

AUS DEM MEDIZINISCHEN ZENTRUM FÜR NERVENHEILKUNDE
DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG
GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR: PROF. DR. KRIEG
KLINIK FÜR NEUROLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. W. H. OERTEL

Kandidatengestudien
bei
Fokaler Idiopathischer Torsionsdystonie (F-ITD)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Dirk Sibbing
aus Detmold

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg am 24.02.2005.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: PD Dr. O. Bandmann

Korreferent: Prof. Dr. H. Bertalanffy

Meinen Eltern und meiner Oma gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Allgemeiner Teil	1
1.1.1	Definition und Geschichte der Dystonie	1
1.1.2	Klassifikation und Genetik der Dystonien	2
1.1.2.1	Primäre Dystonien	3
1.1.2.2	Dystonie-plus Syndrome	4
1.1.2.3	Sekundäre Dystonien	5
1.1.2.4	Heredodegenerative Erkrankungen	6
1.1.3	Epidemiologie	6
1.2	Spezieller Teil	7
1.2.1	Fragestellung	7
1.2.2	Zur Bedeutung des Kupferstoffwechsels bei der Dystonie	7
1.2.2.1	Überblick	7
1.2.2.2	Der humane Kupfermetabolismus	8
1.2.2.3	Untersuchte Kupfertransportproteine	9
1.2.3	Das DYT1-Gen	10
1.2.3.1	Überblick	10
1.2.3.2	Polymorphismen im DYT1-Gen	11
1.2.4	Zur Bedeutung des Homocysteinmetabolismus bei der Dystonie	13
1.2.4.1	Überblick bisheriger Studienergebnisse	13
1.2.4.2	Der humane Homocysteinmetabolismus	14
1.2.4.3	Untersuchte Kandidatengene zum Homocysteinstoffwechsel	15
1.2.5	Das (CA) _n -Repeat im Gen des Dopamin-5-Rezeptors bei F-ITD	17
1.2.5.1	Das Dopamin-D5-Rezeptor-Gen (DRD5)	17
1.2.5.2	Überblick bisheriger Studienergebnisse	18
1.2.5.3	Zur Bedeutung des Neurotransmitters Dopamin bei Dystonien	18
1.2.5.4	Zur Analyse des (CA) _n -Repeat Polymorphismus im DRD5-Gen	19
1.2.6	Immunologische Mechanismen bei F-ITD	19
1.2.6.1	Überblick bisheriger Studienergebnisse	19
1.2.6.2	Der HLA-Genkomplex	20
1.2.6.3	Zur Analyse des HLA-DRB-Locus	21

1.2.7	Neuroleptika induzierte tardive Dyskinesien und F-ITD	22
1.2.7.1	Tardive Dyskinesien und Dystonien unter Neuroleptikabehandlung	22
1.2.7.2	Phänotypischer Vergleich der F-ITD und der tardiven Dyskinesien	22
1.2.7.3	Überblick bisheriger Studienergebnisse zu tardiven Dyskinesien.....	23
1.3	Zusammenfassung der untersuchten Kandidatengene.....	25

2 Methoden26

2.1	Studienpopulationen	26
2.2	DNA-Extraktion	27
2.2.1	Materialien	27
2.2.2	Extraktion aus Lymphozyten	27
2.2.3	DNA-Quantifizierung	27
2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
2.3.1	PCR-Reagenzien / Geräte	28
2.3.2	Prinzip der PCR	28
2.3.3	Primersequenzen	29
2.3.4	PCR-Protokolle	31
2.3.5	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	32
2.4	Agarose Gel-Elektrophorese	33
2.4.1	Materialien	33
2.4.2	Protokoll.....	33
2.5	Restriktionsenzymverdau.....	34
2.5.1	Materialien	34
2.5.2	Überblick	34
2.5.3	Verwendete Enzyme	34
2.5.4	Restriktionsprotokolle.....	35
2.6	HLA-Typisierung	36
2.6.1	Materialien	36
2.6.2	Überblick	36
2.6.3	PCR-Reaktionsansatz.....	36
2.6.4	ELPHA DRB LowRes Typisierung	37
2.6.5	Versuchsauswertung	38

2.7	DNA-Sequenzierung	39
2.7.1	Materialien	39
2.7.2	Die Kettenabbruchmethode nach Sanger	39
2.7.3	Cycle Sequencing-Protokolle.....	40
2.7.4	Dye Terminator Aufreinigung.....	41
2.7.5	Sequenzierung auf dem ABI PRISM® 310	41
2.7.6	Die Sequence-Navigator Software	42
2.8	Fragmentlängenanalysen.....	43
2.8.1	Materialien	43
2.8.2	Primer-Markierung	43
2.8.3	Längenstandards	43
2.8.4	Spezielle Anwendungen.....	44
2.8.5	Fragmentanalyse auf dem ABI PRISM® 310.....	45
2.9	Statistik	46
2.9.1	Statistische Methoden	46
2.9.2	Das Hardy-Weinberg-Equilibrium.....	46
2.9.3	Haplotypen-Analyse	47
2.9.4	Die Power-Kalkulation	47
3	<i>Ergebnisse</i>	48
3.1	Mutationssuche in Kupfergenen.....	48
3.1.1	Menkes-Gen (Exone 10 und 23)	48
3.1.2	Menkes-Gen (Promotor-Region)	49
3.1.3	Wilson-Gen (Exone 8, 14 und 18)	50
3.1.4	Das Kupfer-Chaperon ATOX1 (Exone 2, 3 und 4).....	51
3.2	Polymorphismen im DYT1-Gen	52
3.2.1	Der C246T-Polymorphismus in Exon 2.....	52
3.2.2	Der G646C-Polymorphismus in Exon 4	53
3.2.3	Genotypfrequenzen der Polymorphismen in Exon 2 und 4 des DYT1-Gens.....	53
3.2.4	Haplotypen-Analyse	54
3.3	Gene des Homocystein-Metabolismus.....	55
3.3.1	Die 68bp-Insertion im Cystathionin-β-Synthase -Gen	55
3.3.2	Der 31bp-VNTR des Cystathionin-β-Synthase -Gen	57
3.3.3	Der C677T-Polymorphismus im Gen der Methylen-tetrahydrofolatreduktase	61
3.3.4	Der A2756G-Polymorphismus im Methionine-Synthase-Gen	63

3.4	Zum Dopamin-5-Rezeptor-Polymorphismus	65
3.4.1	Analyse des (CA) _n -Repeats auf dem ABI PRISM® 310.....	65
3.4.2	Allelverteilung in der Studienpopulation	66
3.5	HLA DRB-Typisierung.....	68
3.5.1	Analyse mit der Biotest Typing-Software.....	68
3.5.2	Allelverteilung in der Studienpopulation	69
3.6	Assoziationsstudien zur tardiven Dyskinesie	71
3.6.1	Der C/A-Polymorphismus in Intron 1 des Cytochrom P450 1A2-Gens	71
3.6.2	Der A118G-Polymorphismus im μ -Opioid-Rezeptorgen	72
3.6.3	Der -C9T-Polymorphismus der Manganese-Superoxid-Dismutase (MnSOD).....	73
3.6.4	Der A/G-Polymorphismus im Gen des D3-Rezeptors	75
3.6.5	Der C102T-Polymorphismus im 5HT2A-Serotonin-Rezeptorgen.....	76

4 Diskussion **78**

4.1	Allgemeiner Teil	78
4.1.1	Allgemeine Betrachtung zu genetischen Assoziationsstudien	78
4.1.2	Probleme und Voraussetzungen bei genetischen Assoziationsstudien.....	79
4.1.3	Der Kandidatengenansatz	81
4.1.4	Zur Wahl der Statistischen Verfahren.....	82
4.2	Spezieller Teil	83
4.2.1	Zu den Kupfertransportproteinen ATP7B, ATP7A und ATOX1	83
4.2.1.1	Die Analyse der P-Typ ATPasen ATP7B und ATP7A	83
4.2.1.2	Die Analyse der 5'Promotorregion von ATP7A	84
4.2.1.3	Die Analyse des Kupfer-Chaperone-Proteins ATOX1	85
4.2.1.4	Die Bedeutung des Kupfermetabolismus bei F-ITD	85
4.2.2	Zur Analyse der Polymorphismen im DYT1-Gen/TOR1A	87
4.2.2.1	Die mögliche Funktion des DYT1-Gens	87
4.2.2.2	Die Analyse des C246T- und G646C-Polymorphismus bei F-ITD Patienten	87
4.2.3	Zur Bedeutung des Homocysteinmetabolismus bei Dystonien.....	88
4.2.3.1	Die Dystonien und Störungen des Homocysteinstoffwechsels	88
4.2.3.2	Mögliche Pathomechanismen erhöhter Homocysteinspiegel bei Dystonien	89
4.2.3.3	Vergleich der Resultate in den beiden Studienpopulationen	90
4.2.4	Zum (CA) _n -Repeat im Dopamin-D5-Rezeptor	92
4.2.4.1	Die Datenlage zum (CA) _n -Repeat	92
4.2.4.2	Analyse der Studien zum (CA) _n -Repeat	92
4.2.5	Zur Analyse des HLA-DRB-Locus.....	95
4.2.5.1	Die Bedeutung und Funktion des HLA-Locus	95

4.2.5.2	Die Methodik der PCR-SSO-Typisierungstechnik.....	96
4.2.5.3	Testung des Hardy-Weinberg Equilibriums	97
4.2.5.4	Ergebnisse der Typisierung	97
4.2.6	Zur Analyse der Polymorphismen bei Tardiven Dyskinesien.....	98
4.2.6.1	TD und F-ITD: Gleiche oder getrennte genetische Suszeptibilitätsfaktoren?	98
4.2.6.2	Die Frage der funktionellen Relevanz der untersuchten Polymorphismen.....	99
4.2.6.3	Die Problematik positiver Ergebnisse bei Assoziationsstudien zu TD.....	101
4.3	Schlussbetrachtung und Ausblick.....	102
5	<i>Zusammenfassung</i>	<i>104</i>
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	<i>106</i>
7	<i>Anhang</i>	<i>119</i>
7.1	Abkürzungen	119
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	121
7.3	Lebenslauf.....	123
7.4	Verzeichnis akademischer Lehrer	124
7.5	Danksagung	125
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	126
7.7	Veröffentlichungen.....	127

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Teil

1.1.1 Definition und Geschichte der Dystonie

Der Begriff der Dystonie bezeichnet ein „Syndrom anhaltender Muskelkontraktionen, das häufig zu verzerrenden und repetitiven Bewegungen oder abnormalen Haltungen führt“ (Fahn et al., 1987). Der Ausdruck kann sich auf ein einzelnes Krankheitsmerkmal, eine eigene Krankheitsentität, oder ein Syndrom bei sekundären Dystonien beziehen. Oppenheim verwendete den Begriff erstmals 1911. Er bezeichnete ein Syndrom als „Dystonia musculorum deformans“, das er anderen damals bekannten Erkrankungen wie der Chorea Huntington nicht zuordnen konnte. Der erste Fall wurde jedoch schon 3 Jahre früher 1908 von Schwalbe beschrieben, der von Mitgliedern einer Familie berichtete, die unter eigentümlichen tonischen Krampfformen litten. 1919 prägte Mendel den Begriff Torsionsdystonie, um die beiden charakteristischen Merkmale der Erkrankung, die torquierenden Körperverszerrungen und den Wechsel zwischen Hyper- und Hypotonie, in einem Wort zusammen zu fassen. Herz definierte erstmals 1944 Diagnosekriterien. Den wichtigen Zusammenhang zwischen Manifestationsalter und Prognose der Erkrankung betonten Marsden und Harrison in den siebziger Jahren, indem sie eine Form mit Symptombeginn im Kindesalter bei starker Generalisierungstendenz und eine Form mit Erstmanifestation im Erwachsenenalter bei häufig fokaler Symptomatik beschrieben. Auch die Tatsache, dass der Erkrankung eine zentralnervöse Pathologie zugrunde liegt, wurde von Marsden unterstrichen (Marsden et al., 1976). In den 80er und 90er Jahren wurden chromosomale Loci und einzelne Gene, die in der Pathogenese zumindest einiger Formen der Dystonie eine Rolle spielen, identifiziert (Nemeth et al., 2002).

1.1.2 Klassifikation und Genetik der Dystonien

Verschiedene Möglichkeiten der Klassifikation der Dystonien sind in der Literatur beschrieben. Eine seit Beginn der 80er Jahre genutzte Klassifikation teilt die Dystonie nach ihrer Ätiologie in eine primäre idiopathische und eine sekundäre symptomatische Form ein. Die Klassifikation nach dem Alter der Erstmanifestation unterteilt die Dystonie in eine infantile Form mit Beginn der Erkrankung bis zum 12. Lebensjahr, eine juvenile Form mit einem Manifestationsalter zwischen 13 und 20 und eine adulte Form mit einem Manifestationsalter von >20 Jahren. Eine dritte Klassifikationsmöglichkeit berücksichtigt die topische Verteilung der Dystonie. Diese Einteilung unterteilt die Dystonie in eine fokale Form, die auf eine Körperregion begrenzt ist (z.B. Blepharospasmus), eine segmentale Form mit zwei benachbarten Körperregionen (z.B. oromandibuläre Dystonie), eine multifokale Form mit zwei oder mehreren nicht benachbarten Körperregionen und zuletzt eine generalisierte Form, bei der die Ausdehnung auch nicht benachbarte Körperregionen mit einschließt und mindestens eine der unteren Extremitäten betroffen ist.

In den letzten Jahren kam es durch zahlreiche Forschungsergebnisse zu einer Revision der Klassifikation, die nun den äthiologischen Ansatz mehr betont. Dystonien können danach in folgende 4 Gruppen unterteilt werden:

1. **Primäre Dystonien:** Hier ist die Dystonie das einzige klinische Zeichen mit Ausnahme eines zusätzlichen Tremors.
2. **Dystonie-plus Syndrome:** Hier wird die Dystonie von anderen neurologischen Symptomen begleitet, wie Myoclonus oder Parkinsonismus (Dopa-responsive Dystonie).
3. **Sekundäre Dystonien:** Die Dystonie tritt hier als Folge einer Grunderkrankung auf, wie Entzündungen, Tumore, metabolische Störungen, Drogen oder Toxine.
4. **Heredodegenerative Erkrankungen:** Hierzu zählt man Erkrankungen wie zum Beispiel den Morbus Parkinson oder auch die mitochondrialen Enzephalopathien, bei denen es zum neuronalen Zelltod kommt und die als Teil des Krankheitsbildes auch eine Dystonie zeigen können.

1.1.2.1 Primäre Dystonien

Die Primären Dystonien lassen sich hinsichtlich ihrer Ausbreitung in eine generalisierte und eine fokale primäre Dystonie unterteilen:

Die **primäre generalisierte Dystonie** beginnt typischerweise in der frühen Kindheit und wird in ca. 85% der Fälle autosomal-dominant mit einer Penetranz von ungefähr 30% vererbt (Bressman et al., 1989). Bei den meisten Fällen handelt es sich um die so genannte DYT1-Dystonie. Linkage-Studien lokalisierten den DYT1-Locus bei einer großen Familie auf Chromosom 9q32-34 (Ozelius et al., 1989). Durch Analyse weiterer ostjüdischer Familien (Aschkenazi-Juden) konnte man das DYT1-Gen dem Locus 9q34 zuordnen (Kramer et al., 1990). Klinische Studien zeigten, dass die DYT1-Dystonie einen sehr charakteristischen Phänotyp mit Betonung der Extremitäten und auch des Rumpfes unter häufiger Aussparung der craniocervikalen Muskulatur zeigt (Bressman et al., 1994). Da die DYT1-Dystonie bei Ashkenazi-Juden eine hohe Prävalenz zeigt, führte man Studien durch, die mit Hilfe von DNA-Polymorphismen zeigten, dass die Erkrankung hier auf eine vor ca. 350 Jahren entstandene „founder mutation“ zurückzuführen ist (Risch et al., 1995). Es besteht jedoch bei der primär generalisierten Dystonie genetische Heterogenität. In zwei Mennoniten-Familien in den USA, die den Phänotyp der generalisierten Dystonie bei autosomal dominanter Vererbung zeigten, konnte das verantwortliche Gen dem Chromosom 8p21-22 zugeordnet werden und wurde mit DYT6 bezeichnet (Almasy et al., 1997). Mit DYT13 wurde ein weiterer Dystonie-Locus auf dem Chromosom 1p36.13-36.32 in einer großen italienischen Familie lokalisiert (Valente et al., 2001). Zu den beiden letztgenannten Loci konnten jedoch bisher noch keine mutierten Gene nachgewiesen werden.

Die **primäre fokale Dystonie** beginnt typischerweise im Erwachsenenalter bei fokaler Symptomatik. Es ist die häufigste Form der primären Dystonien mit meistens sporadischem Auftreten. Eine klinisch-genetische Studie, basierend auf Hausbesuchen und klinischen Untersuchungen, die bei 40 Index-Patienten mit 153 Verwandten ersten Grades durchgeführt wurde, zeigte bei 25% aller Verwandten ebenfalls eine Dystonie (Waddy et al., 1991). Segregationsanalysen legten nahe, dass die Präsenz eines dominanten Gens mit reduzierter Penetranz der Grund für die Dystonie sein könnte (Waddy et al., 1991). Ein möglicher genetischer Hintergrund bei fokaler idiopathischer

Torsionsdystonie (F-ITD) könnte auch aufgrund eines publizierten Fallberichtes zum gemeinsamen Vorkommen von F-ITD bei monozygoten Zwillingen vermutet werden (Wunderlich et al., 2001). Eine weitere Studie untersuchte eine große norddeutsche Familie bestehend aus 7 Mitgliedern mit definitiver und 6 mit möglicher fokaler Dystonie. Linkage-Analysen in dieser Familie lokalisierten den Locus DYT7 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 18 bei autosomal dominantem Erbgang (Leube et al., 1996). Leube und Mitarbeiter unternahmen in dieser Familie und bei 15 sporadischen Patienten aus der gleichen Region Haplotypenanalysen. Die Ergebnisse legten nahe, dass sich alle Fälle auf eine „gemeinsame founder Mutation“ im DYT7-Gen zurückführen ließen (Leube et al., 1997). Anschließende Untersuchungen unter Verwendung größerer Fallzahlen konnten diese Tatsache jedoch nicht bestätigen (Klein et al., 1998). Ergänzend dazu wurde von drei Patienten mit Entwicklungsverzögerung und Dystonie berichtet, bei denen eine interstitielle Deletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 18 zu finden war, die den DYT7-Locus mit einschloss (Klein et al., 1999b). Somit bleibt die Bedeutung von DYT7 in der Pathogenese der F-ITD außerhalb dieser norddeutschen Familie unklar und kann erst geklärt werden, wenn das eigentliche DYT7-Gen isoliert worden ist.

1.1.2.2 Dystonie-plus Syndrome

Die **Dopa-responsive Dystonie (DRD)** wird häufig auch nach dem japanischen Neurologen Segawa benannt (Segawa-Disease). Er hat diese Erkrankung als erster umfassend klinisch charakterisiert. Sie ist eine sich typischerweise im Vorschulalter manifestierende Form der Dystonie mit Gangstörungen und akinetisch-rigiden Störungen. Charakteristisch für die Erkrankung ist eine Verschlechterung der Symptomatik zum Abend hin oder nach körperlicher Belastung mit deutlicher Besserung auf Gabe von L-DOPA. Die Mehrzahl der Fälle zeigt einen autosomal dominanten Erbgang mit reduzierter Penetranz (Furukawa et al., 1998).

Die autosomal dominant vererbte **Myoklonus-Dystonie (DYT11)** manifestiert sich meistens im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt mit myoklonen Bewegungsstörungen vor allem in der oberen Extremität und einer milden Form der fokalen Dystonie. Der Genuss von Alkohol bessert die Symptomatik. Auch bei dieser Form der Dystonie liegt

genetische Heterogenität vor. Die meisten untersuchten Familien zeigen Kopplung zum Chromosom 7q21-q31 (Nygaard et al., 1999; Asmus et al., 2001). Mittlerweile ist das verursachende Gen bekannt. Es fanden sich bei allen Indexpatienten dieser Familien Mutationen im ϵ -Sarcoglycan-Gen. (Zimprich et al., 2001). Berichtet wurde aber auch von einer Familie mit Kopplung zum D2-Rezeptorgen auf Chromosom 11q23 (Klein et al., 1999a).

1.1.2.3 Sekundäre Dystonien

Die dystone Störung ist bei den sekundären Dystonien durch einen identifizierbaren Faktor entstanden, der zu einer neurochemischen oder aber auch zu einer anatomisch-strukturellen Hirnläsion führte. Eine häufige Form ist die **Tardive Dystonie**, die als Nebenwirkung in Verbindung mit der Gabe von Dopaminrezeptor-Antagonisten im Rahmen einer antipsychotischen Therapie auftritt. Zu sekundären Dystonien kann es auch nach Kopfverletzungen, Enzephalitiden, cerebrovaskulären Erkrankungen, Tumoren, cerebralen Hypoxien oder nach Aufnahme von Toxinen wie Mangan oder Cyanid kommen. Ein weiteres Beispiel ist der **Morbus Wilson**, der in über einem Drittel aller Fälle als Begleitsymptomatik eine Dystonie zeigt (Svetel et al., 2001). Es ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die durch Leberzirrhose und Neurodegeneration aufgrund eines gestörten Kupfermetabolismus charakterisiert ist. Die Pathologie liegt in einer reduzierten Exkretion von Kupfer in die Galle. Es kommt zur Ansammlung von Kupfer aufgrund einer Funktionsstörung des Kupfer-Transportproteins ATP7B. Das Wilson-Gen (ATP7B-Gen) codiert für dieses Protein, welches vor allem in der Leber exprimiert wird. Bei Funktionseinschränkung des Proteins sammelt sich Kupfer zunächst in den Hepatozyten an, wodurch eine Leberzirrhose entstehen kann. Im weiteren Verlauf wird der Überschuss an Kupfer von extrahepatischen Geweben aufgenommen. Ablagerungsorte sind der Limbus der Kornea, wo der so genannte Kayser-Fleischer-Kornealring entsteht und die Basalganglien. Die Ablagerung in den Basalganglien, die zu Degeneration der Neurone und zur Gliose führt, erklärt die neurologischen Symptome wie Tremor, Parkinsonismus und Dystonien. Des Weiteren können psychische Symptome wie Persönlichkeitsveränderungen oder Schizophrenie bei Wilson-Patienten beobachtet

werden. Auf Aufbau und Funktion des ATP7B-Proteins wird in Kapitel 1.2.2.2 noch detailliert eingegangen.

1.1.2.4 Heredodegenerative Erkrankungen

Diesen Erkrankungen liegt ein Prozess der Neurodegeneration zugrunde, als Folge dessen es auch zu einer Dystonie kommen kann. Eine Vielzahl dieser Erkrankungen ist genetisch bedingt. Beispiele sind die Chorea Huntington, der Morbus Parkinson, die Multisystematrophien und die mitochondrialen Enzephalopathien.

1.1.3 Epidemiologie

Die hier aufgeführten Daten zur Epidemiologie der Dystonie basieren auf einer jüngst durchgeführten Querschnittsstudie der ESDE (=Epidemiological Study of Dystonia in Europe)-Collaborative Group (ESDE, 2000). Sie ergab eine Prävalenz von 152 Patienten mit primärer Dystonie pro 1.000.000 Individuen (95%-Konfidenzintervall: 142-162 pro 1.000.000). Die Tabelle 1.1 zeigt die berechneten Prävalenzraten für die einzelnen kategorisierten Formen.

Typ	Fälle	Prävalenzrate ^a	95%-KI ^b
<i>fokal</i>	677	117	(108-126)
<i>segmental</i>	183	32	(27-36)
<i>multi-fokal</i>	14	2,4	(1,3-1,4)
<i>Torticollis</i>	330	57	(51-63,5)
<i>Blepharospasmus</i>	208	36	(31-41)
<i>Schreibkrampf</i>	81	14	(11-17)

^aPrävalenzraten pro eine Million; ^b95%-Konfidenzintervall

Tabelle 1.1: Epidemiologische Daten zur primären Dystonie (ESDE, 2000)

Zum Einfluss des Geschlechts auf die Erkrankung wurde festgestellt, dass die multifokale, die segmentale und die fokale Dystonie mit Ausnahme des Schreibkrampfes häufiger bei Frauen als bei Männern vorkommen. Ein früheres Alter der Erstmanifestation bei Männern im Vergleich zu Frauen wurde sowohl für segmentale Dystonie (44,6 bei Männern zu 53,3 bei Frauen), als auch für fokale Dystonie (43,8 zu 47,8) beobachtet (ESDE, 1999).

1.2 Spezieller Teil

1.2.1 Fragestellung

Im Rahmen der vorgelegten Dissertation wurden verschiedene Gene analysiert. Die Fragestellung war, ob Mutationen innerhalb dieser Gene oder aber Assoziationen von genetischen Markern dieser Gene (wie z.B. Polymorphismen, Microsatellit-Allele, Insertionen) mit der fokalen idiopathischen Torsionsdystonie (F-ITD) zu finden sind. Die einzelnen Gene werden im Detail in den folgenden Kapiteln 1.2.2 – 1.2.7 besprochen.

1.2.2 Zur Bedeutung des Kupferstoffwechsels bei der Dystonie

1.2.2.1 Überblick

Anhaltspunkte für eine Störung des Kupfermetabolismus bei F-ITD sind in mehreren Studien beschrieben worden. Im Rahmen einer post mortem Studie wurde der Gehalt der Schwermetalle Kupfer, Mangan, Eisen, Zink und Kalzium in ausgewählten Kerngebieten des Gehirns bei drei Patienten mit Dystonie und zehn Kontrollen untersucht (Becker et al., 1999). Der Kupfergehalt im Globus pallidus und im Putamen war bei den Dystonieklienten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Der Mangangehalt zeigte bei den Patienten signifikant erhöhte Werte im Putamen und im Thalamus. Eine weitere Studie untersuchte die Expression der Kupfertransportproteine ATP7A (Menkes-Protein), ATP7B (Wilson-Protein) und Ceruloplasmin bei 3 Dystonieklienten (2 mit fokaler und einer mit generalisierter Dystonie) und 3 Kontrollen (Berg et al., 2000). Die Expression des Menkes-Proteins war bei allen drei Patienten deutlich erniedrigt im Vergleich zu den Kontrollen. Die Expression des Wilson-Proteins und des Ceruloplasmins war bei den beiden Patienten mit F-ITD verglichen mit den Kontrollen erhöht, jedoch bei dem Patienten mit generalisierter Dystonie reduziert. Bei 24 Patienten mit F-ITD und 17 Kontrollen verglich man den Gehalt an Kupfer und die Expression des Menkes-Gens (ATP7A) in peripheren

Leukozyten und fand für beide Parameter erniedrigte Werte bei den Patienten (Kruse et al., 2001). Interessanterweise zeigten in einer weiteren Studie 2 Familienmitglieder einer Familie mit autosomal-dominant vererbter whispering dysphonia neben den für diese Erkrankung charakteristischen Symptomen der Dystonie auch eine Kupferstoffwechselstörung ähnlich dem Morbus Wilson (Parker, 1985).

1.2.2.2 Der humane Kupfermetabolismus

Kupfer ist ein integraler Bestandteil vieler Enzyme. Geringe Mengen sind somit lebenswichtig, aber ein Zuviel an Kupfer im Körper ist toxisch für das Gewebe. Die Homöostase und der Transport dieses Elements werden durch zahlreiche Proteine reguliert. Durch Absorption im Magen und Dünndarm gelangt Kupfer über das Transportprotein hCTR1 in die Mukosazellen. An der basolateralen Seite der Zellen erfolgt die Abgabe in den portalen Kreislauf über das Menkes-Protein (ATP7A). Wie auch das Wilson-Protein (ATP7B), welches vor allem in der Leber exprimiert wird, ist ATP7A eine P-Typ ATPase mit hoher Strukturhomologie zu ATP7B. Im Blut bindet Kupfer an Albumin oder Histidin. Nach Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} erfolgt die Aufnahme des Elementes in die Hepatozyten über passive Transportmechanismen. Dort erfolgt eine Speicherung in Enzymen, wie z.B. der Superoxiddismutase oder in Form von Methallotionin-Kupfer. Darüber hinaus kann Kupfer unter Vermittlung von ATP7B im Golgi-Apparat in Ceruloplasmin inkorporiert werden (Petrukhin et al., 1994). Ceruloplasmin wird von Hepatozyten abgegeben und dient als wichtiges Transportvehikel des Kupfers zu peripheren Geweben. ATP7B vermittelt auch die biliäre Exkretion von Kupfer über die kanalliculäre Membran der Hepatozyten. Das periphere Gewebe kann Kupfer entweder aus der Bindung an Albumin oder Histidin aufnehmen, oder aber aus Ceruloplasmin unter Vermittlung eines Ceruloplasmin-Rezeptors. In beiden Fällen gelangt das Element nach Reduktion, wie auch in der Leber, durch einen passiven Transportmechanismus in die Zelle. Im Unterschied zum Hepatozyten ist im peripheren Gewebe und vor allem auch im Gehirn nicht ATP7B sondern ATP7A für eine Weiterverteilung des Elements und auch für eine spätere Ausschleusung in den Extrazellularraum verantwortlich. Kupfer wird hierzu im Trans-

Golgi-Netzwerk (TGN) an ATP7A gebunden um dann als Komplex über die Plasmamembran abgegeben zu werden. Bei den intrazellulären Transportmechanismen ist das Kupfer-Chaperon-Protein ATOX1 von großer Bedeutung, da es den Transport von Kupfer zu ATP7A und auch zu ATP7B vermittelt (Larin et al., 1999).

1.2.2.3 Untersuchte Kupfertransportproteine

Die in Kap. 1.2.2.1 aufgeführten Daten zeigen Hinweise für einen gestörten Kupfermetabolismus bei Dystoniepatienten. Im Rahmen der Arbeit wurden mit ATP7A, ATP7B und ATOX1 zentrale Gene des Kupfermetabolismus mittels Sequenzanalyse untersucht. Das Menkes-Protein (ATP7A), welches ja für einen Transport von Kupfer aus der Zelle heraus verantwortlich ist, könnte bei einer Funktionseinschränkung zu einer Ansammlung von Kupfer im Intrazellularraum führen, wie es bei Dystoniepatienten beschrieben wurde (Becker et al., 1999). Da das komplette Gen aus 23 Exons besteht, war eine Fokussierung bei der Sequenzierung notwendig. ATP7A ist im Ausgangszustand im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert. Dort inkorporiert es Kupfer zur Weiterverteilung an Enzyme oder über die Plasmamembran an den Extrazellularraum. Das Golgi-Lokalisationssignal wird von Exon 10 codiert (Francis et al., 1998) und ein Di-Leucin-Motif am C-Terminus von Exon 23 vermittelt die Endozytose von der Plasmamembran (Francis et al., 1999). Aufgrund der funktionellen Bedeutung dieser beiden Exone des Gens wurden sie fokussiert analysiert. Ergänzend dazu erfolgte eine Analyse der kompletten Promotorregion des Gens, um zu untersuchen, ob Mutationen in diesem Bereich als direkter Grund für eine reduzierte Genexpression zu finden waren. Der überwiegende Anteil aller Mutationen (englisch="mutational hot spots") im Wilson-Gen (ATP7B) in der kaukasischen Bevölkerung ist in den Exonen 8, 14 und 18 zu finden (Shah et al., 1997). Aus diesem Grund wurden ausschließlich diese 3 Exone untersucht. Da der Morbus Wilson eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung ist, manifestiert sie sich nur dann, wenn beide Allele des ATP7B-Gens mutiert sind. Aber zumindest bei einigen der klinisch unauffälligen heterozygoten Mutationsträger fanden sich biochemische und morphologische Abnormalitäten (Brewer, 2001). Neben einem niedrigen

Coeruloplasmin und erhöhter Kupferausscheidung im Urin fand sich eine Akkumulation von Kupfer in der Leber. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob heterozygote Mutationsträger unter den Patienten mit F-ITD häufiger zu finden sind als in der Normalbevölkerung. Dieses wäre eine mögliche Erklärung für die Berichte über erhöhte Kupferspiegel bei F-ITD.

Das intrazelluläre Kupfer-Chaperone-Protein ATOX1 wurde mit seinen 3 codierenden Exonen komplett sequenziert. Da es Kupfer zu ATP7A und ATP7B transportiert und somit eine Interaktion zwischen diesen Proteinen besteht (Larin et al., 1999), könnten veränderte Strukturen von ATOX1 zu einer Störung dieser Interaktion und damit zu einer gestörten Funktion von ATP7A und ATP7B führen.

1.2.3 Das DYT1-Gen

1.2.3.1 Überblick

Das DYT1-Gen ist auf Chromosom 9q34 lokalisiert und überspannt eine Region von 10kb (Ozelius et al., 1989; Ozelius et al., 1997). Es besteht aus 5 Exons mit 998 Basenpaaren und codiert für ein 332 Aminosäuren langes Protein, genannt TorsinA (TOR1A). Dieses Protein zählt zur Familie der AAA+- (ATPase associated with a variety of cellular activities) ATPasen. Ihnen gemeinsam ist eine Mg²⁺-ATP bindende Domäne, eine AAA+ spezifische Region, die bei allen Vertretern dieser Familie homolog ist und eine Ringstruktur mit sechs Transmembran-Domänen. Das Protein ist an der intrazellulären Lokalisation und Faltung anderer Proteine beteiligt (Ozelius et al., 1999). In besonders hohen Konzentrationen findet es sich im Kortex, den Basalganglien, dem Hippocampus, dem Thalamus und der Substantia nigra (Augood et al., 2003). Interessanterweise zeigen die meisten Patienten mit DYT1-Dystonie dieselbe Mutation: Eine 3bp-Deletion in Exon 5 des Gens, die zum Verlust eines GAG-Triplets führt, welches für die Aminosäure Glutamat am C-Terminus des Proteins codiert (Ozelius et al., 1997). Diese Deletion führt dazu, dass TOR1A intrazellulär Aggregate mit Membranbestandteilen bildet und somit den intrazellulären Membrantransport stört (Hewett et al., 2000). Die Deletion lässt sich jedoch nur bei ca. 90% aller Ashkenazi-

Juden mit generalisierter Dystonie und bei 50-60% der Patienten in übrigen Populationen finden. Es zeigte sich auch, dass bei bekannter GAG-Deletion der Phänotyp sehr unterschiedlich sein kann. Beobachtet wurden fokale Dystonien, schwere generalisierte Dystonien oder aber auch ein komplett unauffälliger Phänotyp (Opal et al., 2002; Leube et al., 1999). Bressman und Mitarbeiter legten Richtlinien zur Testung auf die DYT1-Deletion fest: Jeder Dystoniepatient, unabhängig von Phänotyp oder Familienanamnese, sollte mit Beginn der Symptomatik vor dem 26. Lebensjahr auf die DYT1-Deletion getestet werden (Bressman et al., 2000).

1.2.3.2 Polymorphismen im DYT1-Gen

Eine Studie untersuchte das DYT1-Gen bei 15 Individuen mit primär generalisierter Dystonie und 24 Individuen mit „Early Onset Parkinson“ (EOP) nach Mutationen (Chung-on Leung et al., 2001). Zwei häufige Polymorphismen wurden identifiziert: Zum einen war dies der **C246T-Polymorphismus in Exon 2** des Gens. Dieser Polymorphismus führt nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. Alanin bleibt an Position 82 der Aminosäuresequenz erhalten. Zum anderen fand sich ein zweiter Polymorphismus. Dieser **G646C-Polymorphismus in Exon 4** führte zum Austausch der Aminosäure Aspartat durch Histidin an Position 216. Beide Polymorphismen liegen in einem Abstand von ca. 4kb innerhalb des DYT1-Gens. Abbildung 1.1 zeigt die Lokalisation und Struktur des DYT1-Gens. Dargestellt sind auch die Lokalisationen der beiden untersuchten Polymorphismen und der GAG-Deletion.

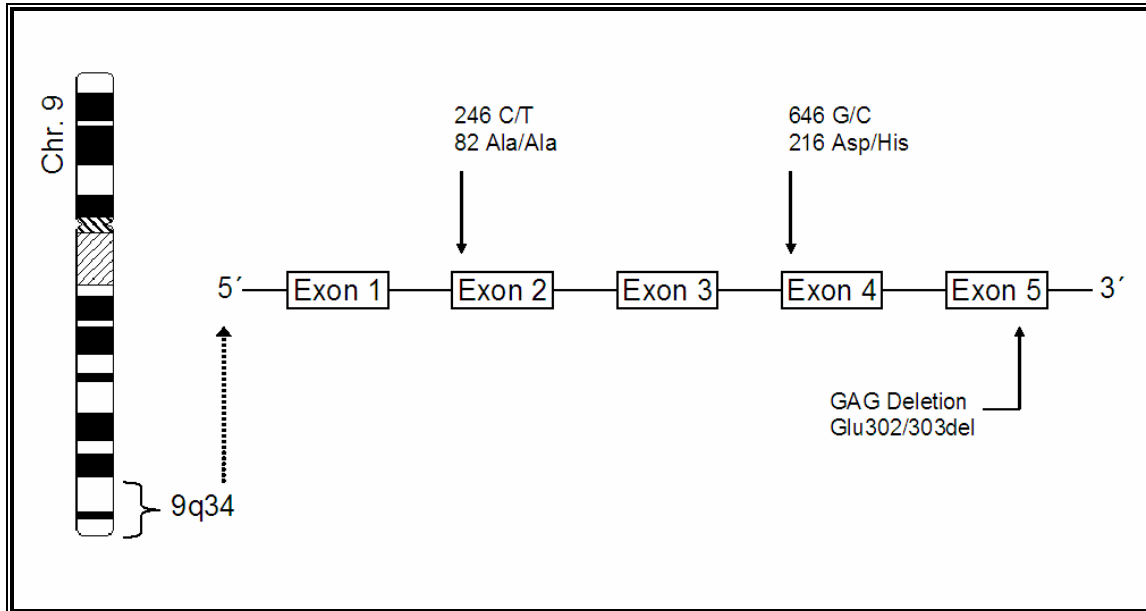


Abbildung 1.1: Lokalisation und Struktur des DYT1-Gens. Die Abbildung zeigt die Lokalisation des DYT1-Gens auf Chromosom 9q34. Dargestellt sind die 5 Exone mit dem 246 C/T-Polymorphismus in Exon 2 und dem 646 G/C-Polymorphismus in Exon 4. Dargestellt ist auch die Lokalisation der GAG-Deletion in Exon 5. Ala=Alanin, Asp=Aspartat, His=Histidin, Glu=Glutamat, del=Deletion, Chr.=Chromosom.

Die in Kap. 1.2.3.1 berichtete GAG-Deletion im DYT1-Gen ist bei Patienten mit sporadischer F-ITD sehr selten (Brassat et al., 2000). Während auch beim Morbus Parkinson die meisten Fälle sporadisch auftreten, ohne dass sich genetische Defekte nachweisen lassen, existieren auch hier Mutationen in verschiedenen Genen, die zumindest bei einem Teil der Parkinsonpatienten gefunden wurden. Im Jahre 1997 fanden Polymeropoulos et al. eine Mutation im Alpha-Synuclein Gen bei familiärem Morbus Parkinson und entdeckten somit den ersten genetischen Defekt bei dieser Erkrankung (Polymeropoulos et al., 1997). Mutationen im Alpha-Synuclein Gen sind jedoch sehr selten. Farrer et al. zeigten aber, dass bestimmte Haplotypen von Polymorphismen in diesem Gen mit Morbus Parkinson assoziiert sind (Farrer et al., 2001). Bei Haplotypen handelt es sich um ein Abfolge von Nukleotiden an einer oder mehreren polymorphen Stellen auf einem einzelnen Chromosom beim jeweiligen Individuum. Ein Haplotyp kann für ein Gen oder auch für eine chromosomale Region definiert werden. Aufgrund der räumlichen Nähe, die die Loci der Haplotypen zueinander haben, tendieren sie dazu gemeinsam weitervererbt zu werden. Je enger die Loci zusammenliegen, umso unwahrscheinlicher ist es, dass sie durch crossing-over getrennt werden. Interessanterweise zeigte eine kürzlich durchgeführte Studie zu dem Locus *PARK3*, dass auch Haplotypen dieses Locus einen Einfluß auf das Alter der

Erstmanifestation des Morbus Parkinson hatten (Karamohamed et al., 2003). Auf diesen Ergebnissen basierend und den gleichen Ansatz wie in den Haplotypenstudien zum Morbus Parkinson verfolgend wurden die beiden oben aufgeführten Polymorphismen (C246T und G646C) im DYT1-Gen untersucht. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit analysiert, ob die Polymorphismen oder aber deren Haplotypen als Suszeptibilitätsfaktoren für die F-ITD in Frage kommen.

1.2.4 Zur Bedeutung des Homocysteinmetabolismus bei der Dystonie

1.2.4.1 Überblick bisheriger Studienergebnisse

In einer Fall-Kontroll-Studie wurde der Homocysteingehalt im Blut bei 24 Patienten mit primärer Torsionsdystonie und 24 Kontrollen nach 10 Stunden Fasten gemessen (Mueller et al., 2000). Die Patienten mit Dystonie zeigten signifikant ($p=0,008$, t-Test) erhöhte Werte mit $19,3 (+/-8,5)$ $\mu\text{mol/ml}$ im Vergleich zu Kontrollen mit $13,9 (+/- 4,2)$ $\mu\text{mol/ml}$. Während eine Korrelation zu Alter und Dauer der Erkrankung nicht gefunden werden konnte, zeigten sich signifikante Unterschiede in Bezug auf die Schwere der Erkrankung. Je ausgeprägter die Symptome waren, umso höher waren auch die Homocystein-Spiegel im Blut ($p=0,046$). Verschiedene Fallberichte zeigten eine Koinzidenz von Dystonien und hereditären Erkrankungen des Homocysteinstoffwechsels. Kempster und Mitarbeiter berichteten von 3 Patienten mit einer Homocysteinurie aufgrund eines Defekts der Cystathionine- β -Synthase (CBS), die auch eine progressive generalisierte Dystonie entwickelten (Kempster et al., 1988). Davous und Rondot beschrieben einen Jungen, der aufgrund einer Homocysteinurie durch einen Defekt der CBS für diese Erkrankung charakteristische Symptome wie mentale Retardation, epileptische Anfälle, Linsenluxation, Skelettdeformitäten und vaskuläre Okklusionen entwickelte. Im Verlauf der Erkrankung zeigte sich bei ihm aber auch eine Dystonie (Davous und Rondot, 1983). In einem weiteren Fall wurde von zwei Schwestern berichtet mit ausgeprägter generalisierter Dystonie und Homocysteinurie bei im MRT sichtbaren Läsionen der Basalganglien (Berardelli et al., 1991). Aufgrund dieser Daten wurde hier untersucht, ob Polymorphismen in zentralen Genen des Homocysteinstoffwechsels, nämlich der Methylentetrahydrofolatreduktase

(MTHFR), der Cystathionin- β -Synthase (CBS) oder der Methionin-Synthase (MS) eine Assoziation mit der F-ITD zeigten.

1.2.4.2 Der humane Homocysteinmetabolismus

Die schwefelhaltige Aminosäure Homocystein ist ein Zwischenprodukt im Methioninstoffwechsel und entsteht aus Methionin durch Demethylierung von S-Adenosylmethionin (AdoMet) zu S-Adenosylhomocystein (AdoHcy) (Finkelstein et al., 1990). Der metabolische Status bestimmt dann die Weiterverarbeitung von Homocystein. Zum Einen kann es über das Vitamin B6-abhängige Enzym Cystathionin- β -Synthase (CBS) dem Transsulfierungsweg zugeführt werden, wo es irreversibel in Cystein umgewandelt wird. Unter negativer Methionin-Balance kann es auch über eine Remethylierung mit Hilfe des Enzyms Methionin-Synthase (MS) zu Methionin zurückverwandelt werden. MS benötigt als Cosubstrat für diesen Reaktionsschritt neben Vitamin B12 auch Methyltetrahydrofolat (Methyl-THF). Die Bildung von Methyl-THF wird durch die Vitamin B2-abhängige Methyltetrahydrofolatreduktase (MTHFR) katalysiert, welche somit einen indirekten aber großen Einfluss auf den Homocystein-Spiegel hat (Refsum et al., 1998). Bei einem Defekt oder aber einer verminderten Aktivität eines dieser Enzyme durch Strukturalterationen oder Vitaminmangel kommt es zu einem Anstieg von Homocystein im Blut. Abbildung 1.2 zeigt den Methioninstoffwechsel und soll die mögliche Akkumulation von Homocystein bei einem Defekt eines der Enzyme verdeutlichen:

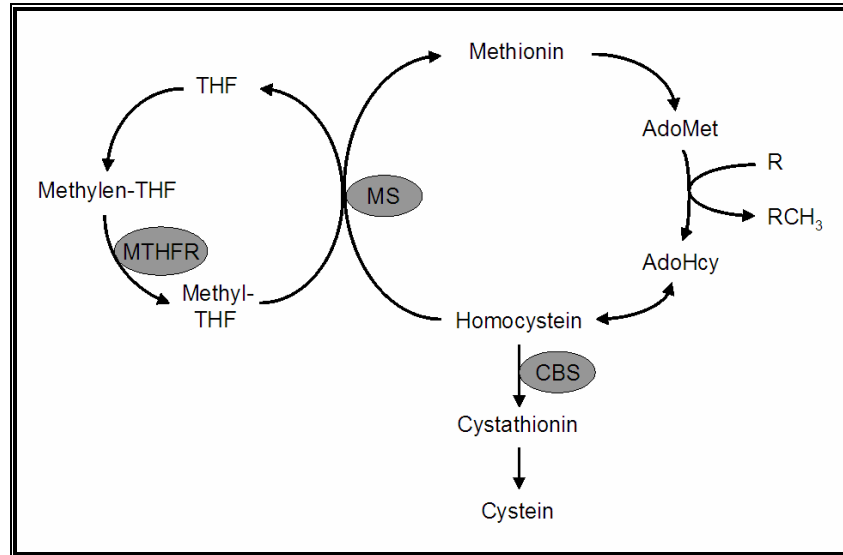


Abbildung 1.2: Der Homocystein-Metabolismus. THF, Tetrahydrofolat; MTHFR, Methylen-tetrahydrofolat-reduktase; MS, Methionin-Synthase; CBS, Cystathionin- β -Synthase; AdoMet, S-Adenosylmethionin; AdoHcy, S-Adenosylhomocystein

1.2.4.3 Untersuchte Kandidatengene zum Homocystein-Stoffwechsel

Analysiert wurden der C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen, eine 68bp-Insertion und ein 31bp VNTR- (Variable Number of Tandem Repeat) Polymorphismus im CBS-Gen und schließlich der A2756G-Polymorphismus im MS-Gen. Es wurden speziell diese Polymorphismen ausgewählt, weil für sie ein Effekt auf den Homocystein-Spiegel beschrieben wurde:

Der **C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen** führt zum Austausch der Aminosäure Alanin durch Valin. Bei Vorhandensein des homozygoten T/T-Genotyps zeigten untersuchte Individuen einen hochsignifikant erhöhten Homocystein-Spiegel ($p < 0,01$) bei reduzierter Enzymaktivität der MTHFR (Frosst et al., 1995). Diese Studie zeigte auch, dass der TT-Genotyp mit einer deutlicheren Abnahme der Enzymaktivität verbunden war als der heterozygote C/T-Genotyp.

Eine **68bp-Insertion in Exon 8 des CBS-Gens** wurde mit einer Frequenz von 11,7% in einer untersuchten Kontrollpopulation gefunden (Tsai et al., 1996). Ob diese Insertion isoliert einen Effekt auf die Enzymaktivität zeigt, ist bisher nicht abschließend geklärt (Sperandeo et al., 1996; de Stefano et al., 1998; Tsai et al., 2000). Die Kombination des

Auftretens des zuvor beschriebenen C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen mit dieser Insertion und deren Auswirkungen auf den Homocystein-Spiegel wurden im Rahmen einer großen Studie mit 787 Kontrollen und 309 Patienten mit venöser oder arterieller Verschlusskrankheit untersucht (de Franchis et al., 2000): Ein gehäuftes Vorkommen des C677T-Polymorphismus in Verbindung mit der Insertion, aber nicht ein gehäuftes Vorkommen der isolierten Insertion wurde bei den untersuchten Individuen mit Hyperhomocysteinämie beschrieben (OR=21,9; KI=8,35-57,4). Im gleichen Gen wurde ein **31bp VNTR-Polymorphismus** beschrieben. Biochemische und molekularbiologische Analysen der Beziehung zwischen Anzahl an Repeats und Enzymaktivität und Homocysteinspiegeln zeigten, dass dieser VNTR mit einer reduzierten CBS Aktivität assoziiert war ($p=0.035$) und zu erhöhten Homocysteinspiegeln nach Belastung führte ($p=0.002$) (Lievers et al., 2001). Abbildung 1.2 soll diesen Zusammenhang verdeutlichen.

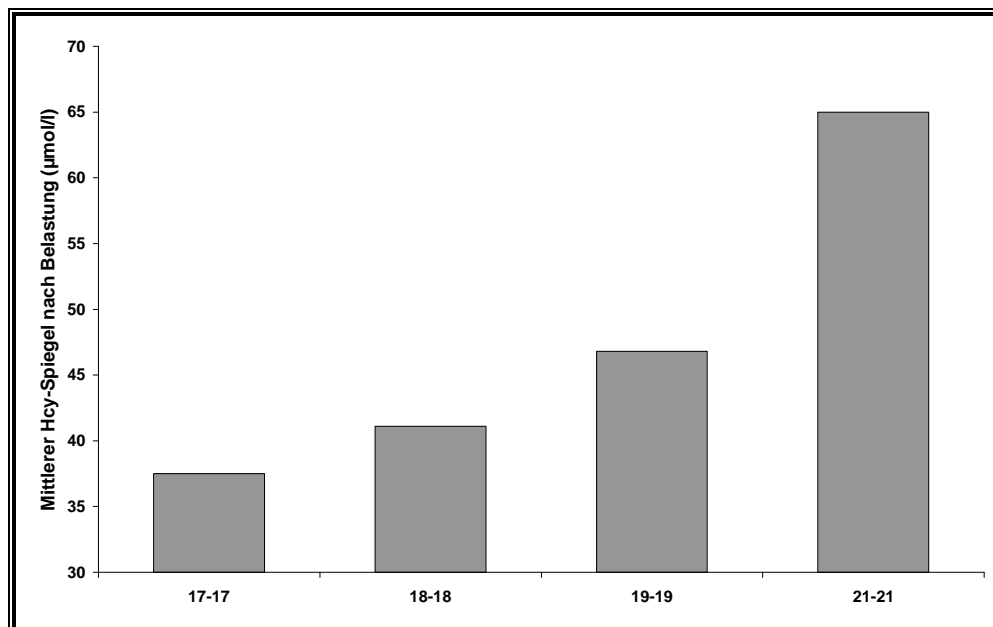


Abbildung 1.3 (nach Lievers et al., 2000): Mittlerer Homocysteinspiegel nach Belastung bei Probanden in Zuordnung zum Genotyp des 31bp VNTR im CBS Gen. Auf der x-Achse sind die 4 Genotypen, so wie auch von Lievers et al. gegenübergestellt, abgebildet: 17-17 ($n=11$), 18-18 ($n=289$), 19-19 ($n=7$), 21-21 ($n=2$). Die y-Achse zeigt den gemessenen mittleren Homocysteinspiegel nach Belastung in $\mu\text{mol/l}$. p (für linearen Trend) nach Lievers et al. =0,013. Hcy=Homocystein.

Lievers et al. fanden bei der Analyse von 190 Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit und 381 Kontrollen Individuen mit 16 bis maximal 21 Repeats des

VNTR im CBS Gen. Abbildung 1.3 verdeutlicht die kontinuierliche Zunahme des Hcy-Spiegels mit der Anzahl an Repeats. Die Analyse zur CBS Enzymaktivität wurde an 26 Individuen durch Messung der Aktivität der CBS in kulturierten Fibroblasten durchgeführt und zeigte eine deutliche negative Korrelation: Mit der Anzahl der Repeats nahm die Enzymaktivität sukzessive ab.

Der relativ häufige **A2756G-Polymorphismus im MS-Gen** führte zu einem Austausch der Aminosäure Aspartat durch Glycin an Position 919 der Aminosäuresequenz. Es wurde auch für diesen Polymorphismus ein Effekt auf die Homocystein-Konzentration nachgewiesen (Harmon et al., 1999): Es fand sich eine signifikante Assoziation des Polymorphismus mit der Homocystein-Konzentration ($p=0,03$), wobei der AA-Genotyp mit einer leichten aber signifikanten Erhöhung des Homocystein-Spiegels verbunden war.

1.2.5 Das (CA)_n-Repeat im Gen des Dopamin-5-Rezeptors bei F-ITD

1.2.5.1 Das Dopamin-D5-Rezeptor-Gen (DRD5)

Das Dopamin-D5-Rezeptor-Gen ist auf Chromosom 4p15.1-p15.3 lokalisiert (Polymeropoulos et al., 1991; Grandy et al., 1992). Der Rezeptor selber ist wie die anderen vier Dopaminrezeptoren (D1-D4) ein Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und besitzt hohe Strukturhomologie mit dem D1-Rezeptor. Die Affinität des D5-Rezeptors zu Dopamin ist im Vergleich zum D1-Rezeptor jedoch 10fach höher (Sunahara et al., 1991). Die hohe Affinität für den endogenen Neurotransmitter Dopamin lässt vermuten, dass der D5-Rezeptor im dopaminergen System für die Aufrechterhaltung einer dopaminergen Grundstimulation verantwortlich ist (Ongini et al., 1989). Stark exprimiert wird der D5-Rezeptor vor allem in Neuronen und hier speziell in der Substantia nigra pars compacta, im Neocortex und im Hippocampus (Beischlag et al., 1995). Sherrington et al. identifizierten einen (CA)_n-Repeat Polymorphismus im DRD5-Gen, wobei 12 Allele dieses Polymorphismus beschrieben worden sind (Sherrington et al., 1993).

1.2.5.2 Überblick bisheriger Studienergebnisse

Die Bedeutung des Dopamin-D5-Rezeptor-Gens (DRD5) als ein mögliches Suszeptibilitätsgen für die F-ITD wurde in der Vergangenheit in drei Fall-Kontroll-Studien untersucht. Initial wurden 100 Patienten mit Torticollis und Kontrollen untersucht (Placzek et al., 2001). Zum einen fand sich eine Häufung des Allels 2 des (CA)_n-Repeats in der Patientenpopulation ($p=0.004$) und zum anderen eine auch nach der Bonferroni-Korrektur signifikante Häufung des Allels 6 in der Kontrollpopulation. In einer weiteren Studie untersuchte man den Polymorphismus in einer Population von 88 Patienten mit Blepharospasmus und Kontrollen (Misbahuddin et al., 2002). Auch hier fand sich ein erhöhtes Vorkommen des Allels 2 bei den Patienten im Vergleich zu Kontrollen ($p=0.009$), wobei die Ergebnisse zum Allel 6 von Placzek et al. nicht repliziert werden konnten. Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte später 104 Patienten mit Torticollis und Kontrollen (Brancati et al., 2003). Es zeigte sich in dieser Population eine Häufung des Allels 4 bei den Patienten ($p=0.01$) und eine allerdings nicht signifikante Häufung des Allels 10 bei den Kontrollen ($p=0.06$).

1.2.5.3 Zur Bedeutung des Neurotransmitters Dopamin bei Dystonien

Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass das nigrostriatale dopaminerge System eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Dystonie spielt. Wie bereits in Kap. 1.1.2.2 beschrieben, ist eine spezielle Form der Dystonie, die dopa-responsive Dsytonie (DRD), das Resultat eines gestörten Dopamin-Metabolismus aufgrund eines Enzymdefektes in der Dopamin-Synthese (Ichinose et al., 2001; Ichinose et al., 1994). Außerdem kann sich durch eine extrinsische Beeinflussung des dopaminergen Systems durch Neuroleptika, bei denen es sich ja um Dopaminantagonisten handelt, eine Tardive Dystonie als Nebenwirkung zeigen, welche eine ähnliche klinische Präsentation wie die F-ITD zeigen kann. 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) schädigt irreversibel die dopaminergen Zellen der Substantia nigra und als Resultat zeigte sich in Studien an Pavianen neben einem Parkinsonismus eine transiente dem Parkinsonismus vorausgehende Dystonie (Perlmutter et al., 1997a). PET- und SPECT-Studien mit D2-

Rezeptor-Liganden zeigten eine reduzierte postsynaptische Bindung dieser Liganden im Striatum von Patienten mit F-ITD (Perlmutter et al., 1997b; Naumann et al., 1998).

1.2.5.4 Zur Analyse des (CA)_n-Repeat Polymorphismus im DRD5-Gen

Aufgrund der Daten, die für eine mögliche Beteiligung des dopaminergen Systems bei Dystonien sprechen (siehe Kap. 1.2.5.3), wurde mit dem DRD5-Gen im Rahmen dieser Arbeit ein Kandidatengen analysiert, für welches bereits positive Ergebnisse existieren. Analysiert wurde die Verteilung der Allelfrequenzen des (CA)_n-Repeat-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen. Die Analyse dieses Polymorphismus mit bisher 12 beschriebenen Allelen erfolgte mit der Fragestellung, ob sich die vorausgegangenen Studien in der hier untersuchten Population replizieren ließen.

1.2.6 Immunologische Mechanismen bei F-ITD

1.2.6.1 Überblick bisheriger Studienergebnisse

In der Vergangenheit zeigten sich in verschiedenen Studien Zusammenhänge zwischen autoimmunologischen Mechanismen und F-ITD. (Jankovic und Ford, 1983). In einer Studie wurden die Titer von Autoimmunantikörpern wie antinukleäre Antikörper (ANA), antithyreoidale Antikörper und weitere Antikörper bei 254 Patienten mit cervicaler Dystonie und 137 Kontrollen untersucht (Duane et al., 1995). Es fanden sich erhöhte Seruntiter für die ANA in der Patientengruppe ($p=0.005$). Eine andere Studie untersuchte die Lymphozytenzahlen bei 11 Patienten mit Torticollis und 25 Kontrollen (Moore et al., 1986). Hier fanden sich signifikant reduzierte Zellzahlen für T-Suppressor- und T-Helfer-Zellen in der Patientenpopulation ($p<0.02$). Wiederholt wurde auch in Fallberichten von einer Koinzidenz von Autoimmunerkrankungen wie Myasthenia gravis oder Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) und F-ITD berichtet (Jankovic und Patten, 1987; Rajagopalan et al., 1989). Interessanterweise zeigte eine weitere Studie eine deutliche Besserung der Symptomatik bei manchen Patienten mit

cervicaler Dystonie nach wiederholter Injektion von Methylprednisolon (Kumar et al., 1997).

Die Assoziation bestimmter Allele des HLA-DRB Locus mit autoimmunen Erkrankungen wie Multiple Sklerose (MS) oder Diabetes mellitus ist allgemein bekannt (Klein und Sato, 2000b; Undlien et al., 2001). (Zur Terminologie: Der Terminus „DRB“ bezieht sich auf die genotypische Typisierung, während sich der Terminus „DR“ auf die serologische Typisierung bezieht.) Die HLA-DRB Allele, welche sich gehäuft bei Diabetes mellitus Typ 1 finden, sind die Allele DR3 und DR4 (Undlien et al., 2001). Eine in Rochester (Minnesota) durchgeführte epidemiologische Studie zeigte bei Patienten mit cervicaler Dystonie ein gehäuftes Vorkommen von Diabetes mellitus und Schilddrüsenenerkrankungen, die ja häufig auch eine autoimmune Genese zeigen (Claypool et al., 1995). Es ist bekannt, dass autoimmune Mechanismen bei ein und derselben Person häufig zu mehreren Erkrankungen gleichzeitig führen können. Eine Störung des Immunsystems könnte aufgrund dieser Ergebnisse somit auch der Grund für die Entstehung der Dystonie sein. Man könnte daher vermuten, dass bei der F-ITD eine Häufung speziell der HLA-DRB Allele zu finden ist, die eine positive Assoziation zum Diabetes mellitus zeigten (DR3/DR4). Die einzige bisher publizierte HLA-Typisierungsstudie bei F-ITD, mit allerdings sehr geringen Fallzahlen (n=13), zeigte eine Häufung des DR3-Allels bei den Dystoniepatienten (Korein et al., 1981). Eine andere Studie wiederum, durchgeführt mit 26 Patienten mit komplexem regionalem Schmerzsyndrom (CRPS), die im Verlauf eine multifokale oder generalisierte tonische Dystonie entwickelten, zeigte eine Häufung des DR13-Allels (Hilten et al., 2000).

1.2.6.2 Der HLA-Genkomplex

Das HLA-System stellt den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC= major histocompatibility complex) des Menschen dar (Klein und Sato, 2000a). Es beinhaltet zahlreiche Genorte, deren Produkte eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort und hier insbesondere bei der Prozessierung und Präsentation von Antigenen an T-Lymphozyten spielen. Es ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6p21 lokalisiert. Innerhalb des HLA-Systems liegen unterschiedliche Loci vor, zu denen auch der HLA-Locus gehört, welcher sich wiederum in 2 Klassen einteilen lässt, die strukturell und

funktionell verschieden sind. Zur Klasse I gehören neben anderen auch die Loci HLA-A, HLA-B und HLA-C. Diese HLA-ABC-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus in unterschiedlicher Quantität und dienen vor allem der Prozessierung endogener Proteine. Die Klasse II (Loci der HLA-D-Region) kann in mindestens 3 Subregionen unterteilt werden: HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP. Die Gewebsverteilung ist hier spezifisch, da sich die HLA-D-Moleküle vor allem auf B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen sowie dendritischen Zellen befinden. Die Klasse-II-Moleküle sind insbesondere für die Prozessierung exogener Proteine verantwortlich.

1.2.6.3 Zur Analyse des HLA-DRB-Locus

Aus folgenden Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem HLA DRB Locus selektiv ein Bestandteil der Klasse II des MHC analysiert: Zum einen existieren nur für diesen Locus positive Daten in Verbindung mit Dystonien (siehe Kap. 1.2.6.1) und zum anderen ist es gerade dieser Locus, der in Verbindung mit anderen Autoimmunerkrankungen immer wieder positive Ergebnisse in Assoziationsstudien zeigte (siehe auch Tabelle 4.1).

Der HLA-DRB Locus auf Chromosom 6 beinhaltet 13 verschiedene Allele. Nur für einige dieser Allele bestehen Hinweise für ein gehäuftes Vorkommen bei Dystonien, so dass speziell diese Allele fokussiert untersucht wurden. Zum einen fanden sich, wie oben aufgeführt (Hilten et al., 2000; Korein et al., 1981), die beiden Allele DRB3 und DRB13 gehäuft bei Patienten mit F-ITD oder selteneren Syndromen, die als Begleitsymptomatik eine Dystonie zeigten. Neben diesen beiden Allelen wurde auch das Allel DRB4 in die hier durchgeführten Analysen integriert. Es findet sich gehäuft bei Patienten mit Diabetes mellitus (DM) und Dystonien zeigen eine erhöhte Koinzidenz mit DM. Man könnte somit postulieren, dass der HLA DRB Locus für beide Erkrankungen eine Rolle bei der Frage nach prädispositionellen Faktoren spielt. Aus diesen Gründen wurden gezielt die Allele DRB3, DRB4 und DRB13 analysiert.

1.2.7 Neuroleptika induzierte tardive Dyskinesien und F-ITD

1.2.7.1 Tardive Dyskinesien und Dystonien unter Neuroleptikabehandlung

Aufgrund der in Kapitel 1.2.7.2 beschriebenen Ähnlichkeit zur F-ITD soll im Folgenden insbesondere auf die **Tardiven Dystonien** und **Tardiven Dyskinesien** eingegangen werden: Der Begriff „Tardive“ beschreibt die späte Erstmanifestation im Verlauf der Therapie und der Ausdruck „Dyskinesie“ beschreibt abnormale unfreiwillige Bewegungsmuster. Die klassischen **Tardiven Dyskinesien**, die zu den häufigsten extrapyramidalen Nebenwirkungen zählen, präsentieren sich somit als repetitive, in gewisser Weise rhythmische unwillkürliche Bewegungen. Eine häufige motorische Präsentation sind die orofacialen Dyskinesien, die auch unter dem Begriff des Bucco-linguo-mastikatorischem Syndroms zusammengefasst werden. Eine weitere Präsentation sind stereotype choreiforme unwillkürliche Bewegungen des Rumpfes und der Extremitäten. Zur Einteilung des Schweregrades dient die Abnormal Involuntary Movements Scale (AIMS). Mögliche Manifestationsformen der **tardiven Dystonien** sind Blepharospasmus, Torticollis, Retrocollis und oculogyrische Spasmen. Die Präsentation der Tardiven Dystonien ist sehr ähnlich den Symptomen der akuten Dystonien, so dass eine Unterscheidung dieser beiden Formen häufig nur aufgrund der Anamnese mit gezielter Frage nach einer Einnahme von Neuroleptika oder aufgrund der Dauer der Symptomatik möglich ist. Dystonien zählen zu den häufigsten phänotypischen Manifestationen der durch Neuroleptika induzierten Bewegungsstörungen (Molho et al., 1998; Jankovic et al., 1991).

1.2.7.2 Phänotypischer Vergleich der F-ITD und der tardiven Dyskinesien

Tan und Jankovic verglichen im Rahmen einer klinischen Studie zahlreiche Parameter bei 24 Patienten mit tardiver oromandibulärer Dystonie (OMD) und 92 Patienten mit idiopathischer OMD (Tan und Jankovic, 2000). Im Vergleich zeigten sich zahlreiche Gemeinsamkeiten: Blepharospasmus und cervicale Dystonie waren die häufigsten assoziierten Bewegungsstörungen in beiden Gruppen. Als weiteres wichtiges Ergebnis dieser Studie ist festzuhalten, dass eine Unterscheidung zwischen tardiver und

idiopathischer OMD insbesondere dann schwierig zu treffen ist, wenn die Bewegungsstörungen, facial beginnend, sich nicht auf andere Körperregionen ausbreiten.

1.2.7.3 Überblick bisheriger Studienergebnisse zu tardiven Dyskinesien

Sowohl für die F-ITD (Waddy et al., 1991) als auch für die neuroleptikainduzierten Tardiven Dyskinesien (TD) (Yassa und Ananth, 1981) wurde, basierend auf epidemiologischen Studien, eine genetische Prädisposition postuliert. Die Ergebnisse von Waddy et al. zur F-ITD sind in Kap. 1.1.2 erläutert. Yassa und Ananth untersuchten 500 Patienten mit einer Langzeitneuroleptikatherapie, unter denen 8 Patienten Verwandte ersten Grades hatten, die auch aufgrund psychiatrischer Grunderkrankungen Neuroleptika erhielten. Diese 8 Pärchen (Patient plus Verwandter mit Neuroleptikatherapie) zeigten eine Konkordanz für das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein Tardiver Dyskinesien. Kiriakakis et al. analysierten im Rahmen einer prospektiven Studie den Verlauf von 107 Patienten mit Tardiven Dystonien, einer Untergruppe der Tardiven Dyskinesien (Kiriakakis et al., 1998). Bei 2 von 20 Verwandten 1. Grades dieser 107 Indexpatienten zeigten sich auch tardive Dystonien als Nebenwirkung ihrer Neuroleptikatherapie. Dieses entspricht einem Anteil von 10%, welcher höher ist als das durchschnittliche Auftreten von tardiven Dystonien bei psychiatrischen Patienten unter Neuroleptikatherapie.

Hinweise für eine genetische Prädisposition zeigte sich auch in molekulargenetischen Studien, die Polymorphismen verschiedener Gene und deren Beziehung zu tardiven Dyskinesien (TD) untersuchten. Berichtet wurde in diesem Zusammenhang immer wieder über positive Assoziationen einiger der untersuchten Gene mit TD. Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den Genen aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden:

Ohmori et al. untersuchten 216 Patienten mit Schizophrenie und unterteilten diese dichotom in eine Gruppe mit Patienten, welche im Verlauf der Neuroleptikatherapie eine TD entwickelten und in eine zweite Gruppe, die keine TD entwickelte (Ohmori et al., 2001). Als genetischer Marker wurde der **A118G Polymorphismus im Gen des μ -opioid-Rezeptors** untersucht und es zeigte sich, dass das 118G-Allel signifikant

seltener bei den TD-Patienten gefunden wurde ($p=0.009$). In einer weiteren Studie analysierten Hori et al. 192 Patienten mit Schizophrenie (39 mit TD / 153 ohne TD) und 141 Kontrollen (Hori et al., 2000). Es wurde die Verteilung des **Ala-9Val Polymorphismus in der mitochondrialen Targetingsequenz (MTS) des Gens der Manganesesuperoxiddismutase (MnSOD)** untersucht, wobei das -9Ala-Allel signifikant seltener bei den TD-Patienten zu finden war ($p=0.02$). Dieses würde, ähnlich wie beim 118G-Allel im μ -OR, für eine protektive Rolle bei der Entstehung von TD unter Neuroleptikatherapie sprechen. Zahlreiche Studien verschiedener Arbeitsgruppen betrachteten den **Ser9Gly Polymorphismus in Exon 1 im Gen des Dopamin-3-Rezeptors (DRD3)** (Steen et al., 1997; Segman et al., 1999; Basile et al., 1999). Bei unterschiedlichen Fallzahlen und bei Analyse unterschiedlicher Populationen war diesen Studien gemeinsam, dass eine Häufung des 9Gly-Allels bei Patienten mit TD gefunden wurde. Als weiterer genetischer Marker wurde der **T102C Polymorphismus im Gen des 5-HT_{2A} Serotonin-Rezeptors** analysiert (Segman et al., 2001; Tan et al., 2001). Zwei voneinander unabhängige Studien berichteten von einer Häufung des 102C-Allels bei Patienten mit TD verglichen mit Patienten ohne TD. Segman et al. fanden bei der Analyse von 121 jüdischen Patienten mit Schizophrenie (59 mit TD / 62 ohne TD) und 96 Kontrollen ebenso signifikante Ergebnisse ($p=0.0008$) wie Tan et al. bei der Untersuchung von 221 Chinesen mit Schizophrenie (87 mit TD / 134 ohne TD) und 97 Kontrollen ($p=0.044$). Des Weiteren untersuchten Basile et al. den **A/C Polymorphismus an Position 734 in Intron 1 des CYP1A2-Gens** (Basile et al., 2000). Es zeigte sich hier, dass TD-Patienten, die homozygote Träger des C-Allels sind, eine signifikant höhere AIMS Score aufwiesen, verglichen mit Patienten vom A/C- oder A/A-Genotyp ($p=0.0007$). Verglichen mit den vorher aufgeführten Studien war der methodische Ansatz dieser Studie etwas anders. Bei insgesamt 85 untersuchten Patienten mit Schizophrenie wurden 3 Gruppen mit den 3 möglichen Genotypen (A/A, A/C, C/C) gebildet und der Score auf der AIMS-Skala wurde für jeden Patienten einzeln ermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die fünf hier aufgeführten Polymorphismen analysiert mit der Fragestellung, ob sie genetische Suszeptibilitätsfaktoren für die F-ITD sind.

1.3 Zusammenfassung der untersuchten Kandidatengene

Analysiert wurden zwei Polymorphismen des **DYT1-Gens**. Zum einen der C246T-Polymorphismus in Exon 2 und zum anderen der G646C-Polymorphismus in Exon 4. Des Weiteren wurden die Exone 10 und 23 des **Menkes-Proteins (ATP7A)**, die Exone 8, 14 und 18 des **Wilson-Proteins (ATP7B)** und die drei codierenden Exone des Gens **ATOX1** untersucht. Analysiert wurden auch zahlreiche Polymorphismen in Genen des Homocysteinestoffwechsels. Diese sind im Einzelnen: Der C677T-Polymorphismus im Gen der **Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR)**, die 68bp Insertion und der 31bp VNTR im Gen der **Cystathionin- β -Synthase (CBS)** und der A2756G-Polymorphismus im Gen der **Methionin-Synthase (MS)**. Im Gen des **Dopamin-D5-Rezeptors (DRD5)** wurde ein (CA)_n-Dinukleotid-Repeat Polymorphismus analysiert und als Bestandteil des HLA-Systems wurde im Speziellen der **HLA-DRB Locus** untersucht. Des Weiteren wurden folgende Polymorphismen analysiert: Der A118G Polymorphismus im Gen des **μ -opioid-Rezeptors (μ -OR)**, der C-9T Polymorphismus im Gen der **Manganesesuperoxiddismutase (MnSOD)**, der Ser9Gly-Polymorphismus im Gen des **Dopamin-3-Rezeptors (DRD3)**, der C102T-Polymorphismus im Gen des **5HT2A-Serotoninrezeptors** und schließlich der C/A Polymorphismus im **CYP1A2-Gen**.

2 Methoden

2.1 Studienpopulationen

Zur Anwendung kamen im Rahmen dieser Arbeit insgesamt drei verschiedene Populationen:

1. Die deutsche Studienpopulation wurde in der Poliklinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München rekrutiert. Sie bestand aus 100 Patienten (64 Frauen und 36 Männer) mit F-ITD und 100 dazu nach Alter und Geschlecht passenden Kontrollen. Sämtliche Patienten wiesen eine negative Familienanamnese für Dystonie auf. Das Durchschnittsalter lag bei 54,8 Jahren (SA=15,67) und das mittlere Alter der Erstmanifestation betrug 44,5 Jahre (SA=16,3). Die Phänotypen der F-ITD waren wie folgt verteilt: 52 Patienten mit Torticollis, 28 Patienten mit Schreibkrampf, 14 Patienten mit Blepharospasmus und 6 Patienten mit Meige-Syndrom. Das Durchschnittsalter der Kontrollen betrug 54,7 Jahre (SA=15,66).

2. Eine zweite Studienpopulation wurde im Hopital de la Salpêtrière in Paris rekrutiert. Sie bestand aus 121 Patienten mit Kontrollen. 84 Frauen und 37 Männer mit negativer Familienanamnese für F-ITD bei einem Durchschnittsalter von 50,05 (SA=15,03) waren enthalten. Das mittlere Alter der Erstmanifestation lag bei 43,26 (SA=16,52). Die Phänotypverteilung war folgendermaßen: 51 Patienten mit Torticollis, 32 Patienten mit Blepharospasmus, 28 Patienten mit Schreibkrampf und 10 Patienten mit Meige Syndrom. Das Durchschnittsalter der Kontrollen betrug hier 51,11 Jahre (SA=14,77). Im Falle positiver Ergebnisse in der deutschen Population wurde sie zur Replikation herangezogen.

3. Die dritte Population zur Sequenzierung der Promotorregion des Menkes-Gens stammte aus dem Queens Square Hospital in London und beinhaltete 6 Frauen und 7 Männer mit primärer Torsionsdystonie. Diese Patienten hatten alle eine positive Familienanamnese für Dystonie. 10 wiesen eine generalisierte Form auf und 3 zeigten eine fokale Symptomatik. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 15,62 Jahre (SA=13,06).

2.2 DNA-Extraktion

2.2.1 Materialien

BACC2 Extraktions-Kit (Amersham); 5M Natriumperchlorat (70 %); Silica; Chloroform; Ethanol absolut; TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 7,4); Polypropylen-Röhrchen (Greiner Labortechnik); Shimadzu UV-1202 Spectrophotometer.

2.2.2 Extraktion aus Lymphozyten

Die Extraktion der DNA erfolgte aus venösen Blutproben, die in EDTA-Röhrchen gesammelt wurden. Zur Verwendung kam das BACC2 Extraktions-Kit der Firma Amersham. Hiermit trennte man die Zellen von Plasma, lysierte die Erythrozyten und isolierte die Leukozyten, um aus ihnen die DNA zu extrahieren. 5ml des EDTA-Blutes wurden auf 40ml mit Reagenz A des Extraktions-Kits in einem 50ml Polypropylen Röhrchen aufgefüllt, für 4 Minuten gründlich durchmischt und dann bei 1300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 2ml Reagenz B resuspendiert und anschließend in ein 5ml-Röhrchen überführt. 500µl 5M Natriumperchlorat-Lösung wurden dazugegeben und dann gemischt. Danach fügte man 2ml Chloroform hinzu und nach 10 Minuten Mischen wurde bei 800 g für 2 Minuten zentrifugiert. Langsam gab man nun 300µl Nucleon Resin dazu und es wurde 4 Minuten bei 1400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt und die DNA mit Ethanol absolut ausgefällt. In ca. 500µl TE-Puffer löste man die DNA auf und lagerte die Stammlösung bei -80°C .

2.2.3 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Konzentration wurde mittels optischer Dichte (OD) mit einem Photometer bestimmt. 10µl der DNA-Stammlösung wurden in 990µl destilliertem H₂O aufgelöst (1:100). Die optische Dichte wurde bei 260nm, dem Absorptionsmaximum von DNA, bestimmt, nachdem die Absorption von destilliertem Wasser als Vergleichsstandard

gemessen wurde. Eine OD-Einheit entspricht einer DNA-Konzentration von ca. 50µg/ml. Somit ließ sich mit folgender Formel die Konzentration der Stammlösung (X) berechnen: $X(\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} * 100 * 50$. Das Photometer berechnete gleichzeitig die OD_{280} und anschließend den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$. Eine Ratio $<1,65$ war ein Hinweis auf eine Kontamination insbesondere durch Proteine und man musste die Probe erneut aufreinigen. Zuletzt wurde nun anhand der Stammlösung eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 25µg DNA/ml hergestellt.

2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.3.1 PCR-Reagenzien / Geräte

PCR Supermix (Invitrogen); Platinum® PCR Supermix; DMSO; PTC-200 (Biozyme); Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems); Mastercycler Gradient-PCR (Eppendorf); 200µl PCR-Softtubes (Biozyme).

2.3.2 Prinzip der PCR

Die PCR wurde 1984 von Kary Mullis veröffentlicht und ist inzwischen eine Standardmethode in der Molekulargenetik, die es möglich macht beliebige DNA-Abschnitte in vitro zu amplifizieren. Nach dem Prinzip der PCR werden zunächst bei 90-95°C die komplementären DNA-Stränge getrennt (Denaturierung). Nach Abkühlung des Reaktionsansatzes auf Temperaturen um die 50-60°C erfolgt die Bindung der spezifischen Primer an die DNA-Stränge. Die zwei Primer sind Oligonukleotide mit einer Länge von 15-25 Basen, die an den 5`-Enden der beiden Einzelstränge binden (Annealing). Die Effizienz der Bindung ist von der gewählten Temperatur dieser Phase abhängig. Kreuzhybridisierungen entstehen bei zu niedrigen Temperaturen und führen zu einer geringen Spezifität der PCR, während die Effizienz bei zu hoch gewählten Temperaturen abnimmt. In der darauf folgenden Zyklusphase werden die 3`-Enden der hybridisierten Primer mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) sequenzspezifisch verlängert und die zwischen den Primern gelegene Zielsequenz wird verdoppelt (Elongation). Diese drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation

werden 25-35 Mal durchlaufen. Neu synthetisierte Doppelstränge dienen im nächsten Zyklus selber als Matrize. Theoretisch entstehen so nach n Zyklen 2^n DNA-Moleküle, wobei diese Zahl aber in der Praxis nicht erreicht wird.

Sämtliche PCRs liefen auf dem Gene Amp[®] PCR System 9700 der Firma Perkin Elmer. Lediglich die Amplifikation der Promotor Region des Menkes Gens wurde mit ihren 4 verschiedenen PCRs auf einem Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt. Dieser ermöglichte eine schnellere Optimierung der PCR, da die Maschine in der Lage war über den Heizblock einen Temperaturgradienten zu bilden. Nach Optimierung der Annealing-Temperatur mit Hilfe dieses Gradienten konnten die 4 PCRs mit verschiedenen Annealing-Temperaturen gleichzeitig durchgeführt werden. Die Amplifikation des DRB-Gens wurde auf der PTC-200 der Firma Biozyme durchgeführt. Diese Maschine ermöglichte durch die Tiefe ihrer Kavitäten des Heizblocks eine Amplifikation mit einem Ansatz von 100 μ l, der in diesem Fall benötigt wurde.

2.3.3 Primersequenzen

Die unmodifizierten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert und als getrocknete Pellets geliefert. Das Lösungsvolumen für eine Konzentration von 100pmol/ μ l war angegeben und so konnte mit HPLC-Wasser eine Stammlösung angesetzt werden. Diese wurde dann im Verhältnis 1:10 mit HPLC-Wasser verdünnt um eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10pmol/ μ l zu erhalten.

Die mit dem Farbstoff FAM zur Fragmentlängenanalyse markierten Primer wurden von der Firma Applied Biosystems synthetisiert und ebenso nach Lieferung als getrocknete Pellets in Gebrauchslösung angesetzt.

Den folgenden Tabellen sind sämtliche benutzte Primer mit Angabe des Gens und des Amplifikationsortes zu entnehmen. T* gibt die Annealingtemperatur in °C an, wobei Z* die Anzahl an Zyklen benennt.

Gen	Ort	sense-Strang (5'-3')	antisense-Strang (5'-3')	T*	Z*
ATP7B ^a	Exon 8	cgctcattgaactctcctcc	aacatgggtgtcagaggaagtgag	55	30
	Exon 14	cagctaggagagaaggacatgg	agttctgcctcaggagtgtgac	55	30
	Exon 18	caagggtaactgaggttctgc	tcattctgatggagaggagcac	55	30
ATP7A ^b	Exon 10	atatatgtgaattcagcatttttaa	atgtattccaatgattggcc	50	35
	Exon 23	tctcattacttttggtattgaaact	agtgcatagacaagttaaactggc	57	35
	Promotor 1	tgtgccggacgctgttctaa	gggtcattttattctgtct	52	35
	Promotor 2	ggaaagcaagaataaaatga	tatcctctccctccattga	51	34
	Promotor 3	atggagggaagaggataaaat	ccaccccgccccacgacaa	52	35
	Promotor 4	ttctggtttcgcttttgcg	aatccacgtacgcaggctcc	59	35
ATOX1 ^c	Exon 2	ctccgggaccaggccttagc	ctgtgcagccgagaagcaacc	60	30
	Exon 3	cttgaccctgagtgggcctgtc	tgcatactgaacatggcataag	60	35
	Exon 4	gaggaaagggcaagggtgggtg	ctctcccgctccactcaagctc	60	35

Tabelle 2.1: Primersequenzen der untersuchten Gene des Kupfermetabolismus: ^aPrimer verwendet nach Petrukhin et al., 1994; ^bdie 1326bp große Promotorregion des Menkes-Gens wurde mit 4 sich überlappenden Primerpaaren analysiert (Gu et al., 2001), Primer zu Exon 10 und 23 nach Tümer et al., 1997; ^cPrimersequenzen zu ATOX1 wurden freundlicherweise überlassen von D. W. Cox und M. Nanyi, Universität von Alberta, Edmonton, Kanada.

Gen	Ort	sense-Strang (5'-3')	antisense-Strang (5'-3')	T*	Z*
CBS	68bp Ins ^a	ctggccttgagccctgaa	ggccgggctctggactc	60	35
	31bp VNTR ^b	tgcagccgtcagaccaa	ttaagtccccaaaacac	52	32
MTHFR	C677T ^c	tgaaggagaaggtgtctgcggga	aggacgggtgcggtgagagtg	55	35
MS	A2756G ^d	tgttccagctgtagatgaaaat	gatccaaagcctttacactctc	55	34

Tabelle 2.2: Primersequenzen der untersuchten Gene des Homocysteinmetabolismus; ^aDie 68bp-Insertion befindet sich in Exon 8, Primer nach Tsai et al., 1996; ^bdas 31bp-VNTR liegt an der Grenze von Exon 13 zu Intron 13, Primer nach Lievers et al., 2001, der Vorwärtsprimer wurde mit 6-FAM markiert; ^cPrimer nach Frosst et al., 1995; ^dPrimer nach Harmon et al., 1999.

Gen	Ort	sense-Strang (5'-3')	antisense-Strang (5'-3')	T*	Z*
DYT1	Exon 2 ^a	gggattccaaactccatcc	ggttcgcaaggtgcttggga	58	35
	Exon 4 ^b	agcctctgagctccaggag	gatgctgacagtgaccctg	60	33
	Exon 5 ^c	cctggaatacaaacaccta	ggctgccaatcatgactgtc	59	30

Tabelle 2.3: Primersequenzen der analysierten Exone des DYT1-Gens (TorsinA): ^aPrimer amplifizieren den C246T-Polymorphismus in Exon 2; ^bPrimer amplifizieren den G646C-Polymorphismus in Exon 4, Primer zu Exon 2 und 4 nach Chung-on Leung et al., 2001; ^cPrimer amplifizieren die GAG-Deletion (Glu302/303del) in Exon 5, wobei der Vorwärtsprimer mit 6-FAM zur Fragmentlängenanalyse markiert wurde.

Gen	Ort	sense-Strang (5'-3')	antisense-Strang (5'-3')	T*	Z*
DRD3 ^a	Ser9Gly	gctctatctccaactctcaca	aagtctactcacctccaggta	56	35
CYP1A2 ^b	C/A	ctactccagccccagaagtg	gaaggaacagactgggaca	57	32
MnSOD ^c	C-9T	cagcccagcctgcgtagacg	gcgttgatgtgaggtccag	59	35
μ-OR ^d	A118G	cctggcgctactcaagttgctc	ttcggaccgcatgggacggac	66	32
5HT _{2A} ^e	C102T	tctgctacaagttctggctt	ctgcagcttttctctaggg	60	32

Tabelle 2.4: Primersequenzen der untersuchten Gene zu Polymorphismen bei Tardiver Dyskinesie:
^aPrimer nach Lannfelt et al., 1992; ^bPrimer nach Basile et al., 2000; ^cPrimer nach Shimoda-Matsubayashi et al., 1996; ^dPrimer nach Bergen et al., 1997; ^ePrimer nach Tan et al., 2001.

Gen	Ort	sense-Strang (5'-3')	antisense-Strang (5'-3')	T*	Z*
D-5-Rezeptor	4p	tgcagccgtcagaccaa	ttaagtccccaaaacac	52	32

Tabelle 2.5: Primersequenz zum (CA)_n-Repeat Polymorphismus im Dopamin-5-Rezeptor. Der Primer wurde am 5'-Ende mit Fam markiert zur Fragmentlängenanalyse, Primer nach Sherrington et al., 1993.

2.3.4 PCR-Protokolle

Sämtliche PCRs mit anschließender Sequenzierung wurden mit dem Platinum® PCR Supermix in einem 50µl Gesamtansatz durchgeführt. Für alle übrigen Amplifikationen kam der normale PCR Supermix in einem 25µl Ansatz zur Anwendung. Ein typischer Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25µl sah folgendermaßen aus: Zu 1µl der DNA-Gebrauchslösung (25ng) gab man je 0,5µl (5pmol) des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers, die vorher in einem Mix zusammen mit dem PCR-Supermix gemischt wurden. Dieser enthielt im Einzelnen folgende Bestandteile in definierter Konzentration: 22mM Tris-Hcl (pH 8,4), 55mM KCl, 1,65 mM MgCl₂, je 220 µM der dNTPs, 22U *Taq-DNA-Polymerase*/ml. Der große Ansatz mit Platinum® PCR Supermix enthielt die doppelte Menge an DNA und Primern. Weiterer Bestandteil des Platinum® PCR Supermix waren anti-*Taq-DNA-Polymerase* Antikörper. Durch Inhibition der *Taq* bei Raumtemperatur ermöglichten diese Antikörper einen automatischen „hot-start“ der PCR, was zu höherer Spezifität und größerer Ausbeute führte. Abweichend von obigen Ansätzen war das Protokoll der PCR zur Amplifikation der polymorphen Region des HLA-DRB Gens, welches in Kapitel 2.6.3 beschrieben wird. Des Weiteren wurde bei der Amplifikation des zweiten Teils der Promotorregion des Menkes-Gens zusätzlich 5%-DMSO hinzu gegeben. Dieses verhinderte während der PCR die Bildung von Sekundärstrukturen zwischen DNA-Strängen.

Ein typisches **PCR-Protokoll** sah folgendermaßen aus:

Schritt	Zeit	Temperatur
initiale Denaturierung	4 min	94°C
<i>25-35 Zyklen*</i>		
Denaturierung	30 sec	94°C
Annealing	45 sec	T*
Extension	1 min	72°C
Finale Extension	4 min	72°C
Abkühlung	∞	4°C

* Die speziellen primerabhängigen Annealingtemperaturen und die Anzahl der Zyklen sind den Tabellen der verwendeten Primer zu entnehmen.

2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Im Anschluss an die PCR mussten zur Vorbereitung auf die Sequenzierung die PCR-Produkte aufgereinigt werden. Überschüssige Primer, Nukleotide, Taq-Polymerase und Salze wurden hierbei entfernt. Dazu verwendete man das PCR-Purification-KitTM der Firma Qiagen. Zunächst wurden PB-Puffer (hohe Salzkonzentration) und PCR-Produkte im Verhältnis 5:1 vermischt, auf eine Säule aufgetragen und bei 10000 g für 1 Minute zentrifugiert. Während die DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und einem pH-Wert $\leq 7,5$ an die Silica-Gel Membran der Säule gebunden wurde, wurden die auszuwaschenden Bestandteile nicht von der Membran zurückgehalten. Zur anschließenden Entfernung der Salze wurde die Säule mit 750 μ l Ethanol haltigem PE-Puffer beladen und zweimal bei gleichen Bedingungen zentrifugiert (10000g für 1 min). Im Gegensatz zur Adsorption der DNA an die Säule war die Elution am effektivsten bei niedrigen Salzkonzentrationen und einem basischen pH-Wert. Zuletzt wurde somit die DNA mit 30-50 μ l des basischen EB-Puffers (pH=8,5) eluiert. Wollte man höhere DNA-Konzentrationen im Eluat erreichen, eluierte man mit weniger EB-Puffer.

2.4 Agarose Gel-Elektrophorese

2.4.1 Materialien

SeaKem LE Agarose; 10X TBH-Puffer (Invitrogen); DNA 100bp Leiter (Sigma); 10X Loading Buffer (Invitrogen); CYBR Gold (Eugene), Elektrophorese PowerPac (BioRad); Mikrowelle (Samsung); Herolab EASY Win Software mit Kamera und UV-Platte.

2.4.2 Protokoll

Es wurden 3g Agarose zu 150ml TBH-Puffer gegeben und gründlich gemischt. Anschließend ließ man den Ansatz so lange in der Mikrowelle erhitzen, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Die Lösung wurde unter kaltem Wasser auf ca. 50°C abgekühlt und pro Gramm Agarose wurde 1g CYBR Gold dazugegeben, welches ähnlich wie Ethidiumbromid in der DNA interkalierte. Nach gutem Mischen wurde die Agarose in Gelform gegossen, ein Kamm inseriert, um dann das Gel abkühlen und erhärten zu lassen. Nach Entfernung des Kammes platzierte man die Gele in einer Elektrophoresekammer. 5 µl des PCR-Produktes wurden mit 2µl des 1:4 verdünnten Loading-Puffers gemischt und in die Taschen pipettiert. Die 20µl des Restriktionsverdau wurden mit 3µl unverdünntem Loading-Puffer in breite Taschen aufgetragen. Als Standard diente eine 100bp-Leiter der Firma Sigma. Die Elektrophorese lief mit 5-10 V/cm, bis eine klare Auftrennung von Produkten und Leiter zu sehen war. Die Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe des Herolab EASY Win Systems wurden die Gele aufgezeichnet und dokumentiert.

2.5 Restriktionsenzymverdau

2.5.1 Materialien

BsaW I mit 10X NEBuffer 2; Bsp120I mit Buffer B+; Drd I mit 10X NEBuffer 4; Hae III mit Buffer C; HinfI mit Buffer B; Msc I mit 10X NEBuffer 4; MspI mit 10X NEBuffer 2; Aqua ad.; Memmert Wasserbad.

2.5.2 Überblick

Zur Detektion bereits bekannter Mutationen und Polymorphismen wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese Enzyme sind prokaryontische Phosphodiesterasen, welche an für das Enzym charakteristischen Stellen den DNA-Strang spalten. Diese Schnittstellen weisen in Bezug auf die Basenfolge eine Rotationssymmetrie (Palindrome) auf. Wird nun durch eine Mutation oder durch einen Polymorphismus die Basenfolge dahingehend verändert, dass eine palindromische Sequenz entsteht, dann schneidet das Enzym und es entstehen in ihrer Länge charakteristische DNA-Fragmente. Aufgetrennt auf einem Agarosegel werden diese sogenannten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) sichtbar und sind ein probates Mittel zur Untersuchung größerer Populationen auf bekannte Mutationen oder Verteilung von Polymorphismen im Rahmen von Assoziationsstudien.

2.5.3 Verwendete Enzyme

Zur Untersuchung der Polymorphismen der verschiedenen Gene wurden im Rahmen der Arbeit sieben verschiedene Restriktionsendonucleasen benutzt, welche im Folgenden mit ihren Charakteristika aufgelistet sind:

Name	Schnittstelle	Hersteller	Quelle
<i>BsaWI</i>	A*CCGGT TGGCC*A	New England Biolabs	Bacillus stearothermophilus
<i>Bsp120I</i>	G*GGCCC CCC*GG	MBI Fermentas	Bacillus subtilis
<i>DrdI</i>	GACNNNN*NGTC CTGNN*NNNNCAG	New England Biolabs	Deinococcus radiodurans
<i>HaeIII</i>	GG*CC CC*GG	Promega	Haemophilus aegyptius
<i>Hinfl</i>	G*ANT*C C*TNA*G	Promega	Haemophilus influenzae
<i>MscI</i>	TGG*CCA ACC*GGT	New England Biolabs	Micrococcus species
<i>MspI</i>	C*CGG GGC*C	New England Biolabs	Moraxella species

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme. Angegeben sind zu den Enzymen die Schnittstelle, der Hersteller und die Quelle, aus welcher das Enzym isoliert wurde.

2.5.4 Restriktionsprotokolle

Alle Proben der sieben verschiedenen Ansätze zum Restriktionsverdau wurden im Wasserbad bei enzymespezifischer Temperatur für mindestens 4 Stunden inkubiert. Für alle sieben Ansätze wurde ein Gesamtvolumen von 20µl gewählt. Die speziellen Bedingungen und Ansätze sollen in folgender Tabelle dargestellt werden:

Gen / Position	Enzym	H ₂ O	Puffer	BSA	Enzym	DNA	Temp.
MnSOD	<i>BsaWI</i>	14,3µl	2µl	0,2µl	2µl (5U/µl)	1,5µl	60°C
CYP1A2	<i>Bsp120I</i>	16µl	2µl	/	1µl (10U/µl)	1µl	37°C
µ-Opioid Rez.	<i>DrdI</i>	13,5µl	2µl	/	2,5µl (5U/µl)	2µl	37°C
MS	<i>HaeIII</i>	15,8µl	2µl	0,2µl	1µl (10U/µl)	1µl	37°C
MTHFR	<i>Hinfl</i>	13,8µl	2µl	0,2µl	2µl (10U/µl)	2µl	37°C
D3-Rezeptor	<i>MscI</i>	14µl	2µl	/	2µl (3U/µl)	2µl	37°C
5-HT2A	<i>MspI</i>	14µl	2µl	/	2µl (5U/µl)	2µl	37°C

Tabelle 2.7: Restriktionsprotokolle der verwendeten Enzyme in Zuordnung zu den analysierten Genen. Angegeben sind die Mengen an H₂O, Puffer, BSA, Enzym und DNA aus der PCR. Temp.=Inkubationstemperatur für den Enzymverdau.

2.6 HLA-Typisierung

2.6.1 Materialien

Biotest ELPHA DRB LowRes Mikrottestplatten-Set; Biotest ELPHA Reagenzien-Set: 0,1M NaOH, 0,1M HCl, 20XSSC-Puffer, 1% SDS-Lösung, Puffer A, Blockierungsreagenz, Konjugat (Schaf-IgG konjugiert mit Peroxidase), Tetramethylbenzidin (TMB); Primermix C; PCR-Puffer; Taq Polymerase (Invitrogen); 10mM Nukleotidlösung; Biotest HLA Typing Software; Dynex MRX ELISA Reader.

2.6.2 Überblick

Zur Durchführung der Typisierung der HLA DRB-Allele wurde der ELPHA DRB LowRes Test der Firma Biotest benutzt (ELPHA=Enzyme Linked Probe Hybridization Assay). Es handelt sich hierbei um einen DNA-Hybridisierungstest. Die Differenzierung der polymorphen Sequenzmotive des DRB-Locus wurde mit sequenzspezifischen Oligonukleotid-Sonden (=SSO-Sonden) erreicht, deren Bindung nach einem vom Protein-ELISA abgeleiteten Prinzip nachgewiesen wurde.

2.6.3 PCR-Reaktionsansatz

Zunächst wurde anhand der 10mM Nukleotidlösungen eine 1,25 mM Gebrauchslösung hergestellt: 400 µl Aqua dest. wurden mit 100 µl dATP (10 mM), 100 µl dGTP (10 mM) 100 µl dCTP (10 mM) 100 µl dTTP (10 mM) vermischt. Die Amplifikation der polymorphen Region des DRB-Gens wurde auf einer Biozyme Cycler Maschine durchgeführt. Die PCR- Konditionen waren folgendermaßen: Ein Zyklus bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden, 55°C für 15 Sekunden und 72°C für 15 Sekunden mit einer abschließenden Verlängerungszeit von 6 Minuten bei 72°C. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte entweder bei -20°C gelagert oder direkt mit dem ELPHA DRB LowRes Kit typisiert. Ein typischer Ansatz für die PCR sah folgendermaßen aus:

Menge	Komponenten
60.5 µl	H ₂ O (Aqua ad.)
10.0 µl	10x PCR-Puffer
16.0 µl	Nukleotidgebrauchslösung
8.0 µl	Primermix C
0.5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
5 µl	DNA (50-200 ng/µl)
100 µl	

2.6.4 ELPHA DRB LowRes Typisierung

Jede Platte, die zur Typisierung von 4 Proben ausreichte, wurde mit den Streifen Nr.1, Nr.2 und Nr.3 im Wechsel bestückt, so dass 12 Streifen auf einer Platte enthalten waren. 90 µl des PCR-Produktes gab man zu 400 µl der Denaturierungslösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß, um anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Die DNA-Doppelstränge wurden hier in Einzelstränge überführt. Nach der Inkubationszeit gab man in das Reaktionsgefäß 400 µl der Neutralisierungslösung zur Wiederherstellung des pH-Wertes. Nach weiterer Zugabe von 800 µl Aqua dest. wurde mit Hilfe eines Vortexers alles gemischt. In jede Kavität der Streifen wurden 50 µl des so verdünnten und denaturierten PCR-Produktes gegeben und anschließend wurde die Platte mit einer Folie abgeklebt. Die Platte wurde in einem genau temperierten Wasserbad für 45 Minuten bei 46 Grad Celsius inkubiert um eine Hybridisierung von DNA mit den SSO-Sonden zu ermöglichen. Die Platte wurde in den Biotest Elisa Washer gestellt und anhand eines programmierten Ablaufs wurden zunächst die Hybridisierungslösungen aus allen Kavitäten entfernt, um danach die Kavitäten mit jeweils 200 µl der angesetzten 2 X SSC / 0,1 % SDS – Lösung zu waschen. Nach zwei Waschsritten wurden die Kavitäten mit 200 µl der gleichen Lösung befüllt. Nicht gebundene Sonden wurden dadurch entfernt. Die Platte, mit einer neuen Folie abgeklebt, wurde wieder für 15 Minuten bei 46 Grad Celsius inkubiert. Nicht vollständig homologe Sonden wurden in diesem Stringenzwaschschritt gelöst. Im Anschluß wurde die Platte wieder in den Elisa Washer gestellt und dreimal mit 200 µl des verdünnten Puffers A gewaschen. Die Kavitäten wurden mit jeweils 50 µl der

Konjugatverdünnung befüllt und die Platte wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. An die gebundenen und vollständig homologen FITC markierten Sonden lagerten sich die mit Peroxidase gekoppelten FITC-Antikörper an. Die Konjugatverdünnung wurde verworfen und die Platte wurde wie vorher mit Puffer A dreimal gewaschen. 50 µl der Substratlösung (TMB) wurden hinzugefügt, wonach die Platte für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur und Lichtausschluß inkubiert wurde. Das Enzym Peroxidase setzte das Substrat Tetramethylbenzidin um, wodurch diese Kavitäten ihre Farbe von farblos nach blau änderten. Durch Zugabe von 50 µl 1 N Schwefelsäure stoppte man die Reaktion und die Farbe schlug von blau nach gelb um.

2.6.5 Versuchsauswertung

Die Auswertung erfolgt mit einem ELISA Reader der Firma Dynex MRX. Die Ermittlung der Versuchsergebnisse erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei 450 nm. Der Referenzfilter hatte eine Wellenlänge von 620 nm. Positive und negative Ergebnisse der einzelnen Kavitäten wurden anhand eines Cut-off Wertes definiert, der standardmäßig bei 0,2 lag (siehe auch Abbildung 3.12). Werte oberhalb wurden als positiv beurteilt und Werte unterhalb als negativ. Durch die Kombination der positiven Resultate der Kavitäten der drei Streifen, die zu einer Probe gehörten, ergab sich das Typisierungsergebnis. Die Zuordnung zu den DRB-Allelen wurde mit Hilfe der Biotest ELPHA Typing Software durchgeführt. Diese Software war in der Lage durch das Muster der positiven Reaktionen eine Zuordnung zu einem DRB-Allel herzustellen. An Hand von mitgelieferten Tabellen konnte dieses auch von Hand geschehen.

2.7 DNA-Sequenzierung

2.7.1 Materialien

ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer; Eppendorf Centrifuge 5415 D; Heidolph REAX Vortexer; ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit v2.0 (AmpliTaq DNA-Polymerase, MgCl₂, Tris HCl-Puffer pH 9, dNTPs, ddNTPs); POP-6[™]; EDTA-Puffer, HPLC Wasser.

2.7.2 Die Kettenabbruchmethode nach Sanger

Sämtliche Sequenzierungen wurden nach einer Modifikation der von Frederick Sanger entwickelten enzymatischen Kettenabbruchmethode durchgeführt (Sanger et al., 1977). Nach der normalen Amplifikation mittels PCR und anschließender Aufreinigung der Produkte wurde eine Cycle-Sequencing-PCR durchgeführt. Im Reaktionsansatz hierfür enthalten waren die AmpliTaq DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂, Tris HCl (pH 9,0), das zu sequenzierende Template und ein Primer. Zusätzlich waren aber in einem definierten Verhältnis fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthalten. Wie bei einer PCR wurde der an das Template angelagerte Primer am 3'-Ende durch die Polymerase und dNTPs verlängert. Immer, wenn durch die DNA-Polymerase aber ein ddNTP im neu synthetisierten Strang eingebaut wurde, kam es zum Kettenabbruch, da diese ddNTPs nicht über das für den Einbau der folgenden Base benötigte freie 3'-OH-Ende verfügen. So entstanden Fragmente unterschiedlicher Länge, die am Ende alle eine fluoreszenzmarkierte Base tragen mit jeweils für die Base charakteristischer Fluoreszenz. Im Verlauf der Zyklen des Cycle-Sequencing kam es so zu einer linearen Zunahme der markierten PCR-Produkte, die anschließend durch Elektrophorese auf einem Sequencer in ihrer Länge aufgetrennt und analysiert werden konnten.

2.7.3 Cycle Sequencing-Protokolle

Zur Sequenzierung wurde das BigDye™ Terminator Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Sämtliche Cycle-Sequencing-PCRs liefen auf dem Gene Amp® PCR System PE 9700.

Ein typisches **Cycle-Sequencing-Protokoll** sah folgendermaßen aus:

Schritt	Zeit	Temperatur
<i>25 Zyklen</i>		
Denaturierung	10 sec	96°C
Annealing	5 sec	45°-60°C *
Extension	4 min	95°C
<i>Abkühlung</i>	∞	4°C

* Die speziellen primerabhängigen Annealingtemperaturen und die Menge an BigDye sind in der Tabelle zu entnehmen. Für sämtliche Ansätze wurde ein Gesamtvolumen von 20µl gewählt. Dieses Gesamtvolumen enthielt typischerweise 5µl des DNA-Templates (10-100ng des PCR-Produktes), 1µl eines der beiden Primer (max. 10pmol), den BigDye-Premix in variabler Konzentration und H₂O ad 20µl. Die Komponenten wurden nacheinander in PCR-Tubes pipettiert und durchmischt.

Gen	Ort	Annealing	BigDye
<i>ATP7B</i>	Exon 8	50°C	6µl
	Exon 14	50°C	6µl
	Exon 18	50°C	8µl
<i>ATP7A</i>	Exon 10	45°C	6µl
	Exon 23	55°C	8µl
	Promotor 1	48°C	6µl
	Promotor 2	50°C	6µl
	Promotor 3	50°C	6µl
	Promotor 4	50°C	6µl
<i>Atox1</i>	Exon 2	50°C	4µl
	Exon 3	55°C	6µl
	Exon 4	50°C	6µl
<i>DYT1</i>	Exon 2	50°C	6µl
	Exon 4	50°C	6µl

Tabelle 2.8: Reaktionsansätze zum Cycle-Sequencing: Neben den Genen mit Ort der Sequenzierung ist die jeweilige Annealingtemperatur und die Menge an Big Dye angegeben.

2.7.4 Dye Terminator Aufreinigung

Im Anschluss an das Cycle-Sequencing wurden die überschüssigen Dye-Terminatoren, Puffer und Salze, die im 20µl Reaktionsansatz vorhanden waren, mit den Centri-Sep™ Säulen der Firma Princeton Separations entfernt. Diese Säulen basierten auf dem Prinzip der Gel-Filtration. Das trockene Gel dieser Säulen wurde dazu zu Beginn mit 800µl HPLC Wasser verflüssigt. Nach Vortexen wurde eine halbe Stunde gewartet. Es wurde dann 2 Minuten bei 750 g zentrifugiert. Überschüssige Flüssigkeit sammelte sich in einem Cup unter der Säule, so dass diese fest wurde. Auf diese feste Säule konnten nun die 20µl des Reaktionsansatzes langsam pipettiert werden. Es wurde nun erneut zentrifugiert, wobei die 20µl des Ansatzes dabei durch die Säule liefen. In Röhrchen, in denen sich die Säule befand, sammelt sich das aufgereinigte Produkt. Dieses konnte entweder direkt sequenziert oder bei -20°C gelagert werden.

2.7.5 Sequenzierung auf dem ABI PRISM® 310

Der ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer ist ein Instrument zur automatischen Analyse fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente durch Kapillarelektrophorese. Zur Sequenzierung wurden 4µl des aufgereinigten Cycle-Sequencing-Produktes mit 16µl HPLC Wasser in einem Tube vermischt. 48 dieser Tubes konnten im Autosampler des Sequenzers positioniert werden. Der Autosampler brachte die Probe zunächst in Kontakt mit der Kathodenelektrode und der mit Polymer gefüllten Kapillare (47 cm Länge). Zur Sequenzierung wurde das Polymer POP-6™ der Firma Applied Biosystems benutzt, welches 8M Harnstoff und den Elektrophorese Puffer (TAPS) enthielt. Die Anodenelektrode war permanent in Kontakt mit einem Puffer. Floss nun Strom zwischen Kathode und Anode, gelangten die negativ geladenen DNA-Moleküle durch eine elektrokinetische Injektion in die Kapillare. Diese Injektionszeit konnte variabel verändert werden. Schwache Produkte sollten länger injiziert werden und starke Produkte kürzer. Je länger die Injektionszeit, umso schlechter war die Auflösung der Basenfolgen in der späteren Analyse. Kapillare und Kathode wurden nun in ein Puffergefäß positioniert, welches den gleichen Puffer enthielt, in dem die Anode lag. Strom wurde appliziert und die Elektrophorese bei 15kV startete. Die Kapillare wurde

durch einen Heizblock permanent auf 60°C geheizt. Wenn die DNA-Stränge das Detektionsfenster der Kapillare erreichten, erregte ein Argonlaser die ddNTPS, welche daraufhin Fluoreszenz emittierten, die von einer Kamera in ihrer für die jeweilige Base speziellen Wellenlängen detektiert und als digitales Signal auf einem Computer gespeichert wurde. Die Sequencing Analysis Software „übersetzte“ hieraus die Sequenz des Stranges, welche in Form eines Elektropherogramms dokumentiert wurde. In ca. 50 Minuten konnte so ein Fragment mit einer Länge von bis zu 450bp analysiert werden.

2.7.6 Die Sequence-Navigator Software

Diese Software eignete sich insbesondere bei Studien großer Populationen zum Alignment, d.h. dem Übereinanderlegen von Mustersequenzen und zu untersuchender Sequenz. Stellen innerhalb der Sequenz der Probe, die sich nicht deckten mit der Mustersequenz aus der GeneBank™-Datenbank, konnten so schnell auffindig gemacht werden. Wurde das Cycle-Sequencing mit dem Rückwärtsprimer durchgeführt, schrieb die Software diesen Strang automatisch in den komplementären Vorwärtsstrang um. Somit konnte effektiv und sicher nach Mutationen im Rahmen der Sequenzanalysen gesucht werden.

2.8 Fragmentlängenanalysen

2.8.1 Materialien

ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer; GeneScan[®]-500 Size Standard; GeneScan[®]-2500 Size Standard; ABI PRISM[®] 10XBuffer mit EDTA; Formamid; HPLC Wasser; FAM-makierte Primer.

2.8.2 Primer-Markierung

Zur Fragmentlängenanalyse wurden die verwendeten Primer am 5'-Ende mit dem Farbstoff 6-Carboxyfluoreszein (6-FAM) nach der Phosphoramidit-Methode markiert. Dieser Farbstoff zeichnete sich insbesondere durch eine hohe Signalstärke aus und eignete sich deswegen auch für PCR-Reaktionen mit niedriger Ausbeute. Während der PCR dienten diese Primer genau so wie unmarkierte Primer der Amplifikation und ihre Fluoreszenz wurde später bei einer hochauflösenden Elektrophorese zur Längenbestimmung genutzt. In den von uns durchgeführten Fragmentanalysen wurde jeweils der Vorwärtsprimer markiert. Prinzipiell könnte man aber auch den Rückwärtsprimer markieren. Die Primersequenzen sind dem Kapitel 2.3.3 zu entnehmen. Die Synthese dieser markierten Primer wurde bei der Firma Applied Biosystems in Auftrag gegeben.

2.8.3 Längenstandards

Zwei verschiedene Längenstandards fanden bei der Fragmentlängenanalyse im Rahmen der Arbeit Verwendung:

1. GeneScan[®]-500 Size Standard (16 Fragmente von 35bp bis 500bp)
2. GeneScan[®]-2500 Size Standard (27 Fragmente von 55bp bis 14097bp)

Bei diesen Standards handelte es sich um fluoreszenzmarkierte DNA-Leitern mit definierten Fragmentlängen, welche durch eine Restriktions-Ligationsmethode hergestellt wurden. Beide hier verwendeten Standards wurden mit dem Farbstoff 6-

Carboxyrhodamin X (ROX) markiert und waren als Kit bei der Firma ABI erhältlich. Zur Probe bei der Analyse dazugegeben, unterlagen diese Standards in der Elektrophorese den gleichen elektrophoretischen Kräften wie die Probe und konnten somit Variationen von Injektion zu Injektion ausgleichen.

Die Standards dienten der genauen und reproduzierbaren Fragmentlängenbestimmung der zu untersuchenden Probe. Diese wurde in drei Schritten erreicht:

1. Mit Hilfe der GeneScan[®] Analysis Software wurden in der Software definierte Längenstandards mit den internen Standards in jedem Lauf verglichen und „gematcht“.
2. Die Software generierte eine Eichkurve mit Hilfe der verschiedenen Fragmente. Dieses erfolgte nach der „Local Southern Method“ (Southern et al., 1979), die zur Fragmentlängenbestimmung mindestens 2 längere Fragmente benötigte als das, welches bestimmt werden sollte.
3. Zuletzt wurden anhand der Migrationszeiten der Fragmente deren Größen berechnet.

2.8.4 Spezielle Anwendungen

Die Fragmentlängenanalyse wurde in dieser Arbeit für folgende Untersuchungen angewendet:

Gen	Anwendung	Fragmentlängen	Standard
DYT1 (TorsinA)	Ausschluss der GAG-Deletion	201 / 204	GS-500
DRD5	(CA) _n -Repeat	134 - 158	GS-500
CBS	31bp VNTR	784 - 908	GS-2500

Tabelle 2.7: Durchgeführte Fragmentlängenanalysen: Aufgelistet sind die untersuchten Gene mit ihrer speziellen Anwendung, die detektierten Fragmente und die verwendeten Standards zur Längenbestimmung. GS=GeneScan

Nach erfolgter PCR mussten die Proben in Formamid unter Zusatz des Längenstandards geladen werden. Die PCR-Produkte des Dopamin-5-Rezeptors wurden im Verhältnis 1:10 mit HPLC Wasser verdünnt, da hier sonst unverdünnt die Signalstärke zu groß war

Es wurde dann, wie bei den anderen beiden Anwendungen, jeweils 1µl in ein Röhrchen mit 15µl Formamid gegeben. Je 0,25µl des GS-500-Standards bzw. 1µl des GS-2500-Standards wurden hinzugegeben. Der gesamte Ansatz wurde bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Bis zum Einsatz auf dem Sequencer wurden die Proben auf Eis gelegt oder aber bei -20°C eingefroren.

2.8.5 Fragmentanalyse auf dem ABI PRISM® 310

Die Detektion erfolgte auf dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer nach dem im Kap. 2.7.5 beschriebenen Ablauf. Das Laufmodul für Genescan-Analysen unterschied sich aber in folgenden Punkten vom Modul für Sequenzierungen: Die Injektionszeit betrug nur 5 Sekunden, da sehr kleine Mengen DNA zur Detektion ausreichten und die Elektrophorese mit 15kV lief für 55 Minuten bei 50°C. Aufgrund der langen Fragmente musste bei der Analyse des 31bp VNTR im CBS-Gen die Detektionszeit auf insgesamt 90 Minuten verlängert werden, da es solange dauerte, bis mindestens zwei Leitern des Längenstandards, die länger waren als das zu untersuchende Fragment, das Detektionfenster passiert hatten, was ja zur Längenbestimmung notwendig war (Southern et al., 1979). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der GeneScan® Analysis Software der Firma ABI.

2.9 Statistik

2.9.1 Statistische Methoden

Als Entscheidungsgrundlage, ob ein genetisches Merkmal einen Risikofaktor oder einen Suszeptibilitätsfaktor für die Entwicklung der untersuchten Krankheit F-ITD darstellt, wurden zahlreiche statistische Methoden angewendet. Es wurde untersucht, ob die Unterschiede zweier Stichproben (Patienten und Kontrollen) in Bezug auf ein bestimmtes Merkmal zufällig bedingt waren (Nullhypothese H_0), oder ob überzufällig starke Abweichungen vorlagen (Alternativhypothese H_1). Statistische Verfahren dienten der Errechnung der Prüfgrößen und des p-Wertes. Dieser zeigt die Wahrscheinlichkeit, mit der vorliegende Ergebnisse zufällig entstehen konnten. Er entspricht somit der Wahrscheinlichkeit, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese verwirft. Ist der errechnete p-Wert kleiner als das vereinbarte Signifikanzniveau α , bezeichnet man das Ergebnis als signifikant. Man setzte $\alpha=0,05$. Anwendung fanden die üblichen statistischen Testverfahren wie der Chi-Quadrat Test, die Odds Ratio, der exakte Test nach Fisher (Fleiss, 1981), der Cochran Armitage Trend Test (Agresti, 1991) und die logistische Regression (siehe Kap. 4.1.4).

2.9.2 Das Hardy-Weinberg-Equilibrium

Das Hardy-Weinberg Gesetz besagt Folgendes: Allelfrequenzen und Genotyp-Verteilungen in einer sich durch zufällige Kreuzung vermehrenden Population bleiben von Generation zu Generation konstant. Die Verteilung der Genotypen lässt sich auf Grundlage der Allelfrequenzen nach der Formel „ $p^2+2pq+q^2=1$ “ berechnen, wobei p und q die Frequenzen der beiden Allele eines Gens darstellen. Um die Validität von Ergebnissen genetischer Studien zu unterstreichen, ist es sinnvoll, die Verteilung ermittelter Genotypfrequenzen auf Einhaltung des Hardy-Weinberg Gesetzes hin zu untersuchen. Abweichungen vom HWE können verschiedene Ursachen haben. Im häufigsten Fall deuten sie auf Laborfehler hin. Es kann aber auch zum Beispiel durch systematische Effekte wie Selektion zustande kommen, hat dann also auch wirklich funktionelle Relevanz. Außerdem sind bestimmte Verfahren, z.B. der Vergleich von

Allelfrequenzen, nur dann korrekt, wenn keine Abweichungen vom HWE vorhanden sind. Anhand des Likelihood Ratio Testes wurde überprüft, ob die Population in Bezug auf die Genotypfrequenzen des untersuchten Gens im HWE liegt. Der Test berechnet auf Grundlage der Allelfrequenzen ein Intervall, in dem die Häufigkeit der einzelnen Genotypen liegen sollte. Die Größe des Intervalls wird durch das Signifikanzniveau α bestimmt.

2.9.3 Haplotypen-Analyse

Bei Haplotypen handelt es sich um eine Kombination von Allelen eng verbundener Loci, die auf einem Chromosom gefunden werden können und durch ihre Nähe zueinander dazu tendieren zusammen weitervererbt zu werden. Auch die Kombination einzelner Nukleotidveränderungen in einem Gen können als Haplotypen bezeichnet werden. Die Analyse wurde mit dem Genetics-Modul des SAS-Programms durchgeführt, welches auf dem so genannten EM Algorithmus beruht (Excoffier et al., 1995). Hierbei wurden Haplotypen rekonstruiert, so dass die Häufigkeit von Haplotypen in den verschiedenen Gruppen miteinander verglichen werden konnte.

2.9.4 Die Power-Kalkulation

Im Rahmen dieser Arbeit war die Power-Kalkulation insbesondere dann von Bedeutung, wenn es darum ging bereits bekannte Ergebnisse zu replizieren. Die Power eines Testes sagt aus, wie wahrscheinlich es ist, bei gegebener Fallzahl, bei gegebenem Ausmaß des Effektes, bei dem es sich z.B. um die Häufung eines bestimmten Allels in der Patientenpopulation handeln kann, und bei gegebenem Signifikanzniveau, einen tatsächlich vorhandenen Effekt mit der verwendeten Studienpopulation zu detektieren. Die Power errechnet sich nach der Formel $1-\beta$, wobei es sich bei β um den Fehler 2. Art handelt. Der Fehler 2. Art beschreibt die Wahrscheinlichkeit ein falsch-negatives Ergebnis zu bekommen. Wäre beispielsweise $\beta=5\%$, so läge die Power des Testes bei 95%. Bei der Wahl höherer Fallzahlen und bei einem hohen Ausmaß des Effektes steigt somit die Power des Tests.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationssuche in Kupfergenen

Sequenziert wurden die 100 Patienten aus der deutschen Studienpopulation. Exon 10 und Exon 23 des Menkes-Gens (ATP7A) wurden direkt sequenziert. Ebenso wurden die codierenden Exone 2, 3 und 4 des Gens ATOX1 komplett sequenziert. Die codierende Region des Gens ATOX1 beginnt erst in Exon 2, so dass Exon 1 nicht sequenziert werden musste. Bei der Sequenzierung der Exone 8, 14 und 18 des Wilson-Gens wurden nur ausgewählte Proben sequenziert. Grundlage war hierfür eine im Vorfeld dieser Dissertation durchgeführte SSCP-Analyse als Screeningmethode zur Mutationsdetektion. Darauf basierend wurden gezielt die Proben auf dem Sequencer analysiert, die ein abweichendes Laufverhalten mit Bandenverschiebung bei der SSCP-Analyse zeigten.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Sequence-Navigator Software der Firma ABI. Die Referenzsequenzen wurden für jede Probe mit Hilfe dieser Software übereinander gelegt (Alignment), was eine schnelle und gründliche Auswertung ermöglichte.

3.1.1 Menkes-Gen (Exone 10 und 23)

Sequenziert wurden die Exone 10 und 23 des X-chromosomal lokalisierten Menkes-Gens bei den 100 F-ITD-Patienten. Bei keinem der Patienten ließen sich in diesen beiden Exonen Mutationen finden. Lediglich ein bereits beschriebener Polymorphismus in Exon 10 (Das et al., 1994) konnte mit einer Allelfrequenz von 35% nachgewiesen werden. Der G2444C-Polymorphismus liegt in Exon 10 und führt zu einem Austausch der hydrophoben Aminosäure Valin mit Leucin. 60 der 172 X-chromosomalen Allele waren mutiert. Diese Frequenz war ähnlich der bereits publizierten Frequenz (29%) von Das und Mitarbeitern (Das et al., 1994). Die Abweichungen der Allelfrequenzen im Vergleich waren nicht signifikant ($p > 0,05$). Auch die Analyse der splice-sites beider Exone zeigte bei den 100 Proben keine Abweichung von der ag-gt Regel.

Das folgende Bild zeigt die Sequenz der drei gefundenen Genotypen (GC, CC, GG). Abgebildet ist der Rückwärtsstrang, da zum Cycle-Sequencing sämtlicher 100 Proben aufgrund der besseren Sequenzen der Rückwärtsprimer dem Vorwärtsprimer vorgezogen wurde.

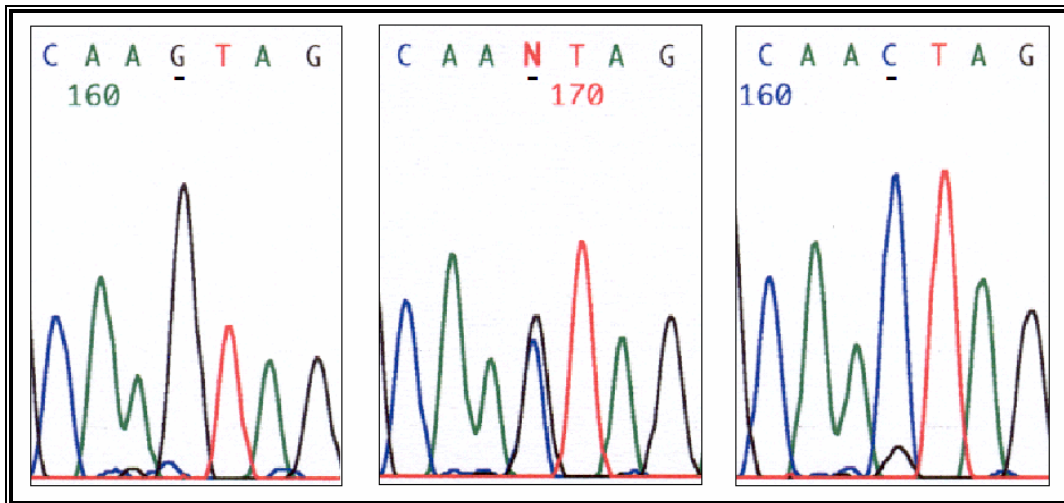


Abbildung 3.1: Elektropherogramme der Sequenzierung des G244C-Polymorphismus in Exon 10 des Menkes-Gens. Die Abbildung zeigt in drei verschiedenen Elektropherogrammen die 3 Genotypen des Polymorphismus. Links ist der GG-Genotyp dargestellt, in der Mitte der heterozygote GC-Genotyp und rechts der CC-Genotyp. Jeweils unterstrichen ist die Base an der Lokalisation des Polymorphismus.

3.1.2 Menkes-Gen (Promotor-Region)

Abweichend von den übrigen Sequenzanalysen wurde zur Analyse der 5'Promotor-Region des Menkes-Gens, die in Kapitel 2.1 beschriebene Population bestehend aus 13 Patienten mit generalisierter oder fokaler Dystonie aus London benutzt. Die als häufigste Ursache generalisierter Dystonien bekannte GAG-Deletion in Exon 5 des DYT1-Gens musste im Voraus mit Sicherheit als Grund für die Dystonie dieser Patienten ausgeschlossen werden (Bressman et al., 2000). Dazu wurde, wie in Kapitel 2.8.5 beschrieben, eine Fragmentlängenanalyse dieses Bereichs des DYT1-Gens mittels PCR und anschließender Fragmentlängenbestimmung auf dem ABI PRISM® 310 durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch eine Probe mit der GAG-Deletion, welche als Positivkontrolle bei der Bestimmung mit analysiert wurde. Darunter sieht man exemplarisch das Ergebnis eines der 13 Patienten, welche alle als negativ in Bezug auf die Deletion getestet wurden.

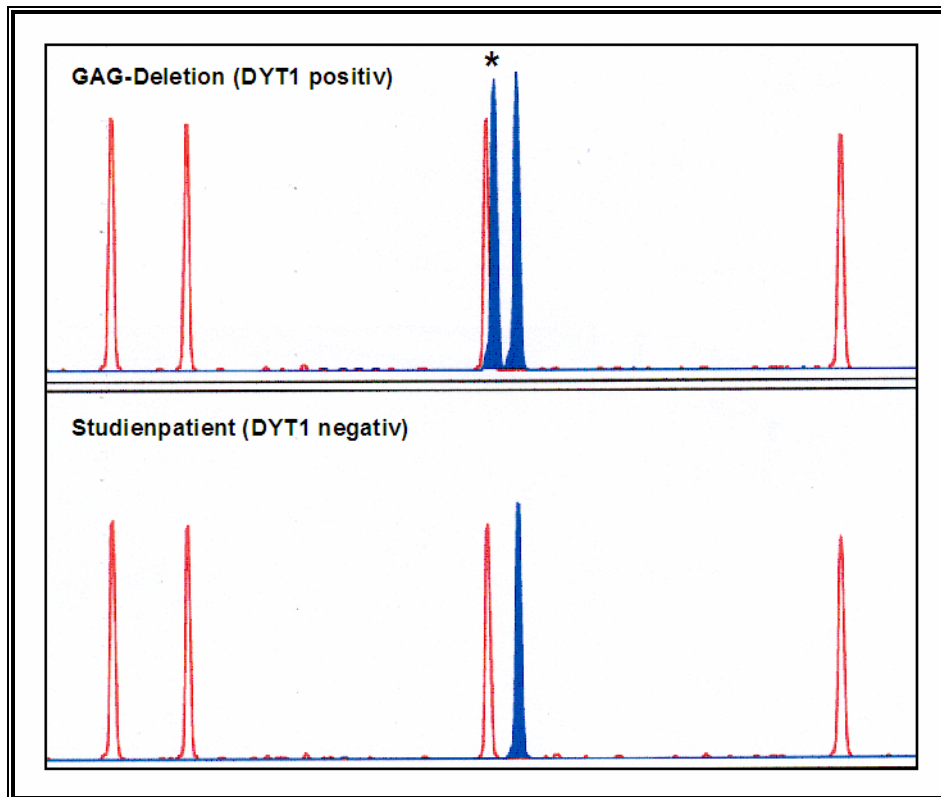


Abbildung 3.2: Fragmentlängenanalyse zum Nachweis der GAG-Deletion im DYT1-Gen. Der obere Teil der Abbildung zeigt neben den 4 Fragmenten der GS-500 Leiter (in rot) die beiden detektierten DNA-Fragmente (in blau). Bei dem längeren Fragment handelt es sich um das 204bp lange Fragment ohne Deletion. Der Patient ist heterozygot für die GAG-Deletion und somit findet sich neben dem 204bp-Fragment auch ein 201bp-Fragment (* in der Abbildung). Der untere Teil der Abbildung zeigt exemplarisch einen der 13 Studienpatienten (DYT1 negativ). Hier findet sich nur das homozygote 204bp-Fragment ohne Deletion.

Die 5'Promotor-Region des Menkes Gens wurde in ihrer gesamten Länge sequenziert und auf Mutationen hin analysiert. Nach Amplifikation der 1326bp langen Region mittels 4 sich überlappender PCR-Segmente (Gu et al., 2001) zeigte eine Analyse der 13 Patienten keine Veränderungen in der DNA Sequenz, welche mit der unter der GenBank Accession Nummer AY039755 zu findenden Mustersequenz verglichen wurde.

3.1.3 Wilson-Gen (Exone 8, 14 und 18)

Nach erfolgter SSCP-Analyse der Exone 8, 14 und 18 des Wilson-Gens mussten im Einzelnen folgende Anzahl an Proben aufgrund von Bandenverschiebungen im SSCP-

Gel zusätzlich sequenziert werden: 31 Proben für Exon 8, 19 Proben für Exon 14 und 41 Proben für Exon 18.

In Exon 8 konnte bei einem Patienten eine heterozygote Mutation gefunden werden. Durch die gefundene und bisher nicht beschriebene Substitution der Base G durch A an Position 2337 innerhalb des Gens wird aus dem Codon, welches für die Aminosäure Tryptophan codiert, ein Stop-Codon (TGG / TAG). Es handelt sich somit um eine nonsense-Mutation. Folgende Abbildung zeigt die Elektropherogramme der Sequenzierung des Forward- und des Reverse-Stranges:

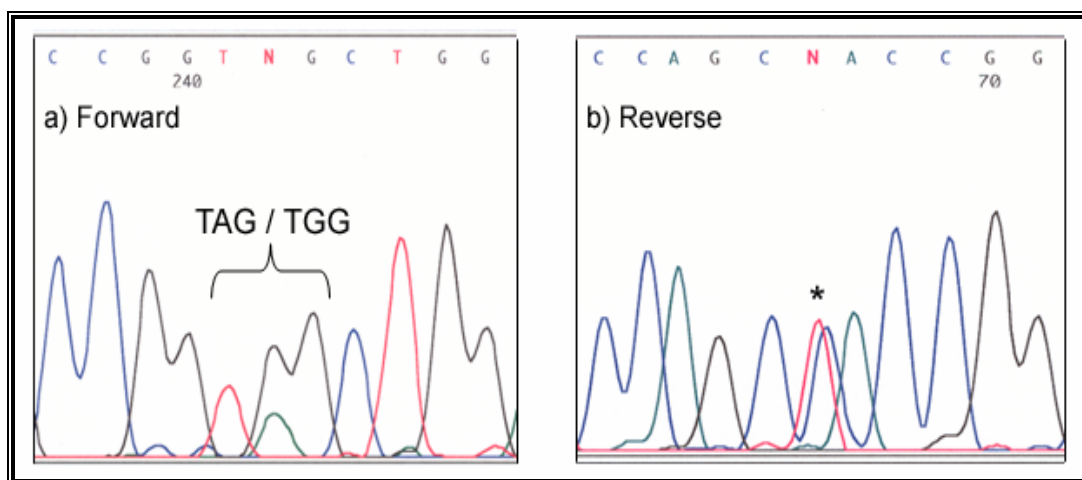


Abbildung 3.3: Elektropherogramme der Sequenzierung von Exon 8 des Wilson-Gens (ATP7B). Gezeigt ist die G2337A-Mutation eines Patienten mit F-ITD. Der Forward-Strang zeigt die heterozygote Mutation, die zu einem Stop-Codon (TAG) führt. Zur Absicherung wurde auch der Reverse-Strang analysiert. Die heterozygote Mutation ist hier durch ein Sternchen (*) markiert.

3.1.4 Das Kupfer-Chaperon ATOX1 (Exone 2, 3 und 4)

Die gesamte codierende Region des Gens ATOX1 (Exone 2-4) wurde bei den 100 F-ITD Patienten sequenziert. In keinem der drei Exone konnten Mutationen nachgewiesen werden. Auch eine Betrachtung der splice-Sites an den Exongrenzen zeigte für alle 100 sequenzierten Proben keinerlei Abweichungen von der normalen ag-gt Regel.

3.2 Polymorphismen im DYT1-Gen

3.2.1 Der C246T-Polymorphismus in Exon 2

Sowohl der C246T-Polymorphismus in Exon 2 des DYT1-Gens als auch der G646C-Polymorphismus in Exon 4 wurden mittels Sequenzanalyse untersucht. Dazu wurden die Polymorphismen flankierende Primer benutzt und durch die Methodenwahl der Sequenzierung war es möglich die beiden Exone komplett auf eventuelle Mutationen und Polymorphismen hin zu untersuchen. Innerhalb der 5 Exone des DYT1-Gens waren diese beiden untersuchten Sequenzvarianten in Exon 2 und Exon 4 die häufigsten (Chung-on Leung et al., 2001).

Der C246T-Polymorphismus führt nicht zu einem Austausch einer Aminosäure. Es handelt sich somit um eine so genannte stille Mutation (Ala82Ala). Die folgende Abbildung zeigt die Elektropherogramme der drei verschiedenen Genotypen:

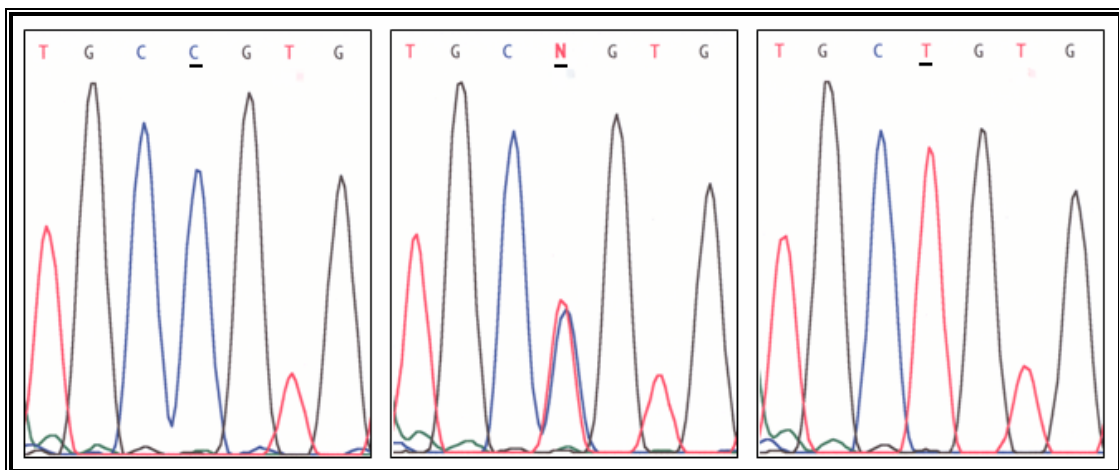


Abbildung 3.4: Elektropherogramme des C246T-Polymorphismus im Exon 2 des DYT1-Gens. Die Abbildung zeigt in drei verschiedenen Elektropherogrammen die drei verschiedenen Genotypen. Die Base an der Stelle des Polymorphismus ist jeweils unterstrichen. Die drei nach links und rechts flankierenden Basen sind ebenfalls mit abgebildet. Der linke Teil der Abbildung zeigt den homozygoten Genotyp C/C. Mittig ist der heterozygote Genotyp C/T dargestellt. Der rechte Teil der Abbildung zeigt den homozygoten Genotyp T/T.

3.2.2 Der G646C-Polymorphismus in Exon 4

Der G646C-Polymorphismus in Exon 4 führt zu einem Aminosäureaustausch. Die saure und hydrophile Aminosäure Aspartat (Asp) wird durch die basisch hydrophile Aminosäure Histidin (His) ausgetauscht. Die Abbildung zeigt die drei Genotypen in den Elektropherogrammen:

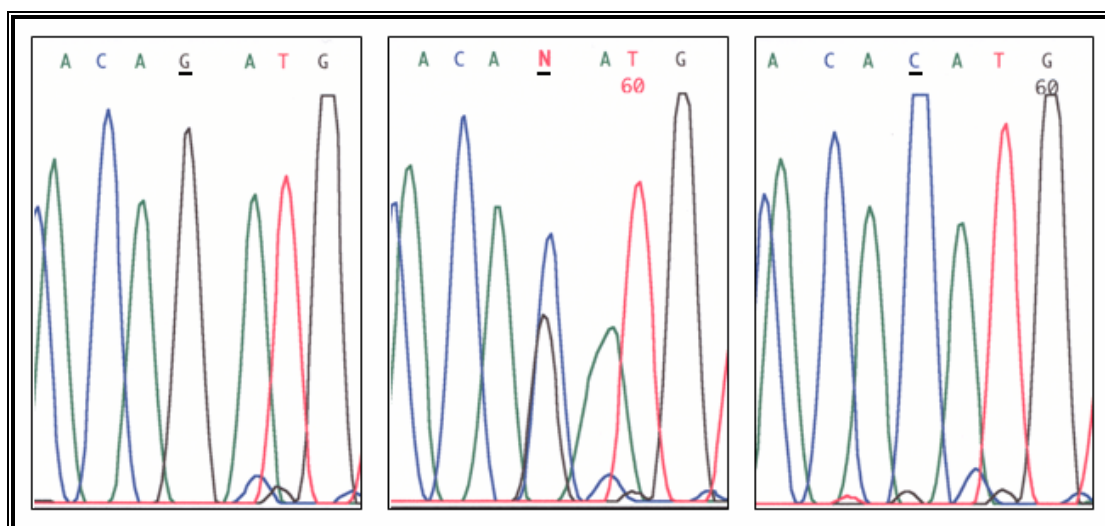


Abbildung 3.5: Elektropherogramme des G646C-Polymorphismus in Exon 4 des DYT1-Gens. Die Abbildung zeigt in drei verschiedenen Elektropherogrammen die drei verschiedenen Genotypen. Die Base an der Stelle des Polymorphismus ist jeweils unterstrichen. Die drei nach links und rechts flankierenden Basen sind ebenfalls mit abgebildet. Der linke Teil der Abbildung zeigt den homozygoten Genotyp G/G. Mittig ist der heterozygote Genotyp G/C dargestellt. Der rechte Teil der Abbildung zeigt den homozygoten Genotyp C/C.

3.2.3 Genotypfrequenzen der Polymorphismen in Exon 2 und 4 des DYT1-Gens

Die Tabelle zeigt die Verteilung der Genotypen für die beiden Loci innerhalb des DYT1-Gens bei Patienten und Kontrollen im Vergleich. In Exon 2 wurde das häufigere Allel mit der Base C an Position 246 als Wildtypallel (wt) bezeichnet und das seltenere Allel mit der Base T als mutiertes Allel (mt). In Exon 4 war das Wildtypallel jenes mit der Base G (wt) und das mutierte Allel jenes mit der Base C (mt).

Locus	Genotyp	Patienten	Kontrollen	OR (95 % KI)
		n (%)	n (%)	
Exon 2	wt/wt	56	66	
	wt/mt	37	29	1,388 (0,854-2,282)
	mt/mt	7	5	1,927 (0,729-5,209)
Exon 4	wt/wt	78	79	
	wt/mt	20	16	0,926 (0,513-1,661)
	mt/mt	2	5	0,857 (0,263-2,758)

Tabelle 3.1: Genotypfrequenzen der Polymorphismen in Exon 2 und 4 des DYT1-Gens. wt=Wildtyp-Allel, mt=mutiertes Allel, OR= odds ratio, KI=Konfidenzintervall

Die Berechnung der OR für die drei Genotypen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollpopulation. Das 95%-Konfidenzintervall schloss für alle Berechnungen die 1 mit ein. Es fand sich somit keine Häufung eines der untersuchten Genotypen bei den F-ITD Patienten. Abweichungen vom HWE waren nicht zu beobachten.

3.2.4 Haplotypen-Analyse

Die Ergebnisse der Haplotypen-Analyse zu den beiden Polymorphismen sind der aufgeführten Tabelle zu entnehmen:

Haplotypen	Patienten	Kontrollen	x ²	p (exakt)
	n (%)	n (%)		
11 (wt-wt)	125 (62,5)	138 (69,0)		
12 (wt-mt)	24 (12,0)	23 (11,5)		
21 (mt-wt)	51 (25,5)	36 (18,0)		
22 (mt-mt)	0 (0,0)	3 (1,5)	6.250	0.0872

Tabelle 3.2: Haplotypen-Analyse der beiden Polymorphismen des DYT1-Gens. wt=Wildtyp-Allel, mt=mutiertes Allel, x²=Chi-Quadrat Test

Die erste Zahl im Feld Haplotypen gibt an, ob in Exon 2 das Wildtypallel (1) oder das mutierte Allel (2) vorlag. Die zweite Zahl benennt diesen Sachverhalt für den Polymorphismus in Exon 4. Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass keiner der aufgeführten Haplotypen häufiger bei den Patienten oder Kontrollen zu finden ist ($p > 0,05$). Die Berechnungen erfolgten mit dem Genetics-Modul des Statistikprogramms SAS auf Basis des EM Algorithmus (Excoffier et al., 1995).

3.3 Gene des Homocystein-Metabolismus

3.3.1 Die 68bp-Insertion im Cystathionin- β -Synthase -Gen

Die 68bp-Insertion in Exon 8 im Gen der Cystathionin- β -Synthase (CBS) wurde mittels einfacher PCR und nachfolgender Gel-Elektrophorese unter Verwendung einer 100bp-Leiter als Längenstandard untersucht. Aufgrund des Größenunterschieds der beiden Allele mit und ohne Insertion war eine Zuordnung nach Elektrophorese eindeutig zu treffen. Das folgende Bild zeigt die verschiedenen Genotypen nach Elektrophorese auf einem 3%igen Gel:

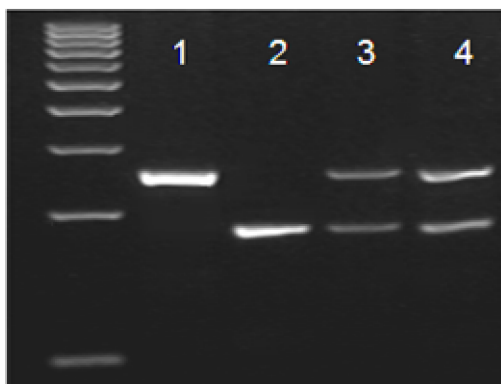


Abbildung 3.6: Genotypen der 68bp-Insertion in Exon 8 des CBS-Gens nach Gelelektrophorese. Spur 1 zeigt das 252 Basen lange PCR-Produkt mit homozygoter Insertion auf beiden Allelen; Spur 2 zeigt das 184 Basen lange homozygote Wildtypallel ohne Insertion; Spur 3 und 4 zeigen die Insertion im heterozygoten Zustand; die 100bp-Leiter neben Spur 1 verdeutlicht den Abstand von 68 Basen zwischen den Allelen.

Die Ergebnisse der Analyse der deutschen Studienpopulation sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Genotypfrequenzen, gruppierte Genotypen und Allelfrequenzen im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen wurden analysiert.

Genotypen	Patienten	Kontrollen	OR (95 % KI) ^a	p-Wert
	n=100	n=100		
<i>wt/wt</i>	81	93		
<i>wt/ins</i>	18	7	3,074 (1,202-8,950)	
<i>ins/ins</i>	1	0	9,447 (1,446-80,100)	0,016 ^b
<i>wt/wt</i>	81	93		
<i>wt/ins+ins/ins</i>	19	7	3,116 (1,173-9,187)	0,019 ^c
Allele	n=200	n=200		
<i>wt</i>	180 (90,0)	193 (96,5)		
<i>ins</i>	20 (10,0)	7 (3,5)	3,063 (1,205-8,764)	0,015 ^c

^a odds ratio, Konfidenzintervall ^b Cochran-Armitage-Test ^c Fisher-Test

Tabelle 3.3: Genotyp- und Allelfrequenzen der 68bp-Insertion des CBS-Gens in der Münchner Studienpopulation. wt=Wildtyp-Allel, ins=Insertion

Die Berechnung der odds ratio und des p-Wertes zeigten sowohl bei den Genotypfrequenzen als auch bei den Allelfrequenzen eine signifikante Häufung des Alleles mit der 68bp-Insertion bei den Patienten. Die 95%-Konfidenzintervalle der odds ratio schlossen für alle Berechnungen die 1 nicht mit ein. Alle berechneten p-Werte waren <0,05 und somit signifikant. Die kombinierte Analyse dieser Ergebnisse in Verbindung mit dem C677T-Polymorphismus des MTHFR-Gens ist dem Kapitel 3.3.3 zu entnehmen.

Aufgrund der positiven Resultate war es notwendig eine weitere Population von Patienten mit F-ITD und Kontrollen auf die 68bp-Insertion hin zu untersuchen. Es wurde dazu die in Kap. 2.1 beschriebene aus 121 Patienten und Kontrollen bestehende Population aus Frankreich genutzt. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Analyse in dieser zweiten Population.

Genotypen	Patienten	Kontrollen	OR (95 % KI) ^a	p-Wert
	n=121	n=121		
<i>wt/wt</i>	99 (81,8)	103 (85,1)		
<i>wt/ins</i>	21 (17,4)	17 (14,0)	1,229 (0,623-2,460)	
<i>ins/ins</i>	1 (0,8)	1 (0,8)	1,512 (0,388-6,049)	0,6312 ^b
<i>wt/wt</i>	99 (81,8)	103 (85,1)		
<i>wt/ins+ins/ins</i>	22 (18,2)	18 (14,9)	1,272 (0,609-2,679)	0,604 ^c
Allele	n=242	n=242		
<i>wt</i>	219 (90,5)	223 (92,1)		
<i>ins</i>	23 (9,5)	19 (7,9)	1,233 (0,622-2,467)	0,629 ^c

^a odds ratio, Konfidenzintervall ^b Cochran-Armitage-Test ^c Fisher-Test

Tabelle 3.4: Genotyp- und Allelfrequenzen der 68bp-Insertion des CBS-Gens in der Französischen Studienpopulation. wt=Wildtyp-Allel, ins=Insertion

Die signifikanten Unterschiede, die in der ersten Population zu sehen waren, ließen sich in dieser Population nicht replizieren. Das Konfidenzintervall der odds ratio schloss für alle Berechnungen die 1 mit ein und berechnete p-Werte waren >0,05.

3.3.2 Der 31bp-VNTR des Cystathionin-β-Synthase -Gens

Das 31bp VNTR an der Grenze zwischen Exon 13 und Intron 13 im Gen der Cystathionin-β-Synthase (CBS) wurde auf dem ABI PRISM[®] 310 mittels Fragmentlängenbestimmung analysiert. Genotypfrequenzen und Allelfrequenzen wurden bei der Population aus München und bei der aus Frankreich untersucht. Nach bisherigem Wissensstand existierten 5 Allele mit 16, 17, 18, 19 und 21 Repeats. Das seltene Allel mit 16 Repeats (Lievers et al., 2001) fand sich in keiner der beiden Populationen. Bei der Kontrollpopulation aus Frankreich fand sich jedoch ein Allel mit 24 Repeats, welches bisher nicht beschrieben wurde. Exemplarisch ist hier das Ergebnis der Fragmentlängenanalyse von zwei Proben aufgeführt.

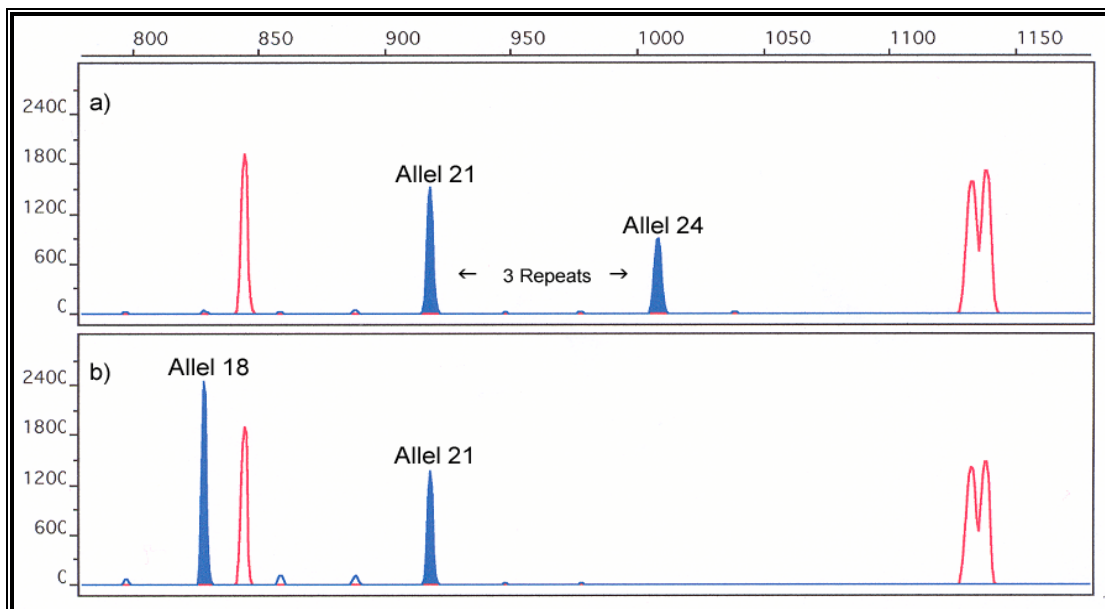


Abbildung 3.7: Fragmentlängenanalyse des 31bp-Repeat im CBS-Gen. Auf der x-Achse ist die Länge in Basenpaaren angegeben und auf der y-Achse die Signalintensität. Bei den beiden roten Peaks handelt es sich um zwei Leiterfragmente mit 845 und 1133 Basen. Die obere Analyse zeigt die Kontrolle mit dem Genotyp 21/24, wobei es sich bei dem Allel 24 um das bisher nicht beschriebene handelt. Die untere Analyse zeigt das häufigste Allel 18 mit dem Allel 21.

Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Analyse von Genotyp- und Allelfrequenzen der Population aus München:

Allele	Patienten	Kontrollen	Overall χ^2 ^a	p-Wert
	n=200	n=200		
17	18 (9,0)	7 (3,5)		
18	140 (70,0)	165 (82,5)		
19	22 (11,0)	20 (10,0)		
21	20 (10,0)	8 (4,0)	12,13	0,0062
Genotypen	n=100	n=100		
17/17	1	0		
17/18	14	6		
17/19	2	1		
18/18	50	66		
18/19	12	19		
18/21	14	8		
19/19	2	0		
19/21	4	0		
21/21	1	0	16,96	0,0116

^aChi-Quadrat Mehrfeldertest

Tabelle 3.5: Genotyp- und Allelfrequenzen des 31bp VNTR im CBS-Gen in der Studienpopulation aus München

Die Berechnung des p-Wertes mit dem Chi-Quadrat Mehrfeldertest zeigte sowohl bei der Verteilung der Allelfrequenzen ($p=0,0062$) als auch der Genotypfrequenzen ($p=0,016$) signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Detaillierte Berechnungen wurden nun für die Verteilung des Allels 21 und für den Vergleich von kurzen zu langen Allelen bei Patienten und Kontrollen durchgeführt. Die Kategorisierung in kurze (17 oder 18) und lange (19 oder 21) Allele wurde aufgrund der Ergebnisse von Liewers et al. vorgenommen (siehe auch Abb. 1.3), da eine Zunahme der Anzahl an Repeats mit einer Abnahme der Enzymaktivität assoziiert war (Liewers et al., 2001).

Allele	Patienten	Kontrollen	OR (95% KI) ^a	p-Wert ^b
	n=200	n=200		
<i>übrige</i>	180 (90,0)	192 (96,0)		
21	20 (10,0)	8 (4,0)	2,667 (1,089-7,166)	0,0295
<i>kurze (17,18)</i>	158 (79,0)	172 (86,0)		
<i>lange (19,21)</i>	42 (21,0)	28 (14,0)	1,633 (0,937-2,872)	0,0866

^aodds ratio, 95%-Konfidenzintervall; ^bexakter Test nach Fisher (zweiseitig)

Tabelle 3.6: Verteilung des Allels 21 und Verteilung kurzer und langer Allele in der Studienpopulation aus München.

Für die Verteilung des Allels 21 lag der exakt berechnete p-Wert bei 0,0295 und war somit signifikant. Das Allel 21 kam signifikant häufiger bei den Patienten vor. Beim Vergleich langer und kurzer Allele zwischen Patienten und Kontrollen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p>0,05$). Aufgrund der signifikanten Daten der Studienpopulation aus München zeigte sich auch hier die Notwendigkeit die Resultate in einer zweiten unabhängigen Population zu replizieren. Wie bei der 68bp-Insertion in diesem Gen wurde dazu die Französische Population verwendet. Die Daten dazu sind im Folgenden dargestellt:

	Patienten	Kontrollen		
Allele	n=242	n=242	Overall χ^2 ^a	p-Wert
17	20 (8,3)	20 (8,3)		
18	189 (78,1)	182 (75,2)		
19	21 (8,7)	30 (12,4)		
21	12 (5,0)	9 (3,7)		
24	0 (0,0)	1 (0,4)	3,149	0,5452
Genotypen	n=121	n=121		
17/17	1 (0,8)	1 (0,8)		
17/18	14 (11,6)	16 (13,2)		
17/19	1 (0,8)	1 (0,8)		
17/21	3 (2,5)	1 (0,8)		
18/18	76 (62,8)	67 (55,4)		
18/19	16 (13,2)	26 (21,5)		
18/21	7 (5,8)	6 (5,0)		
19/19	1 (0,8)	1 (0,8)		
19/21	2 (1,7)	1 (0,8)		
21/22	0 (0,0)	1 (0,8)	5,491	0,8592

^aChi-Quadrat Mehrfeldertest

Tabelle 3.7: Genotyp- und Allelfrequenzen des 31bp VNTR im CBS-Gen in der französischen Studienpopulation

Der Vergleich von Genotypen und Allelen zwischen Patienten und Kontrollen zeigte in dieser Population keine signifikanten Unterschiede. Die positiven Ergebnisse aus der ersten Population ließen sich nicht replizieren ($p > 0,05$). Zusätzlich zu den bisher bekannten Allelen des 31bp-Repeats wurde ein bisher nicht beschriebenes Allel mit 24 Repeats in der Kontrollpopulation gefunden (siehe auch Abb. 3.7). In folgender Tabelle sind, wie auch bei der Population aus München berechnet, die Verteilungen von Allel 21 und den kurzen und langen Allelen dargestellt:

	Patienten	Kontrollen		
Allele	n=242	n=242	OR (95% KI) ^a	p-Wert ^b
<i>übrige</i>	230 (95,0)	233 (96,3)		
21	12 (5,0)	9 (3,7)	1,351 (0,511-3703)	0,6565
<i>kurze (17,18)</i>	209 (86,4)	202 (83,5)		
<i>lange (19,21,24)</i>	33 (13,6)	40 (16,5)	0,797 (0,467-1,354)	0,4462

^aodds ratio, 95%-Konfidenzintervall; ^bexakter Test nach Fisher (zweiseitig)

Tabelle 3.8: Verteilung des Allels 21 und Verteilung kurzer und langer Allele in der Studienpopulation aus Frankreich.

3.3.3 Der C677T-Polymorphismus im Gen der Methylen-tetrahydrofolatreduktase

Nach PCR und Enzymverdau erfolgte die Zuordnung der Proben der Population durch Elektrophorese auf einem 3%igen-Agarosegel. Das Enzym *HinfI* spaltete das 198bp lange PCR-Fragment im Falle eines T an Position 677 in zwei Fragmente mit einer Länge von 175 und 23 Basenpaaren. Das Bild der Elektrophorese zeigt die möglichen Genotypen.

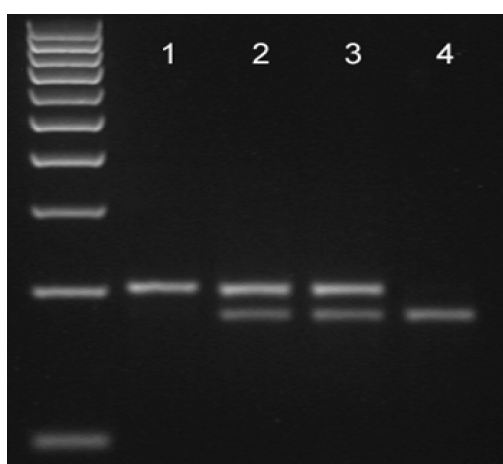


Abbildung 3.8: Genotypen des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen nach Gelelektrophorese. Spur 1 zeigt das 198bp lange Fragment mit homozygotem Wildtypallel (C), welches nicht gespalten wurde. Spur 2 und 3 zeigen den heterozygoten Genotyp mit Fragmenten von 198bp und 175bp. Das 23bp-Fragment ist aufgrund seiner Länge aus dem Gel gelaufen. Spur 4 zeigt das homozygot mutierte Allel (T) mit einem sichtbaren Fragment von 175bp. Als Längenstandard ist eine 100bp-Leiter neben Spur 1 aufgetragen.

Genotypen	Patienten		Kontrollen		OR (95 % KI) ^a	p-Wert
	n=100	n=100	n=100	n=100		
CC	41	47				
CT	52	48			1,252 (0,766-2,059)	
TT	7	5			1,567 (0,586-4,241)	0,408 ^b
CC	41	47				
CT/TT	59	53			1,276 (0,702-2,321)	0,476 ^c
Allele	n=200		n=200		1,206 (0,772-1,886)	0,449 ^c
C	134 (67,0)	142 (71,0)				
T	66 (33,0)	58 (29,0)				

^a odds ratio, Konfidenzintervall ^b Cochran-Armitage-Test ^c Fisher-Test

Tabelle 3.9: Genotyp- und Allelfrequenzen des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen

Die Daten der statistischen Berechnungen zeigten, dass die Verteilung der Genotypen und Allelfrequenzen im Vergleich von Patienten zu Kontrollen keine signifikanten Unterschiede erkennen ließ. Das Konfidenzintervall der odds ratio schloss für alle Berechnungen die 1 mit ein und p-Werte waren $>0,05$.

Ergänzend wurde die Summe der Mutationen im MTHFR-Gen (677T) und CBS-Gen (68bp Insertion) bei Patienten und Kontrollen verglichen. Das Vorliegen der Insertion im CBS-Gen in Kombination mit der thermolabilen Form der MTHFR stellte nach einer Studie von de Franchis et al. einen Risikofaktor für eine Hyperhomocysteinämie dar (de Franchis et al., 2000).

# Mutationen	Patienten ^a	Kontrollen ^a	OR (95 % KI) ^b	p-Wert ^c
0	24	27		
1	40	45	1,255 (0,915-1,733)	
2	24	24	1,575 (0,838-3,004)	
3	11	3	1,977 (0,767-5,206)	
4	1	1	2,481 (0,702-9,023)	0,166

^an=100 ^bodds ratio mit 95% Konfidenzintervall ^cCochrane-Armitage Trend Test

Tabelle 3.10: Totale Anzahl an Mutationen im CBS- und MTHFR-Gen

Die Berechnung der OR und des p-Wertes zeigten aber auch in diesem Fall keine signifikanten Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen. Ein gehäuftes Auftreten der Kombination beider Mutationen konnte nicht beobachtet werden.

Des Weiteren wurde durch Berechnung der Logistischen Regression untersucht, inwiefern die beiden Mutationen im CBS- und MTHFR-Gen einen Einfluss unabhängig voneinander hatten oder nicht.

	β^a	S.F. ^b	OR (95 % KI) ^c	p-Wert
<i>MTHFR</i>	0,292	0,259	1,339 (0,782-2,312)	0,317
<i>CBS</i>	1,193	0,571	3,298 (1,001-13,183)	0,050
<i>MTHFR</i> * <i>CBS</i>	-0,033	0,746	0,967 (0,189-6,636)	1,000

^a Regressionskoeffizient β ^b Standardfehler ^c odds ratio mit 95% Konf.intervall

Tabelle 3.11: Logistische Regressionsberechnung zu MTHFR und CBS

Die Daten zeigten, dass die Mutation im CBS-Gen in der untersuchten Studienpopulation einen Einfluss unabhängig von möglichen Mutationen im MTHFR-Gen hatte. Die p-Werte verdeutlichten diesen unabhängigen Einfluss: $p(\text{CBS})=0,05$; $p(\text{MTHFR}*\text{CBS})>0,05$. Insbesondere der letzte p-Wert zeigte, dass ein möglicher Effekt der Insertion im CBS-Gen, wenn überhaupt, dann unabhängig vom C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen war. Somit war es nicht notwendig in der zweiten Studienpopulation aus Frankreich den C677T-Polymorphismus zu untersuchen. Diese Population musste nachfolgend nur auf die Insertion untersucht werden (siehe Kap. 3.3.1).

3.3.4 Der A2756G-Polymorphismus im Methionine-Synthase-Gen

Der A2756G-Polymorphismus im Gen der Methionine-Synthase (MS) wurde auf seine Häufigkeit in der Studienpopulation untersucht. Nach PCR und Enzymverdau erfolgte die Analyse durch Gel-Elektrophorese. Das 211bp lange PCR-Fragment wurde beim seltenen G-Allel durch das Enzym *HaeIII* in zwei Fragmente mit 131bp und 80bp Länge geschnitten. Das Bild zeigt die Aufnahme nach Gel-Elektrophorese mit den möglichen Genotypen.

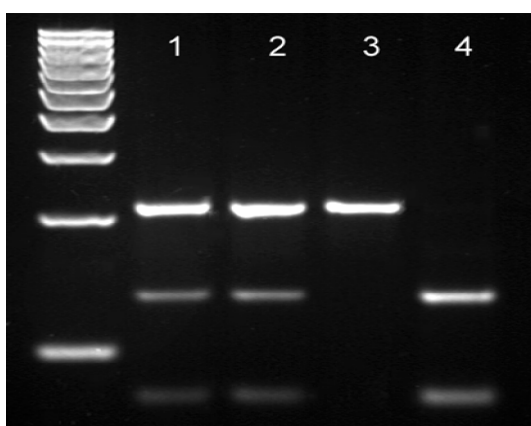


Abbildung 3.9: Genotypen des A2756G-Polymorphismus im MS-Gen nach Gelelektrophorese. Spur 1 und Spur 2 zeigen den heterozygoten Genotyp mit Fragmenten von 211, 131 und 80 Basen Länge. Spur 3 zeigt das nicht geschnittene Fragment (211 Basen) bei einem A an Position 2756 des MS-Gens. Spur 4 zeigt den homozygoten Genotyp mit einem G an Position 2756 auf beiden Allelen. Neben Spur 1 ist zur Längenkontrolle eine 100bp-Leiter aufgetragen.

Genotypen	Patienten	Kontrollen	OR (95 % KI) ^a	p-Wert
	n=100	n=100		
AA	65	62		
GA	31	35	0,938 (0,552-1,591)	
GG	4	3	0,880 (0,304-2,532)	0,899 ^b
AA	65	62		
GA/GG	35	38	0,879 (0,474-1,627)	0,769 ^c
Allele	n=200	n=200		
A	161 (80,5%)	159 (79,5%)		
G	39 (19,5%)	41 (20,5%)	0,939 (0,558-1,580)	0,901 ^c

^a odds ratio, Konfidenzintervall ^b Cochran-Armitage-Test ^c Fisher-Test

Tabelle 3.12: Genotyp- und Allelfrequenzen des C2756G-Polymorphismus im MS-Gen

Die Frequenzen der möglichen Genotypen (AA/GA/GG), die Frequenzen der gruppierten Genotypen und die Allelfrequenzen wurden in der Patienten- und Kontrollgruppe analysiert. Die Ergebnisse waren in allen Bereichen als nicht signifikant zu bezeichnen. Das Konfidenzintervall der odds ratio schloss für alle Berechnungen die 1 mit ein. Die p-Werte waren sowohl für die isolierte als auch für die gruppierte Analyse der Daten $>0,05$. Eine Assoziation des seltenen G-Allels mit F-ITD konnte in der Studienpopulation nicht gefunden werden. Sämtliche Genotypverteilungen der hier analysierten Gene des Homocysteinmetabolismus lagen im HWE.

3.4 Zum Dopamin-5-Rezeptor-Polymorphismus

3.4.1 Analyse des (CA)_n-Repeats auf dem ABI PRISM® 310

Während in der Literatur (Sherrington et al., 1993) von bisher 12 Allelen des (CA)_n-Repeat Polymorphismus mit einer Länge von 134 bis 156 Basenpaaren die Rede war, wurde ein zusätzliches Allel mit einer Länge von 158bp in der hier untersuchten Patientenpopulation gefunden. Die Nomenklatur der Allele erfolgte in der Literatur absteigend nach ihrer Länge (Placzek et al., 2001). Allel 5 beispielsweise besaß einen Repeat mehr als Allel 6. Entgegen der bisherigen Nomenklaturregel wurde das zusätzlich gefundene Allel mit der Zahl 13 bezeichnet (siehe auch Abb. 3.10).

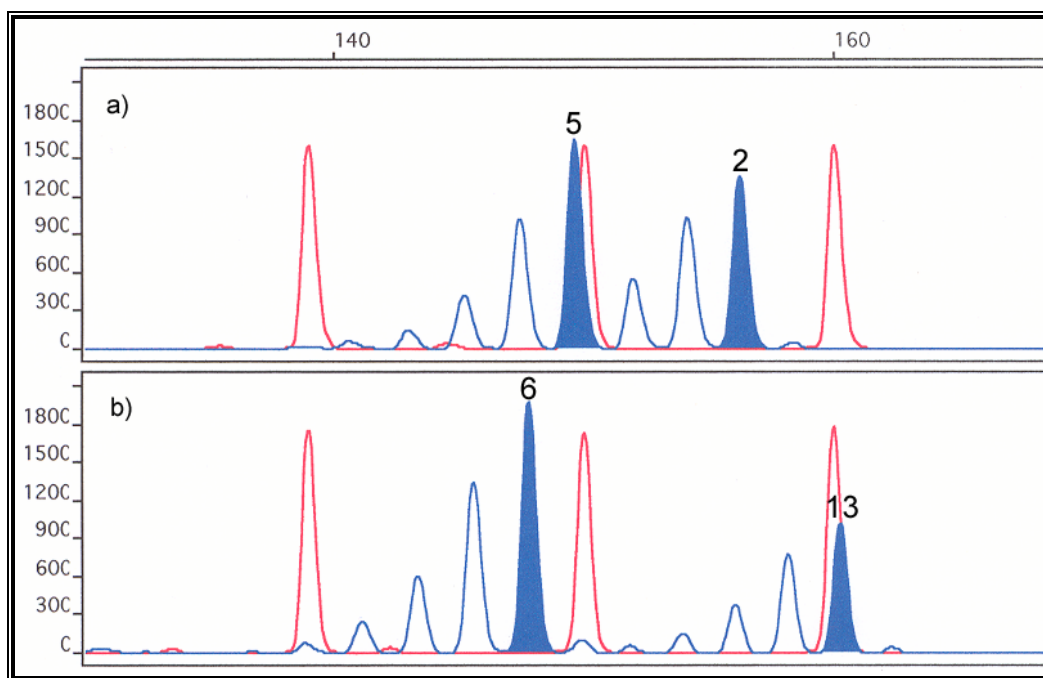


Abbildung 3.10: Fragmentlängenanalyse des (CA)_n-Repeat Polymorphismus im DRD5-Gen. Das Bild zeigt das Ergebnis der Fragmentlängenanalyse des Repeats bei zwei Patienten. Die roten Peaks sind von links nach rechts die Fragmente der Leiter (139, 150, 160). Auf der x-Achse ist die Fragmentlänge abgetragen und auf der y-Achse die Signalstärke. Die somit ermittelten Genotypen der beiden Patienten sind 5/2 und 6/13.

3.4.2 Allelverteilung in der Studienpopulation

Berechnet wurden nach Analyse der Studienpopulation aus München die absoluten und relativen Häufigkeiten der 13 gefundenen Allele in der Patienten- und Kontrollpopulation. Folgende Tabelle zeigt die Allelverteilung:

Allele ¹	Patienten	Kontrollen
	n (%)	n (%)
1	2 (1,0)	4 (2,0)
2	5 (2,5)	3 (1,5)
3	12 (6,0)	16 (8,0)
4	14 (7,0)	20 (10,0)
5	105 (52,5)	100 (50,0)
6	9 (4,5)	11 (5,5)
7	9 (4,5)	7 (3,5)
8	12 (6,0)	4 (2,0)
9	12 (6,0)	12 (6,0)
10	11 (5,5)	13 (6,5)
11	7 (3,5)	6 (3,0)
12	1 (1,0)	4 (2,0)
13	1 (1,0)	(0,0)

Chi-Quadrat=10,410; p=0,596; ¹ n=200 pro Gruppe

Tabelle 3.13: Allelfrequenzen des (CA)_n-Repeat Polymorphismus im DRD5-Gen

Aufgrund der bisher publizierten Befunde zum DRD5-Gen und F-ITD (Placzek et al., 2001; Misbahuddin et al., 2002) erfolgte eine spezielle Analyse der Häufigkeiten der Allele 2 und 6. Folgende Tabelle zeigt die Berechnungen für die Häufigkeitsverteilungen dieser beiden Allele in der Studienpopulation.

Allele	Patienten	Kontrollen
	n (%)	n (%)
2	5 (2,5)	3 (1,5)
andere	195 (97,5)	197 (98,5)
6	9 (4,5)	11 (5,5)
andere	191 (93,5)	189 (94,5)

Allel 2: Odds Ratio=1,684, 95% KI=0,322-10,980
 Allel 6: Odds Ratio=0,720, 95% KI=0,246-2,016

Tabelle 3.14: Allelfrequenzen der Allele 2 und 6 des (CA)_n-Repeat Polymorphismus im DRD5-Gen. KI=Konfidenzintervall

Die Allelverteilungen wurden auf Abweichungen vom HWE getestet, wobei hier weder für Patienten noch für Kontrollen signifikante Abweichungen zu sehen waren ($p > 0,05$). Die Genotypfrequenzen lagen im HWE.

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass weder bei einer Gesamtbetrachtung der Häufigkeiten aller Allele des Polymorphismus zwischen Patienten und Kontrollen noch bei einer speziellen Analyse der Allele 2 und 6 signifikante Differenzen zu erkennen waren (siehe auch Abb. 3.11). Die exakten p-Werte und Konfidenzintervalle der OR sind dazu den Tabellen zu entnehmen. Für alle Berechnungen schloss das 95%-Konfidenzintervall der OR die 1 mit ein.

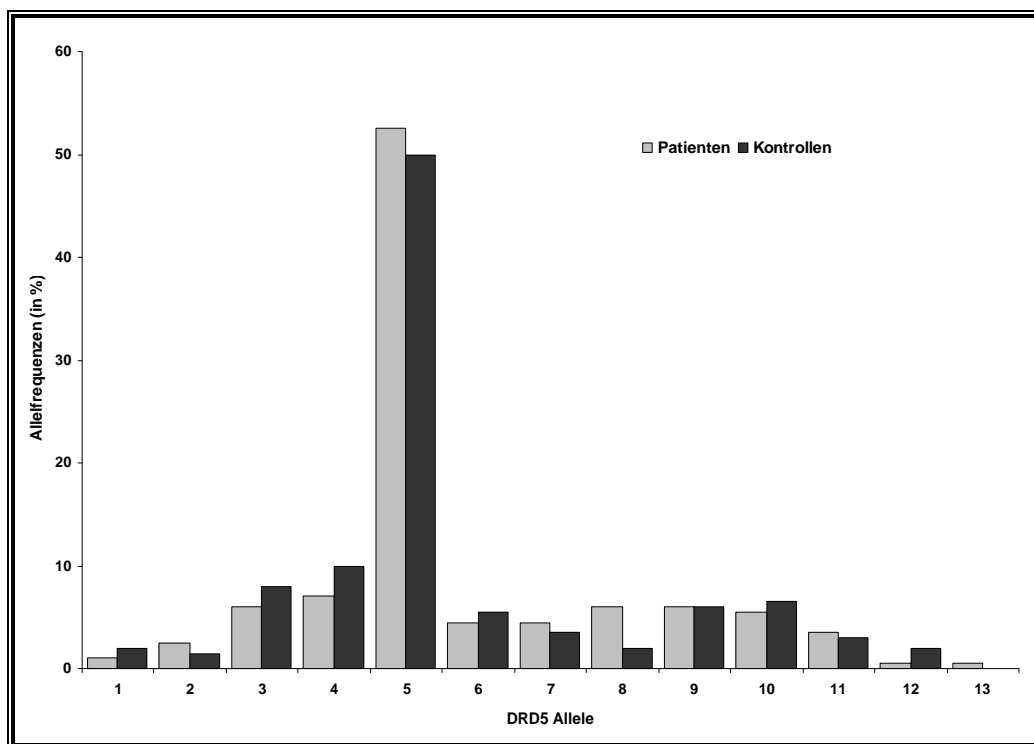


Abbildung 3.11: Verteilung der 13 Allele des (CA)_n-Repeats bei den F-ITD Patienten und Kontrollen. Auf der x-Achse sind die dreizehn detektierten DRD5-Allele abgetragen. Auf der y-Achse dazu die Allelfrequenzen in %. Die grauen Balken entsprechen den Patienten. Die schwarzen Balken entsprechen den Kontrollen.

3.5 HLA DRB-Typisierung

3.5.1 Analyse mit der Biotest Typing-Software

Nach Typisierung mit dem ELPHA DRB LowRes Kit erfolgte die endgültige Bestimmung der Allele des HLA-DRB Locus mit der Biotest ELPHA HLA Typing Software Version 5.0. Das Programm interpretierte nach photometrischer Messung der Absorptionswerte der Kavitäten die Reaktionsmuster zu jeder einzelnen Probe und gab als Ergebnis die möglichen Allelkombinationen an. Dieses konnte auch manuell mit Tabellen durchgeführt werden. Bei der Auswertung wurde als Option innerhalb der Software die Ergebnisstufe „Häufige Allelkombinationen mit vollständigem Reaktionsmuster“ ausgewählt. Der Bezeichnung „häufiges Allel“ lagen zwei Kriterien zugrunde:

Das Allel trat in einer vom U.S. National Marrow Donor Program (NMDP) durchgeführten Großstudie häufiger als 1:1000 (>1‰) mal auf und musste laut EFI Akkreditierungsprogramm in einem hochauflösenden System nachgewiesen werden.

Anhand eines Charts stellte die Software die Signalintensitäten in den einzelnen Kavitäten dar und markierte den Cutoff bei 0,2. Ein typischer Ausdruck sah folgendermaßen aus:

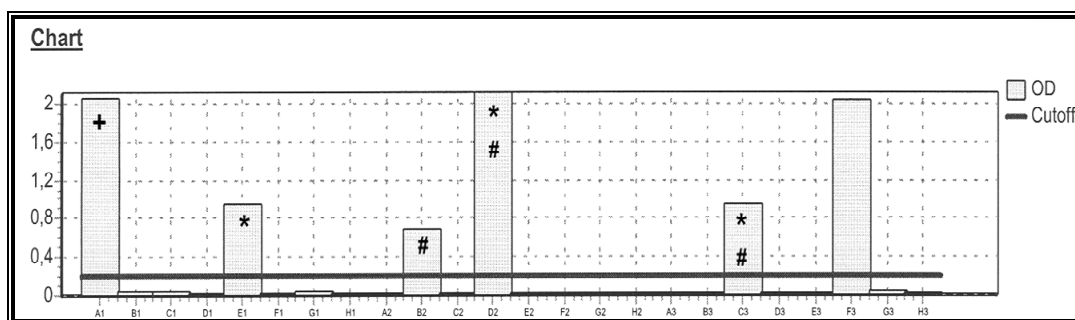


Abbildung 3.12: Chartmuster (modifiziert) einer Probe nach HLA DRB-Typisierung. Die x-Achse zeigt die einzelnen Kavitäten und auf der y-Achse sind die OD-Werte abgetragen. Als schwarze Linie ist der Cutoff eingetragen

In Position A1 war jeweils die Positivkontrolle zu sehen. Haben alle Reaktionen funktioniert, war dieser Wert immer deutlich positiv. Die mit einem Stern (*) markierten Balken wiesen auf das Allel 03 hin. Die mit einer Raute (#) markierten

Balken wiesen auf das Allel 13 hin. Wie der Chart zeigt, kann eine Kavität bei verschiedenen Allelen positiv sein. Erst die Kombination lieferte das endgültige Ergebnis: Genotyp DRB1* 03/13. Die Kavitäten F3 bis G3 dienten als ergänzende Typisierung der Loci DRB3*, DRB4* und DRB5*. Diese Kavitäten waren nur positiv in Verbindung mit einigen Allelen des DRB1* Locus.

3.5.2 Allelverteilung in der Studienpopulation

		Patienten Kontrollen			
	Allele	(n=100)	(n=100)	OR (95% KI) ^a	p-Wert ^b
DRB-3	0	81	80		
	1	18	20	1,000 (0,482-2,077)	
	2	1	0	1,000 (0,232-4,312)	1,000
DRB-4	0	79	68		
	1	21	32	0,567 (0,282-1,120)	0,109
	2	0	0		
DRB-13	0	75	76		
	1	24	22	1,000 (0,531-1,883)	
	2	1	2	1,000 (0,282-3,544)	1,000

^a OR, odds ratio; KI, Konfidenzintervall

^b exakter Cochran-Armitage Trendtest (zweiseitig)

Tabelle 3.15: Genotypfrequenzen der Allele DRB-3, DRB-4 und DRB-13 des HLA-DRB Locus: 0=kein Allel ist vorhanden, 1=das Allel ist heterozygot vorhanden, 2=das Allel ist homozygot vorhanden

Die Tabelle zeigt die Genotypfrequenzen der Allele DRB-3, DRB-4 und DRB-13 im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen. Da nur zu diesen Allelen des DRB-Locus publizierte Daten mit Verbindung zur Dystonie vorlagen (Claypool et al., 1995; Hilten et al., 2000; Korein et al., 1981), wurde bei der Auswertung der Focus insbesondere auf diese drei Allele gelegt. Die Häufigkeiten sind in 3 Klassen unterteilt: Homozygot (Allele=2), Heterozygot (Allele=1) und Allel nicht vorhanden (Allele=0).

Berechnet wurde die OR und der zweiseitige p-Wert mit dem Cochran-Armitage-Test. Die Berechnungen zeigten, dass keiner der untersuchten Genotypen eine signifikante Häufung bei den 100 Patienten mit F-ITD zeigte. Das 95%-Konfidenzintervall für die Berechnung der OR schloss bei allen 3 Allelen die 1 mit ein. Der p-Wert nach dem Cochran-Armitage-Test lag für alle 3 Allele bei $p > 0,05$. Abweichungen vom HWE

wurden für die Genotypen 01/04 und 07/13 in der Kontrollgruppe beobachtet ($p < 0.001$) (siehe Kap. 4.2.5.3).

Das folgende Diagramm zeigt die Verteilung der Allele der Studienpopulation am HLA-DRB Locus. Die relativen Häufigkeiten in der Patienten- und Kontrollgruppe sind gegenübergestellt:

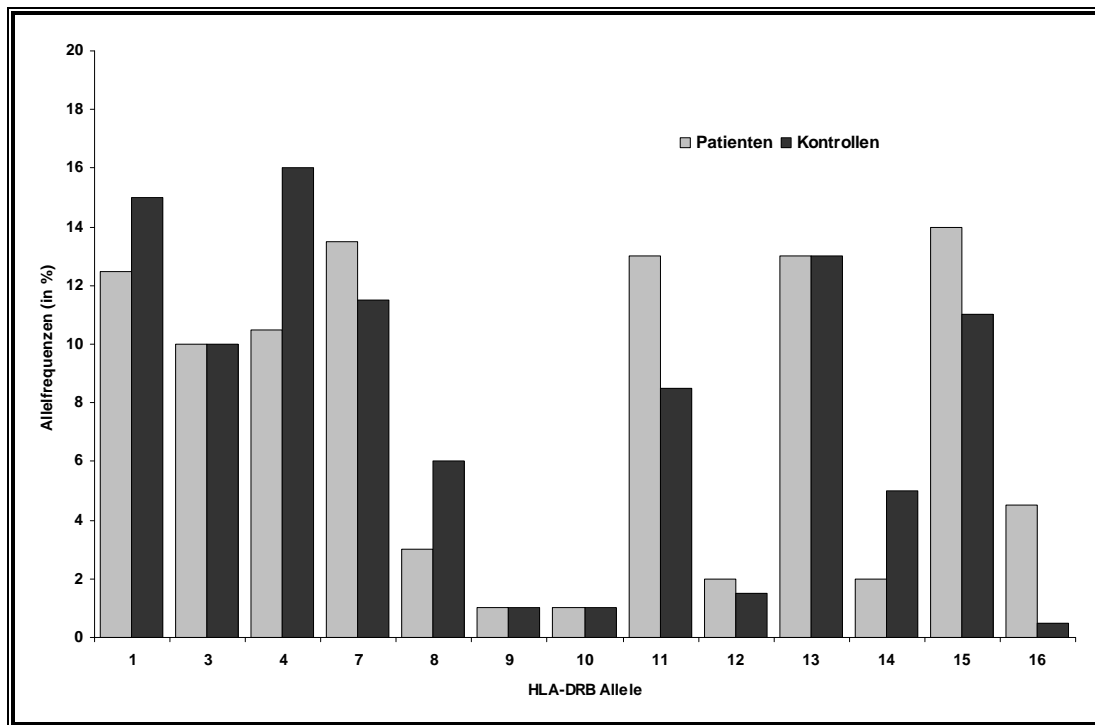


Abbildung 3.13: Verteilung der HLA-DRB Allele bei den F-ITD Patienten und Kontrollen. Auf der x-Achse sind die dreizehn detektierten HLA-Allele abgetragen. Auf der y-Achse dazu die Allelfrequenzen in %. Die grauen Balken entsprechen den Patienten. Die schwarzen Balken entsprechen den Kontrollen.

3.6 Assoziationsstudien zur tardiven Dyskinesie

3.6.1 Der C/A-Polymorphismus in Intron 1 des Cytochrom P450 1A2-Gens

Der C/A-Polymorphismus im ersten Intron des Cytochrom P450 1A2-Gens (CYP1A2) wurde mittels PCR und anschließendem Enzymverdau in der Population aus München untersucht. Das 370bp lange PCR-Fragment wurde durch das Enzym *BspI20I* in zwei Fragmente von je 240bp und 130bp Länge im Falle des C-Allels gespalten (siehe auch Basile et al., 2000). Folgendes Bild zeigt die drei Genotypen nach Gelelektrophorese:

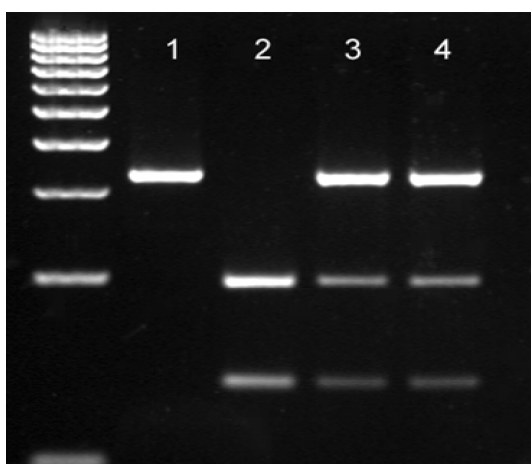


Abbildung 3.14: Genotypen des C/A-Polymorphismus in Intron 1 des CYP1A2-Gens nach Gelelektrophorese. Spur 1 zeigt das 319bp lange unverdaute PCR-Produkt mit dem Wildtypallel (A) in homozygoter Ausprägung. Spur 2 zeigt das homozygot mutierte Allel mit einem C auf beiden Allelen, welches sich nach Restriktionsverdau in zwei Fragmente mit 240bp und 130bp Länge aufspaltete. Spur 3 und 4 zeigen den heterozygoten Genotyp. Neben Spur 1 ist als Längenstandard eine 100bp Leiter abgetarget.

Genotypen	Patienten		Kontrollen		OR (95 % KI) ^a	p-Wert
	n=100	n=100	n=100	n=100		
AA	50	51				
AC	42	38			0,955 (0,612-1,489)	
CC	8	11			0,912 (0,374-2,216)	
AA/AC	92	89				
CC	8	11			0,704 (0,234-2,027)	0,6306 ^c
Allele	n=200		n=200		OR (95 % KI) ^a	p-Wert
A	142 (71,0)	140 (70,0)				
C	58 (29,0)	60 (30,0)			0,953 (0,606-1,499)	0,9146 ^c

^a odds ratio, Konfidenzintervall ^b Cochran-Armitage-Test ^c Fisher-Test

Tabelle 3.16: Genotyp- und Allelfrequenzen des C/A-Polymorphismus im CYP1A2-Gen

Sowohl für die Genotypfrequenzen als auch für die Allelfrequenzen zeigten sich im Vergleich von Patienten zu Kontrollen keine signifikanten Unterschiede. Das 95%-Konfidenzintervall der OR schloss für alle Berechnungen die 1 mit ein und berechnete p-Werte waren $>0,05$. Insbesondere ein gehäuftes Auftreten des Genotyps CC, wie in Zusammenhang mit Tardiver Dyskinesie berichtet (Basile et al., 2000), ließ sich bei den Patienten nicht nachweisen.

3.6.2 Der A118G-Polymorphismus im μ -Opioid-Rezeptorgen

Der A118G-Polymorphismus (Asn40Asp) wurde bei Patienten und Kontrollen der Studienpopulation aus München untersucht. Der Restriktionsverdau des 95bp langen PCR-Fragments mittels der Restriktionsendonuklease *DrdI* führte bei Vorhandensein des G-Allels zu zwei Fragmenten von 73bp und 22bp Länge (siehe auch Bergen et al., 1997). Das folgende Bild zeigt die 3 möglichen Genotypen nach Gelelektrophorese:

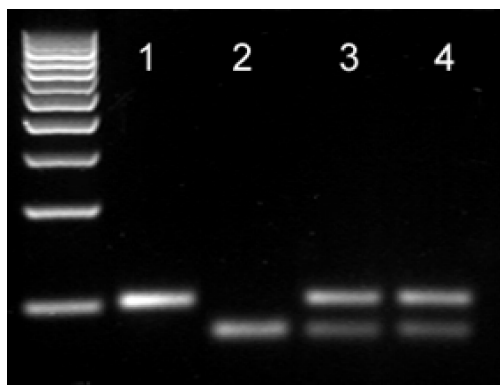


Abbildung 3.15: Genotypen des A118G-Polymorphismus im Gen des μ -Opioid-Rezeptors nach Gelelektrophorese. Spur 1 zeigt das ungeschnittene 95bp lange PCR-Fragment des homozygoten AA-Genotyps. Spur 2 zeigt den GG-Genotyp mit dem 73bp langen Fragment nach Restriktion. Das 22bp lange Fragment ist aufgrund seiner Länge aus dem Gel gelaufen. Spur 3 und Spur 4 zeigen den heterozygoten AG-Genotyp mit dem 95bp und 73bp Fragmenten. Neben Spur 1 ist eine 100bp-Leiter aufgetragen.

Genotypen	Patienten	Kontrollen	OR (95 % KI) ^a	p-Wert
	n=100	n=100		
AA	84	77		
AG	16	20	0,594 (0,288-1,181)	
GG	0	3	0,353 (0,083-1,394)	
Allele	n=200	n=200		
A	184 (92,0)	174 (87,0)		
G	16 (8,0)	26 (13,0)	0,582 (0,282-1,172)	1,000 ^c

^a odds ratio, Konfidenzintervall ^b Cochran-Armitage-Test ^c Fisher-Test

Tabelle 3.17: Genotyp- und Allelfrequenzen des A118G-Polymorphismus im μ -Opioid-Rezeptorgen

In Bezug auf die Verteilung der Genotypen und Allelfrequenzen im Vergleich von Patienten zu Kontrollen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Das 95%-Konfidenzintervall schloss für alle Berechnungen die 1 mit ein bei berechneten p-Werten $>0,05$. Berichtet wurde von einer Assoziation des G-Allels mit Tardiver Dyskinesie (Ohmori et al., 2001), aber diese Assoziation ließ sich bei den Dystoniepatienten nicht nachweisen.

3.6.3 Der -C9T-Polymorphismus der Manganese-Superoxid-Dismutase (MnSOD)

Der C/T-Polymorphismus in der mitochondrialen Targeting-Sequenz (MTS) im Gen der MnSOD wurde bei der Population aus München analysiert. Im Anschluß an die PCR erfolgte die Typisierung der Proben mittels Enzymverdau mit der Restriktionsendonuclease *BsaWI*. Das 172bp PCR-Fragment wurde im Falle des T-Allels in zwei Fragmente mit 85bp und 87bp Länge gespalten (siehe auch Shimoda-Matsubayashi et al., 1996). Das aufgeführte Bild zeigt die möglichen Genotypen nach Gelelektrophorese:

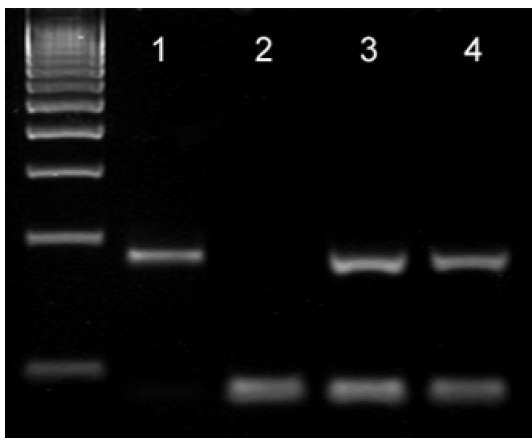


Abbildung 3.16: Genotypen des C/T-Polymorphismus in der MTS des MnSOD-Gens nach Gelelektrophorese. Spur 1 zeigt das ungeschnittene 172bp lange PCR-Fragment des homozygoten C/C-Genotyps. Spur 2 zeigt den TT-Genotyp mit den beiden Fragmenten von 85bp und 87bp Länge. Spur 3 und 4 zeigen den heterozygoten C/T-Genotyp mit den drei Fragmenten von 172bp, 87bp und 85bp Länge. Neben Spur 1 ist eine 100bp Leiter aufgetragen.

Genotypen	Patienten		Kontrollen		OR (95 % KI) ^a	p-Wert
	n=100	n=100	n=100	n=100		
CC	21	26				
CT	51	47			1,125 (0,749-1,695)	
TT	28	27			1,265 (0,560-2,872)	
Allele	n=200		n=200			
C	93 (46,5)	99 (49,0)				
T	107 (53,5)	101 (50,1)			1,128 (0,747-1,702)	0,308 ^c

^a odds ratio, Konfidenzintervall ^b Cochran-Armitage-Test ^c Fisher-Test

Tabelle 3.18: Genotyp- und Allelfrequenzen des C-9T-Polymorphismus im MnSOD-Gen

Weder bei den Genotypfrequenzen noch bei den Allelfrequenzen zeigten sich im Vergleich von Patienten und Kontrollen signifikante Unterschiede. Das 95%-Konfidenzintervall schloss für alle Berechnungen die 1 mit ein, wobei die berechneten p-Werte $>0,05$ waren. Ein gehäuftes Vorkommen des T-Allels, wie bei Tardiver Dyskinesie berichtet (Hori et al., 2000), ließ sich bei den F-ITD Patienten nicht feststellen.

3.6.4 Der A/G-Polymorphismus im Gen des D3-Rezeptors

Der A/G-Polymorphismus im Gen des Dopamin-3-Rezeptors, der zu einem Aminosäureaustausch von Serin durch Glycin an Position 9 der Aminosäuresequenz führt, wurde bei der Population aus München analysiert. Im Anschluß an die PCR erfolgte die Typisierung der Proben mittels Enzymverdau mit der Restriktionsendonuclease *MscI*. Dieses Enzym spaltete das 462bp lange PCR-Fragment im Falle des Glycin-Allels neben zwei konstant vorhandenen Spaltprodukten von 111bp und 47bp in zwei weitere Produkte mit einer Länge von 206bp und 98bp. Im Falle des Serin-Allels zeigte sich nach Restriktionsverdau neben den oben erwähnten zwei konstanten Banden nur eine Bande von 304bp Länge (siehe auch Lannfelt et al., 1992). Das folgende Bild zeigt die möglichen Genotypen nach Gelelektrophorese:

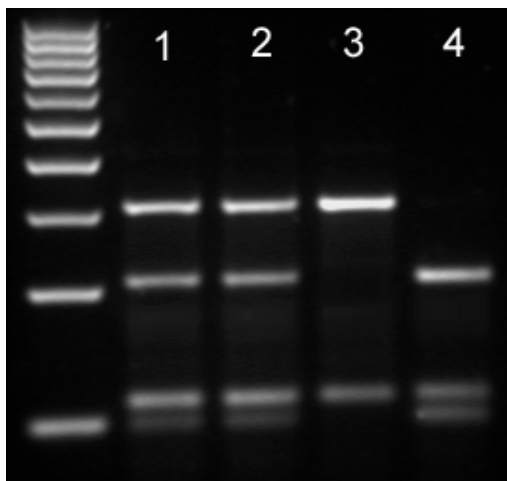


Abbildung 3.17: Genotypen des Ser9Gly-Polymorphismus im DRD3-Gen nach Gelelektrophorese. Spur 1 und 2 zeigen den heterozygoten Ser9Gly-Genotyp mit den Fragmenten von 304bp, 206bp, 98bp und das konstante Fragment von 111bp Länge. Spur 3 zeigt den homozygoten Ser9Ser-Genotyp mit dem ungeschnittenen 304bp-Fragment neben dem konstanten 111bp-Fragment. Spur 4 zeigt den Homozygoten Gly9Gly-Genotyp mit den drei Fragmenten von 206bp, 111bp (konstant) und 98bp Länge. Das 47bp-Fragment ist aufgrund seiner Größe nicht zu sehen. Neben Spur 1 ist eine 100bp Leiter aufgetragen.

Folgende Tabelle zeigt die Verteilungen der Genotyp- und Allelfrequenzen in der Studienpopulation:

Genotypen	Patienten	Kontrollen	OR (95 % KI) ^a	p-Wert
	n=100	n=100		
AA	43	57		
AG	49	32	1,291 (0,827-2,029)	
GG	8	11	1,667 (0,684-4,118)	
Allele	n=200	n=200		
A	135 (67,5)	146 (73,0)		
G	65 (32,5)	54 (27,0)	1,302 (0,828-2,050)	0,137 ^b

^a odds ratio, Konfidenzintervall ^b Fisher-Test

Tabelle 3.19: Genotyp- und Allelfrequenzen des Ser9Gly-Polymorphismus im DRD3-Gen

Der Vergleich der Genotyp- und Allelfrequenzen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Das 95%-Konfidenzintervall der OR schloss für alle Berechnungen die 1 mit ein ($p > 0.05$). Insbesondere ein gehäuftes Vorkommen des Glycin-Allels, wie bei TD-Patienten beobachtet (Steen et al., 1997; Segman et al., 1997; Basile et al., 1999) konnte in der hier durchgeführten Studie bei den Patienten mit F-ITD nicht gefunden werden.

3.6.5 Der C102T-Polymorphismus im 5HT2A-Serotonin-Rezeptorgen

Der C102T-Polymorphismus im Gen des 5HT2A-Rezeptors wurde in der Studienpopulation aus München analysiert. Nach der PCR erfolgte die Analyse der Proben mittels Enzymverdau mit dem Enzym *MspI*. Dieses Enzym spaltete das 342bp lange PCR-Fragment in der Präsenz des C-Allels in Fragmente mit der Länge von 216bp und 126bp (siehe auch Tan et al., 2001) Folgendes Bild zeigt mögliche Genotypen nach Agarose-Gelelektrophese:

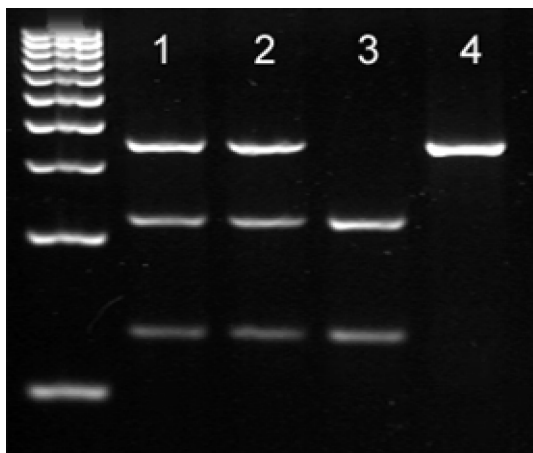


Abbildung 3.18: Genotypen des C102T-Polymorphismus in Exon 1 des 5HT2A-Rezeptorgens. Spur 1 und Spur 2 zeigen den heterozygoten Genotyp mit dem ungeschnittenen 342bp langen Fragment bei Präsenz des T-Allels und den beiden Fragmenten mit 216bp und 126bp Länge nach Restriktion bei Präsenz des C-Allels. Spur 3 zeigt den für das C homozygoten Genotyp. Spur 4 zeigt das ungeschnittene PCR-Fragment bei Vorhandensein des TT-Genotyps. Als Längenstandard ist neben Spur 1 eine 100bp-Leiter aufgetragen.

Folgende Tabelle zeigt die Verteilungen der Genotyp- und Allelfrequenzen in der Studienpopulation:

Genotypen	Patienten		Kontrollen		OR (95 % KI) ^a	p-Wert
	n=100	n=100	n=100	n=100		
TT	10	19				
TC	57	49			1,257 (0,808-1,965)	
CC	33	32			1,579 (0,653-3,862)	
Allele	n=200		n=200			
T	77 (38,5)	87 (43,5)				
C	123 (61,5)	113 (56,5)			1,230 (0,809-1,870)	0,901 ^b

^a odds ratio, Konfidenzintervall ^b Fisher-Test

Tabelle 3.20: Genotyp- und Allelfrequenzen des C102T-Polymorphismus im Serotonin-5HT2A-Rezeptorgen.

Der Vergleich von Patienten und Kontrollen zeigte bei der Verteilung der Genotypen und Allelfrequenzen keine signifikanten Unterschiede. Die berechneten 95%-Konfidenzintervalle der OR schlossen für alle Analysen die 1 mit ein und berechnete p-Werte waren $>0,05$. Insbesondere eine Assoziation des C-Allels, wie bei Tardiver Dyskinesie beschrieben (Tan et al., 2001), konnte bei den Dystoniepatienten in der Studienpopulation nicht nachgewiesen werden. Die Verteilung der Genotypfrequenzen zu den in Kap 3.6.1 - 3.6.5 aufgeführten Polymorphismen lag im HWE.

4 Diskussion

4.1 Allgemeiner Teil

4.1.1 Allgemeine Betrachtung zu genetischen Assoziationsstudien

Im Felde der genetischen Studien ist die Methodik der Allel-Assoziationsstudien sehr weit verbreitet und hat in der Vergangenheit schon für zahlreiche Erkrankungen interessante Ergebnisse gezeigt. So wurde beispielsweise das AB0-Blutgruppensystem kurz nach seiner Entdeckung als Basis für Assoziationsstudien genutzt. Schon vor über 50 Jahren berichteten Aird et al. über eine Häufung des Allels 0 des AB0-Systems mit peptischen Ulzera (Aird et al., 1954). Auch die Entdeckung des HLA-Systems lieferte die Grundlage für zahlreiche Studien zu verschiedensten Erkrankungen. Hier zeigten sich zahlreiche positive Ergebnisse. Als neurologische Erkrankungen sind beispielsweise die Multiple Sklerose und die Narkolepsie zu nennen, für die jeweils Assoziationen zu Allelen des HLA-Locus gefunden wurden (Haines et al., 1998, Mignot, 1998). Durch die komplette Sequenzierung humaner Gene im Rahmen des Humanen Genomprojekts (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) und insbesondere auch durch die Entdeckung unzähliger Polymorphismen bei immer schneller und präziser werdenden genetischen Typisierungsmethoden ist die Anzahl durchgeführter Allel-Assoziationsstudien in den letzten Jahren immer weiter gestiegen. Zahlreiche positive Assoziationen sind publiziert worden, aber ein grundlegendes Problem ist sicherlich, dass sich ein großer Teil dieser Studien nicht replizieren ließ. Als prominentes Beispiel sei hier eine Studie zum Morbus Alzheimer zu nennen: Blacker et al. berichteten über eine Assoziation eines bestimmten Allels des A2M-Gens, welches für das Protein Alpha-2-Macroglobulin kodiert, mit Morbus Alzheimer (Blacker et al., 1998). Im Jahr danach publizierten drei unabhängige Arbeitsgruppen Ergebnisse, die diese Assoziationen nicht bestätigen konnten. Diese kontroversen Ergebnisse machen deutlich, dass man sich bei der Planung und Durchführung von genetischen Assoziationsstudien an festgelegte Richtlinien halten sollte und zeigen sicherlich auch, dass dieser Studientyp im Vergleich zu anderen

Studientypen, wie z.B. der Linkage Analyse neben zahlreichen Vorteilen auch Nachteile hat, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

4.1.2 Probleme und Voraussetzungen bei genetischen Assoziationsstudien

Häufige Probleme genetischer Assoziationsstudien sind ein schlechtes Studiendesign, falsche Annahmen über den möglichen genetischen Hintergrund einer Erkrankung und eine Überinterpretation von ermittelten positiven Ergebnissen. Vor und bei der Durchführung von Studien dieses Typs sollte man sich somit an bestimmte Richtlinien halten, welche in jüngster Zeit immer wieder Gegenstand der Diskussion waren (Bird et al., 2001, Cardon et al., 2001). Idealerweise sollte sich für das untersuchte Gen eine biologische Rolle zur Erkrankung herleiten lassen. Die Polymorphismen sollten zu einer funktionellen Änderung des Proteins führen. Im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien ist ein wichtiger Punkt die Anzahl an untersuchten Proben. Mit steigender Fallzahl sinkt die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art, d.h. ein falsch positives Ergebnis zu bekommen. Ein weiteres Problem zu kleiner Fallzahlen ist sicherlich auch die Tatsache, dass tatsächlich vorhandene Assoziationen maskiert werden. Zur Rekrutierung von Patientenproben ist eine rigorose Festlegung eines Phänotyps mit festgelegten Diagnosekriterien unerlässlich um eine homogene Patientenpopulation zu erhalten. Alle Patienten sollten wirklich die gleiche Erkrankung haben. Die zu den Patienten passenden Kontrollen sollten in Bezug auf Alter, Geschlecht und ethnischer Herkunft den Patienten entsprechen. Ein Hauptproblem im Bereich der Populationsgenetik ist die so genannte Populationsstratifikation. Die untersuchte Population ist hier eigentlich eine Kombination von zwei oder mehr Subpopulationen, die ein unterschiedliches Muster von Allelfrequenzen beinhalten. Auch hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art erhöht. Eine, wenn auch sehr aufwendige Methode diese Stratifikation zu detektieren, ist die Einbeziehung von genetischen Markern – wie z.B. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) – welche mit Sicherheit nicht in einem Linkage Disequilibrium mit der untersuchten Erkrankung stehen. Diese Methode ermöglicht die Detektion der Stratifikation anhand des Musters der Allelfrequenzen dieser Marker, wodurch in Folge eine Korrektur vorgenommen werden kann. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die

Festlegung des Signifikanzniveaus. Es empfiehlt sich $p < 0,05$ oder besser $< 0,01$ zu wählen, um die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Ergebnisse zu verringern. Werden mehrere genetische Marker in einer Population gleichzeitig verglichen, so sollte eine Korrektur des p-Wertes für „multiple comparison“ erfolgen. Das notwendige Signifikanzniveau wird nach der Formel von Bonferroni berechnet: $p < a/n$, wobei a das zunächst festgelegte Signifikanzniveau ist und n die Anzahl untersuchter genetischer Marker. Somit wird deutlich, dass durch eine Erhöhung der Anzahl untersuchter genetischer Marker das Signifikanzniveau steigen muss. Hintergrund dieser Berechnung ist die Überlegung, dass, wenn man nur genug Marker untersucht, irgendwann einer dabei ist, der signifikante Ergebnisse zeigt. Eine weitere und sehr gute Möglichkeit zur Verhinderung des Fehlers 1. Art ist die Verwendung einer zweiten Population zur Bestätigung und Replikation von Ergebnissen. Wie bereits oben erwähnt, konnten viele positive Ergebnisse von Assoziationsstudien zu verschiedensten Erkrankungen nach Replikation in einer zweiten Studienpopulation nicht bestätigt werden. Eine weitere Möglichkeit im Falle positiver Ergebnisse ist auch die Verwendung von nachfolgenden Linkage-Analysen basierend auf Proben, die in Familien rekrutiert wurden, in denen die Erkrankung auftrat. Findet sich eine Assoziation eines genetischen Markers, z.B. eines SNPs auf Ebene der DNA-Sequenz, so sollte sich dieses im Rahmen von Linkage-Studien bestätigen lassen. Die strikte Einhaltung oben aufgeführter Richtlinien (Bird et al., 2001) zu genetischen Assoziationsstudien war zentrale Grundlage der Studienplanung im Rahmen dieser Dissertation: Mit 100 Patienten, die anhand der festgelegten Diagnosekriterien ausgesucht wurden und 100 Kontrollen wurde eine ausreichend hohe Fallzahl für die hier durchgeführten Studien gewählt. Die Kontrollen waren nach Alter, Geschlecht und ethnischem Hintergrund passend zu den Patienten ausgesucht. Bei positiven Ergebnissen wurde in jedem Fall eine Replikation der Daten in einer unabhängigen Studienpopulation versucht. Dieser Ansatz wurde aufgrund höherer Zuverlässigkeit der Korrektur des p-Wertes für „multiple comparison“ (siehe oben) vorgezogen. Bei der Auswahl der untersuchten Kandidatengene wurde grundsätzlich darauf geachtet, dass sie eine plausible funktionelle Bedeutung in der Pathogenese der F-ITD haben könnten (siehe Kap 1.2). Als möglicher Kritikpunkt zu der hier verwendeten Studienpopulation bleibt anzufügen, dass sie Patienten beinhaltete mit insgesamt 4 verschiedenen Phänotypen der F-ITD. Bisher ist es unklar, ob diesen

unterschiedlichen Phänotypen auch Differenzen im genetischen Hintergrund der Pathogenese der Erkrankung zugrunde liegen.

4.1.3 Der Kandidatengenansatz

Als Kandidatengene bezeichnet man jene Gene, die vor dem Hintergrund bereits bekannter Eigenschaften wie Funktion, Lokalisation, Expression oder Struktur als zumindest mögliche Ursache einer Erkrankung in Betracht kommen. Die Auswahl des Kandidatengens X wird somit im Wesentlichen dadurch bestimmt, was vor dem Zeitpunkt über die Erkrankung und die zu untersuchenden Gene bekannt war. In vielen Fällen war dieser Ansatz, die Pathogenese verschiedener Erkrankungen zu klären, erfolgreich. Als Beispiel sei hier aus dem Bereich neurologischer Erkrankungen die autosomal dominant vererbte Form des Morbus Alzheimer zu nennen, bei der Mutationen im Gen des Amyloid-Precursor-Proteins auf Chromosom 21 zu finden sind und für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich gemacht werden (Levy-Lahad und Bird, 1996). Bei der wesentlich häufigeren Form des sporadischen Morbus Alzheimer spielen diese Mutationen aber nach dem bisherigen Stand der Forschung keine Rolle. Die Entdeckung eines Kandidatengens bei einem Kollektiv von Patienten mit der phänotypisch gleichen Erkrankung muß somit nicht die Erklärung für alle Fälle sein, die diese Erkrankung haben. Des Weiteren ist es wichtig zu beachten, dass die bestätigte signifikante Häufung bestimmter Allele eines Gens bei einer Erkrankung nicht den Umkehrschluß zulässt, dass jeder Allelträger auch die Erkrankung entwickelt. Ein Beispiel hierfür ist die Multiple Sklerose, bei der eine Häufung des HLA-DR2 Allels gefunden wurde (Haines et al., 1998). Nicht aber jeder Träger des Allels DR2 erkrankt im Laufe des Lebens an MS. Ein weiterer Punkt, der im Vorfeld der Kandidatengensuche zu einer Erkrankung beachtet werden sollte, ist die Tatsache, dass neben der Möglichkeit, dass ein einzelnes Gen verantwortlich ist, auch mehrere Gene im Zusammenspiel verantwortlich sein könnten. Dieses würde bedeuten, dass jedes einzelne dieser hypothetisch vermuteten Kandidatengene nur einen Teileffekt auf die Entstehung der Erkrankung hätte. Das macht deutlich, dass man bei dem

Kandidatengenansatz die Fallzahl möglichst hoch wählen sollte, um auch die Möglichkeit zu haben, geringere Effekte einzelner Gene sicher zu detektieren.

4.1.4 Zur Wahl der Statistischen Verfahren

Auch unter der Verwendung des gleichen Studiendesigns (Fall-Kontroll-Studie) lassen sich verschiedene statistische Testverfahren anwenden. Dadurch können auf Grundlage des gleichen Datensatzes je nach Wahl des Testverfahrens unterschiedliche Ergebnisse entstehen. Dieses macht deutlich, dass man sich im Rahmen der Studienplanung sehr gut überlegen sollte, welchen Test man benutzt. Häufig verwendet wurde im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen der Cochran-Armitage Trend-Test (Agresti, 1991). Der große Vorteil dieses Tests ist, dass in die Berechnung eines p-Wertes alle drei Genotypen mit einbezogen werden können. Der Test nutzt die gesamte Information über die drei Genotypen und geht von einem linear steigenden Risiko zwischen Genotyp und Risiko für die Entwicklung einer Erkrankung X aus. Auf biochemischer Ebene soll dieses anhand des C667T-Polymorphismus im MTHFR-Gen erläutert werden: Während bei Personen mit dem Genotyp 677CC die Enzymaktivität am höchsten ist, nimmt sie bei Personen mit dem Genotyp 677CT deutlich ab und ist am geringsten bei denen, die Träger des Genotyps 677TT sind (Frosst et al, 1995). Dieses berücksichtigt der Test bei der Berechnung des p-Wertes. Im Vergleich dazu würde in diesem Fall der Chi-Quadrat Test eine wählbare Reduktion der Daten (z.B. dominantes Allel zu rezessivem Allel) erfordern, aber keine Abstufungen ermöglichen. Es wäre in Bezug auf die Berechnungen zur MTHFR lediglich eine Gegenüberstellung der Frequenzen von CC zu CT/TT oder von CC/CT zu TT möglich. Dieses entspräche aber nicht den biochemischen Grundlagen zu der Funktion der MTHFR. Ein Problem bei der Wahl des statistischen Tests liegt allerdings häufig darin, dass im Vorfeld der Untersuchungen nicht für jedes zu untersuchende Gen ein zugrunde liegendes genetisches Modell wie im Fall der MTHFR vorhanden ist. Trotzdem ist es sinnvoll auch dann die Verteilung der Genotypen nach Cochran-Armitage und die Allelfrequenzen in einer Vierfeldertafel nach Fisher zu berechnen. Würde man auch die Genotypen nach Fisher berechnen, müsste man davon ausgehen, dass es keine Rolle

spielt, ob eine Person heterozygoter oder homozygoter Träger einer Mutationen ist. Ein Großteil der Defekte, die sich aber auf biochemischer Stoffwechselebene abspielen, werden rezessiv vererbt und hier ist es ein großer Unterschied, ob man homo- oder heterozygoter Mutationsträger ist.

4.2 Spezieller Teil

4.2.1 Zu den Kupfertransportproteinen ATP7B, ATP7A und ATOX1

4.2.1.1 Die Analyse der P-Typ ATPasen ATP7B und ATP7A

Zum **G2444C-Polymorphismus in Exon 10 des Gens ATP7A**: Da die mit 35% in der hier untersuchten Studienpopulation ermittelte Allelfrequenz vergleichbar ist mit vorausgegangenen Publikationen (Das et al., 1994), wo sie mit 29% beschrieben wurde ($p > 0.05$), ist es unwahrscheinlich, dass dieser Polymorphismus in kausalem Zusammenhang mit der Pathogenese der F-ITD steht. Vielmehr fand sich in der hier untersuchten Patientenpopulation eine Häufigkeit für diesen Polymorphismus, wie man sie auch in einer Normalpopulation erwarten würde. Da sich die Frequenzen sehr ähnelten (35% zu 29%; $p > 0.05$), wurde auf eine Sequenzierung von Kontrollen verzichtet. Selbst wenn man bei der Analyse der Daten eine deutlich höhere Frequenz bei den F-ITD Patienten gefunden hätte, sollte man berücksichtigen, dass die Mutation an Position 2444 zu einem Austausch zweier hydrophober Aminosäuren untereinander (Valin und Leucin) führt. In den meisten Fällen ergibt sich nach dem Austausch von zwei hydrophoben Aminosäuren untereinander keine grundlegend andere Proteinstruktur, die zu einer veränderten Funktion des Proteins führen würde. Somit wäre eine biologische Relevanz im Falle einer Häufung des Polymorphismus fraglich. Anders ist es in den Fällen, wo hydrophobe durch hydrophile Aminosäuren ausgetauscht werden oder umgekehrt. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Sichelzellanämie. Hier wird an Position 6 der β -Kette die hydrophile Aminosäure Glutamat durch Valin ersetzt. Dieses führt zur Produktion eines abnormen Hämoglobins (HbS), welches in deoxygeniertem Zustand präzipitiert und somit zur Störung der

Mikrozirkulation führt. Eine Punktmutation führt in diesem Fall zu einer deutlichen Funktionseinschränkung des Proteins.

Zur G2337A-Mutation in Exon 8 des Gens ATP7B: Es handelt es sich hier um eine nonsense-Mutation, da ein neues Stop-Codon entsteht. Zur richtigen Interpretation dieser Mutation im Rahmen der hier durchgeführten Sequenzanalysen bei insgesamt 100 Patienten ist es wichtig zu wissen, dass die Frequenz für heterozygote Mutationen im ATP7B-Gen in der kaukasischen Bevölkerung bei ca. 1:180 liegt. Die Detektion einer heterozygoten Mutation in diesem Gen bei insgesamt 200 untersuchten Allelen reflektiert somit die erwartete Mutationsfrequenz und spricht nicht für eine Häufung heterozygoter Mutationsträger des ATP7B-Gens in der Population der F-ITD Patienten.

4.2.1.2 Die Analyse der 5' Promotorregion von ATP7A

Da die Sequenz der Promotorregion in allen 13 untersuchten Patienten normal war, legen diese Ergebnisse nahe, dass die beschriebene reduzierte Genexpression der Menkes-mRNA im Gehirn und im peripheren Gewebe (Kruse et al., 2001) ein Epiphänomen ist und nicht als primärer Kausalitätsfaktor für die Pathogenese der Dystonie verantwortlich ist. Exitotoxischer Stress oder unspezifische Degradationsmechanismen der m-RNA könnten Gründe für die Reduktion der Menkes-mRNA sein. Die verminderte Expression könnte somit vermutlich sekundär entstehen aufgrund eines bisher nicht bekannten primären Mechanismus. Überhaupt ist die Expressionsregulation dieses Menkes-Gens bisher nicht umfassend verstanden. Es ist somit nicht auszuschließen, dass Mutationen in anderen codierenden Regionen oder aber auch in intronalen Abschnitten, die eine Rolle bei der Genregulation spielen können, der Grund für die reduzierte Genexpression sind. Auch das phänotypische Erscheinungsbild der idiopathischen Dystonie und des Menkes-Syndroms zeigen kaum Gemeinsamkeiten. Aus diesem Grund und auch aufgrund der Tatsache, dass bei Menkes ein X-chromosomal rezessiver Erbgang besteht, ist es unwahrscheinlich, dass beiden Erkrankungen ähnliche pathogenetische Mechanismen zugrunde liegen. Als Kritikpunkt bleibt anzufügen, dass die 13 hier untersuchten Patienten alle eine positive Familienanamnese für Dystonien zeigten. Grund für die Auswahl speziell dieser Patienten war es, a priori die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, in dem untersuchten

Patientenkollektiv einen genetischen Hintergrund der Erkrankung zu haben. Die Patienten, die in den Studien zuvor nach Störungen im Kupfermetabolismus untersucht wurden (Berg et al., 2000; Kruse et al., 2001), zeigten keine positive Familienanamnese für Dystonien. Verschiedene Pathomechanismen könnten in diesen beiden Gruppen zum Tragen kommen, die zur Manifestation der Dystonie führen. Zukünftig sollte anhand von Linkage Analysen unter Verwendung intronischer oder flankierender Polymorphismen im ATP7A-Gen seine Bedeutung in der Pathogenese der Dystonien weiter untersucht werden. Des Weiteren wird ein zentraler Bestandteil von Folgestudien insbesondere auch die Analyse von Faktoren sein, die mit dem Menkes-Protein interagieren. Mit dem Kupfer-Chaperone-Protein ATOX1 ist ein wichtiger Interaktionsfaktor im Rahmen dieser Arbeit bereits untersucht worden.

4.2.1.3 Die Analyse des Kupfer-Chaperone-Proteins ATOX1

Eine veränderte Struktur des Kupfer-Chaperone-Proteins ATOX1 würde aufgrund seiner funktionellen Bedeutung im Kupfermetabolismus möglicherweise zu einer gestörten Funktion und Interaktion von sowohl ATP7A als auch ATP7B führen. Da aber die Sequenzanalyse der gesamten codierenden Region des Gens ATOX1 keinerlei Alterationen bei den F-ITD Patienten im Vergleich zur Referenzsequenz (D.W.Cox) zeigte, kann ein pathogenetischer Zusammenhang dieses Proteins mit der Genese der F-ITD nahezu ausgeschlossen werden. Auch Splicing-Fehler durch Mutationen in den Splice-Sites, welche die Exone flankieren, sind aufgrund der Tatsache, dass auch hier keine Mutationen gefunden wurden, unwahrscheinlich. Denkbar wären lediglich noch Mutationen in Regionen, die für die Regulation der Genexpression eine Rolle spielen, wie die 5' Promotor-Region oder Intronsequenzen. Für eine herabgesetzte Genexpression gibt es aber bisher bei der F-ITD, ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen bezüglich ATP7A, keine Studienergebnisse, so dass auf eine Analyse dieser Genbereiche verzichtet wurde.

4.2.1.4 Die Bedeutung des Kupfermetabolismus bei F-ITD

Aufgrund der Komplexität dieses Stoffwechselkreises und der großen Zahl an involvierten Enzymen und Carriersystemen konnte im Rahmen der hier durchgeführten

Studien nur ein Ausschnitt analysiert werden. Basierend auf den bisher publizierten Ergebnissen war es notwendig sich auf spezielle Teilbereiche zu spezialisieren. Die Auswahl dieser Teilbereiche basierte zum einen auf den in Kap. 1.2.2.1 genannten Publikationen zum Kupferstoffwechsel bei Dystoniepatienten, und zum anderen auf molekularbiologischen und biochemischen Studien zu den verschiedenen Kupfertransportproteinen. Die durchweg negativen Ergebnisse bei der Sequenzierung verschiedener Kupfer-Gene im Rahmen dieser Arbeit können aber trotzdem eine direkte Beteiligung des Kupfermetabolismus und seiner Enzyme und Carrierproteine an der Pathogenese der F-ITD nicht sicher ausschließen. Defekte in Form von Mutationen oder Dysregulationen im Bereich der Genexpression könnten in anderen hier nicht untersuchten Bereichen der Gene liegen. Während die codierende Region von ATOX1 komplett sequenziert wurde, konnten bei den beiden Genen ATP7A (23 Exone) und ATP7B (20 Exone) aufgrund der Vielzahl an Exonen nur ausgewählte sequenziert werden. Weitere Studien werden sicherlich notwendig sein, um die Relevanz und Zusammenhänge der bei Dystonie beobachteten Störungen des Kupfermetabolismus zu klären. Möglich ist auch eine bisher nicht identifizierte Pathologie außerhalb des Kupferstoffwechsels. So fanden Santamaria et al. bei einer Studie an Ratten, dass es nach intrastriärer Injektion eines neurotoxischen Agens (Quinolinsäure) nach 7 Tagen zu einer Zunahme des Kupfer- und Mangangehaltes im Striatum dieser Tiere kam (Santamaria et al., 1996). Der hohe Kupfer- und Mangangehalt könnte somit die Konsequenz eines neuronalen Zellverlustes sein. Auch bei der F-ITD wäre ein ähnlicher Pathomechanismus denkbar. Ein neuronaler Zellverlust, wie er z.B. durch bisher unbekannte Neurotoxine entstehen könnte, könnte somit sekundär zu einer Erhöhung des Kupfergehaltes im Striatum führen. Dieses wurde von Becker et al. bei F-ITD Patienten berichtet (Becker et al., 1999). Dazu kommen könnte es beispielsweise auch durch die Einwirkung von Umweltfaktoren, die als Neurotoxine fungieren könnten. Patienten, die im Laufe ihres Lebens eine Dystonie entwickeln, könnten diesen Toxinen aus verschiedenen Gründen intensiver ausgesetzt sein. Gerade bei diesen Überlegungen zeigt sich der häufig beobachtete Konflikt bei der Klärung der Ätiologie einer Erkrankung: Wie viel ist genetisch bedingt und wie viel ist umweltbedingt?

4.2.2 Zur Analyse der Polymorphismen im DYT1-Gen/TOR1A

4.2.2.1 Die mögliche Funktion des DYT1-Gens

Die Funktion von TorsinA, dem Genprodukt des DYT1-Gens, ist größtenteils noch ungeklärt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte auf zellulärer Ebene, dass TorsinA Zellen vor oxidativem Stress schützte. Insbesondere die dopaminergen Neurone, denen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Dystonie zukommt (Klein et al., 1999a), sind bedingt durch den Dopaminmetabolismus starkem oxidativem Stress ausgesetzt. Somit könnte man spekulieren, dass bei einem Funktionsverlust dieses Proteins Zellen in erhöhtem Maße dem oxidativem Stress ausgesetzt wären und dieses zur Pathogenese der DYT1-Dystonie beitragen könnte (Kuner et al., 2003). Untersuchungen auf zellulärer Ebene zeigten jüngst, dass das mutierte TorsinA im Sinne einer Umverteilung vom Endoplasmatischen Retikulum in der Kernmembran akkumuliert (Goodchild und Dauer, 2004).

4.2.2.2 Die Analyse des C246T- und G646C-Polymorphismus bei F-ITD Patienten

Bei allen 100 in dieser Studie integrierten F-ITD Patienten war die Testung auf die GAG-Deletion im DYT1-Gen negativ. Sämtliche Fälle waren sporadisch ohne bekannte positive Familienanamnese. Dieses waren wichtige Voraussetzungen für die Analyse des C246T- und des G646C-Polymorphismus bei den F-ITD Patienten. Im Falle positiver Ergebnisse konnte man so im Vorfeld eine kausale Beteiligung anderer Mutationen bzw. der bekannten GAG-Deletion ausschließen.

Beide Polymorphismen sind bisher nur bei Patienten mit generalisierter Dystonie oder bei Patienten mit Early-Onset-Parkinson (EOP) analysiert worden (Chung-on Leung et al., 2001; Ozelius et al., 1997). Eine Analyse dieser Polymorphismen ist bei F-ITD Patienten bisher nicht durchgeführt worden. In der hier untersuchten Studienpopulation von 100 F-ITD Patienten und Kontrollen zeigten sich aber weder bei der isolierten Betrachtung beider Polymorphismen, noch bei der Betrachtung der Haplotypen aus den verschiedenen Kombinationen, Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Damit decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Daten von Bressmann et al.: Auch hier wurde der DYT1-Locus nach Linkage-Analysen von Patienten mit familiärem

Torticollis, einer fokalen Form der Dystonie, als Ursache für die Erkrankung ausgeschlossen (Bressman et al., 1996). Eine genaue Analyse von F-ITD Patienten, wie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, war aus mehreren Gründen trotzdem sinnvoll. In oben genannter Studie sind nur 2 Familien integriert worden. Somit bot die Analyse von 100 Patienten und Kontrollen deutlich mehr Möglichkeiten. Auch leichte additive Effekte dieser Polymorphismen zur Pathogenese der F-ITD wären hier eher zu erkennen gewesen. Ein weiterer Punkt ist die Tatsache, dass Linkage-Analysen ungenau sind und eine Analyse von Haplotypen nicht ermöglichen. Linkage-Analysen können nur Aussagen über einen genetischen Locus treffen. Eine hypothetische Häufung spezieller Haplotypen bei F-ITD Patienten würde mit Linkage-Analysen nicht detektiert werden. Haplotypenanalysen von Kandidatengenomen bieten den Vorteil höherer Zuverlässigkeit im Falle positiver Ergebnisse bei Assoziationsstudien. Sie sind eine probate und aussagekräftige Methode um in Bezug auf einen genetischen Marker zwischen Kontrollen und Patienten zu diskriminieren. Nur in seltenen Fällen entsteht eine Erkrankung aufgrund einer einzigen Mutation im Bereich des Gens (z.B. Sichelzellanämie). Viel wahrscheinlicher ist es, dass eine Kombination von „Single-nucleotide-polymorphisms“ (SNP) zur Entstehung einer Erkrankung beiträgt. Diesen Kombinationsansatz berücksichtigt man, wenn man z.B. basierend auf zwei SNPs Haplotypen bildet. Ein Nachteil ist es, dass durch Bildung von Haplotypen nur ein limitierter Bereich des Gens untersucht werden kann. Im Falle eines kompletten Linkage Disequilibriums zwischen zwei Bereichen eines Gens muß die Information, die durch Haplotypen, gebildet aus einer Region des Gens, nicht prädiktiv für die andere Region sein.

4.2.3 Zur Bedeutung des Homocysteinmetabolismus bei Dystonien

4.2.3.1 Die Dystonien und Störungen des Homocysteinstoffwechsels

Dystonien sind ein bekanntes Phänomen bei der Homocysteinurie und die Studie von Mueller et al. zeigte als bisher einzige Studie, die gezielt Patienten mit F-ITD untersuchte, dass bei diesen Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöhte Homocysteinspiegel im Blut gefunden wurden (Mueller et al., 2000). Bisher wurden

keine Studien publiziert, die diese Daten in anderen Populationen replizieren konnten. Somit ist eine kritische Betrachtung des Studienaufbaus zur Interpretation der hier gewonnenen Ergebnisse unerlässlich. Es finden sich bei der Betrachtung der Studie von Mueller et al. einige Punkte, die mögliche Erklärungen für falsch-positive Ergebnisse sein könnten. Zum einen ist die Fallzahl mit 24 Patienten sehr niedrig. Höhere Fallzahlen könnten hier zu einer Sicherung positiver Ergebnisse beitragen. Zum anderen wird nicht erwähnt, aus welchem Kollektiv die Kontrollen rekrutiert wurden. Wären hierunter beispielsweise auch Patienten mit anderen Bewegungsstörungen oder neurologischen Erkrankungen eingeschlossen, so könnte dieses zu einem Selektionsfehler (selection-bias) führen. Ein weiterer Punkt, der von Mueller et al. explizit angesprochen wurde, ist die Tatsache, dass weder die untersuchten 24 Patienten noch die Kontrollen auf anerkannt genetisch bestimmte angeborene Gründe für eine Hyperhomocysteinämie untersucht wurden, wie beispielsweise der auch im Rahmen dieser Arbeit untersuchte C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen. Als letzter Kritikpunkt sei anzumerken, dass lediglich eine Messung des Basis-Homocysteinspiegels durchgeführt wurde und eine postprandiale Messung eines Homocysteinspiegels nicht aufgezeichnet wurde. Dass die Messung beider Parameter zu durchaus unterschiedlichen Ergebnissen führen kann, zeigt die Studie von Lievers und Mitarbeitern: Lediglich beim Homocysteinspiegel nach Belastung zeigten sich hier signifikante Daten, nicht jedoch beim Homocysteinspiegel im nüchternen Zustand (Lievers et al., 2001).

Weitere biochemische Studien mit differenzierter Messung von Basis-Homocysteinspiegel und Post-Load-Homocysteinspiegel unter Einbeziehung größerer Fallzahlen werden notwendig sein um die Relevanz der bisher berichteten Ergebnisse zu klären.

4.2.3.2 Mögliche Pathomechanismen erhöhter Homocysteinspiegel bei Dystonien

Deutlich erhöhte Homocysteinspiegel charakterisieren die sich in der Kindheit manifestierende Erkrankung der Homocysteinurie. Der hier vorhandene Defekt im CBS-Gen wird autosomal rezessiv vererbt. Leicht erhöhte Spiegel finden sich häufig bei Erwachsenen und gelten als ein vaskulärer Risikofaktor für die Entstehung cerebraler

Ischämien. Postuliert wird die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion, welche zu einer Atherosklerose führt (Chambers et al., 1998). Wie auch schon in den Fallberichten von Berardelli et al. und Kempster et al. postuliert, wäre es denkbar, dass aus bisher nicht bekannten Gründen eine zumindest teilselektive Schädigung striataler Gefäße resultiert, welche zu einer Dysfunktion der Basalganglien führen könnte. Dieses wiederum könnte der Grund für die Entstehung einer Dystonie sein. Störungen im Energiemetabolismus durch atherosklerotische Veränderungen könnten zu einem neuronalen Zellverlust mit nachfolgender Gliose führen. Für ausgeprägte Formen der generalisierten Dystonien ist exakt diese Gliose schon in der Literatur beschrieben worden (Gibb et al., 1992). Dieses wäre ein denkbarer Pathomechanismus für die Entstehung von Dystonien auf Grundlage erhöhter Homocysteinspiegel. Zusätzlich zu den negativen vaskulären Effekten einer Hyperhomocysteinämie sind auch neurotoxische und exitotoxische Effekte beschrieben worden (Parsons et al., 1998). Eine Studie zeigte, dass Homocystein als Agonist an der Glutamat-Domäne des NMDA-Rezeptors exitotoxische Effekte zeigen kann (Lipton et al., 1997). Zellverlust im Bereich der Basalganglien bedingt durch diese Neurotoxizität und erhöhte excitatorische Projektionen aus den Basalganglien zum Motorcortex bedingt durch exitotoxische Effekte des Homocysteins wären mögliche Erklärungen für die Entstehung von Dystonien. Diese Hypothese würde auch indirekt durch die Tatsache unterstützt werden, dass Mueller et al. in ihrer Studie von einer positiven Korrelation zwischen der Schwere der Dystonie und dem Homocysteinspiegel berichteten. Zur Erhärtung dieser Hypothese wären Studien wünschenswert, die den Ansatz verfolgen, zum einen den Homocysteinspiegel bei Patienten mit F-ITD zu messen und zum anderen mit hochauflösenden bildgebenden Verfahren wie MRT oder SPECT mögliche Läsionen im Bereich der Basalganglien aufzudecken und hier eventuelle Korrelationen zu zeigen.

4.2.3.3 Vergleich der Resultate in den beiden Studienpopulationen

Sowohl für die 68bp-Insertion als auch für das 31bp-VNTR im CBS-Gen fanden sich positive Ergebnisse bei F-ITD Patienten in der initial untersuchten deutschen Studienpopulation. Für beide Polymorphismen ist beschrieben worden, dass sie zu einer

Erhöhung des Homocysteinspiegels führen können. Die Daten der zuerst untersuchten Population ließen zunächst eine positive Assoziation mit Polymorphismen im CBS-Gen und F-ITD vermuten. Das gehäufte Vorkommen dieser Polymorphismen bei den deutschen F-ITD Patienten, die nach Studienlage zu einer Erhöhung des Homocysteinspiegels führen können (Lievers et al., 2001; De Franchis et al., 2000) wäre somit auch eine mögliche Erklärung für die Daten von Mueller und Mitarbeitern (Mueller et al, 1998). Der Versuch der Replikation der Ergebnisse in einer zweiten unabhängigen Population ist jedoch nicht gelungen. Während in der deutschen Population eine signifikante Häufung der 68bp Insertion gefunden wurde ($p=0.015$), konnten diese Daten in der französischen Population nicht bestätigt werden ($p=0.314$), obwohl nach durchgeführter Power Calculation, die Power zur Detektion der positiven Daten der deutschen Population für die Studie der französischen Population bei 86.9% gelegen hätte (Signifikanzniveau=5%). Wie bereits in Kap. 3.3.2 erwähnt, war die Situation für das 31bp-VNTR ähnlich ($p=0.006$ in der deutschen Population; $p=0.545$ in der französischen Population). Auch hier gelang eine Replikation der Ergebnisse nicht. Eine mögliche Beteiligung des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen und des A2756G-Polymorphismus im MS-Gen konnte schon initial in der deutschen Population ausgeschlossen werden. Die hier erhobenen Daten verdeutlichen eindrucksvoll die Wichtigkeit, dass man im Rahmen von genetischen Assoziationsstudien den Ansatz verfolgen sollte, initial positive Ergebnisse in weiteren unabhängigen Studienpopulationen zu bestätigen. Als Alternative wäre eine Korrektur der p-Werte nach der Bonferroni-Formel möglich gewesen. Zumindest für das 31bp-VNTR hätte sich bei einem initialen p-Wert von 0.006 auch nach Korrektur ein signifikantes Ergebnis gezeigt. Man sollte somit trotz vielversprechender p-Werte bis zur Replikation der Daten skeptisch bleiben. Die Daten zum CBS-Gen dieser Studie erfüllen somit nicht das wichtige Kriterium der Replikabilität (Bird et al. 2001). Wichtig zu erwähnen ist es aber, dass die hier untersuchten Polymorphismen im CBS-Gen aufgrund der widersprüchlichen Datenlage nicht entgültig als Suszeptibilitätsfaktoren für die F-ITD ausgeschlossen werden können.

4.2.4 Zum (CA)_n-Repeat im Dopamin-D5-Rezeptor

4.2.4.1 Die Datenlage zum (CA)_n-Repeat

Die Analyse der Allelfrequenzen des (CA)_n-Repeats im DRD5-Gen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit F-ITD und Kontrollen. Somit konnten die bisher publizierten Ergebnisse (Placzek et al., 2001; Misbahuddin et al., 2002), welche das Allel 2 dieses Repeats als Suszeptibilitätsfaktor für Dystonie erklärten und das Allel 6 als protektives Allel herausstellten, nicht bestätigt werden. Es ist in diesem Zusammenhang wichtig zu erwähnen, dass die berichtete Assoziation des Allels 2 mit Cervicaler Dystonie nach einer Korrektur für „multiple comparison“ kein signifikantes Niveau mehr erreichte. In genetischen Assoziationsstudien, welche auf einer einzigen Studienpopulation aufbauen, ist es unerlässlich diese Korrektur für „multiple Comparison“ vorzunehmen, da sonst die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Resultate sehr groß ist und mit der Anzahl an untersuchten genetischen Markern kontinuierlich ansteigt. Des Weiteren ist zu beachten, dass der protektive Effekt des Allels 6 nur in der zuerst durchgeführten Studie an Patienten mit Cervicaler Dystonie gezeigt werden konnte (Placzek et al., 2001), aber in der von der gleichen Arbeitsgruppe durchgeführten Folgestudie bei Patienten mit Blepharospasmus nicht bestätigt werden konnte (Misbahuddin et al., 2002). Auch die dritte Studie zur Rolle des (CA)_n-Repeats bei Dystonien (Brancati et al., 2003) konnte die Assoziation mit dem Allel 2 bei F-ITD und den protektiven Effekt des Allels 6 nicht bestätigen, sondern zeigte stattdessen eine Häufung anderer Allele (Allel 4 bei CD, $p=0.01$; Allel 10 bei Kontrollen, $p=0.06$). Ob hier eine Korrektur für multiple Comparison vorgenommen wurde, bleibt unklar.

4.2.4.2 Analyse der Studien zum (CA)_n-Repeat

Zu den hier erhobenen Daten wurde eine Powerkalkulation durchgeführt, um zu berechnen, wie die Wahrscheinlichkeiten sind, die bisher beschriebenen Assoziationen bestimmter Allele mit F-ITD in der hier verwendeten Population zu replizieren, wenn tatsächlich Unterschiede vorhanden wären. Diese Kalkulation liefert eine Aussage darüber, ob die Fallzahl der untersuchten Population eventuell zu klein ist um einen

Effekt zu detektieren. Die Power zur Detektion der bisher beschriebenen Effekte bei einem Signifikanzniveau von 5% betrug 79.4% für Allel 2 und 95.2% für Allel 6. Die Wahrscheinlichkeit für eine Replikation der Ergebnisse im Falle einer tatsächlichen Häufung spezifischer Allele bei Patienten oder Kontrollen war somit sehr hoch. Da jedoch die Resultate in der hier untersuchten Population negativ waren, führte dieses zu der Überlegung die Kontrollpopulation der beiden oben aufgeführten Studien (Misbahuddin et al., 2002; Placzek et al., 2001) mit den Allelfrequenzen der Kontrollen dieser Studie (Sibbing et al., 2003) und zusätzlich zwei externen Kontrollpopulationen (Sherrington et al., 1993; Barr et al., 2000) zu vergleichen. Folgendes Diagramm zeigt den Vergleich der Allelfrequenzen der Allele 2 und 6 in den Kontrollgruppen der verschiedenen Populationen:

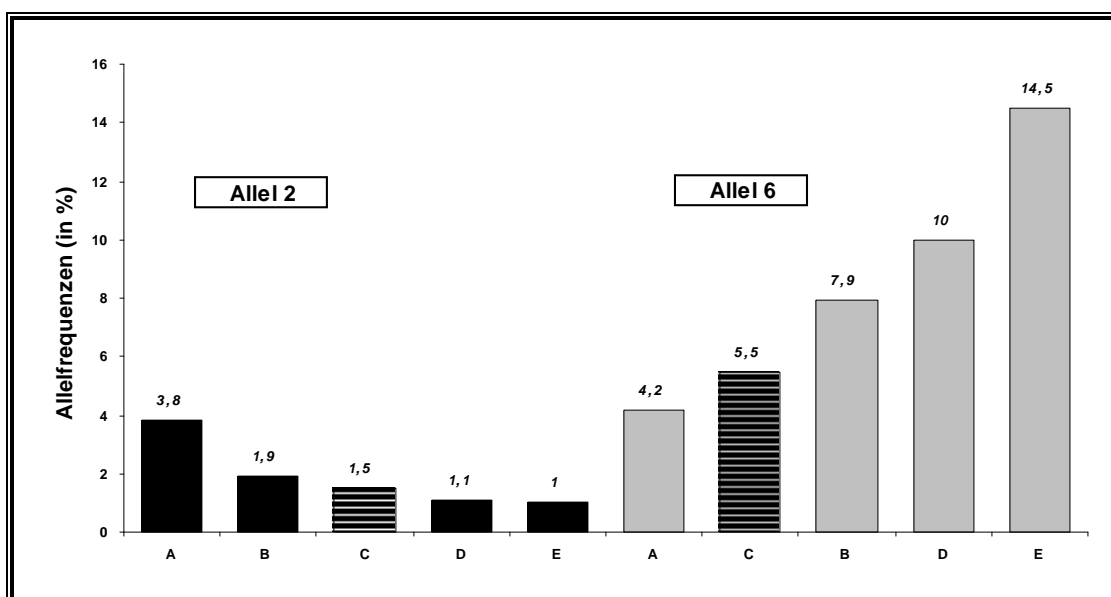


Abbildung 4.1: Die Frequenz der Allele 2 und 6 im des (CA)_n-Repeats im DRD5-Gen in verschiedenen Kontrollpopulationen. Die Studienpopulationen sind wie folgt beschriftet: A= Sherrington et al. (Referenzpopulation 1, n=120), B=Barr et al. (Referenzpopulation 2, n=172), C (schraffiert)= in dieser Studie untersuchte Kontrollpopulation, D=Misbahuddin et al. (Studie, die eine Assoziation des Allels 2 with F-ITD zeigte), E=Placzek et al. (Studie, die einen protektiven Effekt des Allels 6 berichtete)

Bei Betrachtung des Diagramms fällt auf, dass die Frequenz des Allels 2 in den zwei Studien (D und E im Diagramm), die über eine positive Assoziation dieses Allels mit F-ITD berichten, sehr viel kleiner ist als die Frequenz in den externen Kontrollpopulationen, in denen große Fallzahlen untersucht wurden (siehe Legende zu Abb. 4.1). Der Grund für die berichtete Häufung des Allels 2 bei F-ITD Patienten in den

Studien D und E könnte somit durch das überdurchschnittlich seltene Vorkommen dieses Allels bei den Kontrollen der Populationen bedingt sein. Auch die Häufigkeit des Allels 6, welches ja in der Studie von Placzek et al. (E im Diagramm) signifikant häufiger bei den Kontrollen auftrat als bei den Patienten mit Cervicaler Dystonie, liegt deutlich über den Häufigkeiten der Allelfrequenz dieses Allels in den Referenzpopulationen. Das Diagramm zeigt des Weiteren auch, dass die Allelfrequenzen für die Allele 2 und 6 in der hier untersuchten Population (C im Diagramm) im Bereich der Frequenzen in den Referenzpopulationen liegen.

Abschließend stellt sich die Frage, welche Gründe es für diese widersprüchlichen Resultate geben könnte. Bei diesen Überlegungen ist es wichtig zu beachten, dass das $(CA)_n$ -Repeat im DRD5-Gen außerhalb der kodierenden Region am 5'-Ende des Gens lokalisiert ist und somit eine funktionelle Rolle dieses Polymorphismus derzeit hypothetisch ist. Denkbar wäre bei dieser Lokalisation eine Beeinflussung der Promotorregion des Gens, da allgemein Promotorregionen bei Genen am 5'-Ende lokalisiert sind. Wenn aber der Polymorphismus selber keine funktionelle Bedeutung hat, so könnte er dennoch in einem Linkage-Disequilibrium (LD) mit einem bisher nicht bekannten funktionellen Element im DRD5-Gen stehen oder aber mit anderen in der Nähe lokalisierten Genen. Theoretisch wäre es unter Betrachtung der Daten von Brancati et al. und Placzek et al. denkbar, dass abhängig vom genetischen Hintergrund der untersuchten Patienten mit CD (Brancati et al. = italienische Population; Placzek et al. = englische Population) dieses bisher nicht bekannte funktionelle Element im DRD5-Gen je nach Population im LD mit verschiedenen Allelen des $(CA)_n$ -Repeats steht (Brancati et al. = Allel 4; Placzek et al. = Allel 2). Da aber bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Population (deutsche Population) keine der Assoziationen der Allele des $(CA)_n$ -Repeats mit F-ITD bestätigt werden konnte, müssen insbesondere auch unter Berücksichtigung der Analyse der Kontrollpopulationen (siehe Abb. 4.2) die positiven Ergebnisse zu Allelen des Repeats in Frage gestellt werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass keines der Allele sich in allen vier durchgeführten Studien (Brancati et al., 2003; Misbahuddin et al., 2002; Placzek et al., 2001; Sibbing et al., 2003) als Suszeptibilitätsfaktor für die Entstehung von Dystonien herausstellte. Lediglich zum Allel 2 fanden sich in 2 Studien positive Ergebnisse (Misbahuddin et al.,

2002; Placzek et al., 2001), welche aber in den 2 Folgestudien nicht bestätigt werden konnten (Brancati et al., 2003; Sibbing et al., 2003).

4.2.5 Zur Analyse des HLA-DRB-Locus

4.2.5.1 Die Bedeutung und Funktion des HLA-Locus

Die Hauptfunktion des HLA-Locus und seiner beiden Klassen I und II ist die Präsentation von Peptiden (Antigenen) zu T-Zellen. Dieser Mechanismus initiiert die Immunantwort und somit kommt dem HLA-System eine Schlüsselrolle bei den immunologischen Abwehrmechanismen zu (Klein und Sato, 2000a). Hierin begründet liegt auch die Tatsache, dass Dysregulationen dieser Antigenpräsentation Autoimmunität induzieren können. Für viele Autoimmunerkrankungen ist das auslösende Moment bisher unbekannt. Häufig wird aber, wie auch bei der Multiplen Sklerose, eine Infektion mit einem nicht identifizierbaren Agens (z.B. ein Virus) postuliert (Evans et al., 1996). In diesem Zusammenhang wird auch vom so genannten „Molekularen Mimicry“ gesprochen (Albert und Inman, 1999). Das infektiöse Agens X, welches in den Körper eines Individuums gelangt, besitzt antigene Strukturen, die große Ähnlichkeiten mit eigenen Antigenen des Individuums haben. Jedoch unterscheiden sich die extrinsischen Antigene von den eigenen dadurch, dass sie in der Lage sind eine Immunantwort zu induzieren. Dadurch wird dann nicht nur der Eindringling bekämpft, sondern auch das Individuum selbst. Bei der Multiplen Sklerose ist der Angriffspunkt das basische Myelinprotein im ZNS, welches durch Antikörper zerstört wird. Die vermuteten Autoantigene und assoziierten HLA-Marker sind spezifisch für die jeweilige Erkrankung und folgende Tabelle soll eine Auswahl dieser Autoimmunerkrankungen zeigen:

Erkrankung	Assoziierter HLA-Marker	Autoantigen	Relatives Risiko für Erkrankung
Multiple Sklerose	DR2	bas. Myelinprotein	4.1
Myasthenia gravis	DR3	Acetylcholin-rezeptor	2.5
	B8		3.4
Diabetes mellitus Typ I	DR3	GAD65	3.3
	DR4	"	6.4
Goodpasture Syndrom	DR2	Basalmembran	15.9
Morbus Basdow	DR3	Thyreotropinrezeptor	3.7
Spondylarthropathien	B27	HLA-B27	87.4 (!)

Tabelle 4.1 (nach Klein et al., 2000b; Albert und Inman, 1999): Autoimmunerkrankungen und assoziierte HLA-Marker: Die Tabelle zeigt der Erkrankung zugeordnet die HLA-Marker und die angenommenen Autoantigene. Das relative Risiko gibt die Frequenz der Erkrankung bei Personen mit dem HLA-Marker an, verglichen mit Personen ohne den Marker. Eine positive Assoziation bedeutet ein relatives Risiko >1.0.

4.2.5.2 Die Methodik der PCR-SSO-Typisierungstechnik

Während die klassischen serologischen HLA-Klasse-II-Typisierungen eine Fehlerrate von bis zu 25% aufweisen, kann durch Typisierungen auf DNA-Sequenzebene eine viel präzisere und schnellere Typisierung durchgeführt werden. Die PCR-SSO- Technik ist von allen Techniken am besten standardisiert und eignet sich deswegen sehr gut für die Typisierung großer Populationen. Die definitive und exakte Typisierung eines Allels ist nur durch die komplette Sequenzierung der DNA möglich. Somit ist diese Methodik zu aufwendig und eignet sich eher zur Typisierung von Spender und Empfänger bei Knochenmarktransplantationen. Überhaupt wäre eine komplette Sequenzierung von Teilen des HLA-Locus erst dann sinnvoll, wenn auf Basis von SSO-Typisierungen konkrete Assoziationen von Allelen gefunden worden wären. Aus diesen Gründen wurde hier, nicht zuletzt auch aufgrund der zu untersuchenden Fallzahl (n=200), die PCR-SSO-Typisierungstechnik verwendet.

4.2.5.3 Testung des Hardy-Weinberg Equilibriums

Die in der Kontrollpopulation beobachteten Abweichungen vom Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) bei den Genotypen 01/04 und 07/13 sind ein durchaus häufig beobachtetes Phänomen bei HLA-Klasse II Studien. Chen et al. untersuchten in 26 unabhängigen Populationen die Loci DRB1, DQA1, DQB1 und DPB1 auf Abweichungen vom HWE. Für den DRB1-Locus bleibt als Ergebnis dieser Studie festzuhalten, dass die Genotypenverteilung in nur 73% der Fälle im HWE lag. Dieser Locus war aufgrund seiner ausgeprägten Polymorphie der Locus mit dem größten Anteil an Abweichungen (Chen et al., 1999). Erklärungen für diese Abweichungen sind vielfältig. Zum einen kann es sich immer um einen Fehler 1. Art, oder aber auch um evolutionäre Selektionsmechanismen handeln. Zum anderen kommen aber natürlich auch Typisierungsfehler in Frage, deren Wahrscheinlichkeit aber durch standardisierte Typisierungsverfahren sehr gering ist. Gegen Typisierungsfehler in der hier untersuchten Population spricht die Tatsache, dass die absoluten Allelfrequenzen der HLA-DRB Allele sehr nahe bei denen aus größeren untersuchten Populationen lagen (Hurley et al., 1997).

4.2.5.4 Ergebnisse der Typisierung

Eine Assoziation von Allelen des HLA-DRB Locus mit F-ITD konnte in der hier untersuchten Studienpopulation nicht gefunden werden. Bisher publizierte Ergebnisse zur Häufung des Allels DR3 bei F-ITD (Korein et al., 1981) und Häufung des Allels DR13 bei einer seltenen Unterform der Dystonie, der multifokalen oder generalisierten Torsionsdystonie mit komplexem regionalem Schmerzsyndrom (Hilten et al., 2000), konnten im Rahmen der Analyse dieser, im Vergleich zu den Vorstudien deutlich größeren Studienpopulation, nicht bestätigt werden. Problematisch waren sicherlich bei den Vorstudien die kleinen Fallzahlen. So untersuchten Hilten et al. lediglich 26 Patienten und Korein et al. integrierten nur 13 Patienten bei der Analyse des HLA-DR Locus. Während Korein et al. bei der Analyse der 13 Patienten eine Assoziation zum DR3-Allel fanden, konnten sie selber diese Ergebnisse bei einer Linkage Analyse die

bei 9 Familien mit einem aufgrund der Stammbäume vermutlich autosomal rezessiv vererbten generalisierten dystonen Syndrom nicht bestätigen.

Die hier vorgelegten negativen Ergebnisse zu einer möglichen Assoziation des HLA-DRB Locus und F-ITD stimmen somit mit den Daten einer Studie von Bressman et al. überein, in der Linkage-Analysen für zahlreiche Loci bei einer autosomal rezessiv vererbten Form einer sich im Kindesalter manifestierenden generalisierten Dystonie durchgeführt wurden (Bressman et al., 1984). In dieser Studie wurde ein Linkage zum HLA-Locus für diese Form der Dystonie ausgeschlossen. Auch die Ergebnisse der Studien, die Autoantikörper bei Dystonie untersuchten, sind widersprüchlich. In einer kürzlich publizierten Studie bei Patienten mit primärem Blepharospasmus konnten keine Anti-Basalganglien-Antikörper gefunden werden (Ramachandran et al., 2002). Trotz allem lässt sich aber nicht ausschließen, dass ein anderer, bisher nicht identifizierter autoimmuner Faktor eine Rolle bei der Entstehung der F-ITD spielen könnte. Das HLA-System ist nur eine, wenn auch wichtige Komponente des Immunsystems, wobei wiederum der hier untersuchte HLA-DRB-Locus nur ein Teil dessen ist. Insgesamt ist der genaue Pathomechanismus bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten in Verbindung mit spezifischen HLA-Markern noch nicht geklärt. Die Assoziationen zeigen bei verschiedenen Erkrankungen durchaus unterschiedliche Stärke und für viele Erkrankungen wurden zusätzlich andere, häufig wichtigere Gene, die zur Entstehung beitragen, identifiziert.

4.2.6 Zur Analyse der Polymorphismen bei Tardiven Dyskinesien

4.2.6.1 TD und F-ITD: Gleiche oder getrennte genetische Suszeptibilitätsfaktoren?

Die fünf im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen in den Genen des μ -OR, MnSOD, DRD3, 5HT2A und CYP1A2, die in verschiedenen Studien (siehe Kap. 1.2.7.1) als mögliche Suszeptibilitätsfaktoren für Tardive Dyskinesien diskutiert wurden, zeigten keine Assoziation zur F-ITD in der hier untersuchten Population. Bei der Frage nach gleichen oder getrennten genetischen Suszeptibilitätsfaktoren für TD und F-ITD deuten diese Ergebnisse eher auf letzteres hin.

Eine einzige weitere Studie testete die Möglichkeit gleicher genetischer Risikofaktoren von idiopathischen Torsionsdystonien und sekundären Dystonien, wie sie auch als Tardive Dystonien nach Neuroleptikatherapie auftreten. Bei insgesamt 40 untersuchten Patienten mit vermuteter sekundärer Dystonie fand sich bei 39 von ihnen kein Anhalt für eine Assoziation mit dem DYT1 assoziierten Haplotyp bei Ashkenazi Juden (Bressman et al., 1998).

4.2.6.2 Die Frage der funktionellen Relevanz der untersuchten Polymorphismen

Im Vorfeld der Analyse von Polymorphismen in ausgesuchten Kandidatengenomen sollte man sich die Frage stellen, inwieweit die untersuchten Genvarianten von funktioneller Relevanz sein könnten: Die Datenlage zu den Polymorphismen in den Genen des μ -OR, MnSOD, DRD3, 5HT2A und CYP1A2 ist im Folgenden dargestellt:

- a) **CYP1A2:** Das Cytochrom P450 Enzym spielt eine entscheidende Rolle bei der Metabolisierung verschiedener Medikamente und Neurotoxine wie z.B. auch Methylphenyltetrahydropyridin (MPTP) (Coleman et al., 1996). Eine biochemische Studie zeigte, dass der A/A-Genotyp des C/A-Polymorphismus mit erhöhter Induzierbarkeit des CYP1A2-Enzyms assoziiert war (Sachse et al., 1999). Da bei Patienten mit TD der C/C-Genotyp gehäuft vorkam (Basile et al., 2000), würde dieses in die Hypothese passen, dass eine reduzierte Enzymaktivität zur Manifestation der TD disponiert. Auch bei der F-ITD wäre es somit denkbar, dass im Falle langsamer Metabolisierung von Neurotoxinen die Vulnerabilität zur Entstehung der Erkrankung erhöht würde und es somit unter der Einwirkung von Umweltfaktoren, die als Neurotoxine wirken, zum Ausbruch der Erkrankung kommt. Experimentell ist dieser Zusammenhang zwischen der Exposition zu MPTP und der Entstehung einer Dystonie bereits beschrieben (Perlmutter et al., 1997a).
- b) **5HT2A:** Bei dem T102C-Polymorphismus handelt es sich um eine so genannte stille Mutation (englisch="silent mutation"), welche nicht zu einem Aminosäureaustausch führt. Eine funktionelle Relevanz ist somit fraglich. Denkbar wäre es aber, dass dieser Polymorphismus im 5HT2A-Gen in einem Linkage Disequilibrium steht mit anderen funktionellen Elementen des Gens

- oder anderer benachbarter Gene. Als einer der Serotoninrezeptoren wäre es denkbar, dass es durch Alterationen dieses Rezeptors zu Störungen des Serotoninstoffwechsels kommt, welche dann zur Entstehung einer Dystonie führen könnten. Es ist beschrieben, dass selektive Serotoninwiederaufnahmemhemmer (SSRI) Bewegungsstörungen wie z.B. auch Dystonien induzieren können (Gerber et al., 1998).
- c) **μ-OR:** Opiate und Alkohol sind in der Lage via μ-OR das dopaminerge System im ZNS zu stimulieren (Di Chiara et al., 1998). Eine Studie zeigte, dass der A118G-Polymorphismus die Bindungseigenschaften des Rezeptors für β-Endorphine ändert und somit je nach Genotyp unterschiedliche Aktivitäten zeigte (Bond et al., 1998). Denkbar wäre somit eine je nach Genotyp des μ-OR unterschiedliche Aktivierung des dopaminergen Systems, dem ja in der Entstehung der Dystonien eine zentrale Rolle zukommt.
- d) **DRD3:** Funktionelle Studien zum Ser9Gly-Polymorphismus zeigten, dass nach Einführung und Expression von cDNA der 3 möglichen Genotypen in CHO-Zellen die Rezeptorbindungsaffinität für Dopamin für den Gly9Gly-Genotyp signifikant erhöht war (Lundstrom et al., 1996). Dieser Genotyp fand sich auch gehäuft bei den TD-Patienten (Basile et al., 1999). Somit wäre auch durch Polymorphismen im DRD3-Gen eine Beeinflussung des dopaminergen Systems ähnlich wie beim μ-OR denkbar, welches zur Entstehung von Dystonien prädisponieren könnte.
- e) **MnSOD:** Die MnSOD spielt als Detoxifikationsenzym eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung freier Radikale. Eine Studie zur funktionellen Relevanz dieses Ala-9Val-Polymorphismus in der MTS des MnSOD-Gens zeigte, dass die -9Val-Variante mit gestörten intrazellulären Translokationsvorgängen des Enzyms verbunden ist und somit zu Änderungen der Enzymaktivität in Mitochondrien führt (Shimoda-Matsubayashi et al., 1997). Denkbar wäre somit eine durch den Polymorphismus verursachte Funktionseinschränkung des Enzyms mit Ansammlung freier Radikale. Als Neurotoxine könnten diese über eine Strukturschädigung oder Verlust von Neuronen zur Entwicklung einer Dystonie beitragen.

4.2.6.3 Die Problematik positiver Ergebnisse bei Assoziationsstudien zu TD

Zu einem Großteil der analysierten Polymorphismen bei TD, für welche sich im Rahmen der initialen Studien eine positive Assoziation zeigte, gibt es in Folgestudien, die diese Ergebnisse aufgriffen, um sie in unabhängigen Studienpopulation zu replizieren, durchaus widersprüchliche Resultate (Ohmori et al., 2003):

Als Beispiel sei hier zunächst der Ser9Gly Polymorphismus im DRD3-Gen zu nennen. Neben den in Kap. 1.2.7.1 aufgeführten positiven Resultaten mehrerer Studien waren andere Studien nicht in der Lage diese Ergebnisse zu replizieren (Inada et al., 1997; Lovlie et al., 2000). Des Weiteren berichteten Schulze et al. über negative Resultate in Bezug auf den Polymorphismus im CYP1A2-Gen (Schulze et al., 2001), Basile et al. gelang es nicht die positive Assoziation des Polymorphismus im 5HT2A-Gen zu replizieren (Basile et al., 2001) und die negativen Resultate von Zhang et al. zum Polymorphismus im MnSOD-Gen stehen im Widerspruch zu den positiven Daten von Hori et al. (Zhang et al., 2002; Hori et al., 2000).

Diese Datenlage und die sich häufig widersprechenden Ergebnisse zahlreicher Assoziationsstudien zu Tardiven Dyskinesien zeigen eindrucksvoll die Problematik, die dieser Studientyp mit sich bringt. Die methodischen Ansätze, falsch positive Resultate zu verhindern, wurden in zahlreichen Richtlinien und Reviews publiziert (Bird et al., 2001; Cardon et al., 2001) und bereits in Kap. 4.1.2 diskutiert. Trotzdem sind falsch-positive Ergebnisse in genetischen Assoziationsstudien häufig (Ioannidis, 2003). Betrachtet man nun den methodischen Aufbau der Studien zu TD, so fällt auf, dass in keiner dieser Studien im Falle positiver Ergebnisse in einer Studienpopulation A eine weitere Studienpopulation B untersucht wurde um die Daten zu bestätigen oder aber in Frage zu stellen. Dieses leisteten erst die Folgestudien anderer Arbeitsgruppen. Auch Linkage-Analysen als weitere Möglichkeit der Differenzierung und Erhärtung positiver Resultate sind nicht durchgeführt worden. Die Interpretation der Daten bleibt somit schwierig und aufgrund der momentanen publizierten sich häufig widersprechenden Ergebnisse ist eine abschließende Beurteilung zu den einzelnen untersuchten Polymorphismen bei TD nicht möglich. Da aber sowohl für die Tardiven Dyskinesien als auch für die F-ITD ein genetischer Hintergrund sehr wahrscheinlich ist (Yassa und Ananth, 1981; Kiriakakis et al., 1998; Waddy et al., 1991), sollte es das Ziel folgender

molekulargenetischer Untersuchungen zu beiden Erkrankungen sein, genetische Risikofaktoren sicher zu identifizieren. Dieses würde zum einen die Möglichkeit bieten das Verständnis für beide Erkrankungen zu verbessern und zum anderen weitere Optionen bieten, die Frage nach möglichen gleichen oder getrennten genetischen Suszeptibilitätsfaktoren zu klären. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt ist auch die Frage, ob hinter den heterogenen Phänotypen der Dystonie (Torticollis, Blepharospasmus, Schreibkrampf) auch eine heterogener Genotyp steht.

4.3 Schlussbetrachtung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Beteiligung verschiedenster Kandidatengene an der Pathogenese der F-ITD untersucht. Basierend auf dem bisherigen Wissen über die Pathogenese der F-ITD, war diesen Kandidatengenen gemeinsam, dass sie im Falle einer gestörten Funktion zumindest als kontributives Element zur Entstehung der Krankheit beitragen könnten. Unter Gesamtschau sämtlicher Daten fanden sich jedoch keine sicheren und replizierbaren Anhaltspunkte für eine Beteiligung dieser untersuchten Gene an der Entstehung der F-ITD, wobei insbesondere in Bezug auf die Analyse des CBS-Gens im Rahmen der Untersuchungen zum Homocysteinestoffwechsel und in Bezug auf die Analyse zum (CA)_n-Repeat Polymorphismus im DRD5-Gen die Datenlage widersprüchlich ist (Brancati et al., 2003; Misbahuddin et al., 2002; Placzek et al., 2001; Sibbing et al., 2003). Weitere Studien mit großen Populationen werden notwendig sein, diese Widersprüche zu klären und mögliche andere Kandidatengene zu identifizieren. Wie wichtig es ist, die Pathogenese und die genetischen Hintergründe zur F-ITD zu klären, zeigt eindrucksvoll der Stand der Forschung bei der DYT1-Dystonie (G-ITD). Wie bereits in Kap. 1.2.2 erläutert, ist hier eine GAG-Deletion in Exon 5 im DYT1-Gen auf Chromosom 9q34 für die Erkrankung verantwortlich. Mittlerweile ist es in vitro gelungen, in COS7-Zellen unter Verwendung der si-RNA Technologie das mutierte Allel mit der Deletion selektiv zu inhibieren, ohne dabei die Expression des physiologischen Allels merklich zu reduzieren (Gonzalez-Alegre et al., 2003). Gelingt dieses zukünftig auch in vivo, so

hätte man die Möglichkeit einer selektiven Therapie einer bisher nicht heilbaren Erkrankung. Würde es auch bei der F-ITD gelingen Kandidatengene zu identifizieren, würde sich hierdurch zumindest der Ansatz zur Entwicklung möglicher neuer Therapieoptionen ergeben. Die Anhaltspunkte, die bei der Entstehung der F-ITD für einen genetischen Hintergrund sprechen, sind groß genug, um weiterhin den Versuch zu unternehmen Kandidatengene bei der F-ITD zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Bei der fokalen idiopathischen Torsionsdystonie (F-ITD) handelt es sich um die häufigste Form der Dystonien, wobei die Ätiologie dieser Erkrankung bisher nicht geklärt ist. Es fanden sich in klinisch-genetischen Studien Anhaltspunkte dafür, dass genetische Faktoren in der Pathogenese eine Rolle spielen. Eine Identifikation spezieller Gene ist aber bisher nicht gelungen. Basierend auf dem bisherigen Wissen über die Pathogenese der F-ITD, wurden im Rahmen dieser Arbeit Kandidatengene analysiert um einen möglichen Zusammenhang zwischen ihnen und der F-ITD zu untersuchen. Studien berichteten über einen gestörten Kupfermetabolismus bei Patienten mit Dystonie, ohne aber dieses Phänomen ätiologisch klären zu können. In dieser Arbeit wurden mit dem Menkes-Gen, dem Wilson-Gen und dem ATOX1-Gen Gene des Kupfermetabolismus analysiert. Auch über gestörte autoimmune Mechanismen bei Patienten mit F-ITD ist mehrfach berichtet worden und genetische Studien zeigten eine Assoziation von Allelen des HLA-DRB Locus mit Dystonien. Es erfolgte eine HLA-DRB Typisierung, um zu untersuchen, ob spezielle Allele des HLA-DRB Locus eine Assoziation zur F-ITD zeigen. Berichtet wurde auch über phänotypische Ähnlichkeiten zwischen tardiven Dyskinesien (TD) und Dystonien, wobei im Gegensatz zur F-ITD bei der TD genetische Suszeptibilitätsfaktoren bekannt sind. Unter der Hypothese, dass sich die phänotypischen Gemeinsamkeiten auch auf genetischer Ebene widerspiegeln, wurden die für die TD bekannten Suszeptibilitätsfaktoren untersucht: Dieses sind Polymorphismen im μ -Opioid Rezeptor, der Manganesuperoxid-dismutase, im Dopamin-3-Rezeptor, im 5HT_{2A}-Serotonin-Rezeptor und im Gen der CYP1A2. Grundlage weiterer Analysen waren die Daten verschiedener Studien, die einen Zusammenhang zwischen Dystonien und Störungen im Homocysteinmetabolismus zeigten. Analysiert wurden hier im Speziellen funktionelle Polymorphismen in der Cystathionin- β -Synthase (CBS), in der Methylen-tetrahydrofolatreduktase (MTHFR) und in der Methioninsynthetase (MS), wobei es sich hier um Gene handelt, deren Enzyme Bestandteile des Homocysteinmetabolismus darstellen. Des Weiteren wurden zwei Polymorphismen im DYT1-Gen analysiert mit der Frage, ob sie gehäuft bei Patienten mit F-ITD zu finden sind. Grundlage für die Analyse eines Polymorphismus

im Dopamin-D5-Rezeptor (DRD5) war zum einen, dass Studien über Assoziationen von Allelen dieses Polymorphismus mit F-ITD berichteten und zum anderen, dass es Anhaltspunkte für eine Beteiligung des dopaminergen Systems in der Pathogenese der Dystonien gibt. Die Analyse der Kupfertransportproteine ergab keine Anhaltspunkte für eine direkte Beteiligung der untersuchten Gene an der Pathogenese der F-ITD. Auch die Analyse des HLA-DRB Locus zeigte keine signifikanten Assoziationen bestimmter Allele mit der F-ITD. Die Suszeptibilitätsfaktoren der tardiven Dyskinesien zeigten keine Assoziation zur F-ITD. Bei der Analyse der Polymorphismen in Genen des Homocysteinestoffwechsels zeigte sich, neben negativen Daten zur MTHFR und MS, in der initial untersuchten deutschen Population eine Assoziation des 31bp-VNTR und der 63bp-Insertion des CBS-Gens mit der F-ITD. Diese Daten konnten jedoch in der französischen Population nicht bestätigt werden. Die Verteilung der Polymorphismen im DYT1-Gen verfehlte im Vergleich von Patienten zu Kontrollen knapp statistisch signifikante Werte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Analyse des Dopamin-D5-Rezeptors konnten die positiven Daten aus anderen Studien nicht bestätigen. Eine Beteiligung der hier untersuchten Kandidatengene an der Pathogenese der F-ITD wird durch die Daten dieser Arbeit nicht unterstützt. Zu den Ergebnissen der Analyse des CBS-Gens lässt sich festhalten, dass sie nicht das wichtige Kriterium der Replikabilität erfüllen, so dass weitere Studien in anderen Populationen notwendig sein werden. Auch die Bedeutung des Polymorphismus im DRD5-Gen kann nach den negativen Daten dieser Arbeit, die im Widerspruch zu positiven Ergebnissen anderer Studien stehen, nicht abschließend beurteilt werden. Weitere Studien mit großen Studienpopulationen werden notwendig sein, diesen Widerspruch zu klären und auch andere mögliche Kandidatengene bzw. Suszeptibilitätsfaktoren zur F-ITD zu identifizieren. Dieses könnte dann die Grundlage für einen möglichen therapeutischen Ansatz sein, ganz ähnlich wie es bei der DYT1-Dystonie in vitro mit Erfolg bereits praktiziert wurde.

6 Literaturverzeichnis

Agresti A. *Categorical Data Analysis*. Wiley 1991, New York.

Aird I, Bentall HH, Mehigan JA, Roberts JA. The blood groups in relation to peptic ulceration and carcinoma of colon, rectum, breast, and bronchus; an association between the ABO groups and peptic ulceration. *BMJ* 1954;4883:315-321.

Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. *N Eng J Med* 1999;341:2068-2074.

Almasy L, Bressman SB, Raymond D, Kramer PL, Greene PE, Heiman GA, Ford B, Yount J, de Leon D, Chouinard S, Saunders-Pullman R, Brin MF, Kapoor RP, Jones AC, Shen H, Fahn S, Risch NJ, Nygaard TG. Idiopathic torsion dystonia linked to chromosome 8 in two Mennonite families. *Ann Neurol* 1997;42:670-673.

Asmus F, Zimprich A, Naumann M, Berg D, Bertram M, Ceballos-Baumann A, Pruszk-Seel R, Kabus C, Dichgans M, Fuchs S, Muller-Myhsok B, Gasser T. Inherited myoclonus-dystonia syndrome: narrowing the 7q21-q31 locus in German families. *Ann Neurol* 2001;49:121-124.

Augood SJ, Keller-McGandy CE, Siriani A, Hewett J, Ramesh V, Sapp E, DiFiglia M, Breakefield XO, Standaert DG. Distribution and ultrastructural localization of torsinA immunoreactivity in the human brain. *Brain Res* 2003;986:12-21.

Barr CL, Wigg KG, Feng Y, Zai G, Malone M, Roberts W, Schachar R, Tannock R, Kennedy JL. Attention deficit hyperactivity disorder and the gene for the dopamine D5 receptor. *Mol Psychiatry* 2000;5:548-551.

Basile VS, Masellis M, Badri F, Paterson AD, Meltzer HY, Lieberman JA, Potkin SG, Macciardi F, Kennedy JL. Association of the MscI polymorphism of the dopamine D3 receptor gene with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:17-27.

Basile VS, Ozdemir V, Masellis M, Meltzer HY, Lieberman JA, Potkin SG, Macciardi FM, Petronis A, Kennedy JL. Lack of association between serotonin-2A receptor gene (HTR2A) polymorphisms and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001;6:230-234.

Basile VS, Ozdemir V, Masellis M, Walker ML, Meltzer HY, Lieberman JA, Potkin SG, Alva G, Kalow W, Macciardi FM, Kennedy JL. A functional polymorphism of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene: association with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2000;5:410-417.

Becker G, Berg D, Rausch W-D, Lange HKW, Riederer P, Reiners K. Increased tissue copper and manganese content in primary adult-onset dystonia. *Ann Neurol* 1999;46:260-263.

Beischlag TV, Marchese A, Meador-Woodruff JH, Damask SP, O'Dowd BF, Tyndale RF, van Tol HH, Seeman P, Niznik HB. The human dopamine D5 receptor gene: cloning and characterization of the 5'-flanking and promoter region. *Biochemistry* 1995;34:5960-5970.

Berardelli A, Thompson PD, Zaccagnini M, Giardini O, D'Eufemia P, Massoud R, Manfredi M. Two sisters with generalized dystonia associated with homocystinuria. *Mov Disord* 1991;2:163-165.

Berg D, Weishaupt A, Francis MJ, Miura N, Yang XL, Goodyer ID, Naumann M, Koltzenburg M, Reiners K, Becker G. Changes of copper-transporting proteins and ceruloplasmin in the lentiform nuclei in primary adult-onset dystonia. *Ann Neurol* 2000;47:827-830.

Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, Long JC, Virkkunen M, Linnolia M, Goldman D. μ opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 1997;2:490-494.

Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. Genetic association studies – genes in search of diseases. *Neurology* 2001;57:1153-1154.

Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B Jr, Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 1998;19:357-360.

Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, Gong J, Schluger J, Strong JA, Leal SM, Tischfield JA, Kreek MJ, Yu L. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters β -endorphin binding and activity: Possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:9608-9613.

Brancati F, Valente EM, Castori M, Vanacore N, Sessa M, Galardi G, Berardelli A, Bentivoglio AR, Defazio G, Girlanda P, Abbruzzese G, Albanese A, Dallapiccola B, and the Italian Movement Disorders Study Group. Role of the dopamine D5 receptor (DRD5) as a susceptibility gene for cervical dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003 ;74: 665-666.

Brassat D, Camuzat A, Vidailhet M, Feki I, Jedynak P, Klap P, Agid Y, Durr A, Brice A. Frequency of the DYT1 mutation in primary torsion dystonia without family history. *Arch Neurol* 2000;57:333-335.

Bressman SB, de Leon D, Brin MF, Risch N, Burke RE, Greene PE, Shale H, Fahn S. Idiopathic dystonia among Ashkenazi Jews: evidence for autosomal dominant inheritance. *Ann Neurol* 1989;26:612-620.

Bressman SB, de Leon D, Kramer PL, Ozelius LJ, Brin MF, Greene PE, Fahn S, Breakefield XO, Risch NJ. Dystonia in Ashkenazi Jews: clinical characterization of a founder mutation. *Ann Neurol*. 1994;36:771-777.

Bressman SB, de Leon D, Raymond D, Greene PE, Brin MF, Fahn S, Ozelius LJ, Breakefield XO, Kramer PL, Risch NJ. The role of the DYT1 gene in secondary dystonia. *Adv Neurol* 1998;78:107-115.

Bressman SB, Fahn S, Falk C, Allen FH, Suciú-Foca N. Genetic linkage analysis in primary torsion dystonia. *Neurology* 1984;34:1490-1493.

Bressman SB, Sabatti C, Raymond D, de Leon D, Klein C, Kramer PL, Brin MF, Fahn S, Breakefield X, Ozelius LJ, Risch NJ. The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology* 2000;54:1746-1752.

Bressman SB, Warner TT, Almasy L, Uitti RJ, Greene PE, Heiman GA, Raymond D, Ford B, de Leon D, Fahn S, Kramer PL, Risch NJ, Maraganore DM, Nygaard TG, Harding AE. Exclusion of the DYT1 locus in familial torticollis. *Ann Neurol* 1996;40:681-684.

Brewer GJ. Wilson's disease: A clinician's guide to recognition, diagnosis and management. Boston 2001: Kluwer Academic Publishers.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001;2:91-99.

Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Kooner JS. Acute hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction. *Lancet* 1998;351:36-37.

Chen JJ, Hollenbach JA, Trachtenberg EA, Just JJ, Carrington M, Ronningen KS, Begovich A, King MC, McWeeney S, Mack SJ, Erlich HA, Thomson G. Hardy-Weinberg testing for HLA class II (DRB1, DQA1, DQB1, and DPB1) loci in 26 human ethnic groups. *Tissue Antigens* 1999;54:533-542.

Chung-on Leung J, Klein C, Friedman J, Vieregge P, Jacobs H, Doheny D, Kamm C, DeLeon D, Pramstaller PP, Penney JB, Eisengart M, Jankovic J, Gasser T, Bressman SB, Corey DP, Kramer P, Brin MF, Ozelius LJ, Breakefield XO. Novel mutation in the TOR1A (DYT1) gene in atypical, early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. *Neurogenetics* 2001;3:133-143.

Claypool DW, Duane DD, Ilstrup DM, Melton LJ. Epidemiology and outcome of cervical dystonia (spasmodic torticollis) in Rochester, Minnesota. *Mov Disord* 1995;10:608-614.

Coleman T, Ellis SW, Martin IJ, Lennard MS, Tucker GT. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is N-demethylated by cytochromes P450 2D6, 1A2 and 3A4--implications for susceptibility to Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;277:685-690.

Das S, Levinson B, Whitney S, Vulpe C, Packman S, Gitschier J. Diverse mutations in patients with Menkes disease often lead to exon skipping. *Am J Hum Genet* 1994;55:883-889.

Davous P, Rondot P. Homocystinuria and dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983;46:283-286.

De Franchis R, Fermo I, Mazzola G, Sebastio G, Di Minno G, Coppola A, Andria G, D'Angelo A. Contribution of the cystathionine beta-synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost* 2000;84: 576-582.

De Stefano V, Dekou V, Nicaud J, Chasse JF, London J, Stansbie D, Humphries SE, Gudnason V. Linkage disequilibrium at the cystathionine β synthase (CBS) locus and the association between genetic variation at the CBS locus and plasma levels of homocysteine. *Ann Hum Genet* 1998;62:481-490.

Di Chiara G, Tanda G, Cadoni C, Acquas E, Bassareo V, Carboni E. Homologies and differences in the action of drugs of abuse and a conventional reinforcer (food) on dopamine transmission: an interpretative framework of the mechanism of drug dependence. *Adv Pharmacol* 1998;42:983-987.

Duane DD, Clark M, Gottlob L. Elevated autoimmune antibody titres in cervical dystonia versus controls. *Neurology* 1995;45:A456.

Epidemiological Study of Dystonia in Europe (ESDE) Collaborative Group. A prevalence study of primary dystonia in eight European countries. *J Neurol* 2000;247:787-792.

Epidemiological Study of Dystonia in Europe (ESDE) Collaborative Group. Sex-related influences on the frequency and age of onset of primary dystonia. *Neurology* 1999;53:1871-1873.

Evans CF, Horwitz MS, Hobbs MV, Oldstone MB. Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* 1996;184:2371-2378.

Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995;12:921-927.

Fahn S, Marsden CD, Calne D. Classification and investigation of dystonia. In: C. Marsden and S. Fahn (eds) 1987: *Movement Disorders 2*. London, Butterworth. 332-358.

Farrer M, Maraganore DM, Lockhart P, Singleton A, Lesnick TG, de Andrade M, West A, de Silva R, Hardy J, Hernandez D. alpha-Synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2001;10:1847-1851.

Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-237.

Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*, 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons, 1981.

Francis MJ, Jones EE, Levy ER, Ponnambalam S, Chelly J, Monaco AP. A Golgi localization signal identified in the Menkes recombinant protein. *Hum Mol Genet* 1998;7:1245-1252.

Francis MJ, Jones EE, Levy ER, Martin RL, Ponnambalam S, Monaco AP. Identification of a di-leucine motif within the C terminus domain of the Menkes disease protein that mediates endocytosis from the plasma membrane. *Journal Of Cell Science* 1999;112:1721-1732.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.

Furukawa Y, Lang A, Trugman J, Bird TD, Hunter A, Sadeh M, Tagawa T, St George-Hyslop PH, Guttman M, Morris LW, Hornykiewicz O, Shimadzu M, Kish SJ. Gender-related penetrance and de-novo GTP-cyclohydrolase I gene mutations in dopa responsive dystonia. *Neurology* 1998;50:1015-1020.

Gerber PE, Lynd LD. Selective serotonin-reuptake inhibitor-induced movement disorders. *Ann Pharmacother* 1998;32:692-698.

Gibb WR, Kilford L, Marsden CD. Severe generalised dystonia associated with a mosaic pattern of striatal gliosis. *Mov Disord* 1992;7:217-223.

Gonzalez-Alegre P, Miller VM, Davidson BL, Paulson HL. Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA. *Ann Neurol* 2003;53:781-787.

Goodchild RE, Dauer WT. Mislocalization to the nuclear envelope: an effect of the dystonia-causing torsinA mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:847-852.

Grandy DK, Allen LJ, Zhang Y, Magenis RE, Civelli O. Chromosomal localization of three human D5 dopamine receptor genes. *Genomics* 1992;13:968-973.

Gu YH, Kodama H, Murata Y, Mochizuki D, Yanagawa Y, Ushijima H, Shiba T, Lee CC. ATP7A gene mutations in 16 patients with Menkes disease and a patient with occipital horn syndrome. *Am J Med Genet* 2001;99:217-222.

Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, Oksenberg JR, Lincoln R, Zhang DY, Banatao DR, Goodkin DE, Hauser SL. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet* 1998;7:1229-1234.

Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, Young IS, Peng K, Shane B, Evans AE, Whitehead AS. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol* 1999;17:298-309.

Hewett J, Gonzalo-Agosti C, Slater D, Ziefer P, Li S, Bergeron D, Jacoby DJ, Ozelius LJ, Ramesh V, Breakefield XO. Mutant torsinA, responsible for early-onset torsion dystonia, forms membrane inclusions in cultured cells. *Hum Mol Genet* 2000;9:1403-1413.

Hilten JJ van, Beek WJT van de, Roep BO. Multifocal or generalized tonic dystonia of complex regional pain syndrome: a distinct entity associated with HLA-DR13. *Ann Neurol* 2000;48:113-116.

Hori H, Ohmori O, Shinkai T, Kojima H, Okano C, Suzuki T, Nakamura J. Manganese superoxid dismutase gene polymorphisms and schizophrenia: relation to tardive dyskinesia. *Neuropsychopharmacology* 2000;23:170-177.

Hurley CK, Schreuder GM, Marsh SG, Lau M, Middleton D, Noreen H. The search for HLA-matched donors: a summary of HLA-A*, -B*, -DRB1/3/4/5* alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -DR antigens. *Tissue Antigens* 1997;50:401-418.

Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, Nomura Y, Endo K, Tanaka H, Tsuji S, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet* 1994;8:236-242.

Ichinose H, Suzuki T, Inagaki H, Ohye T, Nagatsu T. DOPA-responsive dystonia. From causative gene to molecular mechanism. *Adv Neurol* 2001;86:173-176.

Inada T, Dobashi I, Sugita T, Inagaki A, Kitao Y, Matsuda G, et al. Search for susceptibility locus to tardive dyskinesia. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 1997;12:35-39.

International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.

Ioannidis JPA. Genetic associations: false or true? *TRENDS Mol Med* 2003;9:135-138.

Jankovic J, Ford J. Blepharospasm and orofacial-cervical dystonia: Clinical and pharmacological findings in 100 patients. *Ann Neurol* 1983;13:402-411.

Jankovic J, Leder S, Warner D, Schwartz K. Cervical dystonia: clinical findings and associated movement disorders. *Neurology* 1991;41:1088-1091.

Jankovic J, Patten BM. Blepharospasm and autoimmune diseases. *Mov Disord* 1987;2:159-163.

Karamohamed S, DeStefano AL, Wilk JB, Shoemaker CM, Golbe LI, Mark MH, Lazzarini AM, Suchowersky O, Labelle N, Guttman M, Currie LJ, Wooten GF, Stacy M, Saint-Hilaire M, Feldman RG, Sullivan KM, Xu G, Watts R, Growdon J, Lew M, Waters C, Vieregge P, Pramstaller PP, Klein C, Racette BA, Perlmutter JS, Parsian A, Singer C, Montgomery E, Baker K, Gusella JF, Fink SJ, Myers RH, Herbert A. A haplotype at the PARK3 locus influences onset age for Parkinson's disease: The GenePD study. *Neurology* 2003;61:1557-1561.

Kempster PA, Brenton DP, Gale AN, Stern GM. Dystonia in homocystinuria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:859-862.

Kiriakakis V, Bhatia KP, Quinn NP, Marsden CD. The natural history of tardive dystonia. A long-term follow-up study of 107 cases. *Brain* 1998;121:2053-2066.

Klein C, Brin MF, Kramer P, Sena-Esteves M, de Leon D, Doheny D, Bressman S, Fahn S, Breakefield XO, Ozelius LJ. Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *Proc Natl Acad Sci* 1999a;96:5173-5176.

Klein C, Ozelius LJ, Hagenah J, Breakefield XO, Risch NJ, Vieregge P. Search for a founder mutation in idiopathic focal dystonia from Northern Germany. *Am J Hum Genet* 1998;63:1777-1782.

Klein C, Page CE, LeWitt P, Gordon MF, de Leon D, Awaad Y, Breakefield XO, Brin MF, Ozelius LJ. Genetic analysis of three patients with an 18p- syndrome and dystonia. *Neurology* 1999b;52:649-651.

Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000a;343:702-709.

Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000b;343:782-786.

Korein J, Willoughby E, Pollack MS, Levidow L, Dupont B. Human leukocyte antigen in torticollis and other idiopathic dystonic syndromes. *Ann Neurol* 1981;10:573-575.

Kramer PL, de Leon D, Ozelius L, Risch N, Bressman SB, Brin MF, Schuback DE, Burke RE, Kwiatkowski DJ, Shale H, et al. Dystonia gene in Ashkenazi Jewish population is located on chromosome 9q32-34. *Ann Neurol* 1990;27:114-120.

Kruse N, Berg D, Francis MJ, Breakefield XO, Brin MF, Ozelius LJ. Reduction of Menkes mRNA and copper in leukocytes of patients with primary adult-onset dystonia. *Ann Neurol* 2001;49: 405-408.

Kumar R, Maraganore DM, Ahlskog JE, Rodriguez M. Treatment of putative immune-mediated and idiopathic cervical dystonia with intravenous methylprednisolone. *Neurology* 1997;48:732-735.

Kuner R, Teismann P, Trutzel A, Naim J, Richter A, Schmidt N, von Ahsen O, Bach A, Ferger B, Schneider A. TorsinA protects against oxidative stress in COS-1 and PC12 cells. *Neurosci Lett* 2003;350:153-156.

Lannfelt L, Sokoloff, Martres MP, Pilon C, Giros B, Jonsson E, Sedvall G, Schwartz JC. Amino acid substitution in the dopamine D3 receptor as a useful polymorphism for investigating psychiatric disorders. *Psychiatr Genet* 1992;2:249-256.

Larin D, Mekios C, Das K, Ross B, Yang AS, Gilliam TC. Characterization of the Interaction between the Wilson and Menkes Disease Proteins and the Cytoplasmic Copper Chaperone, HAH1p *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274:28497-28504.

Leube B, Hendgen T, Kessler KR, Knapp M, Benecke R, Auburger G. Sporadic focal dystonia in Northwest Germany: Molecular basis on chromosome 18p. *Ann Neurol* 1997;42:111-114.

Leube B, Kessler KR, Ferbert A, Ebke M, Schwendemann G, Erbguth F, Benecke R, Auburger G. Phenotypic variability of the DYT1 mutation in German dystonia patients. *Acta Neurol Scand* 1999;99:248-251.

Leube B, Rudnicki D, Ratzlaff T, Kessler KR, Benecke R, Auburger G. Idiopathic torsion dystonia : assignment of a gene to chromosome 18p in a German family with adult onset, autosomal dominant inheritance and purely focal distribution. *Hum Mol Genet* 1996;5:1673-1677.

Levy-Lahad E, Bird TD. Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. *Ann Neurol* 1996 ;40:829-840.

Lievers KJ, Klujitmans LA, Heil SG, Boers GH, Verhoef P, van Oppenraay-Emmerzaal D, den Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ. A 31 bp VNTR in the cystathionine β -synthase (CBS) gene is associated with reduced CBS activity and elevated post-load homocysteine levels. *Eur J Hum Genet* 2001;9:583-589.

Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS. Neurotoxicity associated with dual actions of the homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:5923-5928.

Lovlie R, Daly AK, Blennerhassett R, Ferrier N, Steen VM. Homozygosity for the Gly-9 variant of the dopamine D3 receptor and risk for tardive dyskinesia in schizophrenic patients. *Int J Neuropsychopharmacol* 2000;3:61-65.

Lundstrom K, Turpin MP. Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: Expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki forest virus system. *Biochem Biophys Res Comm* 1996;225:1068-1072.

Marsden CD, Harrison MJ, Bunday S. Natural history of idiopathic torsion dystonia. *Adv Neurol* 1976;14:177-187.

- Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* 1998;50: S16-22.
- Misbahuddin A, Placzek MR, Chaudhuri KR, Wood NW, Bhatia KP, Warner TT. A polymorphism in the dopamine receptor DRD5 is associated with blepharospasm. *Neurology* 2002;58:124-126.
- Molho ES, Feustel PJ, Factor SA. Clinical comparison of tardive and idiopathic cervical dystonia. *Mov Disord* 1998;3:486-469.
- Moore AP, Behan PO, Behan WMH. Lymphocyte subset abnormalities in patients with spasmodic torticollis. *Acta Neurol Scand* 1986;74:371-378.
- Mueller T, Woitalla D, Hundsiek A, Kuhn W. Elevated plasma levels of homocysteine in dystonia. *Acta Neurol Scand* 2000;101:388-390.
- Naumann M, Pirker W, Reiners K, Lange KW, Becker G, Bruecke T. Imaging the pre- and postsynaptic side of striatal dopaminergic synapses in idiopathic cervical dystonia: A SPECT study using [¹²³I] epidepride and [123I] β-CIT. *Mov Disord* 1998;13:319-323.
- Nemeth AH. The genetics of primary dystonias and related disorders. *Brain* 2002;125:695-721.
- Nygaard TG, Raymond D, Chen C, Nishino I, Greene PE, Jennings D, Heiman GA, Klein C, Saunders-Pullman RJ, Kramer P, Ozelius LJ, Bressman SB. Localization of a gene for myoclonus-dystonia to chromosome 7q21-q31. *Ann Neurol* 1999;46:794-798.
- Ohmori O, Shinkai T, Hori H, Kojima H, Nakamura J. Polymorphisms of μ and δ opioid receptor genes and tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 2001;52:137-138.
- Ohmori O, Shinkai T, Hori H, Matsumoto C, Nakamura J. A perspective on molecular genetic studies of tardive dyskinesia: one clue for individualized antipsychotic drug therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:581-586.
- Ongini E, Longo VG. Dopamine receptor subtypes and arousal. *Int Rev Neurobiol* 1989;31:239-355.
- Opal P, Tintner R, Jankovic J, Leung J, Breakefield XO, Friedman J, Ozelius L. Intrafamilial phenotypic variation of the DYT1 dystonia: from asymptomatic *TOR1A* gene carrier status to dystonic storm. *Mov Disord* 2002;17:339-345.
- Ozelius LJ, Hewett J, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, de Leon D, Brin MF, Raymond D, Corey DP, Fahn S, Risch NJ, Buckler AJ, Gusella JF, Breakefield XO. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* 1997;17:40-48.

Ozelius LJ, Kramer P, Moskowitz CB, Kwiatkowski DJ, Brin MF, Bressman SB, Schuback DE, Falk CT, Risch N, de Leon D, et al. Human gene for torsion dystonia located on chromosome 9q32-34. *Neuron* 1989;2:1427-1434.

Ozelius LJ, Page CE, Klein C, Hewett JW, Mineta M, Leung J, Shalish C, Bressman SB, de Leon D, Brin MF, Fahn S, Corey DP, Breakefield XO. The TOR1A (DYT1) gene family and its role in early onset torsion dystonia. *Genomics* 1999;62:377-384.

Parker N. Hereditary whispering dysphonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985;48:218-224.

Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. *Neurotoxicology* 1998;19: 599-603.

Perlmutter JS, Stambuk MK, Markham J, Black KJ, McGee-Minnich L, Jankovic J, Moerlein SM. Decreased [¹⁸F]spiperone binding in putamen in idiopathic focal dystonia. *J Neurosci* 1997b;17:843-850.

Perlmutter JS, Tempel LW, Black KJ, Parkinson D, Todd RD. MPTP induces dystonia and parkinsonism. Clues to the pathophysiology of dystonia. *Neurology* 1997a;49:1432-1538.

Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC. Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum Mol Genet* 1994;3:1647-1656.

Placzek MR, Misbahuddin A, Ray Chaudhuri KR, Wood NW, Bhatia KP, Warner TT. Cervical dystonia is associated with a polymorphism in the dopamine (D5) receptor gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:262-264.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-2047.

Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR. The human D5 dopamine receptor (DRD5) maps on chromosome 4. *Genomics* 1991;11:777-778.

Rajagopalan N, Humphrey PRD, Bucknall RC. Torticollis and blepharospasm in systemic lupus erythematosus. *Mov Disord* 1989;4:345-348.

Ramachandran V, Church A, Giovannoni G, Bhatia KP. Anti-basal ganglia antibodies are absent in patients with primary blepharospasm. *Neurology* 2002;58:150.

Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Medicine* 1998;49:31-62.

Risch N, Leon de D, Ozelius LJ, Kramer P, Almasy L, Singer B, Fahn S, Breakefield X, Bressman S. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet* 1995;9:152-159.

Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C->A polymorphism in intron I of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47: 445-449.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74: 5463-5467.

Santamaria A, Rios C, Perez P, Flores A, Galvan-Arzate S, Osorio-Rico L, Solis F. Quinolinic acid neurotoxicity: In vivo increased copper and manganese content in rat corpus striatum after quinolinate intrastriatal injection. *Toxicol Lett* 1996; 87: 113-119.

Schulze TG, Schumacher J, Muller DJ, Krauss H, Alfter D, Maroldt A, et al. Lack of association between a functional polymorphism of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Am J Med Genet* 2001;8:498-501.

Segman R, Neeman T, Heresco-Levy U, Finkel B, Karagichev L, Schlafman M, Dorevitch A, Yakir A, Lerner A, Shelevoy A, Lerer B. Genotypic association between the dopamine D3 receptor and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 1999;4:247-253.

Segman RH, Heresco-Levy U, Finkel B, Goltser T, Shalem R, Schlafman M, Dorevitch A, Yakir A, Greenberg D, Lerner A, Lerer B. Association between the serotonin 2A receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001;6:225-229.

Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, Parano E, Pavone L, Evgrafov O, Ivanova-Smolenskaya IA, Anneren G, Westermarck K, Urrutia FH, Penchaszadeh GK, Sternlieb I, Scheinberg IH, Gilliam TC, Petrukhin K. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet* 1997;61: 317-328.

Sherrington R, Mankoo B, Attwood J, Kalsi G, Curtis D, Buetow K, Povey S, Gurling H. Cloning of the human dopamine D5 receptor gene and identification of a highly polymorphic microsatellite for the DRD5 locus that shows tight linkage to the chromosome 4p reference marker RAF1P1. *Genomics* 1993;18:423-425.

Shimoda-Matsubayashi S, Hattori Y, Matsumine H, Shinohara A, Yoritaka A, Mori H, Kondo T, Chiba M, Mizuno Y. MnSOD activity and protein in a patient with chromosome 6-linked autosomal recessive parkinsonism in comparison with Parkinson's disease and control. *Neurology* 1997;49:1257-1262.

Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawara-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:561-565.

Sibbing D, Asmus F, Konig IR, Tezenas du Montcel S, Vidailhet M, Sangla S, Oertel WH, Brice A, Ziegler A, Gasser T, Bandmann O. Candidate gene studies in focal dystonia. *Neurology* 2003;61:1097-1102.

Southern EM. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* 1979;100:319-323.

Sperandeo MP, de Franchis R, Andria G, Sebastio G. A 68bp Insertion found in a homocysturic patient is a common variant and is skipped by alternative splicing of the cystathionine β -synthase mRNA. *Am J Hum Genet* 1996;59:1391-1393.

Steen VM, Lovile R, MacEwan T, McCreadie RG. Dopamine D3-receptor gene variant and susceptibility to tardive dyskinesia in schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 1997;2:139-145.

Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd B, Seeman P, Laurier LG, Ng G, Georger SR, Torchia J, Van Tol HHM, Niznik HB. Cloning of the human D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 1991;350:614-619.

Svetel M, Kozic D, Stefanova E, Semnic R, Dragasevic N, Kostic VS. Dystonia in Wilson's disease. *Mov Disord* 2001;16:719-723.

Tan EC, Chong SA, Mahendran R, Dong F, Tan CH. Susceptibility to neuroleptic-induced tardive dyskinesia and the T102C polymorphism in the serotonin type 2A receptor. *Biol Psychiatry* 2001;50:144-147.

Tan EK, Jankovic J. Tardive and idiopathic oromandibular dystonia: a clinical comparison. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:186-190.

Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *Am J Hum Genet* 1996;59:1262-1267.

Tsai MY, Bignell M, Yang F, Welge BG, Graham KJ, Hanson NQ. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine β -synthase and A2756G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2000;149:131-137.

Tümer Z, Lund C, Tolshave J, Vural B, Tonnesen T, Horn N. Identification of point mutations in 41 unrelated patients affected with Menkes disease. *Am J Hum Genet* 1997;60: 63-71.

Undlien DE, Lie BA, Thorsby E. HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends Genet* 2001;17:93-100.

Valente EM, Bentivoglio AR, Cassetta E, Dixon PH, Davis MB, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Wood NW, Albanese A. DYT13, a novel primary torsion dystonia locus, maps to chromosome 1p36.13-36.32 in an Italian family with cranial-cervical or upper limb onset. *Ann Neurol* 2001;49:362-366.

Waddy HM, Fletcher NA, Harding AE, Marsden CD. A genetic study of idiopathic focal dystonia. *Ann Neurol* 1991;29:320-324.

Wunderlich S, Reiners K, Gasser T, Naumann M. Cervical dystonia in monozygotic twins: case report and review of the literature. *Mov Disord* 2001;16:714-718.

Yassa R, Ananth J. Familial tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry* 1981;138:1618-1619.

Zhang ZJ, Zhang XB, Hou G, Sha WW, Reynolds GP. The increased activity of plasma manganese superoxide dismutase in tardive dyskinesia is unrelated to the Ala-9Val polymorphism. *J Psychiatr Res* 2002;36:317-324.

Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, Scheidtmann K, Kern P, Winkelmann J, Muller-Myhsok B, Riedel L, Bauer M, Muller T, Castro M, Meitinger T, Strom TM, Gasser T. Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet* 2001;29:66-69.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIMS	Abnormal Involuntary Movements Scale
ANA	Antinukleäre Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
CBS	Cystathionin- β -Synthase
Cu	Kupfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alteri (und andere)
Elisa	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELPHA	Enzyme Linked Probe Hybridization Assay
F-ITD	Fokale idiopathische Torsionsdystonie
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HWE	Hardy Weinberg Equilibrium
Kap.	Kapitel
KI	Konfidenzintervall
MnSOD	Manganese-Superoxid-Dismutase
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Methioninsynthetase
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
MTS	Mitochondriale Targeting Sequenz
μ -OR	μ -Opioid-Rezeptor
n	Stichprobenumfang
OD	Optische Dichte
OMD	Oromandibuläre Dystonie

OR	Odds ratio
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RFLP	Restriktionslängenpolymorphismus
SA	Standardabweichung
SSCP	Single-Strand-Conformational-Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPECT	Single-Photonen-Emissionscomputertomographie
SSO	Sequenzspezifische Oligonukleotide
Taq	Thermophilus aquatus
TD	Tardive Dyskinesie
TGN	Trans Golgi Netzwerk
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
ZNS	Zentralnervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Lokalisation und Struktur des DYT1-Gens. (12)
- Abbildung 1.2: Der Homocystein-Metabolismus. (15)
- Abbildung 1.3 (nach Lievers et al., 2000): Mittlerer Homocysteinspiegel nach Belastung bei Probanden in Zuordnung zum Genotyp des 31bp VNTR im CBS Gen. (16)
- Abbildung 3.1: Elektropherogramme der Sequenzierung des G2444C-Polymorphismus in Exon 10 des Menkes-Gens. (49)
- Abbildung 3.2: Fragmentlängenanalyse zum Nachweis der GAG-Deletion im DYT1-Gen. (50)
- Abbildung 3.3: Elektropherogramme der Sequenzierung von Exon 8 des Wilson-Gens (ATP7B). (51)
- Abbildung 3.4: Elektropherogramme des C246T-Polymorphismus im Exon 2 des DYT1-Gens. (52)
- Abbildung 3.5: Elektropherogramme des G646C-Polymorphismus in Exon 4 des DYT1-Gens. (53)
- Abbildung 3.6: Genotypen der 68bp-Insertion in Exon 8 des CBS-Gens nach Gelelektrophorese. (55)
- Abbildung 3.7: Fragmentlängenanalyse des 31bp-Repeat im CBS-Gen. (58)
- Abbildung 3.8: Genotypen des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen nach Gelelektrophorese. (61)
- Abbildung 3.9: Genotypen des A2756G-Polymorphismus im MS-Gen nach Gelelektrophorese. (63)
- Abbildung 3.10: Fragmentlängenanalyse des (CA)_n-Repeat Polymorphismus im DRD5-Gen. (65)
- Abbildung 3.11: Verteilung der 13 Allele des (CA)_n-Repeats bei den F-ITD Patienten und Kontrollen. (67)

- Abbildung 3.12: Chartmuster (modifiziert) einer Probe nach HLA DRB-Typisierung: (68)
- Abbildung 3.13: Verteilung der HLA-DRB Allele bei den F-ITD Patienten und Kontrollen. (70)
- Abbildung 3.14: Genotypen des C/A-Polymorphismus in Intron 1 des CYP1A2-Gens nach Gelelektrophorese: (71)
- Abbildung 3.15: Genotypen des A118G-Polymorphismus im Gen des μ -Opioid-Rezeptors nach Gelelektrophorese: (72)
- Abbildung 3.16: Genotypen des C/T-Polymorphismus in der MTS des MnSOD-Gens nach Gelelektrophorese: (74)
- Abbildung 3.17: Genotypen des Ser9Gly-Polymorphismus im DRD3-Gen nach Gelelektrophorese. (75)
- Abbildung 3.18: Genotypen des C102T-Polymorphismus in Exon 1 des 5HT2A-Rezeptorgens: (77)
- Abbildung 4.1: Die Frequenz der Allele 2 und 6 im des $(CA)_n$ -Repeats im DRD5-Gen in verschiedenen Kontrollpopulationen. (93)

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten	Name:	Dirk Sibbing
	Anschrift:	Perhamerstrasse 37 80687 München
	Geburtsdatum:	16.05.1978
	Geburtsort:	Detmold
	Konfession:	evangelisch
	Familienstand:	ledig
Schule	1984-1988	Grundschule in Schlangen
	1988-1997	Christian-Dietrich-Grabbe Gymnasium in Detmold
	1997	Abitur
Studium	1997-2003	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
	2003-2004	Studium der Humanmedizin (Praktisches Jahr) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	April 2004	Abschluss: Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	seit Mai 2004	Assistenzarzt im Deutschen Herzzentrum in München; wissenschaftlich tätig in der genetischen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. A. Kastrati
Promotion	08/2000-03/2003	Durchführung der Experimente im Rahmen der Promotion am Med. Zentrum für Nervenheilkunde
	03/2003-08/2004	Schriftliche Verfassung der Promotion

7.4 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Marburg:

Alfke, Aumüller, Arnold, Bandmann, Barth, Basler, Baum, Beato, Behr, Bertalanffy, Bien, Böhringer, Bolm, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Dobbelsstein, Eilers, Engelhardt-Cabillic, Feuser, Fruhstorfer, Gemsa, Gerdes, Geus, Göke, Görg, Gotthardt, Gotzen, Grau, Greger, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Hasilik, Hasse, Hebebrandt, Hellinger, Hellwig, Heufelder, Hoeffken, Hörsch, Höltermann, Hofmann, Hoffmann, Hufnagel, Joseph, Jungclas, Kern, Kleine, Klenk, Klose, Koch, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhn, Lammel, Lang, Lemke, Lennartz, Leppek, Lippert, Löffler, Lührmann, Maser, Maisch, Mennel, Menz, Meinhardt, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Nies, Oertel, Petermann, Pfab, Pfeiffer, Ramaswamy, Rausch, Remschmidt, Renz, Richter, Riegel, Risse, Röhm, Rogausch, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schnabel, Schneider, Seyberth, Seitz, Slenczka, Sommer, Steininger, Stief, Stiletto, Stinner, Sure, Sturm, Vogelmeier, Voigt, Vohland, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, v. Wichert, Wilke, Wolf, Wulf und Zielke

In München:

Brandt, Büttner, Dichgans, Duswald, Hallfeld, Kanz, Kessler, Mutschler, Noachtar, Pfister, Straube, Strupp

In Zürich (Schweiz) und Southampton (Großbritannien):

Arn, Gubler, Kennedy, Koeltz, Licht, Oeltz, Wieler

7.5 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Oliver Bandmann für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation, die hervorragende konstruktive und nette Betreuung und die Zusammenarbeit während und nach der eigentlichen Tätigkeit im Labor recht herzlich bedanken. Danken möchte ich auch für die Korrektur der Arbeit und nicht zuletzt auch für die zahlreichen für mich immer sehr wertvollen Ratschläge in der Zeit der Zusammenarbeit in Marburg und auch darüber hinaus. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. W. H. Oertel, an dessen Institut der praktische Teil dieser Dissertation durchgeführt wurde. Außerdem danken möchte ich Herrn Dr. Michael Grundmann, zum einen für die im Vorfeld dieser Dissertation durchgeführten SSCP-Analysen und zum anderen für die zügige und nette Einarbeitung in die Arbeitstechniken zu Anfang meiner Tätigkeit im Labor. Mein Dank gilt auch Frau Katharina Hölzle und Frau Sarah Schönian für die nette Zusammenarbeit im Labor und Frau PD Dr. I. König für die ausgezeichnete Unterstützung bei den statistischen Analysen.

Besonders danken möchte ich auch meinen Eltern, Inge und Rainer Sibbing, meinen Großeltern, Elise und Josef Rheinberg und nicht zuletzt meinem Bruder Ralf Sibbing. Meine Familie war mir immer in vielerlei Hinsicht eine große Hilfe und wichtige Unterstützung während der Arbeit an der Dissertation.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner lieben Verlobten Frau Lee, die mich in den ganzen Jahren durch ihr Verständnis und ihre Geduld immer auf ganz besondere Weise unterstützt hat. Ihre Meinung und konstruktive Kritik zur Arbeit im Labor und zur schriftlichen Verfassung der Arbeit waren mir immer sehr wichtig und äußerst hilfreich.

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Kandidatengenstudien bei Fokaler Idiopathischer Torsionsdystonie (F-ITD)“

am Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde unter der Leitung von PD Dr. O. Bandmann mit Unterstützung durch die in der Danksagung aufgeführten Personen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in den in Kapitel 7.7 aufgeführten Publikationsorganen veröffentlicht.

7.7 Veröffentlichungen

Publikationen:

Sibbing D, Asmus F, König IR, Tezenas du Montcel S, Vidalihet M, Sangla S, Oertel WH, Brice A, Ziegler A, Gasser T, Bandmann O (2003) Candidate gene studies in focal dystonia. *Neurology* 61: 1097-1101.

Sibbing D, Trender-Gerhardt I, Wood NW, Oertel WH, Bathia KB, Bandmann O (2003) The promotor region of the Menkes Gene ATP7A is not altered in focal or generalized dystonia. *Ann Neurol* 53: 278-279.

Bandmann O, Asmus F, Sibbing D, Grundmann M, Schwab SG, Müller J, Wildenhauer DB, Poewe W, Gasser T, Oertel WH (2002) Copper genes are not implicated in the pathogenesis of focal dystonia. *Neurology* 59: 782-783.

Vorträge:

Sibbing D, Asmus F, König IR, Grundmann M, Oertel WH, Ziegler A, Gasser T, Bandmann O (2002) Candidate gene research in focal dystonia. 12th meeting of the European Neurological Society (ENS), Berlin. *J Neurol* 249 (Suppl. 1): 189.

Poster:

Bandmann O, Sibbing D, Asmus F, König IR, Grundmann M, Ziegler A (2002) Candidate gene research in focal dystonia excludes involvement of ATP7A, ATP7B, ATOX, HLA-DR and MTHFR. 7th international congress of Parkinson's disease and movement disorders, Miami, USA. *Mov Disord* 17 (Suppl. 5): P909.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.