCALES

Rating Scales	Score	Date of rating month/day/year	Scale completed after in-person exam OR after video review
Quality of Life Scale (SF-36)			
Hospital Anxiety Depression Scale (HADS)			
Beck Depression II (BDI II)			
Liebowitz Social Anxiety Scale (LSAS)			
Patient Health Questionnaire 9 (PHQ9)			
EQ-5D-3L			
Global Dystonia Rating Scale (GDRS)			
Fahn Marsden Rating Scale (FM)			

VIDEO

Video completed?	Exam protocol version	Date of video month/day/year
<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Version 28	

Form completed by: _____
Print name _____ Signature _____ Date _____

VIDEO EXAM PROTOCOL – WORKSHEET

Study #: _____ Date: _____

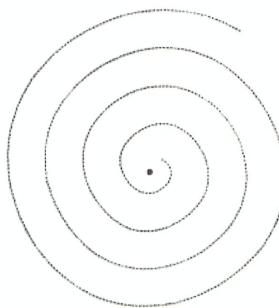
1. Write the following sentence three times with your usual writing hand: Today is a nice day.

2. Write the following sentence three times with your other hand: Today is a nice day.

3. Copy the following spiral with each hand, starting near the dot for each hand and working out.

Left hand

Right hand



4. ●

Vs 6: 8 April 2016

Staff signature: _____

GLOBAL DYSTONIA RATING SCALE

(Movement Disorders, 18: 303-312, 2003)

Patient: _____

DOB: _____

Date examined: _____

Date scored: _____

Evaluator: _____

Evaluator signature: _____

Source of Score: direct exam video review

BODY REGION SCORED	CLINICAL NOTES (Optional)	Score (0-10)	
EYES & UPPER FACE			
LOWER FACE (including platysma)			
JAW & TONGUE			
LARYNX (including pharynx)			
NECK			
SHOULDER & PROXIMAL ARM		R	L
ELBOW, DISTAL ARM, HAND		R	L
PELVIS & UPPER LEG		R	L
DISTAL LEG & FOOT		R	L
TRUNK			
TOTAL SCORE (Sum of all body parts)			

Rate the patient according to body part indicated from 1-10, in relationship to all patients. A score of 0 is no dystonia in that body area. A score of 5 is moderate dystonia. A score of 10 is the most severe dystonia encountered. If the dystonia changes during the examination, rate the maximal dystonia. For mixed motor syndromes, rate only dystonia and not the other components.

FAHN-MARSDEN DYSTONIA SCALE

(Neurology 35:73-77, 1985)

Patient: _____

DOB: _____

Date examined: _____

Date scored: _____

Evaluator: _____

Evaluator signature: _____

Source of score: direct exam video review

EYES	Severity factor		Provoking factor	
	none	0	none	0
	occasional exaggerated blinking	1	only on particular actions	1
	frequent blinking without spasm	2	on many actions	2
	some spasms, but eyes mostly open	3	on action of a distant body part or intermittently at rest	3
	prolonged spasms with eyes closed at least 30% of time	4	present at rest	4

MOUTH	Severity factor		Provoking factor	
	none	0	none	0
	infrequent mouth, tongue, or jaw movement	1	only on particular actions	1
	frequent abnormal movements, but <50% time	2	on many actions	2
	abnormal movements >50% time	3	on action of a distant body part or intermittently at rest	3
	severe, nearly constant movement	4	present at rest	4

SPEECH/SWALLOWING	Severity factor		Provoking factor	
	normal	0	normal	0
	slight indistinct speech or occasional choking	1	either or both occasionally	1
	sometimes difficult to understand or frequent choking	2	either frequently	2
	very difficult to understand or inability to swallow solids	3	one frequent, other occasional	3
	almost anarthric or unable to swallow solids or liquids	4	both frequent	4

NECK	Severity factor		Provoking factor	
	none	0	none	0
	slight occasional pulling	1	only on particular actions	1
	obvious but mild pulling	2	on many actions	2
	moderate pulling	3	on action of a distant body part or intermittently at rest	3
	extreme pulling	4	present at rest	4

Version 3: 15 August 2014

TRUNK	Severity factor		Provoking factor	
	none	0	none	0
	slight occasional bending	1	only on particular actions	1
	obvious bending, but insufficient to impair gait	2	on many actions	2
	moderate bending causing gait impairment	3	on action of a distant body part or intermittently at rest	3
	severe bending prevents walking	4	present at rest	4

UPPER LIMB	Severity factor		Provoking factor	
	none	R 0 L 0	none	R 0 L 0
	slight but clinically insignificant	R 1 L 1	only on particular actions	R 1 L 1
	obvious, interferes with some movements but not disabling	R 2 L 2	on many actions	R 2 L 2
	moderate, with significant impairment of limb use	R 3 L 3	on action of a distant body part or intermittently at rest	R 3 L 3
	severe, with no practical limb use	R 4 L 4	present at rest	R 4 L 4

LOWER LIMB	Severity factor		Provoking factor	
	none	R 0 L 0	none	R 0 L 0
	slight but clinically insignificant	R 1 L 1	only on particular actions	R 1 L 1
	obvious, interferes with some movements but not disabling	R 2 L 2	on many actions	R 2 L 2
	moderate, with significant impairment of limb use	R 3 L 3	on action of a distant body part or intermittently at rest	R 3 L 3
	severe, with no practical limb use	R 4 L 4	present at rest	R 4 L 4

SCORING	Severity	Provoking	Weight	Total
Eyes			0.5	
Mouth			0.5	
Speech/swallow			1.0	
Neck			0.5	
Trunk			1.0	
Right upper limb			1.0	
Left upper limb			1.0	
Right lower limb			1.0	
Left lower limb			1.0	

A.8. DysTract-Videoprotokoll



Dystonia Translational Research
and Therapy Consortium

VIDEO UNTERSUCHUNGSANLEITUNG

Generelle Instruktionen (von Anfang an):

Schuhe und Strümpfe aus, lange Hose hochkremeln, damit man die Füße sehen kann.
Brille + Schal + Schmuck abnehmen, Kaugummi o.ä. aus dem Mund nehmen. Lange Haare vom Hals wegbinden mit einem Haargummi oder Clip.

- Stativ benutzen. Um Schatten vorzubeugen, starke Decken- oder Hintergrundbeleuchtung vermeiden. Mehr Licht auf dem Gesicht als im Hintergrund.
- Jeder Teil sollte als separater Clip aufgenommen und dann vor dem Speichern zusammengefügt werden, um unnötiges Filmmaterial zu vermeiden.
- Wenn nicht anders angegeben, in Frontalansicht filmen
- CAVE: keiner außer dem Patienten darf gefilmt werden
- Pat. Namen, Geburtsdatum oder andere identifizierende Angaben im Video vermeiden
- Zu Beginn: „*This is subject >>REGISTER-ID<< enrolled at ... on (mm/dd/yyyy)*“ abfilmen

Teil I: Prob. sitzt im Stuhl ohne Kopfstütze, Füße flach auf dem Boden, Hände flach im Schoß.
Kameraeinstellung: nur Kopf und Schultern. Sichergehen, dass das gesamte Gesicht erfasst wird.

1. In Ruhe, Augen öffnen für **10 Sek.**
2. In Ruhe, Augen sacht schließen für **10 Sek.**
3. In Ruhe, Augen wieder öffnen für **10 Sek.**
4. **5mal** Augen zukneifen für **1 Sek.**, dann Augen öffnen und für jeweils **10 Sek.** beobachten
5. Folgende Sätze oder Laute einmal laut vorsagen und den Prob. bitten, diese laut zu wiederholen:
 - a . Dritte reitende Artilleriebrigade.
 - b . Liebe Lilly Lehmann.
 - c . Fischer Fritz fischt frische Fische.
 - d . Blaukraut bleibt Blaukraut und Brautkleid bleibt Brautkleid
 - e . TaTaTa
 - f . GaGaGa
 - g . PaPaPa
6. Den Prob. bitten folgende Vokalläute zu halten (**5 Sek.**)
 - a. AHHHHHHHHHHHH
 - b. Iiiiiiiiiiiiiiiiiiihhhh
7. Zunge so weit wie möglich rausstrecken und **5 Sek.** halten lassen
8. **2mal** den Mund so weit wie möglich öffnen und schließen lassen
9. Fragen: „Haben Sie Schwierigkeiten mit dem Schlucken?“ Falls ja: „Gelegentlich oder häufig?“

10. Fragen: „Verschlucken Sie sich?“ Falls ja: „gelegentlich oder häufig?“

Teil II: Prob. sitzt im Stuhl wie vorher

Kameraeinstellung: Oberkörper inkl. Kopf und obere Extremitäten.

11. In Ruhe, Augen **geschlossen**: Prob. soll den Kopf in die komfortabelste Position ziehen lassen (= dyst. Position) **10 Sek.**
12. In Ruhe, Augen **geöffnet**: Prob. soll **1 Min.** Kopf in Mittellinie gerade halten. Für initiale Pos. ggf. verbal helfen. Wenn sich die Kopfposition verändert → NICHT korrigieren.
13. Jeweils max. Bewegungsausmaß:
 - a . Den Kopf erst nach rechts, dann nach links drehen, jeweils soweit wie möglich. Jede Position für **5 Sek.** halten.
 - b . Das Ohr zur rechten, dann zur linken Schulter neigen, jeweils soweit wie möglich. Jede Position für **5 Sek.** halten.
 - c . Nach oben schauen und den Hals strecken, dann nach unten schauen und den Hals beugen, Beides so weit wie möglich. Jede Position für **5 Sek.** halten.

Teil III: Worksheet: Patient sitzt am Tisch. Beide Ärmel des Probanden hochkrempelein, einen stabilen Schreibtisch verwenden, keine Tricks oder Kompensationen erlauben, die nicht-aktive Hand sollte auf dem Tisch ruhen ohne das Papier fest zu halten (Papier mit Klebestreifen befestigen, eventuell Brille aufsetzen).

Kameraeinstellung: Frontalansicht, Oberkörper und Kopf inkl. Arme und Tisch/Papier.

14.
 - a . „Heute ist ein schöner Tag“ **3mal** mit der dominannten Hand in das dazugehörige Erfassungsformular schreiben
 - b . „Heute ist ein schöner Tag“ **3mal** mit der nicht-dominanten Hand in das dazugehörige Erfassungsformular schreiben
 - c . Spirale erst mit rechts, dann mit links zeichnen, jeweils von dem Punkt in der Mitte ausgehend(ohne die aktive Hand aufzustützen)
 - d . Die Spitze des Stiftes mit der rechten Hand für **10 Sek.** über den Punkt (auf dem Blatt links unten) halten, so nah wie möglich ohne dabei den Stift das Papier berühren zu lassen
 - e . Die Spitze des Stiftes mit der linken Hand für **10 Sek.** über den Punkt (auf dem Blatt links unten) halten, so nah wie möglich ohne dabei den Stift das Papier berühren zu lassen
 - f . Blatt für Video hochhalten, jede Sektion einzeln filmen

Teil IV: Prob. sitzt im Stuhl wie vorher

Kameraeinstellung: Oberkörper inkl. Kopf und obere Extremitäten.

15. Arme /Hände ausstrecken in Supination, **5 Sek.** mit geöffneten Augen
16. Arme /Hände ausstrecken in Pronation, **5 Sek.** mit geöffneten Augen
17. Im Ellenbogen gebeugt die Arme/Hände ruhig vor dem Brustkorb halten, ohne dass sie sich berühren, **5 Sek.** mit geöffneten Augen

18. Finger-Nase-Versuch: Pat. tippt mit seinem Finger auf seine Nase und danach auf den Finger des Untersuchers. Langsam genug um Genauigkeit erfassen zu können, **5 mal** pro Hand

Teil V: Proband bleibt sitzen

Kameraeinstellung: Ganzkörper-Einstellung inklusive Kopf und alle Extremitäten (Schuhe und Socken ausziehen)

19. Finger-Tapping (Daumen und Zeigefinger) so groß und schnell wie möglich, **10mal** für jede Hand
20. Komplettes Handöffnen und -schließen beider Hände gleichzeitig und schnell, **5mal**
21. Fuß-Tapping (abwechselnd Ferse, Zehen, Ferse, Zehen etc.) in schneller Reihenfolge, **5mal** je Paar und Seite

Teil VI: Proband steht

Kameraeinstellung: Ganzkörper-Einstellung inklusive Kopf und alle Extremitäten (es dürfen keine anderen Personen durch das Bild laufen)

22. Frontalansicht **5 Sek.**
23. 45° im Uhrzeigersinn drehen = Seitansicht (links) **5 Sek.**
24. 45° im Uhrzeigersinn drehen = Rückansicht **5 Sek.**
25. 45° im Uhzeigersinn drehen = Seitansicht (rechts) **5 Sek.**

Teil VII: Proband geht

Kameraeinstellung: So, dass zehn Schritte erfasst werden, auf denen der Proband komplett zu sehen ist, ohne dass die Kameraeinstellung verändert werden muss

26. Proband geht mindestens **10 Schritte** von Kamera weg (Rückansicht) und **10 Schritte** auf Kamera zu (Frontalansicht)
27. Mindestens **10 Schritte** auf Zehenspitzen von Kamera weg, dann mindestens **10 Schritte** Hackengang auf Kamera zu gehen
28. Seiltänzergang/ Tandemgang mindestens **10 Schritte** von Kamera weg, dann mindestens **10 Schritte** auf Kamera zu

Teil VIII: (nur durchführen wenn zutreffend)

Kameraeinstellung: individuell anpassen

29. Fragen, ob irgendetwas getan werden kann, um die Schwere der Dystonie zu reduzieren (sensorischer Trick), und demonstrieren lassen.
30. Falls der Proband eine Tätigkeits-spezifische Dystonie hat, die im oben genannten Protokoll nicht erfasst wurde, wie beim Spielen eines Musikinstruments oder beim Kauen, bitte diese dystonen Symptome aufnehmen während der Proband solche Tätigkeiten ausführt.

Teil IX: (nur durchführen falls der Proband einen Blepharospasmus hat)

Proband sitzt

Kameraeinstellung: nur Kopf und Schultern

31. In Ruhe, geöffnete Augen, für **2 Minuten** (normal blinzeln lassen).

A.9. DysTract-Selbsteinschätzungsbögen


Dystonia Translational Research and
Therapy Consortium

SELBSTRATINGS-SET

Register ID

1. Quality of Life Scale (SF-36)
2. Hospital Anxiety Depression Scale (HADS)
3. Beck Depression Inventory II (BDI II)
4. Liebowitz Social Anxiety Scale (LSAS)
5. Patient Health Questionnaire 9 (PHQ9)
6. EQ-5D-3L

Version 1 Date: 11 January 2017

SF-36

Matthias Morfeld
Inge Kirchberger
Monika Bullinger

Fragebogen zum Gesundheitszustand

2., ergänzte und überarbeitete Auflage

SELBST BEURTEILUNGSBOGEN

ZEITFENSTER
4 WOCHEN

ID-Nummer											
Name											
Vorname											
Geburtsdatum	J	J	M	M	T	T	Geschlecht			W	m
Testdatum			J	M	M	T	T				

GÖTTINGEN · BERN · WIEN · PARIS · OXFORD · PRAG · TORONTO · CAMBRIDGE, MA · AMSTERDAM · KOPENHAGEN · STOCKHOLM

© Hogrefe Verlag, Göttingen
Nachdruck und jegliche Art
der Vervielfältigung verboten
Best-Nr. 01 195 05

HOGREFE 

In diesem Fragebogen geht es um die Beurteilung Ihres Gesundheitszustandes. Der Bogen ermöglicht es, im Zeitverlauf nachzuvollziehen, wie Sie sich fühlen und wie Sie im Alltag zuretkommen.

Bitte beantworten Sie jede Frage, indem Sie bei den Antwortmöglichkeiten die Zahl ankreuzen, die am besten auf Sie zutrifft.

	Ausgezeichnet	Sehr gut	Gut	Weniger gut	Schlecht
1. Wie würden Sie Ihren Gesundheitszustand im Allgemeinen beschreiben?	1	2	3	4	5

	Derzeit viel besser	Derzeit etwas besser	Etwa wie vor einem Jahr	Derzeit etwas schlechter	Derzeit viel schlechter
2. Im Vergleich zum <i>vergangenen Jahr</i> , wie würden Sie Ihren derzeitigen Gesundheitszustand beschreiben?	1	2	3	4	5

Im Folgenden sind einige Tätigkeiten beschrieben, die Sie vielleicht an einem normalen Tag ausüben. Sind Sie durch Ihren derzeitigen Gesundheitszustand bei diesen Tätigkeiten eingeschränkt? Wenn ja, wie stark?

	Ja, stark eingeschränkt	Ja, etwas eingeschränkt	Nein, überhaupt nicht eingeschränkt
3.a anstrengende Tätigkeiten, z. B. schnell laufen, schwere Gegenstände heben, anstrengenden Sport treiben	1	2	3
3.b mittelschwere Tätigkeiten, z. B. einen Tisch verschieben, staubsaugen, kegeln, Golf spielen	1	2	3
3.c Einkaufstaschen heben oder tragen	1	2	3
3.d mehrere Treppenabsätze steigen	1	2	3
3.e einen Treppenabsatz steigen	1	2	3
3.f sich beugen, knien, bücken	1	2	3
3.g mehr als 1 Kilometer zu Fuß gehen	1	2	3
3.h mehrere Straßenkreuzungen weit zu Fuß gehen	1	2	3
3.i eine Straßenkreuzung weit zu Fuß gehen	1	2	3
3.j sich baden oder anziehen	1	2	3

Hatten Sie in den *vergangenen 4 Wochen* aufgrund Ihrer *körperlichen Gesundheit* irgendwelche Schwierigkeiten bei der Arbeit oder anderen alltäglichen Tätigkeiten im Beruf bzw. zu Hause?

	Ja	Nein
4.a Ich konnte nicht so lange wie üblich tätig sein.	1	2
4.b Ich habe weniger geschafft als ich wollte.	1	2
4.c Ich konnte nur bestimmte Dinge tun.	1	2
4.d Ich hatte Schwierigkeiten bei der Ausführung.	1	2

Hatten Sie in den *vergangenen 4 Wochen* aufgrund *seelischer Probleme* irgendwelche Schwierigkeiten bei der Arbeit oder anderen alltäglichen Tätigkeiten im Beruf bzw. zu Hause (z.B. weil Sie sich niedergeschlagen oder ängstlich fühlten)?

	Ja	Nein
5.a Ich konnte nicht so lange wie üblich tätig sein.	1	2
5.b Ich habe weniger geschafft als ich wollte.	1	2
5.c Ich konnte nicht so sorgfältig wie üblich arbeiten.	1	2

	Überhaupt nicht	Etwas	Mäßig	Ziemlich	Sehr
6. Wie sehr haben Ihre körperliche Gesundheit oder seelischen Probleme in den <i>vergangenen 4 Wochen</i> Ihre normalen Kontakte zu Familienangehörigen, Freunden, Nachbarn oder zum Bekanntenkreis beeinträchtigt?	1	2	3	4	5

	Keine Schmerzen	Sehr leicht	Leicht	Mäßig	Stark	Sehr stark
7. Wie stark waren Ihre Schmerzen in den <i>vergangenen 4 Wochen</i> ?	1	2	3	4	5	6

	Überhaupt nicht	Ein bisschen	Mäßig	Ziemlich	Sehr
8. Inwieweit haben die Schmerzen Sie in den <i>vergangenen 4 Wochen</i> bei der Ausübung Ihrer Alltags-tätigkeiten zu Hause und im Beruf behindert?	1	2	3	4	5

In diesen Fragen geht es darum, wie Sie sich fühlen und wie es Ihnen in den *vergangenen 4 Wochen* gegangen ist. (Bitte kreuzen Sie in jeder Zeile die Zahl an, die Ihrem Befinden am ehesten entspricht).

Wie oft waren Sie *in den vergangenen 4 Wochen* ...

	Immer	Meistens	Ziemlich oft	Manchmal	Selten	Nie
9.a ... voller Schwung?	1	2	3	4	5	6
9.b ... sehr nervös?	1	2	3	4	5	6
9.c ... so niedergeschlagen, dass Sie nichts aufheitern konnte?	1	2	3	4	5	6
9.d ... ruhig und gelassen?	1	2	3	4	5	6
9.e ... voller Energie?	1	2	3	4	5	6
9.f ... entmutigt und traurig?	1	2	3	4	5	6
9.g ... erschöpft?	1	2	3	4	5	6
9.h ... glücklich?	1	2	3	4	5	6
9.i ... müde?	1	2	3	4	5	6

	Immer	Meistens	Manchmal	Selten	Nie
10. Wie häufig haben Ihre körperliche Gesundheit oder seelischen Probleme in den <i>vergangenen 4 Wochen</i> Ihre Kontakte zu anderen Menschen (Besuche bei Freunden, Verwandten usw.) beeinträchtigt?	1	2	3	4	5

Inwieweit trifft *jede* der folgenden Aussagen auf Sie zu?

	trifft ganz zu	trifft weitgehend zu	weiß nicht	trifft weitgehend nicht zu	trifft überhaupt nicht zu
11.a Ich scheine etwas leichter als andere krank zu werden.	1	2	3	4	5
11.b Ich bin genauso gesund wie alle anderen, die ich kenne.	1	2	3	4	5
11.c Ich erwarte, dass meine Gesundheit nachlässt.	1	2	3	4	5
11.d Ich erfreue mich ausgezeichneter Gesundheit.	1	2	3	4	5

Vielen Dank.

HADS-D

Name, Vorname:

Datum:

Geburtsdatum:

Code-Nummer:

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Sie werden von uns wegen körperlicher Beschwerden untersucht und behandelt. Zur vollständigen Beurteilung Ihrer vermuteten oder bereits bekannten Erkrankung bitten wir Sie im vorliegenden Fragebogen um einige persönliche Angaben. Man weiß heute, dass körperliche Krankheit und seelisches Befinden oft eng zusammenhängen. Deshalb beziehen sich die Fragen ausdrücklich auf Ihre allgemeine und seelische Verfassung.

Die Beantwortung ist selbstverständlich freiwillig. Wir bitten Sie jedoch, jede Frage zu beantworten, und zwar so, wie es für Sie persönlich in der letzten Woche am ehesten zutraf. Machen Sie bitte nur ein Kreuz pro Frage und lassen Sie bitte keine Frage aus! Überlegen Sie bitte nicht lange, sondern wählen Sie die Antwort aus, die Ihnen auf Anhieb am zutreffendsten erscheint! Alle Ihre Antworten unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht.

Ich fühle mich angespannt oder überreizt.

- meistens
- oft
- von Zeit zu Zeit/gelegentlich
- überhaupt nicht

Ich fühle mich in meinen Aktivitäten gebremst.

- fast immer
- sehr oft
- manchmal
- überhaupt nicht

Ich kann mich heute noch so freuen wie früher.

- ganz genau so
- nicht ganz so sehr
- nur noch ein wenig
- kaum oder gar nicht

Ich habe manchmal ein ängstliches Gefühl in der Magengegend.

- überhaupt nicht
- gelegentlich
- ziemlich oft
- sehr oft

Mich überkommt eine ängstliche Vorahnung, dass etwas Schreckliches passieren könnte.

- ja, sehr stark
- ja, aber nicht allzu stark
- etwas, aber es macht mir keine Sorgen
- überhaupt nicht

Ich habe das Interesse an meiner äußeren Erscheinung verloren.

- ja, stimmt genau
- ich kümmere mich nicht so sehr darum, wie ich sollte
- möglicherweise kümmere ich mich zu wenig darum
- ich kümmere mich so viel darum wie immer

Ich kann lachen und die lustige Seite der Dinge sehen.

- ja, so viel wie immer
- nicht mehr ganz so viel
- inzwischen viel weniger
- überhaupt nicht

Ich fühle mich rastlos, muss immer in Bewegung sein.

- ja, tatsächlich sehr
- ziemlich
- nicht sehr
- überhaupt nicht

Mir gehen beunruhigende Gedanken durch den Kopf.

- einen Großteil der Zeit
- verhältnismäßig oft
- von Zeit zu Zeit, aber nicht allzu oft
- nur gelegentlich/nie

Ich blicke mit Freude in die Zukunft.

- ja, sehr
- eher weniger als früher
- viel weniger als früher
- kaum bis gar nicht

Ich fühle mich glücklich.

- überhaupt nicht
- selten
- manchmal
- meistens

Mich überkommt plötzlich ein panikartiger Zustand.

- ja, tatsächlich sehr oft
- ziemlich oft
- nicht sehr oft
- überhaupt nicht

Ich kann behaglich dasitzen und mich entspannen.

- ja, natürlich
- gewöhnlich schon
- nicht oft
- überhaupt nicht

Ich kann mich an einem guten Buch, einer Radio- oder Fernsehsendung erfreuen.

- oft
- manchmal
- eher selten
- sehr selten



Name

Alter

Geschlecht

m / w

Datum

Anleitung: Dieser Fragebogen enthält 21 Gruppen von Aussagen. Bitte lesen Sie jede dieser Gruppen von Aussagen sorgfältig durch und suchen Sie sich dann in jeder Gruppe eine Aussage heraus, die am besten beschreibt, wie Sie sich in den letzten zwei Wochen, einschließlich heute, gefühlt haben. Kreuzen Sie die Zahl neben der Aussage an, die Sie sich herausgesucht haben (0, 1, 2 oder 3). Falls in einer Gruppe mehrere Aussagen gleichermaßen auf Sie zutreffen, kreuzen Sie die Aussage mit der höheren Zahl an. Achten Sie bitte darauf, dass Sie in jeder Gruppe nicht mehr als eine Aussage ankreuzen, das gilt auch für Gruppe 16 (Veränderungen der Schlafgewohnheiten) oder Gruppe 18 (Veränderungen des Appetits).

1.) Traurigkeit

- 0** Ich bin nicht traurig.
- 1** Ich bin oft traurig.
- 2** Ich bin ständig traurig.
- 3** Ich bin so traurig oder unglücklich, dass ich es nicht aushalte.

2.) Pessimismus

- 0** Ich sehe nicht mutlos in die Zukunft.
- 1** Ich sehe mutloser in die Zukunft als sonst.
- 2** Ich bin mutlos und erwarte nicht, dass meine Situation besser wird.
- 3** Ich glaube, dass meine Zukunft hoffnungslos ist und nur noch schlechter wird.

3.) Versagensgefühle

- 0** Ich fühle mich nicht als Versager.
- 1** Ich habe häufiger Versagensgefühle.
- 2** Wenn ich zurückblicke, sehe ich eine Menge Fehlschläge.
- 3** Ich habe das Gefühl, als Mensch ein volliger Versager zu sein.

4.) Verlust von Freude

- 0** Ich kann die Dinge genauso gut genießen wie früher.
- 1** Ich kann die Dinge nicht mehr so genießen wie früher.
- 2** Dinge, die mir früher Freude gemacht haben, kann ich kaum mehr genießen.
- 3** Dinge, die mir früher Freude gemacht haben, kann ich überhaupt nicht mehr genießen.

5.) Schuldgefühle

- 0** Ich habe keine besonderen Schuldgefühle.
- 1** Ich habe oft Schuldgefühle wegen Dingen, die ich getan habe oder hätte tun sollen.
- 2** Ich habe die meiste Zeit Schuldgefühle.
- 3** Ich habe ständig Schuldgefühle.

6.) Bestrafungsgefühle

- 0** Ich habe nicht das Gefühl, für etwas bestraft zu sein.
- 1** Ich habe das Gefühl, vielleicht bestraft zu werden.
- 2** Ich erwarte, bestraft zu werden.
- 3** Ich habe das Gefühl, bestraft zu sein.

7.) Selbstablehnung

- 0** Ich halte von mir genauso viel wie immer.
- 1** Ich habe Vertrauen in mich verloren.
- 2** Ich bin von mir enttäuscht.
- 3** Ich lehne mich völlig ab.

8.) Selbstvorwürfe

- 0** Ich kritisiere oder tadle mich nicht mehr als sonst.
- 1** Ich bin mir gegenüber kritischer als sonst.
- 2** Ich kritisiere mich für all meine Mängel.
- 3** Ich gebe mir die Schuld für alles Schlimme, was passiert.

9.) Selbstmordgedanken

- 0** Ich denke nicht daran, mir etwas anzutun.
- 1** Ich denke manchmal an Selbstmord, aber ich würde es nicht tun.
- 2** Ich möchte mich am liebsten umbringen.
- 3** Ich würde mich umbringen, wenn ich die Gelegenheit dazu hätte.

10.) Weinen

- 0** Ich weine nicht öfter als früher.
- 1** Ich weine jetzt mehr als früher.
- 2** Ich weine beim geringsten Anlass.
- 3** Ich möchte gern weinen, aber ich kann nicht.



- 11.) Unruhe**
- 0** Ich bin nicht unruhiger als sonst.
 - 1** Ich bin unruhiger als sonst.
 - 2** Ich bin so unruhig, dass es mir schwerfällt, still zu sitzen.
 - 3** Ich bin so unruhig, dass ich mich ständig bewegen oder etwas tun muss.
-
- 12.) Interessenverlust**
- 0** Ich habe das Interesse an anderen Menschen oder an Tätigkeiten nicht verloren.
 - 1** Ich habe weniger Interesse an anderen Menschen oder an Dingen als sonst.
 - 2** Ich habe das Interesse an anderen Menschen oder Dingen zum größten Teil verloren.
 - 3** Es fällt mir schwer, mich überhaupt für irgend etwas zu interessieren.
-
- 13.) Entschlussunfähigkeit**
- 0** Ich bin so entschlussfreudig wie immer.
 - 1** Es fällt mir schwerer als sonst, Entscheidungen zu treffen.
 - 2** Es fällt mir sehr viel schwerer als sonst, Entscheidungen zu treffen.
 - 3** Ich habe Mühe, überhaupt Entscheidungen zu treffen.
-
- 14.) Wertlosigkeit**
- 0** Ich fühle mich nicht wertlos.
 - 1** Ich halte mich für weniger wertvoll und nützlich als sonst.
 - 2** Verglichen mit anderen Menschen fühle ich mich viel weniger wert.
 - 3** Ich fühle mich völlig wertlos.
-
- 15.) Energieverlust**
- 0** Ich habe so viel Energie wie immer.
 - 1** Ich habe weniger Energie als sonst.
 - 2** Ich habe so wenig Energie, dass ich kaum noch etwas schaffe.
 - 3** Ich habe keine Energie mehr, um überhaupt noch etwas zu tun.
-
- 16.) Veränderungen der Schlafgewohnheiten**
- 0** Meine Schlafgewohnheiten haben sich nicht verändert.
 - 1a** Ich schlafe etwas mehr als sonst.
 - 1b** Ich schlafe etwas weniger als sonst.
 - 2a** Ich schlafe viel mehr als sonst.
 - 2b** Ich schlafe viel weniger als sonst.
 - 3a** Ich schlafe fast den ganzen Tag.
 - 3b** Ich wache 1-2 Stunden früher auf als gewöhnlich und kann dann nicht mehr einschlafen.

- 17.) Reizbarkeit**
- 0** Ich bin nicht reizbarer als sonst.
 - 1** Ich bin reizbarer als sonst.
 - 2** Ich bin viel reizbarer als sonst.
 - 3** Ich fühle mich dauernd gereizt.
-
- 18.) Veränderungen des Appetits**
- 0** Mein Appetit hat sich nicht verändert.
 - 1a** Mein Appetit ist etwas schlechter als sonst.
 - 1b** Mein Appetit ist etwas größer als sonst.
 - 2a** Mein Appetit ist viel schlechter als sonst.
 - 2b** Mein Appetit ist viel größer als sonst.
 - 3a** Ich habe überhaupt keinen Appetit.
 - 3b** Ich habe ständig Heißhunger.
-
- 19.) Konzentrationsschwierigkeiten**
- 0** Ich kann mich so gut konzentrieren wie immer.
 - 1** Ich kann mich nicht mehr so gut konzentrieren wie sonst.
 - 2** Es fällt mir schwer, mich längere Zeit auf irgend etwas zu konzentrieren.
 - 3** Ich kann mich überhaupt nicht mehr konzentrieren.
-
- 20.) Ermüdung oder Erschöpfung**
- 0** Ich fühle mich nicht müder oder erschöpfter als sonst.
 - 1** Ich werde schneller müde oder erschöpft als sonst.
 - 2** Für viele Dinge, die ich üblicherweise tue, bin ich zu müde oder erschöpft.
 - 3** Ich bin so müde oder erschöpft, dass ich fast nichts mehr tun kann.
-
- 21.) Verlust an sexuellem Interesse**
- 0** Mein Interesse an Sexualität hat sich in letzter Zeit nicht verändert.
 - 1** Ich interessiere mich weniger für Sexualität als früher.
 - 2** Ich interessiere mich jetzt viel weniger für Sexualität.
 - 3** Ich habe das Interesse an Sexualität völlig verloren.

Summe Seite 2:

Übertrag Seite 1:

Gesamt Seite 1+2:

SOPHOS

Fremdbeurteilungsbogen LSAS

Name: _____ Alter: _____ Testdatum: _____	Angst				Vermeidung			
	keine	gering	mäßig	schwer	nie	Gelegentlich (10-33 % der Situationen)	Oft (33-67 % der Situationen)	Gewöhnlich (10-33 % der Situationen)
1. In der Öffentlichkeit telefonieren.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. An kleinen Gruppen teilnehmen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. An öffentlichen Plätzen essen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Mit anderen Personen an öffentlichen Plätzen trinken.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Mit Autoritätspersonen sprechen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Vor Zuhörern oder Zuschauern etwas tun, auftreten oder eine Rede halten.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Eine Party besuchen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Von anderen beim Arbeiten beobachtet werden.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Von anderen beim Schreiben beobachtet werden.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Jemanden anrufen, den Sie nicht gut kennen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Mit Personen reden, die Sie nicht gut kennen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. Fremden begegnen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. In einer öffentlichen Toilette ein Urinbecken benutzen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. Einen Raum betreten, in dem bereits andere Personen sitzen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. Im Mittelpunkt der Aufmerksamkeit stehen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16. Sich bei einer Besprechung äußern.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17. Eine Prüfung ablegen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18. Eine andere oder gegenteilige Meinung gegenüber Personen äußern, die Sie nicht gut kennen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19. Personen, die Sie nicht gut kennen, in die Augen schauen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20. Einer Gruppe Bericht erstatten.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
21. Mit einer Person flirten.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
22. Bereits gekaufte Ware in einem Geschäft zurückgeben.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23. Eine Party geben.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24. Einem aufdringlichen Verkäufer widerstehen.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Furcht/Angst- Gesamt:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Vermeidung- Gesamt:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	LSAS-Gesamt: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>							

Gesundheitsfragebogen für Patienten (Kurzform PHQ-D)

Dieser Fragebogen ist ein wichtiges Hilfsmittel, um Ihnen die bestmögliche Behandlung zukommen zu lassen. Ihre Antworten können Ihrem Arzt helfen, Ihre Beschwerden besser zu verstehen. Bitte beantworten Sie jede Frage, so gut Sie können. Überspringen Sie Fragen bitte nur, wenn Sie dazu aufgefordert werden.

Name: _____ Alter: _____ Geschlecht: weiblich: männlich: Datum: _____

- 1.** Wie oft fühlten Sie sich im Verlauf der letzten 2 Wochen durch die folgenden Beschwerden beeinträchtigt?
- | | Über-haupt nicht | An einzelnen Tagen | An mehr als der Hälfte der Tage | Beinahe jeden Tag |
|--|------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------|
|--|------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------|

- a. Wenig Interesse oder Freude an Ihren Tätigkeiten
- b. Niedergeschlagenheit, Schwermut oder Hoffnungslosigkeit
- c. Schwierigkeiten, ein- oder durchzuschlafen, oder vermehrter Schlaf
- d. Müdigkeit oder Gefühl, keine Energie zu haben
- e. Verminderter Appetit oder übermäßiges Bedürfnis zu essen
- f. Schlechte Meinung von sich selbst; Gefühl, ein Versager zu sein oder die Familie enttäuscht zu haben
- g. Schwierigkeiten, sich auf etwas zu konzentrieren, z. B. Zeitunglesen oder Fernsehen
- h. Waren Ihre Bewegungen oder Ihre Sprache so verlangsamt, dass es auch anderen auffallen würde? Oder waren Sie im Gegenteil "zappelig" oder ruhelos und hatten durch einen stärkeren Bewegungsdrang als sonst?
- i. Gedanken, dass Sie lieber tot wären oder sich Leid zufügen möchten?

- 2.** Wenn eines oder mehrere der in diesem Fragebogen beschriebenen Probleme bei Ihnen vorliegen, geben Sie bitte an, wie sehr diese Probleme es Ihnen erschwert haben, Ihre Arbeit zu tun, Ihren Haushalt zu regeln oder mit anderen Menschen zurecht zu kommen:

Überhaupt nicht erschwert	Etwas erschwert	Relativ stark erschwert	Sehr stark erschwert
---------------------------	-----------------	-------------------------	----------------------

KODIERUNG: May Dep Syn, wenn fünf oder mehr Fragen 1a-i mit mindestens "an mehr als der Hälfte der Tage" beantwortet sind und Frage 1a oder 1b darunter sind (1 auch mitzählen, wenn es mit "an einzelnen Tagen" beantwortet ist). And Dep Syn, wenn zwei, drei oder vier der Fragen 1a-i mit mindestens "an mehr als der Hälfte der Tage" beantwortet sind und Frage 1a oder 1b darunter sind (1 auch mitzählen, wenn es mit "an einzelnen Tagen" beantwortet ist).



EQ-5D-3L

**Gesundheitsfragebogen
Deutsche Version für Deutschland**

Betriebsstättennummer

Teilnehmernummer

Bitte geben Sie an, welche Aussagen Ihren heutigen Gesundheitszustand am besten beschreiben, indem Sie ein Kreuz in ein Kästchen jeder Gruppe machen.

Beweglichkeit/Mobilität

Ich habe keine Probleme herumzugehen



Ich habe einige Probleme herumzugehen



Ich bin ans Bett gebunden



Für sich selbst sorgen

Ich habe keine Probleme, für mich selbst zu sorgen



Ich habe einige Probleme, mich selbst zu waschen oder mich anzuziehen



Ich bin nicht in der Lage, mich selbst zu waschen oder anzuziehen



Alltägliche Tätigkeiten

(z. B. Arbeit, Studium, Hausarbeit, Familien- oder Freizeitaktivitäten)

Ich habe keine Probleme, meinen alltäglichen Tätigkeiten nachzugehen



Ich habe einige Probleme, meinen alltäglichen Tätigkeiten nachzugehen



Ich bin nicht in der Lage, meinen alltäglichen Tätigkeiten nachzugehen



Schmerzen/Körperliche Beschwerden

Ich habe keine Schmerzen oder Beschwerden



Ich habe mäßige Schmerzen oder Beschwerden



Ich habe extreme Schmerzen oder Beschwerden



Angst/Niedergeschlagenheit

Ich bin nicht ängstlich oder deprimiert



Ich bin mäßig ängstlich oder deprimiert



Ich bin extrem ängstlich oder deprimiert



Um Sie bei der Einschätzung, wie gut oder wie schlecht Ihr Gesundheitszustand ist, zu unterstützen, haben wir eine Skala gezeichnet, ähnlich einem Thermometer.

Der best denkbare Gesundheitszustand ist mit einer "100" gekennzeichnet, der schlechteste mit "0".

Wir möchten Sie nun bitten, auf dieser Skala zu kennzeichnen, wie gut oder schlecht Ihrer Ansicht nach Ihr persönlicher Gesundheitszustand heute ist. Bitte verbinden Sie dazu den untenstehenden Kasten mit dem Punkt auf der Skala, der Ihren heutigen Gesundheitszustand am besten wiedergibt.

Ihr heutiger
Gesundheitszustand

Best denkbarer
Gesundheitszustand



schlechtester denkbarer
Gesundheitszustand

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Kamm für das Anvertrauen dieses interessanten und spannenden Themas sowie der Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit danken. Nur so war es mir möglich diese wissenschaftliche Arbeit an der Klinik für Neurologie und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock durchführen zu können. Neben Herrn Dr. Kamm danke ich allen Schwestern der Poliklinik, die mich bei der Patientenrekrutierung und Organisation der Patienteninterviews unterstützt haben.

Ein großer Dank gilt auch den Patientinnen und Patienten, die sich bereit erklärtan an dieser Studie teilzunehmen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Professor Dr. med. Klein, Leiterin des Instituts für Neurogenetik in Lübeck und Frau Professor Dr. Katja Lohmann für die Möglichkeit der Hospitation und für die ausgezeichnete Betreuung bei der Sequenzierung der DNA-Proben bedanken. Besonders danken möchte ich an dieser Stelle auch Frau Frauke Hinrichs für die hervorragende Einführung in die Laborarbeit und Unterstützung während des laborpraktischen Teils meiner Arbeit in Lübeck. Die Zeit im Institut für Neurogenetik wurde durch die freundliche und offene Zusammenarbeit für mich zu einer unvergesslichen Erfahrung.

Ich möchte außerdem allen meinen lieben Freunden danken, die mich insbesondere während der Patientenrekrutierung begleitet und bei der Verfassung dieser Arbeit unterstützt haben. Besonders hervorheben möchte ich dabei die Unterstützung meiner Schwester Bettina, meines Bruders Stefan und meines Freundes Maxim.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die immer an mich geglaubt und mir zu jeder Zeit beigestanden haben.