

Aus dem Institut für Neurogenetik
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. med. Christine Klein

Identifizierung genetischer Ursachen der Musikerdystonie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Friederike Borngräber
aus Frankfurt (Oder)

Lübeck 2016

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. habil. Peter Pramstaller
3. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Krawcak

Tag der mündlichen Prüfung: 13.9.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.9.2017

Promotionskommission der Sektion Medizin

Was mich antreibt.

Was mich antreibt, ist die Musik – meine Musik.

Die Musik, die mir Freund ist, mich begleitet in allen Lebenslagen. Die mir hilft auszudrücken, was mit Worten nicht auszudrücken ist. Die mich herausfordert, mir Welten eröffnet und mich in ihrer Komplexität fasziniert. Die Musik, die mich mit Fremden verbindet, die in feinen Nuancen eines jeden Individuums doch nach dem Ganzen, dem Großen sucht. Dem, was alle vereint.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1. Die Musikerdystonie	1
1.1.1. Symptome	2
1.1.2. Pathogenese	4
1.1.3. Diagnose	6
1.1.4. Therapie	6
1.2. Der Schreibkrampf	7
1.2.1. Symptome	7
1.2.2. Pathogenese	8
1.2.3. Diagnose	8
1.2.4. Therapie	8
1.3. Genetisch bedingte Erkrankungen	9
1.3.1. Genetische Grundlagen	9
1.3.2. Mono- versus komplex-genetische Erkrankungen	10
1.4. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	11
1.5. Zielstellungen der Arbeit	13
2. Patienten, Material und Methoden	14
2.1. Patienten und Kontrollen	14
2.2. Material	20
2.2.1. Chemikalien	20
2.2.2. Kits	20
2.2.3. Lösungen	21
2.2.4. Geräte	21
2.2.5. Software	22

2.3.	Methoden	23
2.3.1.	Next-generation Sequencing	23
2.3.2.	In Silico-Analyse – auf der Suche nach der Nadel im Heuhaufen .	24
2.3.3.	Primerdesign	26
2.3.4.	Polymerase-Kettenreaktion	26
2.3.5.	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.3.6.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.3.7.	Sanger-Sequenzierung	30
2.3.8.	RNA-Extraktion	32
2.3.9.	Genomweite Assoziationsstudie	33
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Monogenetische Ursache mittels NGS	36
3.1.1.	Genom- bzw. Exomsequenzierung dreier MD-Familien	36
3.1.2.	Identifikation des Kandidatengens <i>RAB12</i>	40
3.1.3.	Statistische Auswertung der gefundenen <i>RAB12</i> -Varianten	44
3.2.	Komplex-genetische Ursachen mittels GWAS	46
3.2.1.	Genotypisierung des Patienten- und Kontrollkollektivs	46
3.2.2.	Replikation genomweit signifikanter Varianten	47
3.2.3.	Validierung der Variante rs 11655081	50
4.	Diskussion	52
4.1.	Monogenetische Ursachen der Musikerdystonie	52
4.1.1.	Phänotyp der MD-Familien A, B und C	52
4.1.2.	Identifikation der Kandidatengene mittels NGS	53
4.1.3.	Chromosom 18 und das Kandidatengen <i>RAB12</i>	56
4.1.4.	Beurteilung des Kandidatengens <i>RAB12</i>	57
4.2.	Komplex-genetische Ursachen der Musikerdystonie	59
4.2.1.	Zusammenstellung des Patienten- und Kontrollkollektivs	59
4.2.2.	Identifikation der Kandidatengene mittels GWAS	62
4.2.3.	Chromosom 17 und das Kandidatengen <i>ARSG</i>	62
4.2.4.	Beurteilung des Kandidatengens <i>ARSG</i>	63
4.3.	Schlussfolgerungen	66
5.	Weiterführende Untersuchungen	68
6.	Zusammenfassung	70
	Literaturverzeichnis	72

Anhang	85
A. Diagnostische Tests	85
B. Phänotyp des mittels GWAS untersuchten Patienten- und Kontrollkollektivs	87
C. Überlappende Varianten der Multiplex-MD-Familien	88
D. Primertabellen	91
E. Eidesstattliche Erklärung	94
F. Danksagung	95
G. Lebenslauf	96

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
bds.	beidseits
C	Cytosin
CNV	Copy Number Variant
cDNA	komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
Cl⁻	Chlorid
cM	centi Morgan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotide
dH₂O	destilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
EVS	Exome Variant Server
ExAC	Exome Aggregation Consortium
F-Primer	Primer des Vorwärtsstrangs der DNA
G	Guanosin

GABA	γ -Aminobuttersäure
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HCl	Chlorwasserstoff
HG	Handgelenk
Hz	Hertz
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
INDEL	Insertions- und Deletionspolymorphismus
k.A.	keine Angaben
KI	Konfidenzintervall
M	Molar
MAF	Minor-Allelfrequenz
Mb	Megabasen
MD	Musikerdystonie
mgl.	möglich
M1-Rezeptor	Muscarinerger Rezeptor
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Next-generation Sequencing
n.u.	nicht untersucht
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	Odds Ratio
P	Signifikanzwert P
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
q	langer Arm eines Chromosoms
R-Primer	Primer des Rückwärtsstrangs der DNA
SNP	Einzelnukleotid Polymorphismus
SNV	Einzelnukleotid Variante

T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus, thermophiles gramnegatives Bakterium
TBE-Puffer	Lösung aus Tris, Borsäure und EDTA
TE-Puffer	Lösung aus Tris, HCl und EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vgl.	Vergleich
Vol.	Volumen
WD	Writer's dystonia, Schreibkrampf
z.A.	zum Ausschluss
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

1.1. Phänotyp bei Musikerdystonie und Schreibkrampf	3
1.2. Triggerfaktoren der Musikerdystonie	4
1.3. Mono- versus komplex-genetische Erkrankungen	11
2.1. Stammbäume der Familien A, B und C	18
2.2. Priorisierender Filteralgorithmus	25
2.3. Phasen der Assoziationsstudie	35
3.1. Sequenzausschnitte gefundener <i>RAB12</i> -Mutationen	41
3.2. Elektropherogramm der cDNA-Sequenz	42
3.3. Schematische Abbildung des <i>RAB12</i> -Gens	44
3.4. Manhattanplot der genomweiten Assoziation	47
3.5. Forestplot der Odds Ratio für rs 11655081	50
4.1. Filteralgorithmus im Diskurs	55
4.2. Idiogramm des Chromosoms 18	56
4.3. Qualität der GWAS	65

Tabellenverzeichnis

2.1. Übersicht der untersuchten Patientenkollektive	16
2.2. Patientendaten der Familie A, B und C	19
2.3. Ansatz der Standard-PCR	27
2.4. Ansatz der PCR mit fluoreszierenden Markern	29
2.5. Ansatz der Sequenz-PCR	31
2.6. Ansatz der Fermentas cDNA-Synthese	33
3.1. Detektierte Varianten der Familien A, B und C	37
3.2. Kandidatengene der interfamiliären Überlappung aus A, B, C	37
3.3. Kandidatengene der interfamiliären Überlappung aus jeweils zwei Familien	38
3.4. Übersicht gefundener Mutationen im <i>RAB12</i> -Gen	43
3.5. Kreuztabelle beobachteter Häufigkeiten	45
3.6. Kreuztabelle erwarteter Häufigkeiten	45
3.7. Beobachtete Häufigkeit der c.586A>G-Variante	45
3.8. Erwartete Häufigkeit der c.586A>G-Variante	45
3.9. Eingeschlossene Varianten der ersten Replikationsphase ($P < 10^{-5}$) . . .	49
3.10. rs 11655081 assoziierte Signale mit genomweiter Signifikanz	50
3.11. Minor-Allelfrequenz der Variante rs 11655081 bei fokalen und segmen- talen Dystoniepatienten sowie gesunden Kontrollen	51
B.1. Phänotyp des Patientenkollektivs	87
B.2. Phänotyp der internationalen Probanden	87
C.3. Überlappende Varianten der MD-Familien A, B und C	88
D.4. Primer für die Validierung gefundener Varianten der MD-Familien	91
C.5. Primer der <i>RAB12</i> -Sequenzierung	93
C.6. Primer der Validierungsphase der GWAS	93

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifikation genetischer Ursachen der Musikerdystonie. Dazu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt, nach denen die Erkrankung erstens einer monogenetischen und zweitens einer komplex-genetischen Ursache zugrunde liegt. Der folgende Abschnitt geht zunächst auf das Krankheitsbild der Musikerdystonie bzw. des Schreibkrampfes ein. Im Anschluss erfolgt eine Einführung in die Grundlagen genetisch bedingter Erkrankungen sowie eine Klärung der im Vorhinein geleisteten Arbeiten der Arbeitsgruppe des Instituts für Neurogenetik Lübeck und die Definition der Fragestellung.

1.1. Die Musikerdystonie

Die Musikerdystonie (MD), auch als Musikerkrampf bezeichnet, ist eine fokale, tätigkeitsspezifische Bewegungsstörung bei Musikern, die zum Verlust der Koordinations- und Kontrollfähigkeit der Muskulatur beim Spiel des Instrumentes führt. Etwa 1% professioneller Musiker entwickelt eine MD, die in vielen Fällen die musikalische Karriere der Betroffenen beendet (Altenmüller, 2010).

Bekannte Vertreter in der Gegenwart und Vergangenheit sind z. B. Leon Fleisher und Robert Schumann. Letzterer beschreibt in den Tagebüchern von 1831-32 technische Probleme beim Klavierspiel, bei denen es zu einer Schwäche mit zunehmendem Kontrollverlust des Mittelfingers der rechten Hand kommt (Altenmüller, 2005). Sein Freund und Arzt Dr. Moritz Reuter in einem Schreiben von 1841:

„Im Jünglingsalter bemerkte er zuerst, dass der Zeigefinger und der Mittelfinger auffallend weniger Kraft und Gelenkigkeit, als die übrigen besaßen. Die längere Zeit fortgesetzte Anwendung einer Maschine, mittels welcher die genannten Finger stark nach dem Handrücken gehalten wurden, hatte zur Folge, dass die selben von nun an in einen lähmungsartigen Zustand verfielen, in dem Maaße dass sie erstens nur schwaches Gefühl besaßen und zweitens rücksichtlich der Bewegung dem Willen nicht mehr unterworfen waren“ (Altenmüller, 2004).

Die beschriebene Maschine, die „Cigarrenmechanik“, entwickelte Schumann selbst als eine Art Hängevorrichtung, in der der Mittelfinger eingespannt wurde, um so ungestört beweglich in den anderen Fingern zu sein. Er komponiert in der Zeit die Toccata op.7, die ohne den rechten Mittelfinger auskommt. Nach kurzzeitiger Besserung verschlechtert sich der Zustand jedoch, sodass Schumann seine solistischen Bestrebungen beendet und sich von nun an der Komposition widmet.

1.1.1. Symptome

Verschiedene Symptome markieren den Beginn der Erkrankung: subtiler Kontrollverlust, das Einrollen einzelner Finger (Abb. 1.1), Verlust der Präzision in der technischen Ausführung von Trillern oder unwillkürliche Flexion des Daumens bei Streichern. In diesem Stadium führen die meisten Musiker die fehlende Präzision auf ein technisches Problem, auf fehlende Übung zurück. Mit der Konsequenz, dass sie ihr Übepensum erhöhen, was die Problematik in den meisten Fällen verstärkt. Typischerweise tritt die MD ohne Schmerzen auf, obgleich in Folge von längeren Spasmen (Verkrampfungen) Muskelkater auftreten kann (Altenmüller, 2010). Oft ist der Verlust der muskulären Kontrolle mit einer Co-Kontraktion der antagonistischen Muskelgruppe vergesellschaftet – die agonistische überwiegt jedoch in vielen Fällen.

Etwa 44% der MD-Patienten entwickeln im Laufe der Erkrankung eine komplexe, d. h. nicht-tätigkeitsspezifische Dystonie, meist kombiniert mit einem Schreibkrampf (Schmidt et al., 2011). Beidem, dem Schreiben sowie dem Spiel eines Instrumentes, ist gemeinsam, dass sie eine hoch auflösende Koordination der Finger- und Handmuskulatur mit intensiv geübten, sich wiederholenden Bewegungen erfordern (Lockwood, 1989; Torres-Russotto, 2008).

Generell überwiegt der Anteil der männlichen MD-Patienten in einem Verhältnis von 4:1 zu weiblichen Erkrankten (Lim et al., 2003), wobei sich der Frauenanteil professioneller Musiker in Deutschland auf 40% beläuft (Liersch, 2015). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 33 Jahren (Schmidt et al., 2009). Jedoch zeigen unterschiedliche Studien eine hohe Variabilität von 16 bis 75 Jahren (Chang und Frucht, 2013).

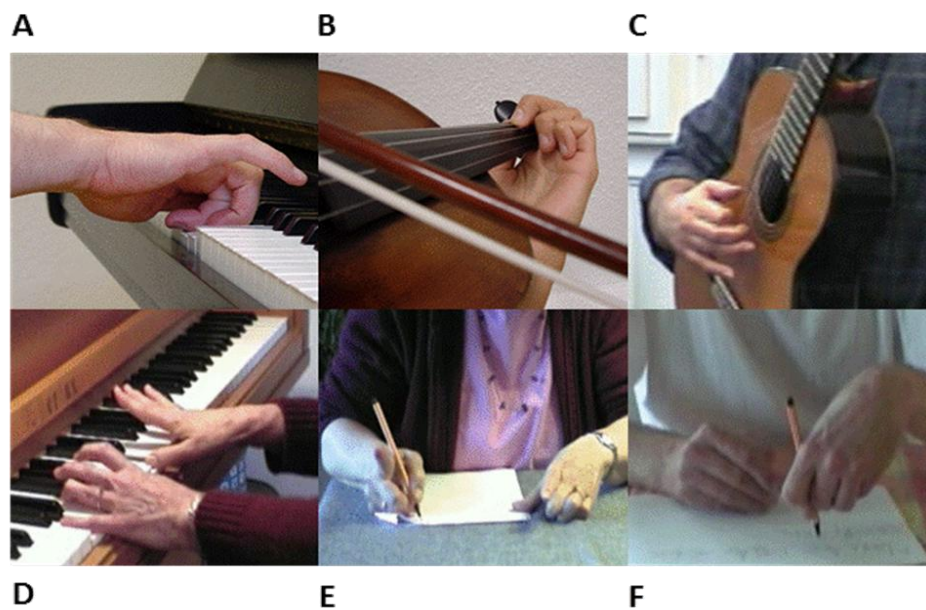


Abb. 1.1.: Phänotyp bei Musikerdystonie und Schreibkrampf. Bei der Musikerdystonie (MD) treten während des Instrumentalspiels unfreiwillige Muskelkontraktionen in Verbindung mit einer veränderten Körperhaltung auf. Die Bilder A-C zeigen eine Flexionsdystonie einzelner Finger bei einem Pianisten (A), einem Geiger (B) und einem Gitarristen (C). Bild D zeigt einen MD-Patienten mit Co-Kontraktion der Extensoren, E und F Verwandte mit einer generalisierten Handdystonie (Vgl. Lohmann et al., 2014).

Die Wahrscheinlichkeit eine MD zu entwickeln, ist abhängig von der Instrumentengruppe. So haben Gitarristen, Klavierspieler und Bläser das höchste Risiko (Jabusch, 2006). Zudem gibt es einen Zusammenhang zwischen der Instrumentengruppe und der Lokalisation der Symptome. Während Bläser hauptsächlich eine Ansatzdystonie (Verlust der Kontrollfähigkeit im Bereich der Mundmuskulatur), selten jedoch der Hand aufweisen, ist bei Musikern der Tasten- und Zupfinstrumente vorwiegend die rechte Hand betroffen, welche einer höheren Arbeitsbelastung mit verstärkter Komplexität der Bewegungsfolgen im Gegensatz zur linken ausgesetzt ist (Altenmüller et al., 2012). Dagegen entwickeln Streicher vor allem in der linken Hand dystone Symptome, welche sehr rasche Bewegungen in hoher räumlicher Auflösung auf dem Griffbrett ausführt, während die rechte Hand den Bogen hält und führt. In der Familie der Streichinstrumente sind vor allem die Violine und Viola betroffen, die eine sehr viel höhere sensomotorische Präzision im Vergleich zum Cello oder Kontrabass erfordern (Abb. 1.2; Altenmüller, 2010).

Ein weiterer Risikofaktor ist das musikalische Genre. So tritt die MD vor allem bei Musikern aus dem klassischen Bereich auf, der im Vergleich zur Pop- oder Jazzmusik deutlich weniger Raum für Improvisation und freie Interpretation lässt. Die klassische Musik er-

fordert höchste technische Genauigkeit im Bereich von Millisekunden. Der Musiker wird dabei stets durch die eigene auditive Wahrnehmung und das Publikum geprüft – Erfolg und Misserfolg liegen dicht beieinander. Zusätzlich ist eine ängstliche oder zum Perfektionismus neigende Persönlichkeitsstruktur als Ursache der MD beschrieben (Jabusch et al., 2004).

In 20 bis 27% der Fälle berichten MD-Patienten eine positive Familienanamnese für dystone Bewegungsstörungen, wie den Blepharospasmus (Lidkrampf), die zervikale Dystonie, den Torticollis (Schiefhals) und vor allem den Schreibkrampf. Dies lässt eine genetische Ursache für die MD vermuten. Das Vererbungsmuster ist autosomal-dominant (Schmidt et al., 2009).

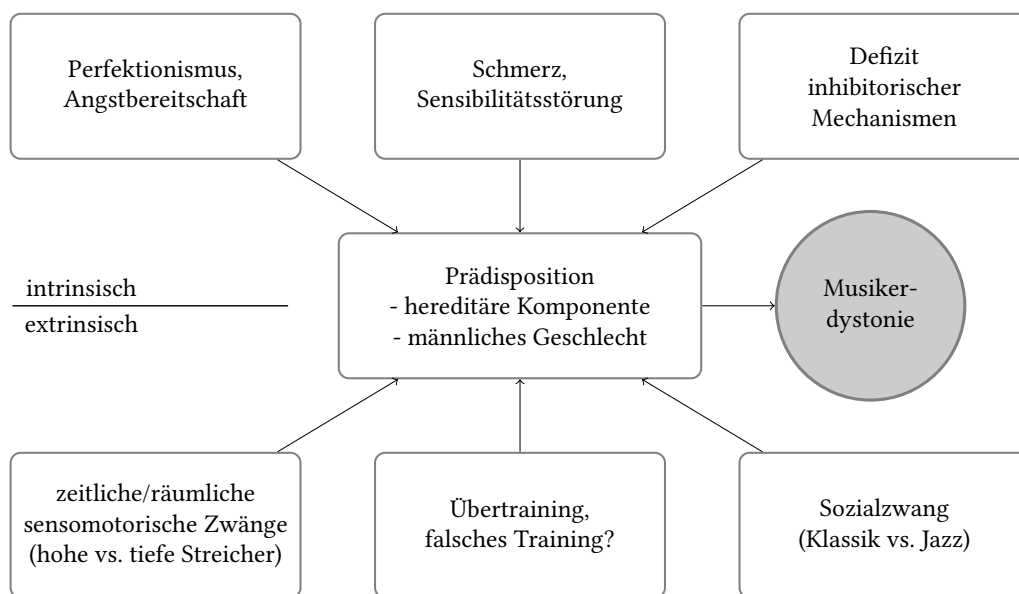


Abb. 1.2.: Intrinsische und extrinsische Faktoren, die eine MD-Erkrankung begünstigen (Vgl. Altenmüller, 2010).

1.1.2. Pathogenese

Im vorangegangenen Abschnitt wurden zwei Hauptfaktoren herausgestellt, die das Risiko an der MD zu erkranken, erhöhen: stereotype Bewegungsabläufe mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung und die genetische Prädisposition. Diese sind mit charakteristischen Veränderungen in drei Bereichen des zentralen Nervensystems (ZNS) assoziiert: 1. ein Defizit der Inhibition des sensomotorischen Systems, 2. eine veränderte sensomotorische Wahrnehmung und 3. eine pathologische sensomotorische Integration (Altenmüller, 2010; Chang und Frucht, 2013).

Verlust der zentralen Inhibition

Die Funktionen des ZNS befinden sich in einer fein abgestimmten Balance zwischen erregenden und hemmenden Reizen des neuronalen Schaltkreises. Diese Abstimmung ermöglicht weiche, kontrolliert koordinierte Bewegungsabläufe, bei denen Agonisten erregt und Antagonisten der angesteuerten Muskeln gehemmt werden müssen. Neurobiologische Untersuchungen von Dystoniepatienten belegen eine verminderte Aktivität von γ -Aminobuttersäure (GABA) – ein wichtiger inhibitorischer Neurotransmitter des ZNS (Chang und Frucht, 2013). Zudem zeigt sich eine erhöhte Aktivität exzitatorischer, cholinergischer Interneurone in den Basalganglien (Martella et al., 2009). Die daraus resultierende fehlende Inhibition, das „Zuviel“ an Erregung, kann auf der spinalen und kortikalen Ebene sowie beim Lösen komplexer Aufgaben nachgewiesen werden (Brighina et al., 2009; Kadota et al., 2010).

Abnorme Plastizität

Die Fähigkeit, zwei unterschiedliche Reize räumlich und zeitlich getrennt voneinander wahrzunehmen, ist bei MD-Patienten eingeschränkt. So kommt es im sensomotorischen Areal der Großhirnrinde, das für die sensible Wahrnehmung der Finger bzw. Lippen zuständig ist, zu einer Überlappung (Elbert et al., 1998; Hirata et al., 2004). Die musikalische Ausbildung führt auf Grundlage der neuronalen Plastizität zur Vergrößerung der repräsentierten Finger- oder Lippenareale. Bei einer Überbeanspruchung durch hochauflösende somatosensorische Stimuli kommt es jedoch zu einer Maladaptation, sodass die einzelnen Bereiche nicht mehr unterschieden werden können (Byl et al., 1996; Altenmüller, 2003).

Pathologische sensomotorische Integration

Die Integration von sensibler Wahrnehmung und motorischer Bewegungsfolge ist bei MD-Patienten pathologisch verändert. Ein klinisches Zeichen ist der sogenannte „sensorische Trick“, der z. B. bei Patienten mit einer zervikalen Dystonie durch Druck auf das Kinn den Kopf wieder geradestellen lässt, was willkürlich nicht möglich ist. Bei einem Großteil der MD-Patienten, z. B. Pianisten, kann durch das Spielen mit Latexhandschuhen die Beschwerdesymptomatik verbessert werden. Die veränderte sensorische Wahrnehmung über die Rezeptoren der Finger führt zu einer Veränderung der motorischen Antwort (Altenmüller, 2003; Avanzino et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genetische Prädisposition die Basis ist, auf

der durch stereotype Bewegungsabläufe, ein erhöhtes Übepensum verbunden mit sozialem Druck und Angst, veränderter Nozizeption (sensorische Eigenwahrnehmung) oder Schmerz das Risiko an der MD zu erkranken, erhöht ist.

1.1.3. Diagnose

Die Diagnose erfolgt durch die gezielte Anamnese und die Analyse des Spiels am Instrument, wobei Unregelmäßigkeiten im Bewegungsablauf für Arzt und Musiker vor allem audiologisch wahrnehmbar sind. Subtile Veränderungen können zudem mit der Zeitlupefunktion eines standardisierten Videoprotokolls detektiert werden. Messungen mittels Elektromyografie zeigen eine erhöhte Muskelaktivität in der betroffenen Muskelgruppe. Weiterhin stehen folgende Scoresysteme zur Verfügung, die sowohl die dystone Symptomatik als auch die Einschätzung des Behinderungsgrades im Alltag, sowie die Persönlichkeitsstruktur der Befragten bewerten: *Beth Israel Dystonia Scale* (BIDS), *Abnormal Involuntary Movement Scale* (AIMS), *Global Disability Score* und das NEO-Fünf-Faktoren-Inventar (NEO-FFI). Sie werden im Abschnitt A des Anhangs näher erläutert.

1.1.4. Therapie

Die Behandlung der MD erfolgt symptomatisch. Zur medikamentösen Therapie eignen sich verschiedene Substanzen, die die Impulsübertragung des zentralen und peripheren Nervensystems beeinflussen. Vier Präparate sind dabei von Interesse: Baclofen, Phenytoin, Primidon und Trihexyphenidyl. Da die Nebenwirkungen teils sehr schwerwiegend sind, Trihexyphenidyl z. B. vermindert als Anticholinergikum die Speichelsekretion, was zu einer trockenen Mundschleimhaut führt und für Bläser daher ungeeignet ist, muss im Einzelfall abgewägt werden, ob sich eine medikamentöse Therapie empfiehlt (Jabusch et al., 2005).

Erfolgversprechend ist die Behandlung mit Botulinumtoxin, das direkt in die betroffene Muskelgruppe injiziert wird. Das Toxin hemmt die Erregungsübertragung in der neuromuskulären Endplatte und führt zur Lähmung des Muskels. Nach Abklingen der Wirkung nach drei bis sechs Monaten muss erneut behandelt werden (Altenmüller, 2010).

Zusätzlich sind, basierend auf der Annahme der maladaptiven Plastizität bei MD-Patienten, verschiedene Retraining-Methoden entwickelt worden, die die Um- bzw. Neustrukturierung des Gehirns bewirken (Candia et al., 2003; Rosenkranz et al., 2009; Rosset-Llobet, 2011). Das Grundprinzip besteht darin, die gesunden Finger zunächst ruhigzustellen und mit den dystonen leichte Übungen am Instrument durchzuführen. Zudem

helfen Techniken, wie z. B. die Feldenkraismethode oder Alexandertechnik bei der Veränderung der Körperwahrnehmung und Stressreduktion. Ausgehend vom Modell des somatosensorischen Inhibitionsdefizits konnten Rosset-Llobet et al. einen positiven Effekt von transkranieller Gleichstromstimulation (transcranial direct current stimulation, tDCS) auf die Neurorehabilitation nachweisen, infolgedessen es zu einem Absinken der neuronalen Erregbarkeit des kathodal stimulierten Areals kam (Nitsche et al., 2003, Rosset-Llobet et al., 2015).

Zuletzt aber liegt das Hauptaugenmerk auf der Prävention der Erkrankung. So sollte bereits in den Anfängen der musikalischen Ausbildung der Spaß, die emotionale Ausdrucksfähigkeit im Vordergrund stehen, weniger die perfekte Virtuosität, die oft in Auftrittsangst resultiert. Die Leistungsgesellschaft, die die im Studio bearbeitete CD-Aufnahme als Gold-Standard eines Konzertes festlegt, sollte sich vielmehr an der Einzigartigkeit eines Live-Konzertes mit seinen Ecken, aber dem Erlebnis der Entstehung und Entwicklung von Klängen, der Musik des Augenblickes erfreuen (Altenmüller, 2010).

1.2. Der Schreibkrampf

Der Graphospasmus oder Schreibkrampf (*Writer's Dystonia*, WD) gehört wie die Musikerdystonie zu den tätigkeitsspezifischen Bewegungsstörungen, bei dem es, ausgelöst durch das Schreiben, zu unwillkürlichen Bewegungen oder Verkrampfungen der Muskulatur der oberen Extremität kommt. Die Prävalenz beträgt 1-2:100 000 (Volkmann, 2012a). Das Erkrankungsalter liegt bei Mitte 30. Männer erkranken etwa zwei bis drei Mal so häufig wie Frauen, eine positive Familienanamnese wird in 21-29% der Fälle berichtet (Marsden, 1990; Ritz et al., 2009). Die Erkrankung wird in drei Hauptgruppen eingeteilt (Marsden, 1990): 1. der einfache, nur beim Schreiben auftretende Krampf, 2. der dystone, d. h. auch in anderen Alltagssituationen, z. B. beim Essen oder Zuknöpfen des Hemdes auftretende Schreibkrampf. Entwickelt sich im Verlauf der Erkrankung aus dem zunächst tätigkeitsspezifischen Krampf eine dystone Symptomatik, spricht man 3. vom progredienten Schreibkrampf.

1.2.1. Symptome

Schon kurz nach Beginn des Schreibens kommt es bei den Betroffenen zu einer abnormen Finger- und Handhaltung mit unwillkürlicher Muskelaktivität. Dabei werden Daumen und Zeige- bzw. Mittelfinger teils schmerzhaft aufeinander gedrückt. Zusätzlich kann es zu einer unwillkürlichen Beugung, Streckung oder Rotation im Handgelenk oder Arm

kommen (Abb. 1.1). Dies führt zu einer veränderten Griffhaltung des Schreibgeräts bei oft massiv erhöhtem Schreibdruck. Das Schriftbild ist krakelig bis unleserlich. Zusätzlich ist auffällig, dass die Patienten weniger flüssig schreiben, oft pausieren – generell langsam und angestrengt schreiben. Weiterhin können ein ein- oder beidseitiger Tremor, plötzlich einschließende Zuckungen der oberen Extremität, sowie eine zunehmende Schwäche der Muskulatur nach längerem Schreiben auftreten (Marsden, 1990; Hallett, 2006).

1.2.2. Pathogenese

Das pathogenetische Erklärungsmodell entspricht dem der MD und stützt sich auf die drei grundlegenden Defektachsen: 1. Verlust der zentralen Inhibition der Basalganglien und Expansion erregender, cholinergischer Interneurone speziell im Striatum (Hallett, 2006; Martella et al., 2009), 2. abnorme Plastizität des motorischen Cortex und 3. die gestörte sensorische Funktion (Hallett, 2006).

1.2.3. Diagnose

Die Diagnose erfolgt durch die gezielte Anamnese, die Analyse der Schreibaktivität bzw. des Schriftbildes. Messungen mittels Elektromyografie zeigen eine erhöhte Muskelaktivität in der betroffenen Muskelgruppe.

1.2.4. Therapie

Angelehnt an die Pathogenese gibt es verschiedene Therapiekonzepte. Das Überangebot an Acetylcholin, ausgelöst durch autonome Interneurone, wird durch den Einsatz anticholinergischer Medikamente wie Trihexyphenidyl ausgeglichen (Martella et al., 2009; Volkmann, 2012b). Verschiedene Retraining-Modelle bauen darauf auf, dass die durch neuronale Plastizität pathologisch veränderten rezeptiven Felder neu „programmiert“ werden (Candia et al., 2002; Zeuner et al., 2005). Ähnlich der Therapie bei der MD kann dem Retraining eine vier- bis sechswöchige Immobilisation der betroffenen Muskelgruppe vorangestellt werden, um eine Dedifferenzierung des sensomotorischen Cortex zu bewirken (Priori et al., 2001; Pesenti et al., 2004). Angelehnt an das Modell der veränderten sensorischen Wahrnehmung wurden von Zeuner et al. ein Verfahren entwickelt, das das Lesen der Braille-Schrift trainiert, was die sensorische Diskrimination verbessert und sich positiv auf die motorische Funktion auswirkt (Zeuner et al., 2005). Gezielte Injektionen mit Botulinumtoxin lindern die Symptomatik, sind jedoch aufgrund der meist

sehr komplexen Störungsmuster weniger erfolgreich als bei der MD. Zusätzlich kann die Anpassung des Schreibgerätes z. B. durch den Einsatz dickerer Griffe, den Umstieg auf das Schreiben am Computer oder das Umlernen des Schreibens mit der anderen Hand hilfreich sein. Häufig kehrt die Symptomatik jedoch nach einiger Zeit wieder, sodass in vielen Fällen ein Beruf mit eingeschränkter Schreibtätigkeit angestrebt werden muss (Volkmann, 2012b).

1.3. Genetisch bedingte Erkrankungen

Schon Anfang des 20. Jahrhunderts beschreibt der englische Arzt Archibald Garrod das gehäufte Auftreten von bestimmten Krankheiten, wie z. B. die metabolische Erkrankung Alkaptonurie, in bestimmten Familien (Garrod, 1923). Bis heute sind etwa 23 000 verschiedene Erkrankungen bekannt, die auf eine genetische Veränderung zurückgeführt werden können (Online Mendelian Inheritance, 2016). Im Folgenden werden genetische Grundlagen beschrieben, die für das Verständnis von Erbkrankheiten relevant sind.

1.3.1. Genetische Grundlagen

Das menschliche Genom ist auf 23 Chromosomen verteilt und setzt sich aus 22 Autosomen und einem Geschlechtschromosom, dem Gonosom, zusammen. Dieser einfache, haploide Chromosomensatz kommt in den Keimzellen vor, während die Körperzellen einen doppelten, diploiden aufweisen, der sich aus jeweils 22 homologen Autosomen des mütterlichen und väterlichen Erbguts und zwei Geschlechtschromosomen (X und Y) zusammensetzt. Etwa 0,1% des Erbguts werden mitochondrial durch die mütterliche Eizelle weitergegeben. Genetische Merkmale können somit autosomal, gonosomal oder mitochondrial vererbt werden.

Zwischen 1993 und 2003 konnte das menschliche Genom durch das *Humane Genome Projekt* entschlüsselt werden. Dabei wurden zwischen 20 000 bis 26 000 verschiedene Gene identifiziert (Venter et al., 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Ein Gen setzt sich aus einem transkribierten Anteil (Exon) und einem nicht-kodierenden Teil (Intron) zusammen. Dazwischen liegen die sog. intergenetischen Abschnitte. Für die Proteinbiosynthese wird die DNA zunächst in die prä-mRNA transkribiert und nach verschiedenen Arbeitsschritten des Spleißens, d. h. des Entfernens der Introns, im Ribosomen in die proteinogene Aminosäuresequenz translatiert. Drei Basen, das sog. Basen-Triplet, kodieren dabei jeweils für eine der 20 Aminosäuren. Aufgrund der Redundanz des genetischen Codes können dabei verschiedene Nukleotidsequenzen

für eine Aminosäure kodieren. So kodiert z. B. die Basenfolge G-G-C ebenso für Glycin, wie G-G-U.

Einzelne Veränderungen der Basenfolge nennt man *Single Nucleotide Variants* (sog. SNVs). Jeder Mensch hat etwa 3 600 000 solcher Varianten, die den individuellen Phänotyp bestimmen (1000 Genomes Project Consortium et al., 2012). Ältere Einteilungen unterscheiden Polymorphismen, Varianten mit einer Häufigkeit >1%, von Mutationen, Varianten mit einer Frequenz von <1% (Brookes, 1999). Die Hypothese, dass seltene Mutationen eher pathogen seien als häufige Polymorphismen, hat sich jedoch nicht bestätigt. Z. B. ist die SNV rs334 im *HBB*-Gen, die bei homozygoter Ausprägung zur Sichelzellanämie führt, in Europa sehr selten, während sie in Afrika in heterozygoter Ausprägung ein häufig auftretender Polymorphismus ist, da sie aufgrund der resultierenden Malariaresistenz einen Selektionsvorteil bietet (Karki et al., 2015). Aktuelle Klassifikationen plädieren deshalb für den einheitlichen Gebrauch des Begriffs „Variante“, der dann genauer unterteilt wird in „pathogen“, „möglicherweise pathogen“, „unklare Signifikanz“, „möglicherweise benigne“ oder „benigne“ (Richards et al., 2015).

Kommt es im Rahmen von SNVs zu Veränderungen der Basenfolge, hat das verschiedene Konsequenzen: Substitutionen, der Austausch einzelner Basen, können stumm erfolgen, da verschiedene Triplets für die gleiche Aminosäuresequenz codieren. Das Einfügen (Insertion) oder der Verlust (Deletion) einzelner Basenpaare dagegen führt, so das Paar kein Vielfaches von drei ist, zu einem Verschieben des Leserasters der Sequenz, einer *frameshift*-Mutation, und damit meist zum Abbruch des Proteins. Wird durch den Austausch einer Base eine andere Aminosäure codiert, spricht man von einer *missense*-Mutation, die die Funktion des Proteins einschränken, verstärken, oder aber keinen Einfluss darauf haben kann. Kommt es zum Abbruch durch ein Stopcodon spricht man von einer *nonsense*-Mutation. Manche Veränderungen werden dabei toleriert, andere können aber bereits eine Krankheit induzieren. Kommt es im Spleißbereich eines Gens zu einer Mutation, kann das dazu führen, dass die prä-mRNA falsch prozessiert wird, da das Spleißosom aufgrund der Falschinformation eine verkürzte oder verlängerte mRNA erzeugt. Infolgedessen wird ein dysfunktionelles oder schädliches Protein translatiert (Rogan et al., 1999). Neben den beschriebenen Mutationsformen gibt es noch viele weitere, auf die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiter eingegangen wird.

1.3.2. Mono- versus komplex-genetische Erkrankungen

Wird eine Erbkrankheit durch die Veränderung in einem einzelnen Gen ausgelöst, spricht man von einer monogenetischen Erkrankung (z. B. Chorea Huntington). Häufiger liegt

einer Erkrankung jedoch eine komplex-genetische Ursache zugrunde. Hierbei spielen einerseits verschiedene endogene Ursachen, wie das Zusammenspiel mehrerer Gene miteinander, und andererseits exogene Einflüsse, wie Stress und Pathogene der Umwelt, eine Rolle (Abb. 1.3; Manolio et al., 2008). Jeder einzelne Faktor erhöht dabei das Risiko zu erkranken, löst diese aber nicht zwangsweise aus (z. B. Schizophrenie; Lill et al., 2010).

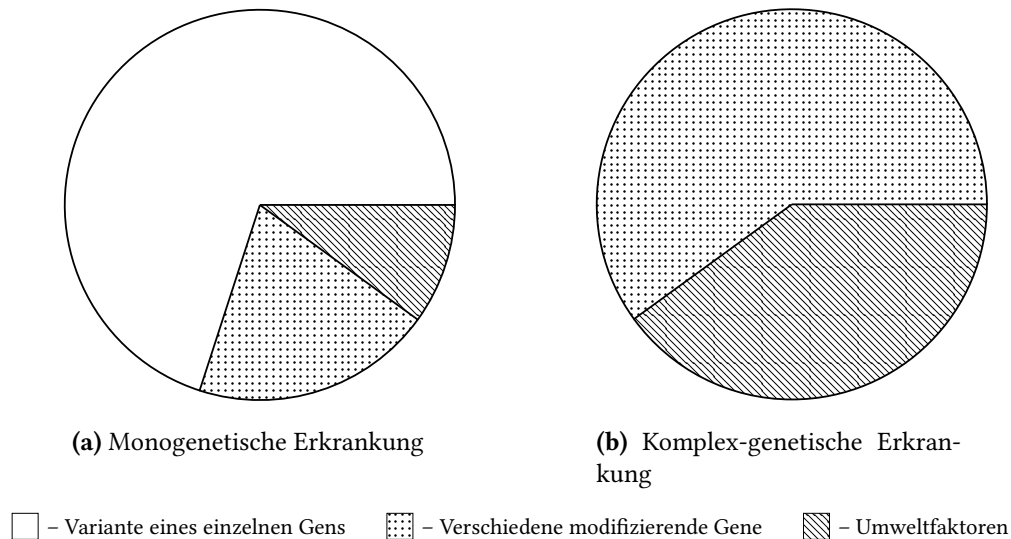


Abb. 1.3.: Einfluss genetischer und umweltbedingter Faktoren auf monogenetische und komplex-genetische Erkrankungen. **(a)** Eine einzelne Variante eines Gens ist der bestimmende Faktor. Verschiedene modifizierende Gene und Umweltfaktoren haben nur einen geringen Einfluss. **(b)** Viele Varianten mit geringer Effektstärke beeinflussen das Erkrankungsrisiko in Verbindung mit verschiedenen Umweltfaktoren (Vgl. Manolio et al., 2008).

Im Falle der MD sind Familien mit mehreren betroffenen Mitgliedern, sog. Multiplex-Familien, rar (Defazio et al., 2007). Möglicherweise spielen genetische Risikofaktoren deshalb pathogenetisch eine größere Rolle als rein monogenetische Ursachen. In den letzten Jahren konnten genomweite Assoziationsstudien (GWAS) mit validem Effekt genetische Risikofaktoren detektieren (Klein et al., 2012). Für Dystonien war vor Beginn dieser Arbeit jedoch keine GWAS publiziert worden. Ein Grund dafür mag die sowohl phäno- als auch genotypische Heterogenität der Erkrankungen sein, weshalb im Rahmen der Lübecker Studie das Augenmerk auf die fokalen, tätigkeitsspezifischen Dystonien, speziell die MD und WD, gelegt wurde.

1.4. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

In den vorangegangenen Jahren rekrutierten Prof. Dr. med. Eckart Altenmüller (Institut für Musikphysiologie und Musikermedizin, IMMM, Hannover), Prof. Dr. med. Hans-

Christian Jabusch (Institut für Musikermmedizin, Dresden) und Prof. Dr. med. Alexander Schmidt (Institut für Neurogenetik, Lübeck) 257 MD-Patienten. Diese wurden klinisch-neurologisch untersucht und mittels Video aufgenommen. Anhand der Daten wurde eine Konsensusdiagnose von den vier Bewegungsstörungsexperten Prof. Dr. med. Eckart Altenmüller, Prof. Dr. med. Johann Hagenah, Prof. Dr. med. Christine Klein und Prof. Dr. med. Alexander Münchau gestellt.

Bei 25% der MD-Patienten wurden nahe Verwandte positiv für dystone Bewegungsstörungen getestet, was die Hypothese einer genetischen Beteiligung stützt (Schmidt et al., 2006; Schmidt et al., 2009; Schmidt et al., 2011). Die Analysen der erstellten Stammbäume weisen darauf hin, dass es sich bei der MD um eine Erkrankung mit monogenetischem, autosomal-dominanten Erbgang handelt. Spezifische Untersuchungen bekannter Dystonie-Gene erbrachten jedoch keinen pathogenetischen Zusammenhang. So wurden keine Mutationen im *DYT6*- und *DYT16*-Gen bei MD-Patienten gefunden (Seibler et al., 2008; Lohmann et al., 2012). Kopplungsanalysen am *DYT7*-Genort konnten bei einer von 11 MD-Familien ausgeschlossen werden, bei den anderen Betroffenen war aufgrund der geringen Anzahl der Familienmitglieder keine Aussage möglich (Schmidt et al., 2009). Bei einem von 184 MD-Patienten, dessen Phänotyp eine komplexe MD und WD aufzeigte, konnte die bekannte GAG-Deletion im *DYT1*-Gen nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2012).

Mit der Entwicklung des *Next-generation Sequencing* (NGS) ist es in den letzten zehn Jahren möglich geworden, mit überschaubar zeitlichem und finanziellem Aufwand nicht nur Ausschnitte bestimmter chromosomaler Regionen zu untersuchen, sondern das gesamte Genom zu sequenzieren und einzelne Varianten zu detektieren. Dafür wurden in dieser Arbeit drei Multiplex-MD-Familien ausgewählt, bei denen jeweils ein Mitglied an der MD und ein oder zwei Familienangehörige an der MD oder einem Schreibkrampf erkrankt waren. Drei Angehörige der Familie A wurde exomsequenziert (ATLAS biolabs GmbH, Berlin). Zwei Mitglieder der Familie B und der Indexpatient der Familie C wurden mittels des NGS genomsequenziert (Complete Genomics, Mountain View, CA, USA). Die dabei im sog. *Calling* detektierten Varianten wurden von den Firmen selbst mit der *Assembly Software* analysiert – dabei werden die Fragment- und Referenzsequenzen miteinander verglichen, um sie einzelnen chromosomalen Regionen zuordnen zu können – und annotiert, d. h. benannt.

Im Rahmen der GWAS wurden 141 nicht-verwandte MD-Patienten von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Katja Lohmann (Institut für Neurogenetik, Lübeck) genomweit genotypisiert. Als Kontrollen dienten 1 214 bereits genotypisierte Proben der PopGen-Kohorte (Krawczak et al., 2006). Im zweiten Schritt wurden die in der Frequenz genomweit signi-

fikant unterschiedlichen SNPs bei zusätzlichen 116 MD-Patienten des IMMM Hannover und 125 gesunden Musikern, zusammengestellt von Prof. Dr. A. Schmidt, repliziert.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit war ich am ersten und zweiten Validierungsschritt der Studie beteiligt, wofür 208 WD-Patienten und 278 gesunde Kontrollen der EPIPARK-Studie Lübeck (Kasten et al., 2013) sowie 1 969 andere Dystoniepatienten und 2 233 ethnisch gematchte Kontrollen auf den genomweit signifikanten SNP ($P < 5 \cdot 10^{-8}$) hin gescreent wurden.

1.5. Zielstellungen der Arbeit

Inhalt meiner Arbeit war es, eine mögliche genetische Beteiligung an der Pathogenese der MD aufzudecken. Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt:

I

Die Identifizierung einer monogenetischen Ursache der MD mittels NGS, wobei das Erbgut dreier Multiplex-MD-Familien untersucht und auf gemeinsame Varianten hin überprüft wurde. Im Anschluss erfolgte ein exonweites Screening von zusätzlichen 238 nicht-verwandten MD-Patienten und 461 gesunden Kontrollen auf das gefundene Kandidatengen.

II

Die Identifizierung genetischer Risikofaktoren, die im Rahmen von komplex-genetischen Zusammenhängen das Risiko an der MD zu erkranken, erhöhen. Hierzu wurde im Vorfeld eine GWAS bei 257 MD-Patienten, 125 gesunden Musikern und 1 214 Kontrollen durchgeführt. Zur Validerung des dabei gefundenen genomweit signifikanten SNPs, wurden nun 208 WD- und 1 969 isolierte Dystoniepatienten sowie insgesamt 2 511 populationsbasierte Kontrollen gescreent.

2. Patienten, Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Identifizierung des genetischen Hintergrundes der MD bei drei Familien (A, B und C) eine Genom- bzw. Exomsequenzierung durchgeführt, auf deren Grundlage die gefundenen Varianten zunächst *in silico* analysiert und gefiltert wurden, um dann durch inter- und intrafamiliäre Überlappung mögliche Kandidatengene zu identifizieren.

Bei einem nicht-verwandten MD-Kollektiv wurde eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) durchgeführt, die der Detektierung möglicher genetischer Risikofaktoren als Ursache komplex-genetischer Hintergründe dient.

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die untersuchten Familien und deren spezifische MD- bzw. WD-Symptomatik beschrieben. Im Anschluss werden die angewandten molekulargenetischen Methoden näher erläutert.

2.1. Patienten und Kontrollen

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Referenznummer: 04-180) genehmigt. Alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Prof. Dr. E. Altenmüller, Prof. Dr. H.-C. Jabusch und Prof. Dr. A. Schmidt, welche eine spezielle Expertise in der Musikermmedizin und den Bewegungsstörungen sowie einen Hochschulabschluss für Musik haben, rekrutierten 257 nicht-verwandte, professionelle Musiker mit diagnostizierter fokaler Dystonie.

Aus diesem Kollektiv wurden drei sog. Multiplex-MD-Familien ausgewählt, bei denen ein oder zwei Familienangehörige der Indexpatienten an der MD oder der WD erkrankt waren. Innerhalb der Familien gab es keinen Anhalt für eine Blutsverwandschaft. Zusätzlich konnten weitere zwei nicht-betroffene Mitglieder der Familie A, drei der Familie B, und zwei der Familie C rekrutiert werden. Prof. Dr. A. Schmidt führte zunächst eine standardisierte Telefonbefragung mittels *Beth Israel Medical Center Dystonia Screen*

(BIDS) durch. Konnten dystone Symptome positiv abgefragt werden, wurden die Patienten klinisch-neurologisch untersucht. Die Ausprägung der Dystonie wurde mittels *Abnormal Involuntary Dystonia Movement Scale* (AIMS) erfasst und ein neuropsychiatrisches Persönlichkeitsprofil (NEO-FFI) zur Extra- und Intraversion, der Ängstlichkeit und der Veranlagung zum Perfektionismus erstellt. Außerdem wurde mit einer Behinderungsskala die Einschränkung im Alltag (*Global Disability Score*) bewertet. Details zu den diagnostischen Tests sind dem Anhang A zu entnehmen. Zusätzlich wurde ein standardisiertes Videoprotokoll angelegt, anhand dessen eine Konsensusdiagnose durch die Neurologen Prof. Dr. E. Altenmüller, Prof. Dr. J. Hagenah, Prof. Dr. C. Klein und Prof. Dr. A. Münchau in den Kategorien Betroffenheitsstatus, Diagnose und Symptomstatus für insgesamt acht MD- und WD-Patienten gestellt wurde.

Weiterhin konnten 208 Patienten mit Schreibkrampf an vier neurologischen Fachzentren in Lübeck, Kiel, Tübingen und Amsterdam durch erfahrene Experten für Bewegungsstörungen rekrutiert werden. Schließlich ist ein Kollektiv von 1 969 Patienten mit verschiedenen fokalen oder segmentalen Formen der Dystonie in Zentren aus Rom, Mailan und Bari (Italien), Sevilla (Spanien), Hamburg, Lübeck und Tübingen (Deutschland), Amsterdam (Niederlande), Belgrad (Serbien), Tokushima und Kyoto (Japan) zusammengestellt worden, welches im letzten Schritt der Assoziationsstudie auf einen genomweit signifikanten SNP ($P < 5 \cdot 10^{-8}$) hin gescreent wurde. Basierend auf der Anamnese, der klinischen Untersuchung und der Abwesenheit atypischer Symptome, wurden alle Patienten der isolierten Dystonie zugeordnet.

Proben aus der PopGen-Kohorte (Krawczak et al., 2006) dienten als gesunde, populationsbasierte Kontrollen für den initialen Schritt der Genotypisierung der GWAS. Um eine mögliche Assoziation mit einem „Musiker-Gen“ auszuschließen, wurden für die Replikation 125 gesunde deutsche Musiker rekrutiert, welche sich einem persönlichem Interview mit standardisierten Fragebögen, die Fragen zu Dystonieerkrankungen und dem medizinischen Befinden beinhalteten, als auch einer kurzen neurologischen Untersuchung unterzogen. Desweiteren wurden 461 populationsbasierte gesunde Probanden der EPIPARK-Studie Lübeck (Kasten et al., 2013) eingeschlossen, welche als Kontrollen sowohl in der Validierungsphase der GWAS bei WD-Patienten, als auch für die Frequenzanalyse möglicher Kandidatenvarianten aus dem NGS genutzt wurden. Weiterhin konnten für die zweite Validierungsphase der GWAS bei isolierten Dystoniepatienten 2 233 ethnisch gematchte Kontrollen der o. g. Partnerinstitute aus Italien, Spanien, Deutschland, der Niederlande, Serbien und Japan rekrutiert werden. Eine Übersicht aller untersuchten Patientenkollektive ist der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tab. 2.1.: Übersicht der untersuchten Patientenkollektive

		Patienten		gesunde Kontrollen
		MD	WD	
mono- genetisch	Familie A	1	2	2
	Familie B	1	2	3
	Familie C	1	mgl. 1	2
	nicht-verwandtes Kollektiv	238	-	461 ^a
komplex- genetisch	GWAS	141	-	1 214 ^b
	Replikation	116	-	125 ^c
	1.Validierung	-	208	278 ^a
	2.Validierung	1 696 isol.	Dystonie	2 233

Es sind die im monogenetischen Ansatz untersuchten drei Kohorten „familiäre MD“, „nicht-verwandtes MD-Kollektiv“ und „gesunde Kontrollen“ der ^aEPIPARK-Studie (Kasten, 2013), sowie die in den unterschiedlichen Phasen der GWAS untersuchten Patienten des komplex-genetischen Ansatzes gezeigt. ^bgesunde Kontrollen der PopGen-Kohorte (Krawczak, 2006); ^cgesunde Musiker; mgl. – möglich; isol. – isoliert

Multiplex-MD-Familien

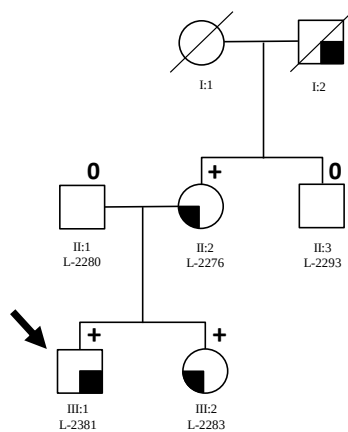
Für die Genom- bzw. Exomsequenzierung standen aus den ausgewählten drei Multiplexfamilien insgesamt sechs Patienten zur Verfügung. Im Folgenden wird die MD-spezifische Symptomatik der Indexpatienten der Familien A, B und C erläutert.

Die deutschstämmige Familie A zählt 14 Familienmitglieder (Abb. 2.1 a). Der erstellte Familienstammbaum umfasst drei Generationen, wobei die Familienmitglieder der ersten Generation bereits verstorben sind. Zu diesen wurden fremdanamnestiche Daten zum Krankheitsstatus und weiteren Vorerkrankungen durch Befragung der Familienmitglieder eingeholt. Der Indexpatient (L-2381) ist Arzt und diplomierter Musiker. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war er 40 Jahre alt. Mit 27 Jahren begannen die ersten Symptome einer fokalen Handdystonie, bei der sich der dritte bis fünfte Finger der rechten Hand beim Klavierspiel unwillkürlich einrollen und verkrampfen (Abb. 1.1a). Zusätzlich entwickelten sich über die Dauer der Erkrankung eine Ungeschicklichkeit, sowie unwillkürliche Bewegungen beider Hände, zunehmend auch unabhängig vom Klavierspiel in Alltagssituationen. Bei der neurologischen Untersuchung des Patienten (L-2381) durch Prof. Dr. A. Schmidt fielen ein beidseitiger Tremor der Hände und orofaziale Dyskinesien auf. Verschiedene therapeutische Ansätze kamen in den Jahren der Erkrankung zum Einsatz: eine Medikation mit Artane, Injektionen mit Botulinumtoxin und ergonomische Maßnahmen durch Anlage einer Fingerschiene. Die Schwester (L-2283) und die Mutter

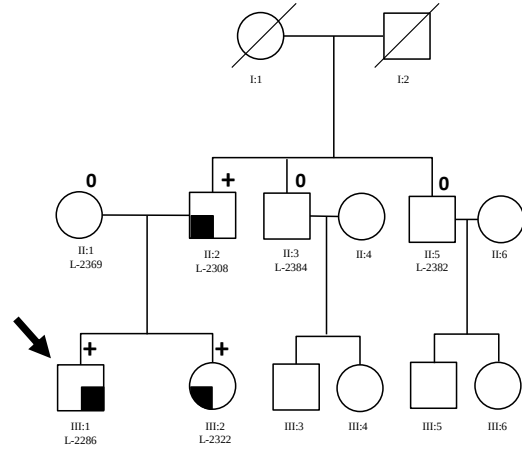
(L-2276) sind seit dem 30. bzw. 28. Lebensjahr am Schreibkrampf erkrankt. Zusätzlich wurden der Vater (L-2280) und Onkel mütterlicherseits (L-2293) auf das Vorhandensein dystoner Symptomatik mittels der BIDS untersucht und negativ befundet. Anamnestisch berichtete der Indexpatient von seinem Großvater mütterlicherseits, der als professioneller Musiker ebenfalls dystone Symptome zeigte. Dieser war jedoch zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits verstorben.

Der Indexpatient der Familie B (L-2286) ist ebenfalls ärztlich tätig und aktiver Gitarrist im Amateurbereich. Seit dem 24. Lebensjahr treten in der rechten Hand dystone Symptome beim Instrumentalspiel auf, sodass der Patient zunächst auf eine Linkshändergitarre umlernte. Nach kurzer Zeit traten jedoch auch in der linken Hand eine Flexion des dritten Fingers sowie eine kompensatorische Extension des zweiten Fingers auf. Zusätzlich zeigte sich in Auftrittssituationen ein beidseitiger Tremor. Der Patient verspürte zudem auch beim Schreiben und Tippen am Computer eine Verkrampfung der rechten Hand, was allerdings in der neurologischen Untersuchung nicht sichtbar war. Sowohl die Schwester (L-2322), als auch der Vater (L-2308) sind Schreibkrampfpatienten (Abb. 2.1 b). Zusätzlich konnten die Mutter (L-2369) und zwei Onkel väterlicherseits (L-2384 und L-2382) für die Studie rekrutiert werden. Sie wurden ebenfalls mittels BIDS untersucht, jedoch negativ befundet.

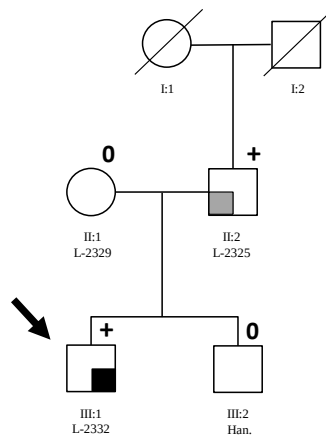
Die Familie C stammt ursprünglich aus den Niederlanden (Abb. 2.1 c). Der Indexpatient (L-2332) ist Klavierlehrer. Am Instrument treten eine Daumenadduktion und Flexion des zweiten bis fünften Fingers der rechten Hand auf. Im Laufe der Erkrankung entwickelte er zusätzlich eine Beugung im Handgelenk und Abduktion der Schulter, was auch beim Schreiben auffiel. Im Verlauf der Erkrankung bereitete zudem auch die linke Hand Probleme. In der Untersuchung zeigten sich ein Tremor und gelegentliches Stottern. Therapeutisch wurden Artane, Botox-Injektionen und Physiotherapie versucht, jedoch mit mäßigem Erfolg. Der Vater (L-2325) wies eine mildere Symptomatik mit subjektiver Anspannung der rechten Hand beim Schreiben sowie ein späteres Erkrankungsalter von 55 Jahren auf und wurde deshalb in der Consensus Diagnose der o. g. Bewegungsstörungenexperten als „möglich erkrankt“ klassifiziert. Außerdem wurden die Mutter (L-2329) und auch der Bruder (Han.) mittels BIDS gescreent – in beiden Fällen negativ. Eine ausführliche Zusammenstellung zum Erkrankungsalter, der Beschwerdesymptomatik, den Vor-erkrankungen und durchgeführten Therapiemaßnahmen zeigt die Tabelle 2.1.



(a) Familie A



(b) Familie B



(c) Familie C

Abb. 2.1.: Stammbäume der Familien A, B und C. Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol gekennzeichnet. Definitiv Betroffene werden schwarz, möglich Betroffene grau markiert, wobei die Füllung rechts einen MD-Patienten charakterisiert, links einen WD-Patienten. Die L-Nummern benennen die für die genetischen Untersuchungen verfügbaren DNA-Proben. Die Nummern I-III geben die Generationen, die nachfolgenden Zahlen 1-6 die einzelnen Personen in den Generationen des Familienstammbaums wieder. Der Pfeil kennzeichnet den Indexpatienten. Die mit „0“ bezeichneten Mitglieder wurden von Prof. Dr. A. Schmidt mittels BIDS untersucht und negativ befundet, diejenigen mit einem „+“ wurden klinisch-neurologisch untersucht und mittels Videoprotokoll, AIMS und Behinderungsscale eingeschätzt (Tab. 2.1).

Tab. 2.2.: Patientendaten der Familie A, B und C

Familie	Code	Geschl.	Untersuchungsalter in Jahren	Diagnose	Erkrankungsalter in Jahren	Symptome	Triggerfaktoren ^a	BIDS	AIMS ^b	Behinderung ^c	Therapie
A	L-2381	♂	40	MD	27	Flexion 3.-5. Finger re. Hand, bds. Handtremor, orofaziale Dyskinesien	Schmerz, Nervenkompression	n.u.	4	1	Artane, Botox, Fingerschiene, Latexhandschuh
	L-2283	♀	42	WD	30	Flexion 4./5. Finger re. Hand, zervikale Dystonie, okulofaziale Dyskinesie	Zeit	n.u.	2	1	Botox, Cipralex
	L-2276	♀	74	WD	28	Flexion re. HG, Athetosis, okulofaziale Dyskinesien	Zeit	n.u.	9	2	Schreibübungen
B	L-2286	♂	45	MD	24	Flexion 3. und Extension 2. Finger li. Hand, Aufttrittstremor, Schreibkrampf	-	n.u.	7	1	Botox, autogenes Training
	L-2322	♀	46	WD	33	Extension HG und Unterarms, segmentale brachiale Dystonie, orofaziale Dystonie	Zeit	n.u.	11,5	2	Physiotherapie
	L-2308	♂	71	WD	20	Flexion re. HG, Anspannung re. Arms	-	positiv	2	1	-
C	L-2332	♂	48	MD	31	Daumenadduktion und Flexion 2.-5. Finger re. Hand, Beugung im HG, Abduktion der Schulter, dystone Haltung li. Hand, bds. Tremor	-	n.u.	18	2	Artane, Botox, Physiotherapie
	L-2325	♂	84	mg.l. WD	55	subjektive Verkrampfung der re. Hand beim Schreiben	Schmerz	n.u.	1	1	-

^a Als Triggerfaktoren gelten Reize, welche die Symptomatik auslösen oder verstärken, wie z. B. ein erhöhtes Übe- oder Schreibpensum (Faktor „Zeit“) und Schmerzen. ^b *Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS)*: Score, der sich aus der Provozierbarkeit (0-4 Punkte: keine Dystonie, Dystonie bei Bewegung bis Dystonie in Ruhe), dem Ausmaß (0-4 Punkte: keine, milde bis schwere Dystonie) und der Verteilung (1-12 Punkte: fokal, segmental bis generalisiert) der dystonen Symptome zusammensetzt. ^c *Disability Score (Behinderung)*: 0 = keine Dystonie, 1+ = mild, geringe funktionelle Beeinträchtigung, 2+ = mäßig, funktionelle Beeinträchtigung oder deutliche dystone Bewegung vorhanden, 3+ = schwer, Rollstuhl erforderlich oder starke unangenehme dystone Spasmen vorhanden. Geschl. – Geschlecht; n.u. – nicht untersucht; HG – Handgelenk

2.2. Material

2.2.1. Chemikalien

Substanz	Firma
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (10%)	Sigma-Aldrich
Betain (5M)	Sigma Aldrich
Desoxyribonukleotide (10mM)	Qbiogene (MP)
Ethanol (96%)	J.T.Baker
Exonuclease I (20U/ μ l)	Thermo Scientific
ExoSAP-IT	USB
Harnstoff	USB
HiDi-Formamid	Applied Biosystem
HPLC-Wasser	Merck
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen
Midori Green	Nippon Genetics
Molekulargewichtsstandard (100bp)	Invitrogen
Natrium-Acetat	Merck
Natrium-Chlorid (6M)	Merck
Oligonukleotide/Primer (10 μ M)	MWG Biotech
Taq-DNA-Polymerase (5U/ μ l)+Puffer	Qbiogene

2.2.2. Kits

Substanz	Firma
Gel Extraction Kit 250	Qiagen
Big Dye Terminatormix v3.1 Sequencing Standard Kit	Applied Biosystem
GC-Rich PCR System	Roche
RNA Extraction Kit	Quiagen
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Fermentas

2.2.3. Lösungen

Substanz	Zusammensetzung
Lyse-Puffer (10x/500ml)	10mM Tris/HCl (pH 8,0)
	400mM NaCl
	0,2mM EDTA (pH 8,0) – steril gefiltert
Formamid-Farbstoff	47,5 ml Formamid
	2ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
	0,01g Bromphenolblau
TBE-Puffer (10x)	890mM Tris
	890mM Borsäure
	20mM EDTA
TE-Puffer (1x) – autoklaviert	10mM Tris/HCl (pH 8,0)
	1mM EDTA (pH 8,0)
Polyacrylamid-Gel	6ml 30%ige Acrylamidlösung
	3ml 10x TBE-Puffer
	3g Harnstoff
	30ml dH ₂ O
	13,4µl Tetramethylethylenylendiamin
Agarose-Gel	400ml 1x TBE-Puffer
	6g Agarose
	20µl Midori Green

2.2.4. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Contifuge stratos	Heraeus
Genetic Analyzer 3130xl und 3500xl	Applied Biosystems
IR-DNA Sequenzierer 4200	Li-COR
Thermocycler PTC 200	Biozym
Thermocycler MJ Mini	BIO-RAD
Transilluminator	Biostep

2.2.5. Software

Bezeichnung	Herausgeber
CADD	University of Washington und Hudson-Alpha Institute for Biotechnology (online verfügbar unter http://cadd.gs.washington.edu/)
Ensembl	The European Bioinformatics Institute und Wellcome Trust Sanger Institute (http://www.ensembl.org/index.html)
ExAC Browser	Exome Aggregation Consortium (http://exac.broadinstitute.org/)
Exome Variant Server	NHLBI Grand Opportunity Exome Sequencing Project (http://evs.gs.washington.edu/EVS/)
Gene Runner v5.1	Frank Buquicchio, Helio Genetics
GraphPad Prism 6	GraphPad Software
MutPred	The Buck Institute for Research on Aging und Department of Computer Science and Informatics Indiana University (http://mutpred.mutdb.org/)
Mutation Surveyor v3.30	Soft Genetics
MutationTaster	Markus Schuelke, Jana Maria Schwarz und Dominik Seelow, Exzellenzcluster NeuroCure und Neuropädiatrie der Charité (http://www.mutationtaster.org/)
Oligo Explorer v1.1.0	Gene Link
OMIM	Johns Hopkins University (http://www.omim.org/)
Polyphen-2	Ivan Adzhubey, Biobyte Solutions (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)
PRIMER3	Whitehead Institute for Biomedical Research (http://primer3.ut.ee/)
PubMed	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)
SequenceAnalysis 5.2	Applied Biosystems
UCSC In-Silico PCR	Jim Kent (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr)

2.3. Methoden

Auf der Suche nach monogenetischen Ursachen der MD wurde das Genom bzw. Exom von sechs Mitgliedern dreier MD-Familien mittels *Next-generation Sequencing* (NGS) aufgeschlüsselt. Die detektierten Varianten wurden systematisch gefiltert und die verbliebenen Kandidatengene dann mittels Resequenzierung und Segregationsanalysen validiert. Jene Kandidatengene, welche alle Qualitätskontrollen bestanden, wurden in einem Kollektiv von 238 nicht-verwandten MD-Patienten und 461 gesunden Kontrollen auf weitere Mutationen hin gescreent.

2.3.1. Next-generation Sequencing

Bedurfte die Entschlüsselung des ersten menschlichen Erbguts mittels Didesoxynukleotid-Sequenzierung nach Sanger noch hunderte Wissenschaftler, 12 Jahre Arbeit und Kosten von rund drei Milliarden Dollar (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), ist es heutzutage möglich, das Genom eines Menschen innerhalb von 24 Stunden und für rund 1000 Dollar zu sequenzieren (Muzzey et al., 2015). Somit auch für den Einsatz im klinischen Alltag erschwinglich geworden, werden NGS-basierte Tests verwendet, um seltene genetische Erkrankungen (Yang et al., 2014) oder das Krebsrisiko eines Menschen (Newman et al., 2014) zu überprüfen.

Der Begriff NGS beschreibt dabei keine spezifische Technologie, sondern ist vielmehr eine Sammlung verschiedener post-Sanger-Sequenzierungsmethoden. Allen gemein ist die *Sequencing-by-Synthesis*-Methode, bei der die Reaktionsschritte Nukleotidaddition und -detektion parallel ablaufen. Millionen DNA-Fragmente, sog. *Reads*, können so simultan sequenziert werden.

Die Funktion des für die Exomsequenzierung dieser Arbeit verwendeten *Illumina Genome Analyzer*, basiert auf dem Brückensyntheseprinzip. Hierbei werden die zu sequenzierenden DNA-Stränge an Adapter geknüpft und auf eine Trägerplatte aufgebracht. Die Adapter binden an der Oberfläche – unter Zugabe von dNTPs und Enzymen werden die Einzelstränge amplifiziert. Jedes dNTP ist dabei mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und wird, nach dem Einbau durch die Polymerase, am freien 3'-OH-Ende der Ribose chemisch geblockt, um die Amplifikation zu stoppen. Ungebundene Reagenzien werden weggespült und das fluoreszierende Signal aufgenommen. Im Anschluss werden sowohl der Farbstoff als auch der 3'-OH-Block chemisch entfernt und der DNA-Strang um eine weitere Base erweitert. Die Länge der so entstehenden DNA-Fragmente ist abhängig von der eingesetzten Technologie und beträgt zwischen 125 bis 300 Basen-

paaren (Illumina, 2016). Sie werden im nächsten Schritt im Vergleich mit einer Referenzsequenz zusammengefügt und analysiert. Mithilfe von Datenbanken, wie der des HapMap-Projekts oder 1000Genome (International HapMap-Consortium, 2007; 1000 Genomes Project Consortium et al., 2010), in denen Veränderungen des menschlichen Genoms gespeichert sind, ist es möglich, SNPs, Insertionen, Deletionen oder Duplikationen zu detektieren.

2.3.2. In Silico-Analyse – auf der Suche nach der Nadel im Heuhaufen

Die rasante technische Entwicklung im Bereich der DNA-Sequenzierung und der Genotypisierungs-Array-Technologie ermöglicht es, innerhalb weniger Tage einzelne Veränderungen in der Basenabfolge des Genoms mit hoher Präzision zu detektieren. Jedoch bleibt die Frage, wie man die enorme Menge an erhaltenen Daten auswertet und interpretiert (Kuhlenbäumer et al., 2011).

Der in dieser Arbeit angewandte Filteralgorithmus ist folgender:

1. Ausgehend davon, dass der exonische Bereich für die Kodierung der Aminosäuresequenz zuständig ist, werden alle Varianten daraufhin gefiltert.
2. Die Varianten sind nicht-synonym, d. h. sie führen zu einem Aminosäureaustausch, einer Proteinstrukturänderung oder einer Spleiß-Mutation.
3. Die Varianten sollten unbekannt oder selten sein, d. h. sie sollten nicht in Datenbanken (z. B. dbSNP) enthalten sein oder bei Kontrollen mit einer Häufigkeit (Frequenz) $<1\%$ vorkommen.
4. Die Varianten segregieren mit dem pathologischen Phänotyp innerhalb einer Familie.
5. In unterschiedlichen MD-Familien treten Varianten in dem selben Gen auf.

Die verbliebenen Varianten, sog. Kandidatengene, wurden resequenziert und auf ihre Echtheit hin überprüft. Außerdem erfolgte eine Frequenzanalyse in einem gesunden Kontrollkollektiv ($n=461$). Zusätzlich wurden Blutproben betroffener und nicht-betroffener Familienangehöriger auf das Segregationsverhalten untersucht (Abb. 2.2).

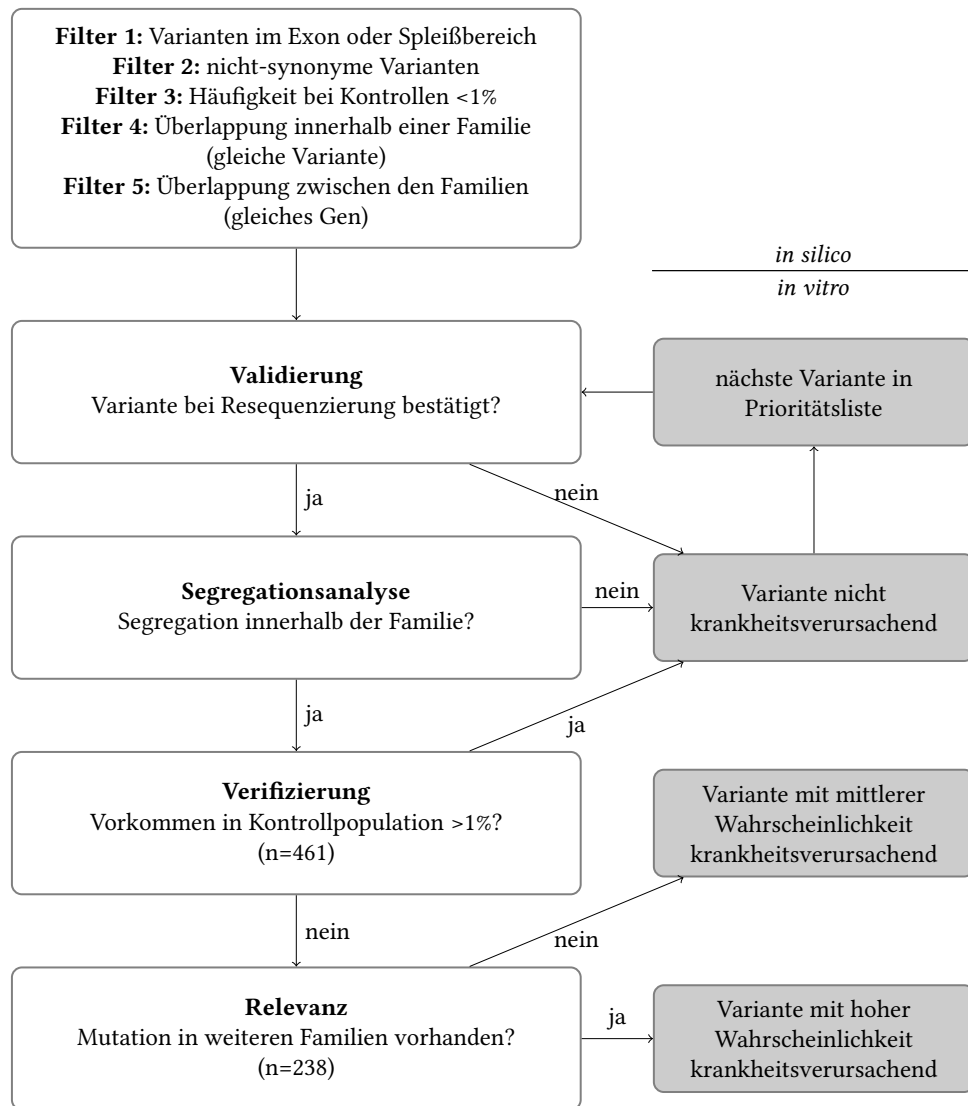


Abb. 2.2.: Algorithmus zur Validierung und Verifizierung der mit Genom- bzw. Exomsequenzierung gefundenen Varianten. Die Filterschritte 1-5 erfolgten dabei *in silico*, die anschließende Validierung mittels Sanger-Sequenzierung, die Segregationsanalyse innerhalb der Familie, die Verifizierung im gesunden Kontrollkollektiv und das Screening eines nicht-verwandten MD-Kollektivs *in vitro*.

Zusätzlich können Mutationsprädiktionsprogramme die Wahrscheinlichkeit voraussagen, mit der eine Variante funktionelle Effekte auf die Proteinsequenz hat (Ng, 2006; Kircher et al., 2014). Die in dieser Arbeit verwendeten Programme sind Poly-Phen-2 (Adzhubei et al., 2010), MutationTaster (Schwarz et al., 2014), MutPred (Li et al., 2009) und der CADD-Score (Kircher et al., 2014).

2.3.3. Primerdesign

Für die Sequenzierung der Kandidatengene wurde jeweils ein Vorwärts (F)- und Rückwärts (R)-Primer mit Hilfe der OLIGO-Software (Kuulasmaa, 2002) bzw. PRIMER3 (Untergasser et al., 2012) entworfen. Dazu wurde die Variante flankierende Sequenz in der UCSC-Sequenzdatenbank (Kent et al., 2002) – plus/minus 300bp – ermittelt. Folgende Kriterien waren beim Entwurf der Primer zu berücksichtigen:

1. Primerlänge zwischen 18 und 25 Basenpaaren.
2. *Annealing*-Temperatur zwischen 51 und 61 °C.
3. Die *Annealing*-Temperatur des F- und R-Primers sollte nicht mehr als 1 °C Unterschied betragen.
4. Der Primer sollte ein freies 3'-Ende aufweisen, um keine Paarbildung mit dem F- oder R-Primer einzugehen.
5. So möglich, sollte der Primer am 3'-Ende die Basen Guanosin oder Cytosin aufweisen, um so die Bindung des Primers an das DNA-Fragment durch Ausbildung dreier Wasserstoffbrücken zu erhöhen.
6. DNA-Abschnitte mit bekannten Polymorphismen werden vermieden, um die Spezifität der Primerbindung zu optimieren.

Die erstellten Primer wurden bei Eurofins MWG bestellt und im weiteren Verlauf auf ihre optimale Bindungstemperatur hin untersucht. Genaue Informationen zur Größe, verwendeten Sequenz und *Annealing*-Temperatur sind der Tabelle D.4-6 des Anhangs zu entnehmen. Im Anschluss wurden die gewünschten Exonabschnitte und angrenzenden Introns der Kandidatengene mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt und die so gewonnenen Produkte zur Bestimmung der DNA-Länge und ausreichenden Menge auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.3.4. Polymerase-Kettenreaktion

Um einen bestimmten Genabschnitt einer Probe zu sequenzieren, benötigt man die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der ein durch die spezifisch bindenden Primer genau selektiertes DNA-Fragment aus einer heterogenen Mischung exponentiell vermehrt werden kann. Der PCR-Zyklus besteht aus den Abschnitten Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Dieser Zyklus wird abhängig vom Protokoll mehrmals wiederholt.

1. **Denaturierung:** Zunächst wird die Lösung auf 95 °C erhitzt, was dazu führt, dass die Wasserstoffbrückenbindungen des DNA-Doppelstrangs und die komplementären Bindungen der Primerpaare untereinander aufgebrochen werden.
2. **Primeranlagerung:** Beim sog. *Annealing* lagern sich nun die Primer an die DNA-Einzelstränge an. Dieser Schritt ist temperaturabhängig – die Temperatur, bei der der Primer spezifisch an die DNA bindet wird auch als *Annealing*-Temperatur bezeichnet.
3. **Die Elongation:** Im Folgenden wird die Temperatur der Lösung wieder angehoben, um die Synthese des komplementären Stranges durch die hitzestabile taq-Polymerase in 5'–3'-Richtung mittels der vier verschiedene Desoxyribonukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, die sich ebenfalls im Ansatz befinden, zu ermöglichen.
4. **Denaturierung:** Durch erneute Temperaturerhöhung wird der Prozess abgeschlossen und die neu synthetisierten Stränge werden nun als Matrize für den nächsten Zyklus genutzt. Innerhalb kurzer Zeit kann so eine einzelne DNA-Sequenz zu einer detektierbaren, sequenzierbaren Menge vermehrt werden.

Tab. 2.3.: Ansatz der Standard-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen in μl
dH ₂ O	-	-	4,23
dNTPs	1 mM	0,2 mM	3
Puffer	10x	1x	1,5
F-Primer	10 μM	0,4 μM	0,6
R-Primer	10 μM	0,4 μM	0,6
taq-Polymerase	5 U/ μl	0,023 U/ μl	0,07
DNA	10 ng/ μl	3,3 ng/ μl	5
Gesamtansatz			15

Standard-PCR-Programm:

5min - 95°C

30sek - 95°C	} 35 Zyklen
30sek - 55°C (abh. vom jeweiligen Primer)	
45sek - 72°C	

10min - 72°C

4°C Endtemperatur

2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung der gewonnenen PCR-Produkte nach ihrer Länge. Dabei entsteht in der mit TBE-Puffer beladenen Gelkammer durch Anlegen einer Spannung ein elektrisches Feld, in dem die negativ geladene DNA anfängt zu wandern, wobei kleinere Produkte schneller durch das Gel in Richtung der Kathode fließen als größere.

1. Suspendieren von 6 g Agarose mit 400 ml 1x TBE-Puffer (1,5%).
2. Aufkochen der Lösung und Zugabe von 20 μ l Midori Green.
3. Einfüllen der Lösung in eine mit Kämme bestückte Agarosekammer und Erkaltenlassen des Gels. Die Kammzähne bilden im Verlauf Vertiefungen, in die das PCR-Produkt pipettiert werden kann.
4. Einlegen des Gels in eine mit TBE-Puffer befüllte Gelkammer.
5. Entnahme von 3 μ l des PCR-Produkts und Versetzen der Proben mit 3 μ l Formamid (FA)-haltigem Farbstoff.
6. Einpipettieren der 6 μ l Probelösung in die Geltaschen, sowie Auftragen von 4 μ l eines Längenstandards (Standard-100-Basenpaarleiter).
7. Elektrophorese bei 120 V für 20 min.

Das im Gel enthaltende Midori Green interkaliert mit den DNA-Doppelsträngen, sodass die Substanz bei Anregung durch UV-Strahlung fluoresziert. Die PCR-Produkte werden so als Banden sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Fotokamera und eines angeschlossenen Bildverarbeitungsprogramms (BioDocAnalyse, Biometra) aufgenommen und ausgedruckt.

2.3.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Einzelne Kandidatengene wurden mit Hilfe des LiCOR-Systems ausgewertet. Dabei laufen fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte durch ein Polyacrylamidgel (PAGE) und werden von einem Infrarot-Laser mit einer Auflösung bis auf eine Base Längenunterschied detektiert. Dem PCR-Ansatz wurden zu Beginn F-Primer zugesetzt, die an ihrem 5'-Ende über eine M13-Sequenz verlängert wurden. Außerdem wurde ein Infrared-Dye-(IRD)800-markierter M13-Primer hinzugefügt, welcher den Farbstoff Heptamethincyanin enthält, der bei einer Wellenlänge von 795 nm sein Absorptionsmaximum hat (DNA Sequencing Manual, 1999).

Tab. 2.4.: Ansatz der PCR mit fluoreszierenden Markern

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen in μl
dH ₂ O	-	-	2,08
dNTPs	1 mM	0,2 mM	1
Puffer	10x	1x	0,5
F-Primer	10 μM	0,12 μM	0,06
R-Primer	10 μM	0,12 μM	0,06
M13-Primer (IRD800- markiert)	10 μM	0,1 μM	0,05
taq-Polymerase	5 U/ μl	0,05 U/ μl	0,05
Betain	-	-	0,2
DNA	10 ng/ μl	2 ng/ μl	1
Gesamtansatz			5

Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden denaturiert und dann auf das Gel aufgetragen, in welchem sich eine Harnstofflösung befindet, die verhindert, dass die DNA Sekundärstrukturen bildet. Der sich im Plattensequenziergerät (LiCOR) befindende Laser detektiert die vorbeifließenden PCR-Produkte und zeichnet Banden je nach Produktgröße auf. Als Kontrolle wurden zwei CEPH-Proben mit bekannter Allelgröße amplifiziert und mit auf das Gel aufgetragen. Das Bild des Gels wurde zur Auswertung in ein Bildbearbeitungsprogramm importiert, ausgedruckt und schließlich per Hand ausgewertet. Durchführung der PAGE:

1. Versetzen von 30 ml denaturierender Polyacrylamid-Gellösung mit 180 μl Ammoniumpersulfat.
2. Gießen des Polyacrylamidgels zwischen zwei Glasplatten (25 cm x 22,5 cm x 0,4 cm).
3. Befestigen der Pufferkammer an der Oberseite der Platte und Einstecken eines Kamms in die Oberkante des Gels. Hier werden im weiteren Verlauf die Proben hineinpipettiert.
4. Einhängen der Platten in eine Pufferkammer im LiCOR-System. Füllen der Pufferkammern mit TBE-Puffer, sodass Ober- und Unterkante des Gels umspült sind. Versetzen der PCR-Produkte mit FA-Farbstoff (10 μl bei 800 nm-Produkten).
5. Denaturieren der PCR-Produkte bei 95 °C für vier Minuten, um DNA-Einzelstränge zu gewinnen. Der Farbstoff erleichtert zum einen das Auftragen der Proben auf das

Gel, zum anderen verhindert er die Renaturierung der DNA. Aufbewahrung der denaturierten Proben auf einem Eisblock.

6. Auftragen von etwa 1,5 μ l Probe pro Tasche.

7. Laufenlassen der Proben bei 45 °C und 35 W über zwei Stunden.

Im Anschluss wurde der Genotyp der analysierten Proben bestimmt. Im Internet kann die Produktgröße der verwendeten CEPH-Kontrollen eingesehen (Marshfield Clinic Research Foundation, 2013) und so die Größe der zu analysierenden Proben ermittelt werden. Ist eine Person für ein Merkmal heterozygot, d. h. die Allele werden von Mutter und Vater unterschiedlich vererbt, zeigen sich auf dem Gel aufgrund der unterschiedlichen Produktgröße zwei Banden. Homozygote Merkmalsträger weisen dagegen nur eine Bande auf.

2.3.7. Sanger-Sequenzierung

Das durch Fred Sanger etablierte Kettenabbruchverfahren ermöglicht es, die Abfolge der DNA-Basen in einer Gensequenz zu bestimmen und einzelnen Variationen nachzuweisen (Sanger et al., 1977). 5 μ l des wie in 2.3.4 erhaltenen PCR-Produkts wurden im Folgenden mit 2 μ l ExoSAP-Lösung aufgereinigt. Diese enthält in Puffer gelöste Endonuclease I, welche überstehende Einzelstrang-DNA entfernt, sowie Shrimp Alkaline Phosphatase, die die restlichen dNTPs verdaut.

ABI37-Programm:

15min - 37°C

15min - 85°C

4°C Endtemperatur

Die aufgereinigte PCR wurde nun für die Sequenz-PCR weiterverarbeitet. Hierzu wurde der jeweilige F- oder R-Primer hinzugefügt, um beide DNA-Stränge separat auf Basenveränderungen hin untersuchen zu können. Außerdem wurde ein Terminatormix, bestehend aus taq-Polymerase, den vier dNTPs (dATP, dTTP, dGTP und dCTP) sowie Didesoxynukleotide (ddNTPs), welche statt einer Hydroxylgruppe nur ein H⁺-Atom am 3'-Ende besitzen, dazugegeben. Die Polymerase kann an diese ddNTPs keine Phosphodiesterbindung anknüpfen, weshalb es zum Kettenabbruch kommt. Statistisch wird die Didesoxyform an allen Positionen eingebaut, sodass die Synthese überall einmal abbricht. Die so entstehenden unterschiedlich langen DNA-Fragmente besitzen an ihrem Ende also ein bestimmtes ddNTP, welches mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist.

Tab. 2.5.: Ansatz der Sequenz-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen in μl
dH ₂ O	-	-	5,5
Puffer	5x	0,75x	1,5
F-Primer	10 μM	0,5 μM	0,5
Terminatormix 3.1	-	-	0,5
ExoSAP-Produkt	-	-	2
Gesamtansatz			10

Sequenz-Programm:

1min bei 96°C

10sec bei 96°C	} 25 Zyklen
60sec bei 60°C	

4°C Endtemperatur

Die übrigen Reagenzien wurden von dem Sequenzprodukt durch Zugabe von Natriumacetat-Ethanol-Lösung in einer Fällungsreaktion getrennt, indem die Hydrathülle der DNA verkleinert und damit die Löslichkeit herabgesetzt wurde.

1. 10 μl Produkt, 10 μl H₂O, 2 μl 5 M NaAc und 50 μl 96% EtOH mischen.
2. 15min bei Raumtemperatur stehen lassen.
3. 15min bei 1300 upm zentrifugieren.
4. Überschuss abziehen.
5. 50 μl 70% EtOH dazugeben.
6. 10min bei 1300 upm zentrifugieren.
7. Alkohol bei 56°C verdampfen lassen.
8. 15 μl HiDi-Formamid zugeben und bei 37°C mindestens 3 Stunden lösen oder über Nacht im Kühlschrank lagern (*Cave*: lichtempfindlich).

Das Sequenzieren und Auswerten der gereinigten Produkte erfolgte mit Hilfe der Sequenzer *Genetic Analyzer 3130XL* und *3500XL*. Die Produkte werden dabei vom Gerät in dünne, gelgefüllte Glaskapillaren pipettiert, durch die die Proben je nach Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandern. Ein Laser detektiert die mit dem Farbstoff markierten ddNTPs. Jede Farbe codiert dabei für eines der vier Nukleotide (A – grün, C

– blau, G – schwarz, T – rot). Anhand der Farbabfolge kann dann auf die Anordnung der Basen geschlossen werden.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte in mehreren Schritten: zunächst wurde die Qualität mit dem Softwareprogramm *Sequence Analysis 5.2* bewertet, wobei die vom Laser detektierten Farbsignale in eine äquivalente Farbkurve umgewandelt wurden. Die Höhe der Kurve gab dabei Aufschluss über die Quantität des Produkts: eine hohe Kurve entsprach einer großen Produktmenge, eine niedrige Kurve einer geringen. Ein zu starkes Signal enthielt demnach zu viel PCR-Produkt und konnte durch Zugabe von Wasser oder einer verkürzten Injektionszeit reduziert werden. Vice versa konnte ein zu schwaches Signal durch Verlängerung der Injektionszeit oder durch eine erhöhte Menge an PCR-Produkt verbessert werden.

Qualitativ gute Sequenzen wurden mit Hilfe der Software *Mutation Surveyor Local v3.25* ausgewertet. Dabei wurde die untersuchte Sequenz mit einer Referenzsequenz verglichen und auf Veränderungen hin untersucht. Da die MD in den drei Multiplex-Familien einem autosomal-dominanten Erbgang folgt, sollte die gefundene Variante heterozygot sein, d. h. auf nur einem der beiden Allele vorkommen. Homozygote Varianten wurden verworfen.

2.3.8. RNA-Extraktion

Beschrieb ein SNV-Prädiktionsprogramm, dass eines der Kandidatengene eine mögliche Spleißmutation sein könnte, wurde, um diese zu validieren, eine RNA-Extraktion und anschließende cDNA-Synthese durchgeführt.

Nach Herstellerangaben des *QIAmp RNA Extraction Kit* wurde RNA aus dem Blut extrahiert und durch das Enzym reverse Transkriptase die komplementäre cDNA synthetisiert. Als Primer diente ein im *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* enthaltenes Oligo-dT-Nukleotid (Desoxythymidin). Der Hybridstrang aus RNA und cDNA wurde durch Zugabe des Enzyms RNase H aufgetrennt, die RNA abgebaut. Im Anschluss erfolgte die Prozessierung des DNA-Doppelstrangs mittels DNA-Polymerase.

Tab. 2.6.: Ansatz der Fermentas cDNA-Synthese

Substanz	Volumen in μl
dH ₂ O	4
ReactionMix 1x	2
Maxima Enzyme-Mix	6
RNA	8
Gesamtansatz	20

cDNA-Synthese-Programm:

10min bei 25°C

15min bei 50°C

5min bei 85°C

Die cDNA wurde mittels PCR amplifiziert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Primer wurden dabei so ausgewählt, dass die die Spleißregion flankierenden Exons komplett abgedeckt wurden. Bei der anschließenden Sequenzierung konnte dann anhand des genetischen Codes die eindeutige Proteinsequenz abgeleitet werden.

2.3.9. Genomweite Assoziationsstudie

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) sind Untersuchungen, bei denen das menschliche Genom auf das gemeinsame Auftreten, die Assoziation, eines Merkmals oder einer Krankheit mit einem bestimmten Genotyp (Allel) hin untersucht wird. Ausgehend von der Annahme, dass ein Großteil der Krankheiten nicht monogen sondern multifaktoriell durch den Einfluss verschiedener Gene und Umweltfaktoren begründet ist (Abb. 1.3b), wurden in den letzten Jahren hunderttausende SNVs bei tausenden Menschen analysiert (Manolio, 2010; Begum et al., 2012). So konnten für viele Volkskrankheiten des 21. Jahrhunderts, wie z. B. Insulinresistenz bei Diabetes mellitus Typ 2 (Willems et al., 2016) oder der koronaren Herzerkrankung (Dai et al., 2016), genetische Risikofaktoren identifiziert werden.

Der methodische Ablauf ist wie folgt: es werden Blutproben zweier Gruppen entnommen – die, der Patienten und die, der gesunden Kontrollgruppe. Nun wird die DNA extrahiert und auf kleine Glasplatten, die sog. Mikroarrays, aufgebracht, die mit bekannten Sequenzvariationen, wie *Copy Number Variants* (CNVs), *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) sowie Insertions- und Deletionspolymorphismen (INDELs) bestückt sind. Die DNA der Patienten- und Kontrollgruppe wird so genotypisiert. Im Anschluss wird die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Variante auftritt, in beiden Gruppen verglichen.

Häuft sich ein Marker bei der Gruppe der Erkrankten, spricht man von einer Assoziation bzw. einem Risikofaktor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden initial 141 deutsche MD-Patienten und 1 214 nord-deutsche Kontrollen voneinander getrennt mittels *Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0* genotypisiert. Auf diesem sind 906 600 SNPs und 946 000 CNVs, strukturelle Veränderungen wie Insertionen, Deletionen und Duplikationen, die DNA-Segmente bis zu einer Million Basenpaarlänge betreffen, aufgebracht.

Die Proben unterliefen dabei der stringenten Qualitätskontrolle der „Travemünde“-Kriterien, durchgeführt am Institut für Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck. Hierbei wurden SNPs mit einer Häufigkeit (Minor-Allelfrequenz, MAF) unter 1%, einer Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht von $P < 10^{-4}$ und fehlerhaften Signalen in den Intensitätsplots der Fluoreszenzfarbstoffe ausgeschlossen. Die detaillierte Vorgehensweise ist der Veröffentlichung „Genome-wide association studies: quality control and population-based measures“ von Prof. Dr. rer. nat. Andreas Ziegler zu entnehmen (Ziegler, 2009).

Insgesamt 557 620 SNPs konnten so bei den verbliebenen 127 MD-Patienten und 984 gesunden Kontrollen detektiert werden. Die sich dabei in ihrer Häufigkeit scheinbar unterscheidenden Varianten ($P < 10^{-5}$) wurden im zweiten Schritt in einem Kollektiv von zusätzlichen 116 MD-Patienten und 125 gesunden Musikern überprüft.

Im Rahmen meiner Arbeit war ich an der dritten und vierten GWA-Phase beteiligt. Erstere beinhaltete das Screening auf einen genomweit signifikanten SNP bei 208 WD-Patienten und 278 Kontrollen. Das Signifikanzlevel wurde dabei auf $5 \cdot 10^{-8}$ festgelegt, was sich in verschiedenen GWAS als Grenzwert, für den eine zufällige Assoziation als unwahrscheinlich gilt, durchgesetzt hat (Manolio, 2010). Im letzten Schritt wurden 1 969 isolierte Dystoniepatienten sowie 2 233 ethnisch gematchte Kontrollen auf den zuvor ermittelten SNP hin geprüft.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Prof. Dr. A. Ziegler und Mitarbeiter des Instituts für Biometrie und Statistik Lübeck und umfasste die Angabe der P -Werte, der Odds Ratios und der 95% Konfidenzintervalle sowie die Einschätzung der Effektstärke und des attributalen Risikos. Da genetische Varianten in unterschiedlichen Subpopulationen eine unterschiedliche Allelfrequenz aufweisen können, wurde desweiteren eine Analyse der Populationsstratifikation durchgeführt, um auszuschließen, dass die gefundene genetische Variante nicht mit der Erkrankung, sondern der Bevölkerungsstruktur assoziiert ist. Zusammenfassend gibt Abbildung 2.3 einen Überblick über die einzelnen GWA-Phasen.

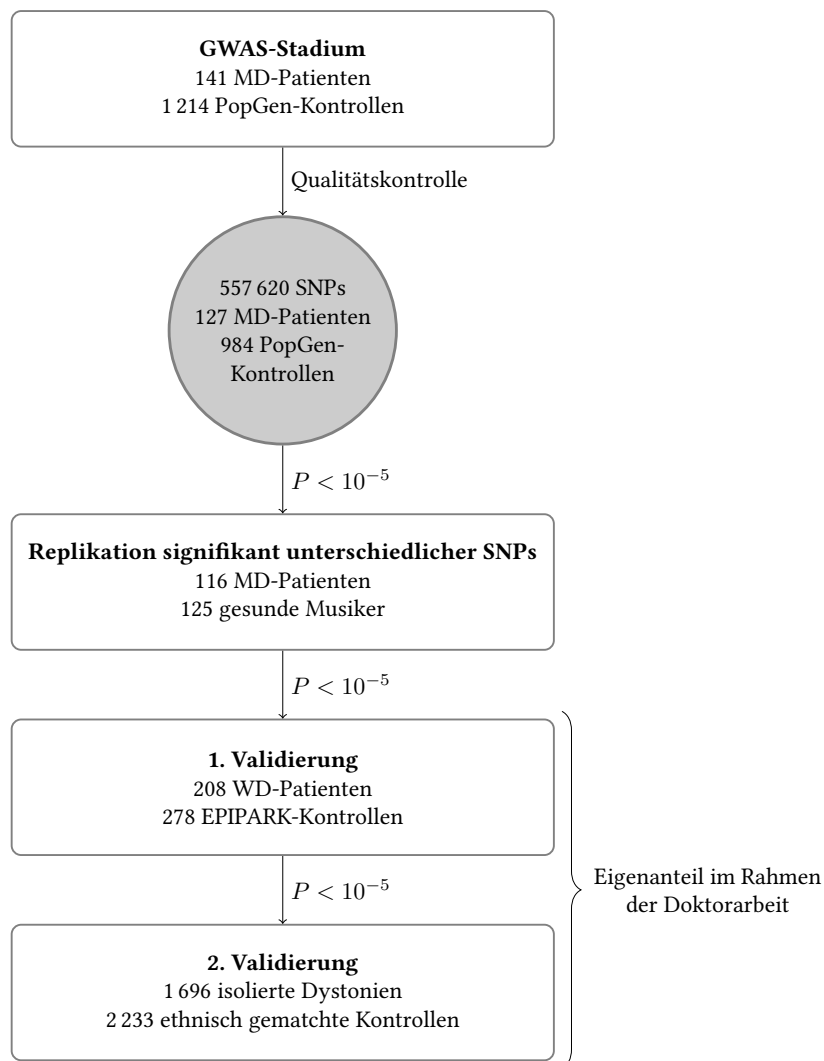


Abb. 2.3.: Übersicht der Assoziationsstudie. Die Kästen kennzeichnen die Phasen eins bis vier. SNPs, die häufiger in der Gruppe der Patienten als in der, der Kontrollen gefunden wurden, waren dabei von Interesse.

3. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Resultate des monogenetischen Ansatzes dargestellt, bei dem Kandidatengene mithilfe des NGS identifiziert wurden. Im zweiten Abschnitt werden Ergebnisse des komplex-genetischen Ansatzes aus der GWA-Studie gezeigt.

3.1. Monogenetische Ursache mittels NGS

Zunächst werden die mittels NGS ermittelten und anschließend *in silico* gefilterten Genom- bzw. Exomdaten dreier MD-Familien vorgestellt. Für die so gefundenen Kandidatenvarianten erfolgte eine Sequenzanalyse, deren Resultate hier präsentiert werden.

3.1.1. Genom- bzw. Exomsequenzierung dreier MD-Familien

Für zwei Mitglieder der Familie B sowie den Indexpatienten der Familie C wurde durch die Firma Complete Genomics ein NGS durchgeführt, wobei etwa vier Millionen Varianten pro Genom detektiert werden konnten. Drei Mitglieder der Familie A wurden von Atlas Biolabs exomsequenziert, was jeweils etwa 28 000 Varianten erbrachte. Diese Varianten wurden im Folgenden systematisch gefiltert und intronische, häufige oder synonyme sowie homozygote Varianten ausgeschlossen (siehe Tab. 3.1).

Anschließend erfolgte eine Überlappung der einzelnen Familienmitglieder, wobei Varianten nur dann ausgewählt wurden, wenn sie sich am selben Genort befanden. Bei Familie A ergaben sich so 83, für Familie B 509 Varianten. Da von Familie C allein der Indexpatient sequenziert wurde, war hier nur eine interfamiliäre Überlappung möglich, die im Folgenden ausführlicher beschrieben wird.

Die im vorangegangenen Schritt detektierten Varianten der Familien A, B und C wurden miteinander überlappt. Dabei konnten vier Kandidatengene identifiziert werden, deren Varianten sich interfamiliär im gleichen Gen befanden: *FLG*, *GRIP2*, *JRK* und *MARS*. Sie wurden zunächst mittels Sanger-Sequenzierung auf ihre Echtheit hin untersucht, um

Tab. 3.1.: Detektierte Varianten der Familien A, B und C

Familie	Code	Genomische Varianten	Exonische Varianten	nicht-synonyme Varianten	Frequenz unter 1%	gleicher Genort intrafamiliär	gleiches Gen interfamiliär
A	L-2381	-	28 208	23 753	1 632	83	4
	L-2276	-	28 102	23 658	1 498		
	L-2283	-	27 737	23 357	1 459		
B	L-2286	3 434 750	20 718	11 000	1 388	509	
	L-2322	3 808 124	20 898	10 340	1 044		
C	L-2332	3 815 968	20 583	10 116	1 023	-	

mögliche falsch-positive Ergebnisse aus dem NGS aufzudecken. Details zur Funktion der Varianten und den verwendeten Primern sind den Tabellen C.3 und D.4 im Anhang zu entnehmen.

Die Kandidatenvariante *MARS* konnte weder bei dem Patienten L-2308, L-2286 noch L-2325 nachgewiesen werden und wurde verworfen. Die verbliebenen drei Varianten wurden bei nicht-betroffenen Familienmitgliedern auf ihre Segregation hin überprüft. Keiner der Gesunden wies eine der Veränderungen auf.

Im nächsten Schritt wurden die Varianten auf ihre Häufigkeit in einem gesunden Kontrollkollektiv überprüft. Da sie jedoch bei mehr als 97,9% der Kontrollen gefunden wurden, mussten im Anschluss alle drei Varianten verworfen werden (siehe Tab. 3.2).

Tab. 3.2.: Kandidatengene der interfamiliären Überlappung aus A, B, C

Familie	Gen	Variante	Validierung	Segregation	Frequenz*
A	FLG	c.C6713G;p.P2238R	ja	ja	n.u.
B+C	FLG	c.C7387G;p.H2463D; rs113188294	ja	ja	1
A	GRIP2	c.C26T;p.T9I; rs188992337	ja	ja	0,98
B+C	GRIP2	c.1019_1021insC; p.P340Pfs;rs5846840	ja	ja	1
A	JRK	c.G455A;p.S152N; rs201592742	ja	ja	0,02
B+C	JRK	c.1387_1388delTG; p.W463Efs;rs33951456	ja	ja	1
A	MARS	c.C2116T;p.R706C; rs148501787	nein	-	-
B+C	MARS	c.C2323G;p.P775A; rs113773319	nein	-	-

*gesunde Kontrollen der EPIPARK-Kohorte; n.u. – nicht untersucht

Da somit kein Kandidatengen blieb, das bei allen drei Familien auftrat und krankheitsverursachend hätte sein können, erfolgte die erneute *in silico*-Auswertung der NGS-Daten unter dem Gesichtspunkt, nun jeweils zwei Familien miteinander zu überlappen. Daraus ergaben sich für Familie A und B drei zusätzliche Varianten zu den im ersten Schritt bereits gefundenen: *CHAC1*, *ZC3H3*, *ZNF696*. Die Überlappung von Familie A und C ergab drei Varianten: *RAB12*, *SYNE2* und *LOR*. Die Überlappung der Familie B und C ergab 23 weitere Kandidatengene. Sie alle wurden resequenziert, danach auf ihre Segregation in nicht-betroffenen Familienmitgliedern hin analysiert und schließlich in einem gesunden Kontrollkollektiv auf ihre Frequenz überprüft (Tab. 3.3). Keines der Kandidatengene konnte dabei bestätigt werden.

Tab. 3.3.: Kandidatengene der interfamiliären Überlappung aus jeweils zwei Familien

Überlappung	Familie	Gen	Variante	Validierung	Segregation	Frequenz*
A+B	A	CHAC1	c.A452G;p.K151R; rs147487857	ja	ja	0,02
	B	CHAC1	c.A37G;p.R13G; rs201335601	ja	ja	0,00
	A	ZC3H3	c.G1203C;p.K401N; rs145312531	ja	nein	-
	B	ZC3H3	c.C1646T;p.S549L; rs149025999	ja	nein	-
	A	ZNF696	c.A887G;p.Q296R; rs547770903	ja	nein	-
	B	ZNF696	c.C106T;p.R36W; rs140398403	ja	nein	-
A+C	A	LOR	c.63_64insGGCGGT; p.G21delinsGGG; rs150026164	ja	ja	n.u.
	C	LOR	c.566_567insCTCTG GCGGCGG; p.Y189delinsYSGGG	ja	ja	0,37
	A+C	RAB12**	c.A586G;p.I196V; rs143888944	ja	ja	0,00
	A	SYNE2	c.C13850T;p.T4617I; rs148582250	ja	ja	0,00
	C	SYNE2	c.12001subCA	ja	ja	0,13
B+C	B	AOC2	c.C1118T;p.T373M; rs143214815	ja	ja	0,00
	C	AOC2**	c.G818A;p.R273Q; rs35508987	ja	ja	0,02
	B+C	BCAM**	c.T611A;p.M204K; rs28399656	ja	ja	0,10
	B	BRPF	c.A3055G;p.S1019G; rs145016452	ja	nein	-

Tab. 3.3.: Kandidatengene der interfamiliären Überlappung; Fortsetzung

Überlappung	Familie	Gen	Variante	Validierung	Segregation	Frequenz*
	C	BRPF	c.G3223A;p.E1075K; rs142171063	ja	nein	-
	B+C	C1QTNF4	c.147insTTCA	nein	-	-
	B	CCDC40	c.1889insTG	nein	-	-
	C	CCDC40	c.2843_74del; p.948_58del	nein	-	-
	B	CCDC116	c.310insCTG	nein	-	-
	C	CCDC116	c.A1790G;p.D597G; rs150451119	nein	-	-
	B+C	CNTNAP3B	c.T1955G;p.L652R; rs62536501	ja(homozygot)	ja	-
	B	DEPDC5	c.G1330A;p.G444R; rs201394709	n.u.	-	-
	C	DEPDC5	c.4295delinsAC	nein	-	-
	B	DEGKZ	c.G254A;p.S85N; rs141189455	nein	-	-
	C	DEGKZ	c.C202A;p.P68T; rs147007748	ja	nein	-
	B	DIS3L	c.G2035A;p.E679K	ja	ja	0,00
	C	DIS3L	c.G2276A;p.R759H; rs35711894	ja	ja	0,011
	B	GRK7	c.G380C;p.S127T; rs35318124	ja	nein	-
	C	GRK7	c.G925C;p.E309Q; rs55824414	ja	nein	-
	B	KIAA0020	c.T1469C;p.L490S	ja	nein	-
	C	KIAA0020	c.T905A;p.L302X; rs137936878	ja	nein	-
	B	MLL4	c.1126_28del; p.376_76del	n.u.	-	-
	C	MLL4	c.1215subCCCC	nein	-	-
	B+C	NES	c.G1825C;p.E609Q; rs114406081	ja	nein	-
	B	NPHS1	c.A563T;p.N188I; rs145125791	ja	nein	-
	C	NPHS1**	c.C1619A;p.A540E; rs149598144	ja	ja	n.u.
	B	POLQ	c.A2891C;p.E964A; rs3218633	ja	nein	-
	C	POLQ	c.3072del;p.1024del	ja	nein	-
	B	RFTN1	c.1548insAGA	n.u.	-	-
	C	RFTN1	c.1543insCCAAGAG; p.D515fs	nein	-	-
	B	SLC26A3	c.T1802C;p.I601T; rs35776303	n.u.	-	-

Tab. 3.3.: Kandidatengene der interfamiliären Überlappung; Fortsetzung

Überlappung	Familie	Gen	Variante	Validierung	Segregation	Frequenz*
	C	SLC26A3	c.310delT;p.Y104fs	nein	-	-
	B+C	SVEP1	c.8249subTG	ja(homozygot)	ja	n.u.
	B+C	TSPYL6	c.580_585del; p.194_95del	ja	ja(homozygot)	n.u.
	B+C	TTC23	c.C37A;p.L13I	nein	-	-
	B	WDR81	c.A2273C;p.Q758P	n.u.	-	-
	C	WDR81	c.2960insGTA	nein	-	-
	B	ZFHX3	c.C1799G;p.A600G	n.u.	-	-
	C	ZFHX3	c.C2810A;p.P937Q	nein	-	-

*gesunde Kontrollen der EPIPARK-Kohorte; ** nach Ausschluss des möglich erkrankten WD-Patienten L-2325 erneut untersuchte Varianten; n.u. – nicht untersucht

3.1.2. Identifikation des Kandidatengens *RAB12*

Der WD-Patient L-2325 der Familie C war in der Consensus Diagnose vierer Experten zuvor als möglich Betroffener klassifiziert worden. Er wurde im nächsten Schritt aus der Analyse ausgeschlossen. Alle Kandidatengene, welche zuvor in der Segregationsanalyse durch das Nichtauftreten bei L-2325 herausgenommen worden waren, wurden nun erneut überprüft und auf ihre Häufigkeit bei Gesunden hin untersucht (siehe Fußnote ** in Tab.3.3). Dabei konnte eine *missense*-Mutation (c.586A>G; p.Ile196Val; rs143888944) im *RAB12*-Gen bei den Indexpatienten von Familie A und C sowie zwei WD-Patienten der Familie A gefunden werden (siehe Abb. 3.1).

Zusätzlich wurde die Mutation bei der gesunden Mutter des Indexpatienten aus Familie C detektiert. Diese war zum Zeitpunkt der Untersuchung 76 Jahre – eine berentete Sekretärin, die weder ein Instrument spielte, noch dystone Symptome zeigte. Bei keinem der zusätzlich untersuchten 461 gesunden Kontrollen konnte die c.586A>G-Mutation nachgewiesen werden. Laut des Exome Aggregation Consortiums tritt sie nur heterozygot mit einer Frequenz von 56 von 119 128 Allelen (0,047%; Exome Aggregation Consortium, 2016) bzw. laut des Exome Variant Servers bei 3 von 8 224 Allelen (0,04%; Exome Variant Server, 2016) auf. Die entsprechende Aminosäure (AS) ist zudem hoch konserviert, das heißt, dass die Proteinsequenz in verschiedenen Spezies gleich ist und somit evolutionär eine vermutlich wichtige Funktion hat. Durch den Basenaustausch von Adenin zu Guanin führt die Mutation zu einem AS-Austausch von Isoleucin zu Valin.

Um einen möglichen Effekt auf die Proteinsynthese vorherzusagen, wurde die Variante

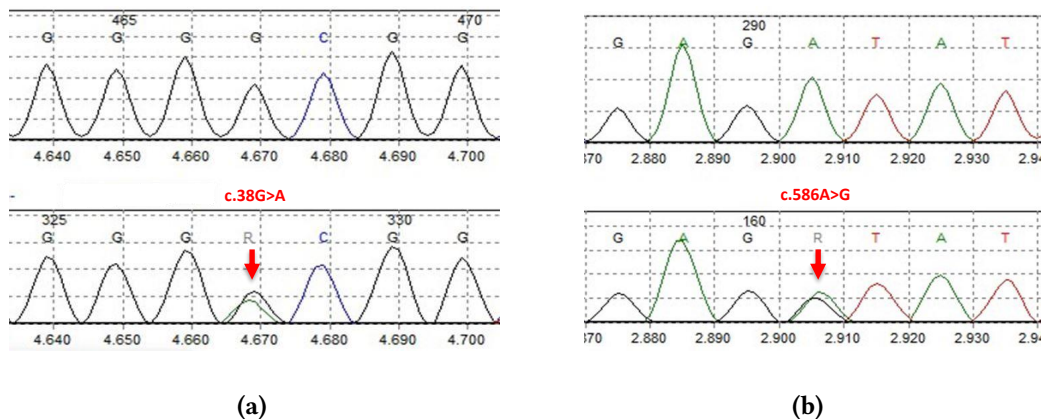
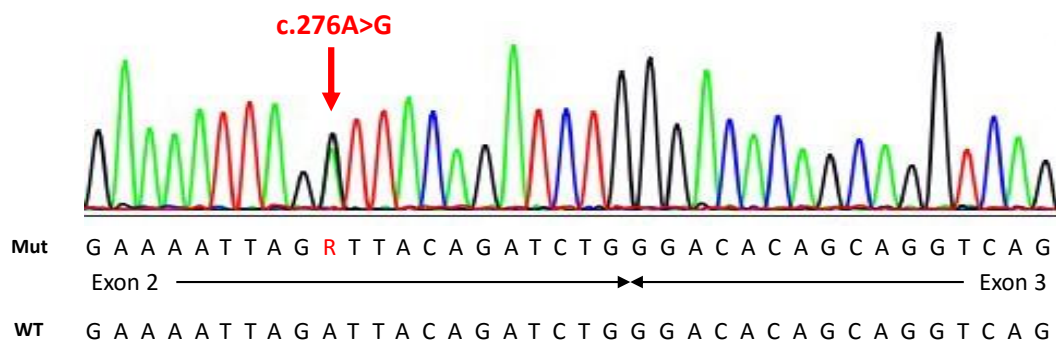


Abb. 3.1.: Elektropherogramme der heterozygoten c.38G>A; p.Gly13Asp-Mutation (a) und der c.586A>G; p.Ile196Val-Mutation (b). Die Kurvenfolge gibt dabei die vom Laser detektierten Basenabfolge wieder, wobei schwarz für Guanin (G), rot für Thymin (T), grün für Adenin (A) und blau für Cytosin (C) steht. Die Zahlen unterhalb der Kurve geben die Nummerierung der Basen im Gen an. Abbildung (a) zeigt in der Patientensequenz (unten) einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin, Abbildung (b) einen Austausch von Adenin zu Guanin im Vergleich zur Referenzsequenz (oben).

in den Prädiktionsprogrammen Polyphen-2 (PolyPhen-2, 2016), MutationTaster (MutationTaster, 2016) und MutPred (MutPred, 2016) nachgeschlagen. Dabei werden unter anderem die Größe und Struktur sowie die Ladung der substituierten Aminosäure analysiert. Polyphen-2 klassifiziert die Mutation c.586A>G als nicht pathogen, MutPred und MutationTaster jedoch als krankheitsverursachend (siehe Tab. 3.4). Der ebenfalls ermittelte Combined Annotation Dependent Depletion-Score (CADD-Score) gibt die Schädlichkeit der Variante mit 16,52 an, d. h. in einem „Pathogenizitäts“-Ranking aller bekannten Varianten gehört die Variante zu den oberen 10% (Kircher et al., 2014). Der Grenzwert, nach dem eine Variante als pathogen eingeschätzt wird, liegt bei über 15 (Combined Annotation Dependent Depletion, 2016).

Nun wurde ein Kollektiv von 238 nicht-verwandten MD-Patienten auf Veränderungen aller sechs Exons des *RAB12*-Gens hin untersucht. Die c.586A>G-Mutation wurde bei einem 31-jährigen Patienten (L-3781) detektiert. Zusätzlich wurde bei einem weiteren Patienten (L-3921) eine heterozygote *missense*-Mutation (c.38G>A; p.Gly13Asp) im Exon 1 gefunden (siehe Abb. 3.1). Bei beiden standen zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Angehörigen für die Segregationsanalyse zur Verfügung. Bei einem 39-jährigen Patienten (L-3799) wurde eine synonyme Variante (c.276A>G; p.Arg92Arg; Abb. 3.2) nahe der Spleiß-Akzeptor-Sequenz von Exon 2 gefunden. Das Prädiktionsprogramm MutationTaster ermöglicht es, auch Varianten ohne AS-Änderung auf ihre Auswirkung auf die Proteinsynthese hin zu analysieren. Es schätzte die gefundene Variante c.276A>G

Um dies nachzuweisen, wurde erneut Blut des Patienten gewonnen und die RNA extrahiert. Die RNA wurde in cDNA, umgeschrieben und amplifiziert, um ausreichend detektierbares Material auf ein Agarosegel auftragen zu können. Bei einer Spleißmutation in einem der Allele, kann es durch falsches Ablesen beim Splicing dazu kommen, dass das betroffene Exon in der mRNA nicht enthalten ist oder das Intron nicht entfernt wird. Auf dem Gel zeigen sich dann zwei unterschiedlich lange Banden, was hier jedoch nicht der Fall war. Die Aufschlüsselung der Basenfolge mittels Sanger-Sequenzierung erbrachte zum einen, dass L-3799 Träger zweier Allele, des Wildtyp und der Mutante, ist. Der Vergleich beider Sequenzen miteinander zeigte jedoch keinen Unterschied der sich der Variante anschließenden Basenfolge (siehe Abb. 3.2), sodass für die c.276A>G-Mutation kein Einfluss auf die Spleißfunktion anzunehmen ist.



Zusätzlich wurde eine Stichprobe von 66 WD-Patienten auf Veränderungen im *RAB12*-Gen getestet, was jedoch keine Auffälligkeiten erbrachte. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die sechs codierenden Exons des *RAB12*-Gens bei 461 gesunden Kontrollen untersucht. Dies ergab zwei Träger seltener *missense*-Varianten und einen weiteren Träger der c.276A>G Variante. Eine Übersicht der gefundenen Varianten ist der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Tab. 3.4.: Übersicht gefundener Mutationen im *RAB12*-Gen

Kollektiv	Code	Phänotyp	Exon	Variante	Polyph-2	MutTast	MutPred	CADD-Score	Kontroll-len*	EVS	ExAC
Familie A	L-2381	MD									
	L-2283	WD		c.586A>G							
	L-2276	WD	5	p.Ile196Val rs143888944	+(0,218)	-(0,999)	-(0,555)	16,52	0/922	G=3/A=8221	0,0004
Familie C	L-2332	MD									
Nicht verwandtes MD-Kollektiv	L-3921	MD	1	c.38G>A	± (0,687)	-(0,994)	+ (0,266)	22,4	0/340	k.A.	k.A.
	L-3799	MD	2	p.Gly13Asp c.276A>G	k.A.	-(0,999)	k.A.	8,22	1/922	G=5/A=8209	0,0002
	L-3781	MD	5	p.Arg92Arg rs372618073 c.586A>G p.Ile196Val rs143888944	+(0,218)	-(0,999)	-(0,555)	16,52	0/922	G=3/A=8221	0,0004
	L-5334	leichter bds. Tremor	2	c.276A>G p.Arg92Arg rs372618073	k.A.	-(0,999)	k.A.	8,22	1/922	G=5/A=8209	0,0002
	L-5385	-	3	c.391G>C p.Asp131His rs373725842 c.392A>T p.Asp131Val rs377072250	+(0,414)	-(0,999)	-(0,452)	28,7	1/922	C=1/G=8255	0,00004
Gesunde Kontrollen	L-5328	-	6	c.693G>A p.Pro231Pro	k.A.	-(0,999)	k.A.	10,49	1/922	T=1/A=8257	k.A.

Polyph-2 – Polyphen-2 (letzter Stand: 16.11.2016); MutTast – MutationTaster (16.11.2016); MutPred (16.11.2016); „+“ – benigne Variante, „±“ – möglich schädigende Variante, „-“ – schädigende Variante, „0“ – Wahrscheinlichkeitsscore des Prädiktionsprogramms; CADD – Combined Annotation Dependent Depletion (05.04.2016); * Allelfrequenz deutscher Kontrollen (EPITARK; Kasten et al, 2013), europäischer Amerikaner des Exom Variant Server (EVS, 05.04.2016) und des Exome Aggregation Consortiums (ExAC, 04.04.2016).

Das *RAB12*-Gen befindet sich in der Region 18p11.22 und umfasst sechs Exons. Es ist Teil der RAB-GTPase-Familie, welche über GDP/GTP-Bindung einen Großteil der membranösen Transportprozesse eukaryotischer Zellen steuert (Stenmark, 2009). *RAB12* reguliert den Abbau von Transferrin-Rezeptoren (Matsui et al., 2011) und aktiviert den mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*)-Komplex 1 welcher Prozesse der Autophagie steuert. Darüber hinaus spielt es eine Rolle beim retrograden Transport von Toxinen.

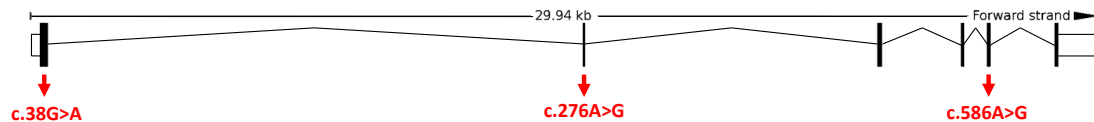


Abb. 3.3.: Schematische Abbildung des *RAB12*-Gens (Ensembl, 2016a), welches zur Familie der kleinen GTPase codierenden Gene gehört. Es sind alle sechs Exons, sowie die drei gefundenen Basenpaarsubstitutionen in Exon 1, 2 und 5 der MD-Patienten gezeigt.

3.1.3. Statistische Auswertung der gefundenen *RAB12*-Varianten

Nun soll ermittelt werden, ob die detektierten Varianten statistisch signifikant häufiger in der Gruppe der MD-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen zu finden sind. Da die Messungen an zwei getrennten Gruppen, den MD-Patienten und Kontrollen erhoben wurden, deren Zielvariable „*RAB12*-Mutationsträger“ dichotom ist, wird hierfür der Chi-Quadrat(χ^2)-Test verwendet. Dieser wird an dieser Stelle für die c.586A>G-Variante beispielhaft händisch ermittelt, während alle weiteren Berechnungen mit der *GraphPad Prism 7.01*-Software erfolgten. Zunächst werden die Ausgangshypothesen formuliert:

H_0 : Der Anteil der c.586A>G-Mutationsträger bei MD-Patienten und gesunden Kontrollen ist gleich.

H_1 : Der Anteil der c.586A>G-Mutationsträger bei MD-Patienten und dem Kollektiv gesunder Kontrollen unterscheidet sich.

Das Signifikanzniveau α ist auf 0,05 festgelegt. Der kritische Wert der Testgröße $\chi^2_{(1-\alpha; m-1)}$, wobei (m-1) die Anzahl der Freiheitsgrade anzeigt, ergibt für $\chi^2_{(0,95;1)}$ laut χ^2 -Verteilungstabelle gleich 3,84 (Fahrmeir et al., 2016). Somit gilt folgendes Schema für die Testentscheidung:

- Entscheidung für H_0 , wenn $-3,84 < \chi^2 < 3,84$
- Entscheidung für H_1 , wenn $\chi^2 < -3,84$
- Entscheidung für H_1 , wenn $\chi^2 > 3,84$

Tab. 3.5.: Kreuztabelle beobachteter Häufigkeiten

	Merkmal X		Σ
	ja	nein	
Gruppe Y	a	b	a+b
Gruppe Z	c	d	c+d
Σ	a+c	b+d	n=a+b+c+d

Tab. 3.6.: Kreuztabelle erwarteter Häufigkeiten

	Merkmal X		Σ
	ja	nein	
Gruppe Y	$\frac{(a+b) \cdot (a+c)}{n}$	$\frac{(a+b) \cdot (b+d)}{n}$	a+b
Gruppe Z	$\frac{(c+d) \cdot (a+c)}{n}$	$\frac{(c+d) \cdot (b+d)}{n}$	c+d
Σ	a+c	b+d	n

Tab. 3.7.: Beobachtete Häufigkeit der c.586A>G-Variante

	c.586A>G		Σ
	ja	nein	
Patienten	3	238	241
Kontrollen*	56	59508	59564
Σ	59	59746	59805

*Exome Aggregation Consortium, 2016

Tab. 3.8.: Erwartete Häufigkeit der c.586A>G-Variante

	c.586A>G		Σ
	ja	nein	
Patienten	0,238	240,762	241
Kontrollen*	58,762	59505,238	59564
Σ	59	59746	59805

*Exome Aggregation Consortium, 2016

Die Stichprobenergebnisse der c.586A>G-Variante zeigt Tabelle 3.7. Daraus kann direkt, wie in Tabelle 3.6 gezeigt, die erwartete Häufigkeit der einzelnen Stichproben abgeleitet werden (siehe Tabelle 3.8). Für die Prüfung auf stochastische Unabhängigkeit wird nun der χ^2 -Test berechnet:

$$\begin{aligned}
 \chi^2 &= \sum_{x=1}^m \frac{(\text{beobachtete Häufigkeit} - \text{erwartete Häufigkeit})^2}{\text{erwartete Häufigkeit}} \\
 &= \frac{(3-0,238)^2}{0,238} + \frac{(238-240,762)^2}{240,762} + \frac{(56-58,762)^2}{58,762} + \frac{(59508-59505,238)^2}{59505,238} \\
 &= 32,22
 \end{aligned}$$

Da 32,22 größer als 3,84 ist, muss die Nullhypothese abgelehnt werden. Der P -Wert kann nun näherungsweise einer χ^2 -Verteilungstabelle entnommen werden und ist kleiner als 0,0001, d. h. die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um ein zufälliges Ergebnis handelt, ist kleiner als 0,01%.

Vergleicht man die beobachteten und erwarteten Häufigkeiten aller gefundenen seltenen, d. h. mit einer Frequenz von $<1\%$ auftretenden, *missense*-Varianten im *RAB12*-Gen bei MD-Patienten (4/241) und EPIPARK-Kontrollen (1/461), lässt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied nachweisen ($P < 0,05$). Aufgrund der kleineren Stichprobe wurde hier der Fisher's Exact Test angewandt. Auch für das Auftreten seltener *missense*-Varianten bei MD-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen der ExAC-Datenbank (227/53100) zeigt sich eine statistisch signifikante Unabhängigkeit: $P = 0,004$; χ^2 -Test.

Die Häufigkeit seltener *missense*-Varianten im *RAB12*-Gen ist somit in der Gruppe der Patienten signifikant höher als bei gesunden Kontrollen des EPIPARK- bzw. ExAC-Kollektivs.

3.2. Komplex-genetische Ursachen mittels GWAS

Um genetische Risikofaktoren zu identifizieren, die mit dem Auftreten der MD assoziiert sind und eine hohe Effektstärke aufweisen, wurde eine GWAS durchgeführt. Dieser Abschnitt geht zunächst auf den Genotypisierungsschritt, anschließend auf den Replikations- und Validierungsschritt sowie die gefundene Kandidatenregion ein.

3.2.1. Genotypisierung des Patienten- und Kontrollkollektivs

Für den ersten Schritt der GWAS wurden 141 MD-Patienten und 1 214 norddeutsche Kontrollen (PopGen; Krawczak et al., 2006) genotypisiert. Sie unterliefen dabei einer stringenten Qualitätskontrolle (Institut für Biometrie und Statistik Lübeck), infolgedessen 32 Proben aufgrund ihrer mangelhaften Signalstärke ausgeschlossen werden mussten. Weitere 208 Proben wurden verworfen, da sie über drei Standardabweichungen vom Mittelwert der autosomalen Heterozygotie lagen oder ihre SNP-Anzahl unter 97% der gefundenen SNPs des Gesamtkollektivs lag. Zusätzlich wurden vier MD-Patienten ausgeschlossen, bei denen eine biologische Verwandtschaft mit einem Anteil von $>0,125$ zu anderen Studienteilnehmern bestand. Desweiteren wurden seltene SNPs (MAF $<1\%$) sowie SNPs mit $P < 10^{-4}$ Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verworfen.

Die verbliebenen 557 620 SNPs von 127 Patienten und 984 Kontrollen wurden mittels Manhattanplot analysiert. Dabei wird die chromosomale Position der SNPs auf der x-Achse gegen deren negativ logarithmischen P -Wert auf der y-Achse aufgetragen (siehe Abb. 3.4). Das führt dazu, dass sich SNPs, die signifikant häufiger bzw. seltener in der Gruppe der MD-Patienten als in der, der gesunden Kontrollen vorkommen, wie „Wol-

kenkratzer“ der New Yorker Skyline von der Masse der nicht-signifikanten SNPs abheben. Insgesamt 10 SNPs aus acht unterschiedlichen genetischen Regionen ($P < 10^{-5}$) konnten so detektiert werden. Im Anschluss erfolgte eine qualitative Auswertung der Markersignale des Genotypisierungsschrittes mithilfe von Signalintensitätsplots.

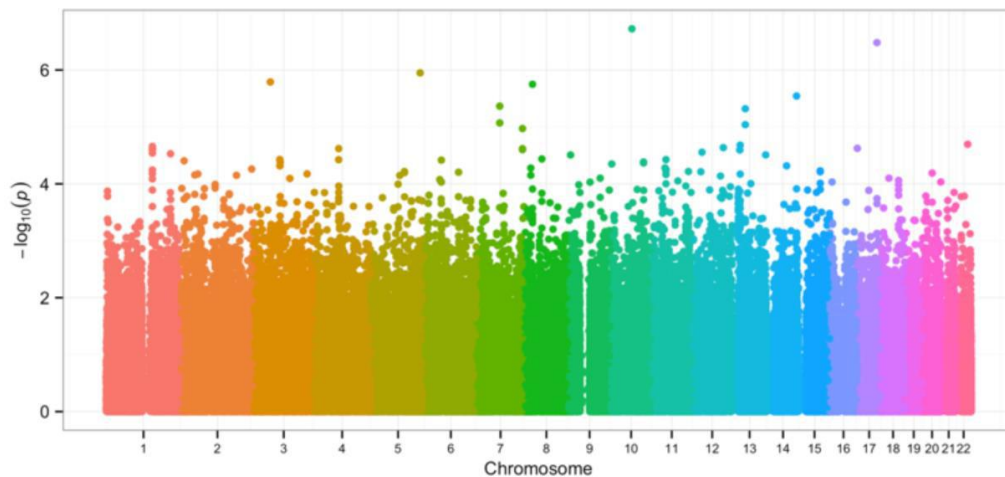


Abb. 3.4.: Der Manhattanplot zeigt die in der ersten Phase genomweit detektierten 557 620 SNPs aller Probanden, die assoziiert mit einer Dystonie auftraten. Dabei wurden die $-\log_{10}P$ -Werte gegen ihre chromosomale Position aufgetragen (Vgl. Lohmann et al., 2014).

Um auszuschließen, dass eine Populationsstratifikation innerhalb der deutschen Bevölkerung als möglicher Confounder der Assoziation agiert, wurde mit Hilfe der *Genomic control*-Methode der Inflationsfaktor λ bestimmt. Unter einer vollständigen Null-Verteilung, d. h. es liegt keine Stratifikation vor, liegt dieser bei 1. Der vom Institut für Biometrie und Statistik errechnete Inflationsfaktor betrug 1,07. Eine falsch-positive Assoziation aufgrund unterschiedlicher Allelfrequenzen in verschiedenen Subpopulationen ist demnach unwahrscheinlich.

3.2.2. Replikation genomweit signifikanter Varianten

Für den unabhängigen Replikationsschritt wurden die zuvor gefundenen zehn SNPs in einem neuen Kollektiv von 116 deutschen MD-Patienten und 125 gesunden Musikern überprüft (Tab. 3.9). Das zu unterschreitende Signifikanzlevel wurde zuvor auf $P < 0,05$ festgelegt. Nur einer der getesteten SNPs zeigte in der Replikationsphase eine Assoziation mit der MD: rs 11655081. Die Risikoallelfrequenz betrug hier 0,09 bei MD-Patienten

im Vergleich zu 0,02 bei gesunden Musikern ($P = 1,66 \cdot 10^{-3}$).

Die intronische Variante rs 11655081 im *ASRG*-Gens befindet sich auf Chromosom 17q-24.2. *ASRG* gehört zur Familie der Sulfatasegene, welche durch Kodierung von hydrolysierenden Sulfatestern an der Signalkaskade der Zelle, Degradierung von Proteinen und Hormonbiosynthese beteiligt sind (Sardiello et al., 2005).

Für die Berechnungen der Assoziation wurden in diesem Schritt die Ergebnisse aus der Analyse der GWA- und der Replikationsphase kombiniert. Bei einer gepoolten Risikofrequenz von 0,08 bei MD-Patienten und 0,02 bei den Kontrollen, ergab sich so eine signifikante genomweite Assoziation der Variante rs 11655081 ($P = 3,95 \cdot 10^{-9}$). Die gepoolte Odds Ratio (OR), die Aufschluss über die Stärke des Zusammenhangs zweier Merkmale gibt, beträgt 4,33 (95% KI: 2,66-7,05). Dabei werden die Wahrscheinlichkeiten miteinander verglichen, mit der Träger bzw. Nicht-Träger der rs 11655081-Variante an der MD erkranken. Eine OR von vier heißt also, dass die Chance (die Odds) an der MD zu erkranken als Träger des SNPs rs 11655081 im Vergleich zu Nicht-Trägern etwa 4fach erhöht ist. Das attributable Risiko, welches angibt, um welchen Prozentsatz man eine Krankheitshäufigkeit senken kann, würde man den Risikofaktor rs 11655081 ausschalten, beträgt 79,19% (95% KI: 60,73-85,57%). Eine Korrelation zwischen dem Erkrankungsalter der MD-Patienten und ihrem Trägerstatus (Nicht-Träger: $34 \pm 10,7$ Jahre vs. Träger: $35 \pm 11,7$ Jahre) konnte nicht nachgewiesen werden.

Desweiteren wurde für die detektierte Variante die *False Positive Report Probability* (FPRP) berechnet. Diese beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine falsch-positive Assoziation zwischen der genetischen Variante und der Erkrankung, auftritt. Sie beträgt in diesem Fall 0,001. Das heißt, die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Resultats liegt bei unter 0,1%.

Tab. 3.9.: Eingeschlossene Varianten der ersten Replikationsphase ($P < 10^{-5}$)

SNP	Chromosom	Positon	Allele	Phase	Frequenz (Pat/Kont)	Anzahl (Pat/Kont)	OR	95% KI	P
rs11711956	3	54353640	G/A	GWA	0,39/0,24	127/984	1,96	1,49; 2,58	$1,62^{-6}$
rs6556752	5	163802421	T/C	MD	0,29/0,24	116/123	1,33	0,89; 2,00	$8,14^{-2}$
				gepoolt		243/1107	1,73	1,38; 2,18	$2,01^{-6}$
				GWA	0,01/0,17	127/966	17,22	5,48; 54,16	$1,12^{-6}$
rs11983527	7	76800804	C/G	MD	0,01/0,01	115/125	0,61	0,10; 3,70	1
				gepoolt		242/1091	6,6	2,51; 17,37	$1,32^{-4}$
				GWA	0,58/0,43	127/968	1,91	1,45; 2,52	$4,32^{-6}$
rs11505827	7	76806531	G/A	MD	0,44/0,44	116/125	1	0,70; 1,42	1
				gepoolt		243/1093	1,5	1,20; 1,86	$2,91^{-4}$
				GWA	0,59/0,44	127/984	1,86	1,42; 2,45	$8,50^{-6}$
rs17060993	8	26978029	A/T	MD	0,44/0,44	116/125	1,01	0,71; 1,45	$4,68^{-1}$
				gepoolt		243/1109	1,48	1,20; 1,48	$3,48^{-4}$
				GWA	0,09/0,03	127/978	3,34	2,03; 5,47	$1,78^{-6}$
rs5030881	10	69974275	A/G	MD	0,08/0,04	113/125	1,76	0,86; 3,57	$5,97^{-2}$
				gepoolt		240/1103	2,7	1,80; 4,06	$1,50^{-6}$
				GWA	0,04/0,18	127/975	5,61	2,93; 10,72	$1,89^{-7}$
rs7491228	13	42009120	T/C	MD	0,05/0,02	115/125	0,48	0,17; 1,33	1
				gepoolt		242/1100	2,78	1,61; 4,82	$2,56^{-4}$
				GWA	0,40/0,26	127/979	1,87	1,42; 2,47	$9,11^{-6}$
rs9594780	13	42019473	G/A	MD	0,29/0,30	116/125	0,97	0,65; 1,43	1
				gepoolt		243/1104	1,5	1,00; 1,88	$4,35^{-4}$
				GWA	0,40/0,26	127/984	1,9	1,44; 2,51	$4,79^{-6}$
rs9323992	14	97719569	T/C	MD	0,29/0,29	115/123	0,99	0,67; 1,48	1
				gepoolt		242/1107	1,54	1,23; 1,93	$1,88^{-4}$
				GWA	0,34/0,21	127/981	1,98	1,49; 2,64	$2,86^{-6}$
rs11655081	17	63893804	C/T	MD	0,32/0,28	116/125	1,22	0,83; 1,79	$1,56^{-1}$
				gepoolt		243/1106	1,67	1,33; 2,10	$1,31^{-5}$
				GWA	0,08/0,02	127/972	4,47	2,52; 7,95	$3,30^{-7}$
				MD	0,09/0,02	116/125	3,98	1,58; 10,01	$1,66^{-3}$
				gepoolt		243/1097	4,33	2,66; 7,05	$3,95^{-9}$

OR – Odds Ratio; KI – Konfidenzintervall; P – Signifikanzwert

3.2.3. Validierung der Variante rs 11655081

Um den SNP rs 11655081 zu validieren, wurden weitere 208 WD-Patienten und 278 Kontrollen genotypisiert. Auch hier konnte, bei einer Risikoallelfrequenz von 0,06 bei WD-Patienten im Vergleich zu 0,04 bei gesunden Kontrollen, eine Assoziation gezeigt werden ($P = 2,78 \cdot 10^{-2}$, siehe Tab. 3.10). Die OR der WD-Patienten weist mit 1,78 (95% KI: 0,99-3,21) im Vergleich zu den gepoolten MD-Patienten mit 4,33 (95% KI: 2,66-7,05) allerdings eine geringere Effektstärke auf. Eine grafische Darstellung der verschiedenen OR der Kollektive „MD“, „WD“ und „weitere Dystonien“ ist der Abbildung 3.5 zu entnehmen.

Tab. 3.10.: rs 11655081 assoziierte Signale mit genomweiter Signifikanz

SNP	Phase	MAF (Pat/Kont)	Anzahl (Pat/Kont)	OR	95% KI	<i>P</i>
rs11655081	GWAS	0,08/0,02	127/972	4,47	2,52;7,95	$3,30^{-7}$
	MD	0,09/0,02	116/125	3,98	1,58;10,01	$1,66^{-3}$
	Pooled MD	0,08/0,02	243/1097	4,33	2,66;7,05	$3,95^{-9}$
	WD	0,06/0,04	208/278	1,78	0,99;3,21	$2,78^{-2}$

OR – Odds Ratio; KI – Konfidenzintervall; *P* – Signifikanzwert

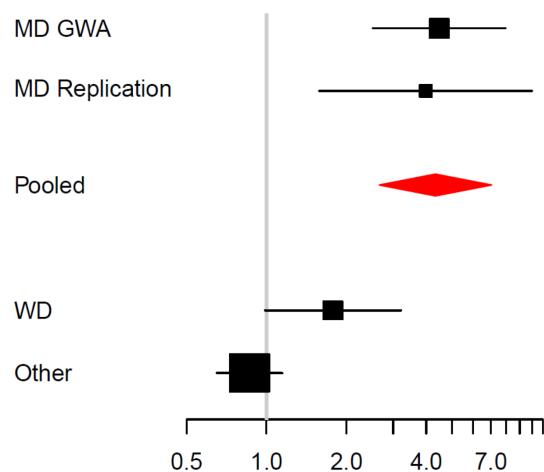


Abb. 3.5.: Forestplot der Odds-Ratio (OR) für rs 11655081. Aufgetragen ist die OR der vier GWAS-Phasen Genotypisierung, Replikation und Validierung bei WD-Patienten und anderen Formen der isolierten Dystonie. Die Streubreite der Messwerte wird durch die Breite der Kästchen (Varianz) und die horizontalen Linien (Konfidenzintervall) angegeben. Die Fläche der Rechtecke gibt Aufschluss über die statistische Aussagekraft der Werte, welche vor allem von der Größe der Stichprobe bestimmt wird. Die OR bei MD- und WD-Patienten zeigt ein erhöhtes Risiko, wobei der Effekt für die MD stärker ausgeprägt ist als für die WD. Für andere Dystonieformen konnte kein Effekt nachgewiesen werden (Vgl. Lohmann et al., 2014).

In einem letzten Validierungsschritt wurden 1 969 Patienten unterschiedlicher Dystonieformen, wie der zervikalen Dystonie, dem Blepharospasmus, der fokalen und segmentalen Dystonie und 2 233 populationsbasierte Kontrollen ebenfalls auf den SNP rs 1165-5081 überprüft. Hier konnte jedoch keine Assoziation, weder im deutschen, holländischen, italienischen, spanischen, serbischen oder japanischen Kollektiv, gefunden werden. Die Angaben der jeweils detektierten MAFs befinden sich in der Tabelle 3.11.

Tab. 3.11.: Minor-Allelfrequenz der Variante rs 11655081 bei fokalen und segmentalen Dystoniekontrollen sowie gesunden Kontrollen

Ethnie	Subgruppe	Anzahl	CC	CT	TT	MAF
Japan	alle Patienten	177	26	74	77	0,36
	zervikal	90	13	43	43	0,38
	fokal	40	7	12	21	0,33
	segmental	47	6	19	22	0,33
	Kontrollen	199	13	105	81	0,33
Niederlande	Patienten (zervikal)	350	1	32	317	0,05
	Kontrollen	913	5	82	826	0,05
Serbien	alle Patienten	113	1	12	100	0,06
	zervikal	43	0	7	36	0,08
	fokal und segmental	70	1	5	64	0,05
	Kontrollen	101	1	12	88	0,07
Italien	alle Patienten	444	2	74	368	0,09
	zervikal	127	1	26	100	0,11
	Blepharospasmus	110	0	21	89	0,10
	fokal	52	0	6	46	0,06
	segmental	155	1	21	133	0,07
	Kontrollen	342	5	49	286	0,09
Spanien	alle Patienten	323	0	41	282	0,06
	zervikal	93	0	9	84	0,05
	Blepharospasmus	128	0	15	113	0,06
	fokal	36	0	5	31	0,07
	segmental	66	0	12	54	0,09
	Kontrollen	266	1	36	229	0,07
Deutschland	alle Patienten	562	0	43	519	0,04
	zervikal	348	0	24	324	0,03
	Blepharospasmus	65	0	3	62	0,02
	fokal	74	0	6	68	0,04
	segmental	76	0	10	66	0,07
	Kontrollen	412	3	30	379	0,04

CC – homozygot für das C-Allel; CT – heterozygot für das C-Allel; TT – Wildtyp; MAF – Minor-Allelfrequenz des C-Allels

4. Diskussion

In diesem Abschnitt werden zu Anfang die Ergebnisse aus dem NGS bei den MD-Familien A, B und C diskutiert. Außerdem wird die Bedeutung des dabei identifizierten Kandidatengens *RAB12* für die MD-Erkrankung beurteilt. Im Anschluss werden die Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus im *ARSG*-Gen und tätigkeits-spezifischen Bewegungsstörungen erörtert.

4.1. Monogenetische Ursachen der Musikerdystonie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es mittels Genom- bzw. Exomsequenzierung möglich, eine Mutation im *RAB12*-Gen auf Chromosom 18 zu detektieren, welches mit großer Wahrscheinlichkeit mit der MD-Erkrankung der Familie A und C in Zusammenhang steht.

4.1.1. Phänotyp der MD-Familien A, B und C

Nach umfangreichen klinisch-neurologischen Untersuchungen von 15 Mitgliedern der Familie A, B und C konnte für sieben Angehörige eine definitive Erkrankung an der MD bzw. WD und für eine weitere Person (L-2325) eine mögliche WD diagnostiziert werden. Das mittlere Erkrankungsalter in den Familien lag bei 28 Jahren (20-33 Jahre) und umfasste eine durch das Instrumentalspiel ausgelöste rechtsseitige Handdystonie bei den drei Indexpatienten, sowie einen Schreibkrampf mit teils brachialer Beteiligung bei vier weiteren Familienmitgliedern. L-2325 wies eine mildere Symptomatik mit lediglich subjektiver Anspannung der rechten Hand beim Schreiben sowie ein späteres Erkrankungsalter von 55 Jahren auf und wurde deshalb als „möglich erkrankt“ klassifiziert. Die im Rahmen der klinischen Untersuchung angefertigten Videoaufnahmen wurden anhand der unter 2.1 beschriebenen Kriterien von vier unabhängigen Bewegungsstörungsexperten beurteilt und bestätigten die MD- bzw. WD-Diagnose.

Anamnestische Daten zu bereits verstorbenen Familienmitgliedern der ersten Generation der Familie A weisen darauf hin, dass auch Person I:4 an der MD erkrankt war. Diese Häufung über zwei bis drei Generationen in drei unterschiedlichen Familien legt eine monogenetische Ursache der MD nahe. Die Verteilung der Erkrankung im Stammbaum ist dabei typisch für einen autosomal-dominanten Erbgang (Abb. 2.1). Da die spezifische Suche nach bekannten Dystoniegenen bei MD-Patienten in der Vergangenheit nicht erfolgreich war, wurde eine Genomsequenzierung mittels NGS vorgenommen. Ein Verfahren, das sich in einer Vielzahl von Arbeiten zur Identifikation krankheitsauslösender Mutationen bei seltenen Erkrankungen bewährt hat (Yang et al., 2014, Legati et al., 2016).

4.1.2. Identifikation der Kandidatengene mittels NGS

Im Zuge der Genomsequenzierung war es möglich, etwa vier Millionen Varianten pro Patient zu detektieren. Wie bereits in 2.3.1 beschrieben, ist das NGS ein Hochdurchsatzverfahren bei dem, im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung, nicht jede einzelne Sequenz eine Qualitätskontrolle durchläuft. So werden sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Varianten erzeugt (Lohmann, 2014). Um letztere zu vermeiden wird eine möglichst hohe Abdeckung der *Reads*, die sog. *Coverage*, angestrebt, wobei das gleiche Fragment mehrmals sequenziert und mit der Referenzsequenz verglichen wird. Beispielsweise erhöht eine *Coverage* von 20 bei einer Fehlerrate von etwa 1% die statistische Zuverlässigkeit der ermittelten Daten auf 99,9999%, d. h. die Wahrscheinlichkeit einer falsch-negativen Variante beträgt eins zu einer Millionen (Muzzey et al., 2015).

Um falsch-positive Varianten zu identifizieren, wurden interessante Kandidatengene mittels Sanger-Methode resequenziert. Dieses Vorgehen wird zunehmend hinterfragt, da die stete Verbesserung der NGS-Technologie dazu führt, dass Fehlerraten sinken und die zeit- und kostenaufwändige Sanger-Sequenzierung infolgedessen redundante Informationen produziert (Baudhuin et al., 2015). Beck et al. zeigten zudem, dass ein einzelner Durchlauf der Sanger-Sequenzierung fälschlicherweise häufiger echt-positive Varianten aus dem NGS widerlegt, als falsch-positive zu detektieren (Beck et al., 2016). Möglicherweise ist im Resequenzierungsschritt dieser Arbeit also die wahre pathogene Mutation ausgeschlossen worden. Trotzalledem erschien das Vorgehen zum Zeitpunkt der Datenerhebung im Jahre 2012 gerechtfertigt, da die verfügbaren NGS-Methoden eine vergleichsweise hohe Fehlerrate aufwiesen. Die des Illumina lag z. B. bei >0,5%, d. h. ein Fehler pro 200 Basen (Mardis, 2013).

Um nun aus der Vielzahl der gefundenen Varianten diejenigen zu detektieren, die mit der MD in Zusammenhang stehen, wurden die Daten nach einem stringenten Algorithmus

gefiltert (Details siehe 2.3.2), welcher im Folgenden kritisch hinterfragt werden soll.

Das Exom ist zuständig für die Kodierung der Aminosäuresequenz der Proteine in den Zellen. Es nimmt anteilig zwar nur 1% der DNA ein, jedoch wurden 85% der pathogenen Varianten genetischer Erkrankungen ebendort identifiziert (Wang et al., 2013). Alle exonischen Varianten wurden folglich herausgegriffen, intronische dagegen verworfen. Wie näher im Abschnitt 4.2.4 erörtert, können auch intronische SNPs durch Faltung der DNA regulatorischen Einfluss auf weit entfernte, kodierende Abschnitte nehmen (Schierding et al., 2014). Es ist also denkbar, dass die tatsächliche pathogene Mutation damit ausgeschlossen wurde. Ein unselektiertes Überlappen der gefundenen Varianten war jedoch nicht möglich, da aufgrund der geringen Fallzahl der MD-Familien keine ausreichende Eingrenzung der Kandidatenvarianten erreicht worden wäre.

Weiterhin wurden synonyme Varianten verworfen, da krankheitsverursachende Mutationen in etwa 90% der Fälle Aminosäuresequenz verändernde *missense*-Mutationen, Stop-Codon vermittelnde *nonsense*-Mutationen oder Duplikationen und Deletionen, die zur Leserasterverschiebung der Aminosäuresequenz führen, sind (Human Gene Mutation Database, 2016). In seltenen Fällen können aber auch synonyme Varianten funktionellen Effekt haben, indem sie beispielsweise das *Splicing* beeinflussen. So wird geschätzt, dass 15% der bekannten synonymen Varianten, wie z. B. die c.855C>T-Variante im *CHRNE*-Gen, die zum kongenitalen myasthenen Syndrom führt (Richard et al., 2007), aufgrund von Splicingdefekten genetische Erkrankungen verursachen (Diederichs et al., 2016).

Die Frequenz der gesuchten Variante sollte zudem unter 1% liegen, da die MD mit einer Inzidenz von 0,1 pro Tausend in der Normalbevölkerung zu den Seltenen Erkrankung zählt (Nowak, 2014), welche, der Annahme einer monogenen Pathogenese folgend, möglicherweise durch eine seltene Variante mit hoher Effektstärke verursacht wird. Auch hierfür gibt es eine Gegenthese: in sog. Founderpopulationen, geografisch oder kulturell isolierten Bevölkerungsgruppen, kann die Häufigkeit einer genetischen Variante deutlich höher als in der Allgemeinbevölkerung sein. Beispielsweise liegt die Risikoallelfrequenz der c.826C>A-Variante im *FKRP*-Gen, welche eine Unterform der Gliedergürtel-Muskeldystrophie verursacht, in der Hutterer-Subpopulation Nordamerikas bei 10,5%, während sie in der ExAC-Datenbank kaukasischer Kontrollen lediglich 0,3% beträgt (Triggs-Raine et al., 2016). Das Argument kann jedoch entkräftet werden, da in dieser Arbeit keine Founderpopulation untersucht wurde.

Nicht zuletzt ist es möglich, dass verschiedene Gene intra- und interfamiliär ursächlich für die Erkrankung sind und somit das wahre Kandidatengen im Überlappungsschritt der MD-Familien unter- und miteinander ausgeschlossen wurde. Auch hier sei angemerkt,

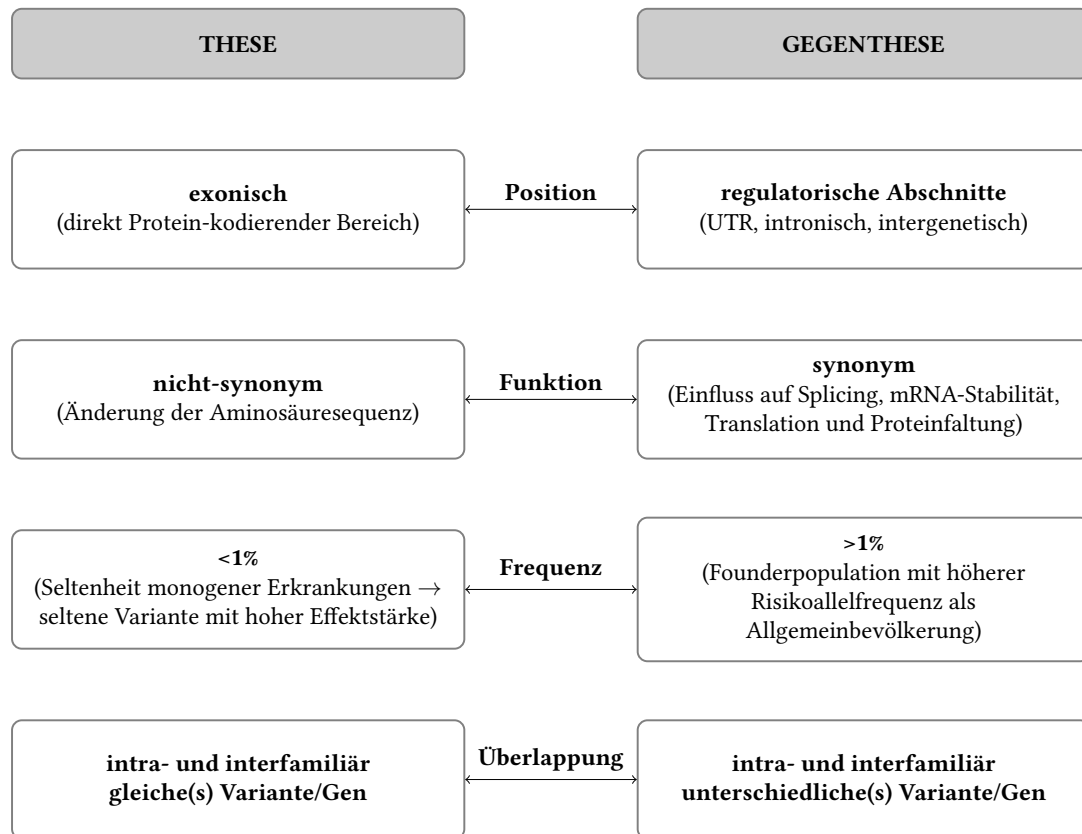


Abb. 4.1.: Filteralgorithmus im Diskurs. Gezeigt sind die Schritte „Position“, „Funktion“ und „Frequenz“ sowie „intra- und interfamiliäre Überlappung“, nach welchen die Genom- bzw. Exomdaten der MD-Familien im monogenen Ansatz gefiltert wurden. Linksseitig sind die dem Algorithmus zugrunde liegenden Thesen, rechtsseitig die, bei der Beurteilung der gefundenen Kandidatengene zu bedenkenden, Gegenthesen dargestellt.

dass aufgrund der geringen Fallzahl keine unselektierte Analyse möglich war. Zusammenfassend werden diese Überlegungen in Abbildung 4.1 einander gegenübergestellt.

Die so ermittelten Varianten wurden resequenziert und unterliefen einer Segregationsanalyse innerhalb einer Familie bzw. einer erneuten Untersuchung der Frequenz bei norddeutschen Kontrollen. Wie bereits in 3.1 erläutert, konnte kein Kandidatengen gefunden werden, welches bei allen drei Familien auftrat und krankheitsverursachend hätte sein können. Auch in der Überlappung von jeweils zwei Familien konnte keine der Varianten verifiziert werden, sodass im weiteren Verlauf der WD-Patient L-2325 aus der Gruppe der Erkrankten ausgeschlossen wurde. Dieser war, wie eingangs beschrieben, als „möglich betroffen“ klassifiziert worden. Nach Reevaluation der zuvor erhobenen Daten, konnte das Kandidatengen *RAB12* in den drei Schritten Resequenzierung, Segregationsanalyse und Frequenzkontrolle bestätigt werden.

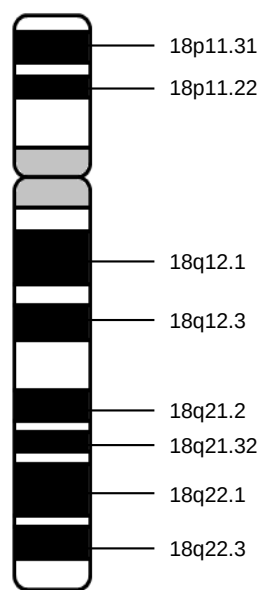


Abb. 4.2: Idiogramm des Chromosoms 18. Die Bänderung ergibt sich aus den genarmen G-Banden (schwarz) und genreichen R-Banden (weiß) sowie dem Centromer (grau). Die Bezeichnung setzt sich wie folgt zusammen: Nummer des Chromosoms, p – kurzer Arm, q – langer Arm und Nummer der chromosomalen Region vom Centromer aus zählend (Vgl. Ensembl, 2016b).

4.1.3. Chromosom 18 und das Kandidatengen *RAB12*

Das *RAB12*-Gen befindet sich auf Chromosom 18p11.22, welches etwa 80 000 000 Basenpaare lang ist und 269 kodierende Gene aufweist (Abb. 4.2; Ensembl, 2016b). Es ist damit das Chromosom mit der geringsten Gendichte des Menschen. Im Falle einer Trisomie kommt es zur Ausprägung des Edwards-Syndrom (Nusbaum et al., 2005). Bekannte Gene sind beispielsweise *Bcl-2*, dessen Genprodukt die Apoptose von Mitochondrien reguliert (Hata et al., 2015) und *MBP*, ein basisches Myelinprotein, welches für die Bildung der Myelinscheide von Nervenzellen nötig ist (Vassall et al., 2015). Interessanterweise beschrieben Leube et al. bereits 1996 die Region 18p in Zusammenhang mit einer zunächst fokal beginnenden und im späten Erwachsenenalter generalisierenden Form der idiopathischen Torsionsdystonie (Leube et al., 1996).

Die Familie der *RAB*-Gene kodiert für kleine Guanosintriphosphat-bindende Proteine (GTPasen), welche eine wichtige Rolle beim Vesikel- und Stofftransport innerhalb der Zelle spielen (Stenmark, 2009). Viele der Gene stehen dabei in Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen. So sind Mutationen im *RAB3*-Gen mit dem Warburg Mikrosyndrom (Aligianis et al., 2005) oder *RAB7*-Gen mit der Neuropathie Charcot-Marie-Tooth Typ 2B assoziiert (Verhoeven et al., 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass Mutationen im *RAB39B*-Gen Parkinson verursachen (Wilson et al., 2014).

RAB12 kodiert eine kleine GTPase, die stark im Gehirn exprimiert ist (Protein Atlas, 2016). Es ist an der Membran verschiedener zellulärer Kompartimente wie dem Golgi-Apparat, Endosom und Lysosom lokalisiert, wo es die Degradation von transmembranären Proteinen, wie z. B. dem Transferrin-Rezeptor, reguliert (Olkkonen et al., 1993, Mat-

sui, 2011). Eine RAB12-induzierte Aktivierung des retrograden Stofftransports schützt die Zelle zudem partiell vor Intoxikation (Rydell et al., 2014) und führt zu einer verminderten Mastzelldegranulation (Efergan et al., 2016).

Matsui et al. beschreiben im Zusammenhang mit Autophagieprozessen die intrazelluläre Signalkaskade: RAB12 liegt zunächst im GDP-gebunden, inaktiven Zustand in der Zelle vor. Kommt es zu einer Aktivierung durch Dennd3, ein *Guanin Nucleotide Exchange Factor* (GEF), wird das an RAB12 gebundene GDP zu GTP phosphoryliert. Dies führt zu einer Translokation und Degradation des Aminosäuretransporters PAT4, infolgedessen der Proteinkomplex mTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) inhibiert wird, was zur Aktivierung der Autophagozytose führt (Matsui et al., 2014; Xu et al., 2015).

4.1.4. Beurteilung des Kandidatengens *RAB12*

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei verschiedene *missense*-Mutationen im *RAB12*-Gen (Gly13Asp; Ile196Val) bei vier von 241 Indexpatienten (1,7%) detektiert werden, die möglicherweise in Verbindung mit deren MD-Erkrankung stehen. Die Einschätzung des Stellenwerts des Kandidatengens ist ambivalent:

Die Segregationsanalyse erbrachte im Falle der Familie A, dass die WD-erkrankten Familienmitglieder Träger der Ile196Val-Variante waren. Bei Familie C wurde diese jedoch bei der nicht-betroffenen Mutter des Indexpatienten (L-2329) gefunden. Sie spielte selbst kein Instrument. Möglich ist, dass der Probandin eine milde Symptomatik im Alltag, ohne die für das Instrumentalspiel erforderliche hochpräzise Bewegungskoordination, nicht auffiel. Die Probandin stand für eine detaillierte klinisch-neurologische Begutachtung leider nicht zur Verfügung. Das anamnestische Fehlen der dystonen Symptomatik ließe sich auch mit dem Vorliegen einer reduzierten Penetranz der *RAB12*-Variante begründen, d. h. der Genotyp „*RAB12*-Variante“ führt nicht bei allen Trägerinnen auch zur Ausprägung des Phänotyps „MD“ bzw. „WD“. Dieses Phänomen ist bereits mehrfach bei Dystonieerkrankungen beschrieben worden, wobei der zugrunde liegende Mechanismus jedoch (noch) nicht verstanden ist. Cooper et al. beschreiben mehrere mögliche Variablen, die die Ausprägung eines Genotyps beeinflussen können. Beispielsweise können regulatorische Gene und epigenetische Faktoren, wie die DNA-Methylierung und Histonmodifikation, den Effekt einer Mutation variieren (Cooper et al., 2013). Ebenso kann das Geschlecht eines Menschen Einfluss nehmen, wenn die betroffenen Gene geschlechtshormonsensitiv sind. Die Arg1132Gln-Mutation im *SCN4A*-Gen beispielsweise führt zu einer hypokaliämischen periodischen Paralyse, bei der die Extremitäten der Betroffenen wiederholt über Stunden bis Tage gelähmt sind. Im Zusammenspiel mit Östro-

genen weisen Frauen indessen eine deutlich mildere Symptomatik auf (Ke et al., 2013). In der Literatur ist das Phänomen der reduzierten Penetranz bereits für verschiedene andere neurologische Erkrankungen beschrieben worden. So etwa bei Duplikationen im α -Synuclein-kodierenden *SNCA*-Locus, welche frontotemporale Demenz und Parkinsonismus verursachen (Kara et al., 2014) oder Mutationen im *DYT1*- und *DYT6*-Gen, welche zur isolierten Dystonie führen (Hutchinson et al., 2013).

Das zusätzlich durchgeführte Screening des MD-Kollektivs erbrachte darüber hinaus eine *missense*-Mutation im Exon 1 (Gly13Asp) sowie einen weiteren Träger der Ile196Val-Variante (L-3781). Keine der beiden *missense*-Varianten konnte im EPIPARK-Kontrollkollektiv gefunden werden. Auch die EVS- bzw. ExAC-Frequenz der Ile196Val-Variante deckt sich mit unter 0,04% (keine Detektion für Gly13Asp) mit der anfänglichen Annahme, die pathogene Variante müsse selten sein, da die MD zum Formenkreis der Seltenen Erkrankungen gehört.

Zu bemerken ist weiterhin, dass *RAB12* insgesamt ein sehr invariables Gen ist – laut ExAC sind in dem 224 Aminosäure langen Protein 55 *missense*- und eine *loss of function*-Mutation bekannt ($55/224=0,23$). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass gerade jene Dystoniegene, deren Pathogenität in unabhängigen Screeningverfahren und funktionellen Studien reproduzierbar war, in invariablen Genen gefunden wurden, wie z. B. das *DYT6*-Gen *THAP1* ($49/213=0,19$). Werden potentielle Kandidatengene dagegen in variablen Genen detektiert, spricht der Befund eher für einen weiteren apathogenen Polymorphismus. In der Vergangenheit sind so verschiedene Dystoniegene entwertet worden: z. B. *CACNA1B*, mit 574 seltenen Varianten im 2 339 Aminosäuren langen Protein ($574/2\,339=0,5$; Domingo et al., 2016).

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Ile196Val-Variante signifikant häufiger in der Gruppe der MD-Patienten gegenüber der der Kontrollen auftritt ($P<0,0001$). Dies war für die Gly13Asp-Variante nicht möglich, da hier keine Frequenzangaben in den Datenbanken des EVS bzw. der ExAC verfügbar waren und die geringe Fallzahl der eigenen Kontrollgruppe nicht für eine statistisch signifikante Aussage genügte. Um nun die Prävalenz der *RAB12*-Mutationen besser einschätzen zu können, ist es folglich nötig, die Patientenzahl zu erhöhen. Aufgrund der Seltenheit der MD, sind dafür Untersuchungen im Rahmen multizentrischer Studien nötig.

Die Prädiktionsprogramme Polyphen-2, MutationTaster und MutPred sagen für beide *missense*-Varianten lediglich einen milden bis keinen Effekt voraus. Für die zusätzlich im Exon 2 gefundene synonyme Variante Arg92Arg des Indexpatienten L-3788 war durch den MutationTaster zunächst eine mögliche Beeinträchtigung der Spleißfunktion vorhergesagt worden. Die weitergehende *in silico* Analyse und Untersuchung der cDNA des

Patienten konnten keinen Einfluss auf das *Splicing* zeigen, sodass die Variante aus den Betrachtungen ausgeschlossen wurde. Um den Effekt der verbleibenden zwei *missense*-Mutationen besser einschätzen zu können, sind deshalb funktionelle Studien nötig, die sich mit der Frage beschäftigen, ob die beschriebenen Varianten zu einer tatsächlichen Veränderung der RAB12-kodierten GTPase führen und deren Aktivität beeinflussen.

4.2. Komplex-genetische Ursachen der Musikerdystonie

Im Rahmen der GWAS konnte die intronische Variante rs11655081 im *ARSG*-Gen als erster möglicher Risikofaktor der MD mit genomweiter Signifikanz identifiziert werden. Bemerkenswerterweise konnte diese Assoziation ebenfalls für die WD, jedoch für keine andere fokale oder segmentale Dystonie nachgewiesen werden.

4.2.1. Zusammenstellung des Patienten- und Kontrollkollektivs

Die Qualität der GWAS ist abhängig von der Zusammenstellung des zu analysierenden Kollektivs. Dies soll unter folgenden Aspekten diskutiert werden: sind die ausgewählten Stichproben 1. repräsentativ und 2. miteinander vergleichbar.

Die für die Genotypisierungs- und Replikationsphase rekrutierten MD-Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung durchschnittlich 44,6 Jahre alt und mit 34,9 Jahren erstmalig an der MD erkrankt. Der Anteil der männlichen Patienten war dabei mit 73,3% deutlich höher als der der weiblichen. Diese Daten decken sich mit den klinischen Angaben in der Literatur, nach denen das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 33 Jahren und das Verhältnis von Männern zu Frauen bei 4:1 liegt (Altenmüller, 2010). In 18,4% der Fälle wurde, die Literaturangaben liegen zwischen 20-27%, eine positive Familienanamnese berichtet (Schmidt et al., 2009).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter der WD-Patienten liegt in dieser Studie mit 48,9 Jahre über dem anderer Quellen mit 38 Jahren, jedoch immer noch in der möglichen Streuung von 30-50 Jahren (Torres-Russotto, 2008). Männer erkrankten etwa drei Mal so häufig wie Frauen (Ritz et al., 2009) – auch diese Aussage deckt sich mit den Werten unserer Studie (Männeranteil 55,9%). Gleiches gilt für die Angaben zur positiven Familienanamnese (20,6%), welche mit den recherchierten 21-29% übereinstimmen (Ritz et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich somit für beide Patientengruppen sagen, dass ihre Erkrankungscharakteristika zu bereits publizierten Arbeiten passen, sie also repräsentativ sind.

Schwierig gestaltet sich die Auswertung der Gruppe der fokalen und segmentalen Dystonien, da diese sehr heterogen ist. Aufgrunddessen sich das niederländische Kollektiv allein aus zervikalen Dystoniepatienten zusammensetzte, soll es an dieser Stelle beispielhaft herausgegriffen werden: das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 41,9 Jahren, der Anteil der Frauen überwog mit 67%. Die Angaben in der Literatur sind ambivalent: das durchschnittliche Erkrankungsalter wird einerseits mit 41 Jahren, der Frauenanteil mit 66% beschrieben (Chan et al., 1991). In einer Arbeit der *Collaborative Group der Epidemiological Study of Dystonia in Europe* werden Werte von 50-70 Jahren und ein 58%-iger Frauenanteil erwähnt (Epidemiological Study of Dystonia in Europe Collaborative Group, 2000). Die Angabe einer positiven Familienanamnese lag mit 20,1% in dieser Studie über den beschriebenen 12% (Chan et al., 1991). Möglicherweise ist dies bedingt dadurch, dass die jeweiligen Untersuchungsteams mit dem Wissen um die Teilnahme an einer genetischen Studie gezielter auf das Erkrankungsmuster von Angehörigen eingegangen sind. Zudem wurden Dystonien in der Vergangenheit immer wieder neu klassifiziert, weshalb die unterschiedlichen Arbeiten nur schwer miteinander verglichen werden können (Albanese et al., 2013; King et al., 2016). Von einer entgültigen Einschätzung zur Auswahl des Patientenkollektivs wird deshalb an dieser Stelle abgesehen.

Bei der Zusammenstellung der Kontrollkollektive wurde zunächst ausgeschlossen, dass die Betroffenen eine Bewegungsstörung wie eine Parkinson-, Restless Legs- oder Tremorerkrankung sowie eine Dystonie, einen Tic oder Myoklonus aufwiesen. Zudem wurde darauf geachtet, dass sowohl die in der Replikationsphase eingeschlossenen gesunden Musiker (Alter bei Untersuchung $47,2 \pm 8,1$ Jahre), als auch die den WD-Patienten als Kontrollen dienenden EPIPARK-Probanden ($69,4 \pm 6,4$ Jahre) das durchschnittliche Erkrankungsalter für die MD und WD bereits überschritten hatten. Ausschließen lässt sich ein späteres Erkrankungsalter jedoch nicht, in der Literatur werden für die MD Streuwerte bis zu 75 Jahren (Chang und Frucht, 2013), für die WD bis zu 65 Jahren angegeben (Ritz et al., 2009). Gleiches gilt auch für die Kontrollgruppe der zervikalen Dystoniepatienten aus der Niederlande: bei der Untersuchung waren sie $77,1 \pm 2,5$ Jahre alt und damit über dem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 41 Jahren, eine Garantie auf ein Nicht-Erkranken gibt es jedoch nicht. Bezüglich der Geschlechterverteilung sind die Gruppen der Replikationsphase unterschiedlich gewichtet: 70,7% der MD-Patienten und nur 50,4% der gesunden Musiker sind männlich. Dies entspricht dem Phänotyp der Erkrankung, nach dem, wie bereits oben beschrieben, Männer häufiger an der MD erkranken als Frauen. Die gewählten Kollektive der ersten (WD 55,9%, EPIPARK 54% männlich) als auch zweiten Validierungsphase (Dystonien 38%, Kontrollen 43,8% männlich) dagegen

sind in diesem Charakteristikum kongruent.

Als epidemiologisches Verfahren beruht die GWAS darauf, die Allelfrequenz von Varianten verschiedener Gruppen miteinander zu vergleichen. Diese kann in unterschiedlichen Ethnien gänzlich anders sein. So ist z. B. der sich im *HBB*-Gen befindende SNP rs334 in Europa sehr selten und führt in homozygoter Ausprägung zur Sichelzellanämie, während er in Afrika einen häufigen Polymorphismus darstellt, der aufgrund der resultierenden Malariaresistenz einen Selektionsvorteil bietet (Karki et al., 2015). Würden nun europäische Sichelzellpatienten mit afrikanischen Kontrollen verglichen werden, würde für die zuvor beschriebene Variante keine Assoziation gezeigt werden können. Patienten- und Kontrollkollektiv müssen also genetisch vergleichbar sein, um vom Phänotyp „krank“ oder „nicht krank“ Rückschlüsse auf den Genotyp und umgekehrt ziehen zu können.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die genetische Varianz in Zentral- und Westeuropa, speziell in Norddeutschland und der Niederlande, sehr gering ist (Steffens et al., 2006; Nelis et al., 2009). Die im Norden Deutschlands rekrutierten MD-Patienten wurden deshalb in der ersten Phase mit norddeutschen PopGen-Kontrollen verglichen (Krawczak et al., 2006). Zu bedenken ist dabei aber, dass die Gruppe der Musiker per se internationaler als die lokale Kontrollgruppe ist. Beispielsweise liegt der Ausländeranteil an deutschen Musikhochschulen bei 31% (Statistisches Bundesamt, 2016), während er in der Allgemeinbevölkerung Schleswig-Holsteins lediglich 4,8% beträgt (Statistikamt Nord, 2014). In der zweiten Phase dienten deshalb, und um eine Assoziation mit einem möglichen „Musiker-Gen“ auszuschließen, gesunde norddeutsche Musiker als Kontrollgruppe. Auch im Falle der WD-Patienten konnte auf lokale populationsbasierte Kontrollen der EPIPARK-Studie zurückgegriffen werden (Kasten et al., 2013). Dankenswerterweise war dies ebenfalls für das internationale Kollektiv der fokalen und segmentalen Dystonien möglich, bei denen die Partnerinstitute jeweils ethnisch gematchte Kontrollen für die Analyse bereitstellten.

Um die Bevölkerungsschichtung als mögliche Störvariable zu identifizieren, wurde die sog. *Genomic Control* (λ_{GC}) berechnet. Beträgt $\lambda_{GC}=1$, liegt keine Stratifizierung vor. Werte über eins weisen dagegen auf eine Hierarchisierung der Population hin (Price et al., 2010). Das sich in dieser Studie ergebende λ_{GC} von 1,07 zeigt an, dass lediglich eine marginale Hierarchisierung vorliegt.

Insgesamt lässt sich somit trotz der diskutierten Für und Wider feststellen, dass die für diese Arbeit verwendeten Patienten- und Kontrollgruppen sowohl repräsentativ als auch vergleichbar sind.

4.2.2. Identifikation der Kandidatengene mittels GWAS

Wie im Abschnitt 2.3.9 beschrieben, ist es mittels GWAS möglich, das menschliche Genom unvoreingenommen, ohne Zuhilfenahme von Hypothesen, zu analysieren. Die Methode basiert dabei auf der *Common Disease, Common Variant*-Hypothese, nach der die Suszeptibilität häufiger Erkrankungen durch Varianten beeinflusst wird, die bei mehr als 1-5% der Bevölkerung vorkommen, selbst häufig nur eine geringe Effektstärke haben und erst im Zusammenspiel verschiedener Gene miteinander bzw. mit Umweltfaktoren zur Ausprägung der Erkrankung führen (Manolio, 2010).

Auf dem Genotypisierungs-Array sind 906 600 SNPs und 946 000 CNVs aufgebracht. Sie sind beispielsweise aus dem HapMap-Projekt bekannt und kommen mit einer Frequenz >1% in der Bevölkerung vor (Affymetrix, 2016). Dieser Ausgangslage muss man sich bewusst sein, wenn man die erhobenen Daten im weiteren Verlauf interpretiert. Es werden also keine seltenen Varianten abgeprüft und es besteht keine Möglichkeit unbekannte Varianten zu detektieren. Ein weiterer Punkt: es werden zwar Punktmutationen und strukturelle Veränderungen von einzelnen DNA-Segmenten abgeprüft, Inversionen und Translokationen von ganzen Chromosomenabschnitten jedoch nicht.

In der ersten Phase der GWAS wurden initial 141 MD-Patienten und 1 214 Kontrollen eingeschlossen. Die dabei ermittelten Daten unterliefen der im Abschnitt 2.3.9 beschriebenen Qualitätskontrolle. Bei den verbliebenen 127 MD-Patienten und 984 Kontrollen wurden 557 620 SNPs gefunden und im Manhattanplot aufgetragen. 10 SNPs zeigten dabei Signifikanz und wurden in der Replikationsphase bei MD-Patienten und gesunden Musikern untersucht. Dabei war allein die sich in dem *ARSG*-Gen befindende intronische Variante rs 11655081 signifikant häufiger in der Gruppe der MD-Patienten als der der gesunden Musiker. Auch in der anschließenden Validierung bei WD-Patienten konnte der SNP rs 11655081 bestätigt werden, wenn auch mit geringerer Effektstärke (OR 1,78) als bei MD-Patienten (OR 4,33). In der zweiten Phase der Validierung, in der 1 696 Patienten mit einer isolierten Dystonie und 2 233 gematchte Kontrollen eingeschlossen wurden, konnte keine Assoziation gezeigt werden.

4.2.3. Chromosom 17 und das Kandidatengen *ARSG*

Das *ARSG*-Gen ist auf dem Chromosom 17q24.2 lokalisiert, welches etwa 83 000 000 Basenpaare lang ist und 1 185 kodierende Gene aufweist (Ensembl, 2016c). Bekannte Gene sind z. B. *MAPT*, welches ein Tau-Protein verschlüsselt, dessen Mutation zu zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen wie der kortikalen Demenz oder Alzheimer führen

kann (López González et al., 2016) oder *GFAP*, welches ein Intermediärfilament der Gliazellen kodiert und bei Veränderung zum Morbus Alexander mit Makroenzephalie, Ataxie und Krampfanfällen führen kann (Yang und Wang, 2015).

ARSG gehört zur Familie der Sulfatasegene, deren Genprodukte Sulfatester hydrolysieren. Diese Proteine sind an der zellulären Signalübertragung, der Proteindegradierung und Hormonbiosynthese beteiligt (Sardiello et al., 2005). *ARSG* wird ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert, im ZNS besonders stark in perivaskulären Makrophagen und Oligodendrozyten (Kowalewski et al., 2015). Auf zellulärer Ebene ist es im Lysosom und endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Kowalewski et al., 2014). Bei *ARSG*-defizienten Mäusen lässt sich eine lysosomalen Speichererkrankung nachweisen, infolgedessen es zu einem Verlust von Purkinje-Zellen und einer Akkumulation von GM-2 und GM-3-Gangliosiden im Kleinhirn mit ataktischem Phänotyp der betroffenen Tiere kommt (Kowalewski et al., 2015).

Bei Hunden verursacht eine homozygote Mutation des *ARSG*-Gens die neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL; Abitbol et al., 2010), bei der es aufgrund von Ablagerungen Ceroid-Lipofuscins zum Abbau der geistigen Aktivität, Epilepsie und Degeneration der Netzhaut kommt. Interessanterweise ist die Dystonie bereits als Merkmal der Erkrankung beschrieben. Folglich basiert die pathophysiologische Rolle des *ARSG*-Gens möglicherweise auch bei der MD bzw. WD auf dem beschriebenen Mechanismus.

4.2.4. Beurteilung des Kandidatengens *ARSG*

Bei der Beurteilung der gefundenen Variante rs 11655081 sind folgende Kritikpunkte zu diskutieren: die intronische Lokalisation, die stark variierende Allelfrequenz und die geringe Stichprobengröße.

Wie auch der identifizierte SNP rs11655081, sind etwa 80% der mittels GWAS analysierten Varianten nicht im codierenden Teil der DNA, sondern in einem inter- oder intra-genetischen Abschnitt, wie z. B. dem Intron lokalisiert (Manolio, 2010). Der Lösung der Frage, wie bis zu mega-Basenpaare voneinander entfernte Loci eines oder unterschiedlicher Chromosomen einander beeinflussen können, ist die Forschung in den letzten Jahren näher gekommen. So tritt mehr und mehr die dreidimensionale Strukturanalyse der DNA in den Vordergrund. Im eukaryonten Zellkern liegt die DNA um sich selbst gewunden und gefaltet vor, weshalb selbst linear sehr weit entfernte Genorte dicht beieinander liegen und sich gegenseitig beeinflussen können (Schierding et al., 2014). Beispielsweise sind SNPs auf Chromosom 8q24 identifiziert worden, die mit dem *MYC*-Gen, einem hoch

potenten Protoonkogen, interagieren, welches >300 kb entfernt lokalisiert ist (Wasserman et al., 2010).

Wie zuvor beschrieben, ist die homogene Verteilung der Allelfrequenz einer Variante ausschlaggebend für die nachfolgende statistische Auswertung der Daten. Diese variiert für rs 11655081 erheblich: von 5 bis 65% in den unterschiedlichen Populationen der dbSNP-Datenbank (NCBI, 2016) und nur 2 bis 4% in den eigenen norddeutschen Kontrollen. Die Berechnung der *Genomic Control* ($\lambda_{GC}=1,07$) zeigte jedoch lediglich eine moderate Hierarchisierung der Bevölkerungsstruktur innerhalb der norddeutschen Patienten und Kontrollen, welche möglicherweise durch die Beteiligung verschiedener Untersuchungsteams bei der Patientenrekrutierung zustande kam. Es ist also denkbar, dass der gefundene SNP in seiner Effektstärke überschätzt wurde.

Zusätzlich ist die kleine Stichprobengröße eine entscheidende Limitation der Studie, die die statistische Aussagekraft der detektierten Assoziationen mindert. Das *Wellcome Trust Case Control Consortium* zeigte, dass in Abhängigkeit von der analysierten Fallzahl von 250 bis 2000 Probanden zwei bis sechzehn SNPs das Signifikanzlevel überschritten. Gerade für häufige SNPs mit nur geringer Effektstärke konnte erst ab einer Stichprobengröße über 2000 eine Assoziation gezeigt werden (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007).

In der Vergangenheit konnten verschiedene Autoren Assoziationen jedoch auch mit geringeren Fallzahlen finden, wiesen die jeweiligen Varianten eine hohe Effektstärke auf, wie beispielsweise der SNP rs 17612858 des HLA-Klasse-II-Locus, der mit der Podocinosis assoziiert ist (je 200 Patienten in der Genotypisierung und Replikation; OR 2,44; Tekola Ayele et al., 2012) Der SNP im ARSG-Gen hat bei MD-Patienten eine gepoolte OR von 4,33 (95% KI 2,66-7,05). Er liegt damit deutlich über der durchschnittlichen OR von 1,1 bis 1,2 mittels GWAS detektierter Varianten (Zeng et al., 2015).

Zusammengefasst ist es denkbar aber nicht wahrscheinlich, dass die gefundene Assoziation ein falsch-positiver Befund ist, der begründet ist in der geringen Probenanzahl der ersten beiden GWAS-Phasen und der stark variierenden Allelfrequenz in unterschiedlichen Populationen (Abb. 4.3). Zugunsten einer echten Assoziation spricht, dass die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Befundes (*False-Positive Report Probability*; FPRP) für rs 11655081 bei 0,001, d. h. weniger als 0,1%, liegt.

Desweiteren konnte die Assoziation von rs 11655081 bei MD- bzw. WD-Patienten in drei unterschiedlichen Phasen, der Genotypisierung, der Replikation und der ersten Validierung, in voneinander unabhängigen Stichproben detektiert werden. Fehlende Assoziationssignale in der zweiten Validierungsphase lassen zwar zunächst vermuten, dass es



Abb. 4.3.: Fragenkatalog nach Pearson et al., der die Qualität der durchgeführten GWAS hinterfragt. Aufgeführt sind zehn Basisfragen, die, im Falle dessen sie positiv beantwortet werden können, einen reliablen Befund identifizieren (Pearson und Manolio, 2008). z. A. – zum Ausschluss; mgl. – möglich; Ø – durchschnittlich

sich bei der Variante rs 11655081 um einen falsch-positiven Befund handelt. Jedoch ist die Gruppe der fokalen und segmentalen Dystonien sehr heterogen, sodass die gefundene Assoziation auch auf den phänotypischen Unterschied „Tätigkeitsspezifität“ der MD- und WD-Erkrankung hindeuten könnte.

Um die erheblichen Unterschiede der Allelfrequenz in verschiedenen Populationen sowie die wahre Effektstärke von rs 11655081 besser einschätzen zu können, sind nun weitere Replikationen der Ergebnisse nötig. Esther Nibbeling et al. haben im Anschluss an diese Arbeit ein zusätzliches Screening von MD- und WD-Patienten durchgeführt. Dabei konnten bei WD-Patienten mehr seltene Varianten im *ARSG*-Gen im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden werden (Nibbeling et al., 2015). Zuletzt sei darauf hingewiesen, dass es sich bei den gefundenen Varianten lediglich um eine Assoziation und keinen kausalen Zusammenhang handelt. Dieser kann erst in anschließenden molekulargenetischen und -biologischen Untersuchungen des Kandidatengens überprüft werden.

4.3. Schlussfolgerungen

Das Ziel, sowohl mono- als auch komplex-genetische Ursachen der MD zu identifizieren, wurde voll und ganz erreicht. Im Nachfolgenden sollen die sich aus den Resultaten dieser Arbeit ergebenden Schlussfolgerungen dargestellt werden:

I

Mit Hilfe des NGS konnte eine seltene *missense*-Mutation (c.586A>G, p.Ile196Val, rs 1438-88944) des *RAB12*-Gens auf Chromosom 18 bei zwei von drei MD-Familien detektiert werden. Das exonweite Screening 238 nicht-verwandter MD-Patienten und 461 gesunder Kontrollen erbrachte einen weiteren MD-Patienten mit der c.586A>G-Variante sowie einen MD-Patienten mit einer neuen *missense*-Mutation (c.38G>A, p.Gly13Asp). Insgesamt konnten zwei verschiedene *RAB12*-Mutationen gefunden werden, die möglicherweise mit der MD-Erkrankung bei 4 von 241 Patienten in Zusammenhang stehen (1,7%). Der Anteil seltener *missense*-Mutationen im *RAB12*-Gen ist damit bei MD-Patienten signifikant höher als bei gesunden Kontrollen ($P < 0,05$, Fisher's Exact Test; Koschmidder und Borngräber et al., *Eur J Hum Genet.*, eingereicht).

II

Im Rahmen der vierstufigen GWAS wurden etwa 500 000 SNPs bei 127 MD-Patienten und 984 Kontrollen genotypisiert und zehn signifikant unterschiedliche SNPs ($P < 10^{-5}$) bei

zusätzlichen 116 MD-Patienten und 125 gesunden Musikern untersucht. Hierbei konnte ein Zusammenhang der intronischen Variante rs 11655081 im *ARSG*-Gen auf Chromosom 17 und dem Auftreten einer tätigkeitsspezifischen Dystonie gezeigt werden. Die Effektstärke ist dabei für die MD stärker ausgeprägt (OR 4,33) als für die in der Validierungsphase untersuchte WD (OR 1,78). Für andere fokale oder segmentale Dystonien konnte keine Assoziation gezeigt werden. Die in verschiedenen Populationen stark schwankende Allelfrequenz von rs 11655081 erfordert nun weitere Replikationen der Ergebnisse, um die wahre Effektstärke einschätzen zu können (Lohmann, ... Borngräber ..., *Mov Disord.*, 2014).

Die in dieser Arbeit gefunden Ergebnisse können die eingangs erwähnte positive Familienanamnese für MD-Patienten von 20-27% nur zum Teil erklären. Sie sind aber ein erster Ansatz für das Verständnis der Pathogenese auf genetischer Ebene und zeigen einmal mehr die erstaunliche Komplexität der MD, welche sich nicht auf EINEN kausalen Zusammenhang reduzieren lässt.

5. Weiterführende Untersuchungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bereiten die Grundlage für aussichtsreiche weiterführende Studien zur Etablierung genetischer Ursachen der MD.

Um die zwei gefundenen *missense*-Mutationen im *RAB12*-Gen als mögliche monogenetische Ursachen der MD zu prüfen, erfolgten durch Eva Koschmidder (Institut für Neurogenetik, Lübeck) funktionelle Studien am RAB12-Protein. Dabei zeigte sich für die Sekundär- und Tertiärstruktur der Mutanten Gly13Asp und Ile196Val im Vergleich zum Wildtyp *in silico* keine Veränderungen. Im Zellmodell konnte jedoch eine Modifizierung der Proteinlokalisierung von einer gleichmäßigen zytosolischen Verteilung beim Wildtyp nach perinukleär bei den RAB12-Mutanten nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich für beide Mutanten eine erhöhte GTPase-Aktivität. Um den daraus resultierenden Effekt auf die Autophagozytose nachzuweisen, wurde die LC3BII/I-Ratio bestimmt. LC3BI ist ein Mikrotubuli-assoziiertes *light-chain*-Protein der Autophagosomenmembran, welches bei Aktivierung der Autophagie vom Typ I zum Typ II konjugiert wird (Tanida et al., 2008). Die Ratio ist bei Gly13Asp-Mutanten leicht erhöht und lässt somit einen Effekt auf die Autophagozytoseaktivität vermuten. Zusätzlich konnte bei Trägern der Ile196Val-Variante ein reduzierter Spiegel löslicher Transferrinrezeptoren im Blut nachgewiesen werden. Die beschriebenen funktionellen Untersuchungen ermöglichten die für die Publikation nötige, deutlich differenziertere Beurteilung des Kandidatengens *RAB12*, bedeuteten jedoch auch einen verzögerten Abschluss der vorliegenden Arbeit (Koschmidder und Borngräber et al., *Eur J Hum Gen.*, eingereicht).

Überdies konnten im Frühjahr 2016 weitere Familienangehörige des im unabhängigen MD-Screening detektierten Ile196Val-Trägers L-3781 rekrutiert werden, wobei sich in der neurologischen Untersuchung zeigte, dass der Vater des Indexpatienten an einer WD erkrankt war. Anamnestisch wurde auch für den Großvater väterlicherseits und die Großmutter mütterlicherseits eine Schreibproblematik angegeben. Die genetische Untersuchung ergab, dass die nicht-betroffene Mutter homozygote Trägerin der Variante war. Die unvollständige Segregation widerspricht zunächst dem pathogenetischen Modell, könnte aber möglicherweise auch auf eine reduzierte Penetranz zurückzuführen sein.

Im Anschluss an diese Arbeit untersuchte Humera Manzoor (Institut für Neurogenetik, Lübeck) das *RAB12*-Gen bei 378 Patienten mit fokaler, segmentaler und generalisierter Dystonie und identifizierte eine weitere *missense*-Mutation bei einer Patientin mit fokaler Dystonie und Alkohol-responsiven Tremor (c.442G>A, p.Ala148Thr, CADD-Score: 31). Um die *RAB12*-Prävalenz besser einschätzen zu können, sollte nun ein zusätzliches Patientenscreening durchgeführt werden. Aufgrunddessen es sich bei der MD um eine Seltene Erkrankung handelt, sind dafür multizentrische Studien in internationaler Zusammenarbeit nötig. Im Falle dessen die beschriebenen *RAB12*-Varianten bei keinen weiteren Patienten nachgewiesen werden können, sollte versucht werden, zusätzliche MD-Familien zu rekrutieren und erneut mittels NGS zu analysieren. Bei ausreichender Größe der Familien ist dann eventuell eine Überlappung ohne vorherige Auswahl der Kandidatengene möglich.

Auch für den komplex-genetischen Ansatz gilt es, den detektierten Risikofaktor rs 11655081 nun in einem großen Patientenkollektiv zu untersuchen. Mit Hinblick auf dessen variable Allelfrequenz, sollten dafür ethnisch vergleichbare Gruppen ausgewählt werden, um die Effektstärke des SNPs besser bewerten zu können. Esther Nibbeling et al. führten im Anschluss der GWAS ein Screening des *ARSG*-Gens bei 158 MD- und 72 WD-Patienten durch. Hierbei konnten elf Varianten, davon zwei nicht-synonyme und seltene, identifiziert werden. Die SNV rs 61999318 (c.1478T>C, p.Ile493Thr) war dabei signifikant häufiger in der Gruppe der WD-Patienten als der der gesunden Kontrollen zu finden (Nibbeling et al., 2015), was den pathogenetische Zusammenhang des *ARSG*-Gens mit tätigkeitsspezifischen Dystonien weiter unterstützt.

Darüber hinaus ist zu prüfen, ob die intronische Variante rs 11655081 die exprimierte Menge oder Aktivität des *ARSG*-Gens beeinflusst. In Anlehnung an die Pathogenese der Ceroid-Lipofuszinose kann dabei die lysosomale Speicherfunktion untersucht werden, deren Beeinträchtigung zum Verlust von Purkinje-Zellen und Ablagerungen von GM-2 und GM-3-Gangliosiden im Kleinhirn führen kann.

6. Zusammenfassung

Die Musikerdystonie (MD) ist eine fokale, tätigkeitsspezifische Bewegungsstörung, die zum Koordinations- und Kontrollverlust der Muskulatur beim Instrumentalspiel führt und etwa 1-2% professioneller Musiker betrifft. In 20% der Fälle treten bei Angehörigen von MD-Patienten ebenfalls fokale Dystonien in Form einer MD oder eines Schreibkrampfes (WD) auf. Dies lässt eine gemeinsame genetische Ursache vermuten, wenig ist jedoch bisher dazu bekannt. Inhalt dieser Arbeit war es, die genetischen Ursachen der MD von zwei Ansätzen aus zu betrachten: dem monogenetischen, bei dem ein einzelner Gendefekt zur Erkrankung führt und dem komplex-genetischen, bei dem genetische Faktoren das Risiko an der MD zu erkranken erhöhen.

Mit Hilfe des *Next-generation Sequencing* wurden sechs Mitglieder drei deutscher MD-Familien genom- bzw. exomsequenziert. Dabei konnte eine seltene *missense*-Mutation (c.586A>G, p.Ile196Val, rs 143888944) des für eine kleine GTPase kodierenden *RAB12*-Gens auf Chromosom 18 bei zwei von drei Familien detektiert werden. Das exonweite Screening 238 nicht-verwandter MD-Patienten und 461 gesunder Kontrollen erbrachte einen weiteren MD-Patienten mit der c.586A>G-Variante sowie einen MD-Patienten mit einer neuen *missense*-Mutation (c.38G>A, p.Gly13Asp). Insgesamt konnten zwei verschiedene *RAB12*-Mutationen gefunden werden, die möglicherweise mit der MD-Erkrankung bei 4 von 241 Patienten in Zusammenhang stehen (1,7%). Der Anteil seltener *missense*-Mutationen im *RAB12*-Gen ist damit bei MD-Patienten signifikant höher als bei gesunden Kontrollen ($P < 0,05$, Fisher's Exact Test; Koschmidder und Borngräber et al., *Eur J Hum Genet.*, eingereicht).

Um genetische Risikofaktoren der MD zu identifizieren, wurde eine vierstufige genomweite Assoziationsstudie durchgeführt. So wurden 557 620 SNPs bei 127 MD-Patienten und 984 Kontrollen genotypisiert und zehn signifikant unterschiedliche SNPs ($P < 10^{-5}$) bei zusätzlichen 116 MD-Patienten und 125 gesunden Musikern überprüft. Hierbei konnte ein Zusammenhang der intronischen Variante rs 11655081 im *ARSG*-Gen auf Chromosom 17 und dem Auftreten einer tätigkeitsspezifischen Dystonie gezeigt werden. Die Effektstärke ist dabei für die MD stärker ausgeprägt (OR 4,33) als für die WD (n=208; OR 1,78). Für 1 696 andere fokale oder segmentale Dystoniepatienten konnte keine Assozia-

tion nachgewiesen werden (Lohmann, ...Borngräber..., *Mov Disord.*, 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass sowohl mono- als auch komplex-genetische Faktoren Einfluss auf die MD haben und sind so ein erster Ansatz für das Verständnis deren Ätiologie auf genetischer Ebene.

Literaturverzeichnis

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G. R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Gibbs, R. A., Hurles, M. E., and McVean, G. A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319):1061–1073.
- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G. R., Auton, A., Brooks, L. D., DePristo, M. A., Durbin, R. M., Handsaker, R. E., Kang, H. M., Marth, G. T., and McVean, G. A. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491(7422):56–65.
- Abitbol, M., Thibaud, J.-L., Olby, N. J., Hitte, C., Puech, J.-P., Maurer, M., Pilot-Storck, F., Hédan, B., Dréano, S., Brahimi, S., Delattre, D., André, C., Gray, F., Delisle, F., Caillaud, C., Bernex, F., Panthier, J.-J., Aubin-Houzelstein, G., Blot, S., and Tiret, L. (2010). A canine arylsulfatase g (arsg) mutation leading to a sulfatase deficiency is associated with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33):14775–14780.
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., and Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4):248–249.
- Affymetrix. URL http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/genomewide_snp6_datasheet.pdf (letzter Zugriff: 19.04.2016).
- Albanese, A., Bhatia, K., Bressman, S. B., DeLong, M. R., Fahn, S., Fung, V. S. C., Hallett, M., Jankovic, J., Jinnah, H. A., Klein, C., Lang, A. E., Mink, J. W., and Teller, J. K. (2013). Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord*, 28(7):863–873.
- Aligianis, I. A., Johnson, C. A., Gissen, P., Chen, D., Hampshire, D., Hoffmann, K., Maina, E. N., Morgan, N. V., Tee, L., Morton, J., Ainsworth, J. R., Horn, D., Rosser, E., Cole, T. R. P., Stolte-Dijkstra, I., Fieggen, K., Clayton-Smith, J., Mégarbané, A., Shield, J. P., Newbury-Ecob, R., Dobyns, W. B., Graham, Jr, J. M., Kjaer, K. W., Warburg, M., Bond, J., Trembath, R. C., Harris, L. W., Takai, Y., Mundlos, S., Tannahill, D., Woods, C. G., and Maher, E. R. (2005). Mutations of the catalytic subunit of rab3gap cause warburg micro syndrome. *Nat Genet*, 37(3):221–223.
- Altenmüller, E. (2003). Focal dystonia: advances in brain imaging and understanding of fine motor control in musicians. *Hand Clin*, 19(3):523–38, xi.
- Altenmüller, E. (2004). Das Ende vom Lied? – Robert Schumanns Verstummen am Klavier. In: Seither, C. (Hrsg.), *Tacet, non tacet: zur Rhetorik des Schweigens. Festschrift für Peter Becker zum 70. Geburtstag*, 90–104. Pfau, Saarbrücken.

- Altenmüller, E. (2005). Robert schumann's focal dystonia. In: Bogousslavsky, J. and Boller, F. (eds.), *Neurological Disorders in Famous Artists*, vol. 19, 1–10. Front Neurol Neuroscience, Basel.
- Altenmüller, E., Baur, V., Hofmann, A., Lim, V. K., and Jabusch, H.-C. (2012). Musician's cramp as manifestation of maladaptive brain plasticity: arguments from instrumental differences. *Ann N Y Acad Sci*, 1252:259–265.
- Altenmüller, Eckart and Jabusch, H.-C. (2010). Focal dystonia in musicians: phenomenology, pathophysiology, triggering factors, and treatment. *Med Probl Perform Art*, 25(1):3–9.
- Avanzino, L., Martino, D., Martino, I., Pelosin, E., Vicario, C. M., Bove, M., Defazio, G., and Abbruzzese, G. (2013). Temporal expectation in focal hand dystonia. *Brain*, 136(Pt 2):444–454.
- Baudhuin, L. M., Lagerstedt, S. A., Klee, E. W., Fadra, N., Oglesbee, D., and Ferber, M. J. (2015). Confirming variants in next-generation sequencing panel testing by sanger sequencing. *J Mol Diagn*, 17(4):456–461.
- Beck, T. F., Mullikin, J. C., , N. I. S. C. C. S. P., and Biesecker, L. G. (2016). Systematic evaluation of sanger validation of next-generation sequencing variants. *Clin Chem*, 62(4):647–654.
- Begum, F., Ghosh, D., Tseng, G. C., and Feingold, E. (2012). Comprehensive literature review and statistical considerations for gwas meta-analysis. *Nucleic Acids Res*, 40(9):3777–3784.
- Brighina, F., Romano, M., Giglia, G., Saia, V., Puma, A., Giglia, F., and Fierro, B. (2009). Effects of cerebellar tms on motor cortex of patients with focal dystonia: a preliminary report. *Exp Brain Res*, 192(4):651–656.
- Brookes, A. J. (1999). The essence of snps. *Gene*, 234(2):177–186.
- Burke, R. E., Fahn, S., Marsden, C. D., Bressman, S. B., Moskowitz, C., and Friedman, J. (1985). Validity and reliability of a rating scale for the primary torsion dystonias. *Neurology*, 35(1):73–77.
- Byl, N. N., Merzenich, M. M., and Jenkins, W. M. (1996). A primate genesis model of focal dystonia and repetitive strain injury: I. learning-induced dedifferentiation of the representation of the hand in the primary somatosensory cortex in adult monkeys. *Neurology*, 47(2):508–520.
- Candia, V., Schäfer, T., Taub, E., Rau, H., Altenmüller, E., Rockstroh, B., and Elbert, T. (2002). Sensory motor retuning: a behavioral treatment for focal hand dystonia of pianists and guitarists. *Arch Phys Med Rehabil*, 83(10):1342–1348.
- Candia, V., Wienbruch, C., Elbert, T., Rockstroh, B., and Ray, W. (2003). Effective behavioral treatment of focal hand dystonia in musicians alters somatosensory cortical organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13):7942–7946.
- Chan, J., Brin, M. F., and Fahn, S. (1991). Idiopathic cervical dystonia: clinical characteristics. *Mov Disord*, 6(2):119–126.

- Chang, F. C. F. and Frucht, S. J. (2013). Motor and sensory dysfunction in musician's dystonia. *Curr Neuroparmacol*, 11(1):41–47.
- Combined Annotation Dependent Depletion. URL <http://cadd.gs.washington.edu/score> (letzter Zugriff: 05.04.2016).
- Cooper, D. N., Krawczak, M., Polychronakos, C., Tyler-Smith, C., and Kehrer-Sawatzki, H. (2013). Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet*, 132(10):1077–1130.
- Dai, X., Wiernek, S., Evans, J. P., and Runge, M. S. (2016). Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *World J Cardiol*, 8(1):1–23.
- Defazio, G., Berardelli, A., and Hallett, M. (2007). Do primary adult-onset focal dystonias share aetiological factors? *Brain*, 130(Pt 5):1183–1193.
- Diederichs, S., Bartsch, L., Berkmann, J. C., Fröse, K., Heitmann, J., Hoppe, C., Iggena, D., Jazmati, D., Karschnia, P., Linsenmeier, M., Maulhardt, T., Möhrmann, L., Morstein, J., Paffenholz, S. V., Röpenack, P., Rückert, T., Sandig, L., Schell, M., Steinmann, A., Voss, G., Wasmuth, J., Weinberger, M. E., and Wullenkord, R. (2016). The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding rna and synonymous mutations. *EMBO Mol Med*, 8(5):442–457.
- Domingo, A., Erro, R., and Lohmann, K. (2016). Novel dystonia genes: Clues on disease mechanisms and the complexities of high-throughput sequencing. *Mov Disord*, 31(4):471–477.
- Efergan, A., Azouz, N. P., Klein, O., Noguchi, K., Rothenberg, M. E., Fukuda, M., and Sagi-Eisenberg, R. (2016). Rab12 regulates retrograde transport of mast cell secretory granules by interacting with the rilp-dynein complex. *J Immunol*, 196(3):1091–1101.
- Elbert, T., Candia, V., Altenmüller, E., Rau, H., Sterr, A., Rockstroh, B., Pantev, C., and Taub, E. (1998). Alteration of digital representations in somatosensory cortex in focal hand dystonia. *Neuroreport*, 9(16):3571–3575.
- Ensembl. URL http://www.ensembl.org/Homo/_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000206418;r=18:8609445-8639381;t=ENST00000329286 (letzter Zugriff: 04.04.2016a).
- Ensembl. URL http://www.ensembl.org/Homo/_sapiens/Location/Chromosome?chr=18;r=18:1-80373285;Ens (letzter Zugriff: 04.04.2016b).
- Ensembl. URL http://www.ensembl.org/Homo/_sapiens/Location/Chromosome?chr=17;r=17:1-83257441 (letzter Zugriff: 06.04.2016c).
- Epidemiological Study of Dystonia in Europe Collaborative Group (2000). A prevalence study of primary dystonia in eight european countries. *J Neurol*, 247(10):787–792.
- Exome Aggregation Consortium. URL <http://exac.broadinstitute.org/> (letzter Zugriff: 04.04.2016).

- Exome Variant Server. URL <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (letzter Zugriff: 05.04.2016).
- Fahrmeir, L., Heumann, C., Künstler, R., Pigeot, I., and Tutz, G. (2016). χ^2 -Verteilung. In: *Statistik – Der Weg zur Datenanalyse*, 8. Aufl., 556. Springer-Verlag, Berlin.
- Garrod, A. E. (1923). Inborn errors in metabolism. *Frowde, Hodder & Stoughton*, 2:17–29.
- Hallett, M. (2006). Pathophysiology of writer’s cramp. *Hum Mov Sci*, 25(4-5):454–463.
- Hata, A. N., Engelman, J. A., and Faber, A. C. (2015). The bcl2 family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer Discov*, 5(5):475–487.
- Hirata, Y., Schulz, M., Altenmüller, E., Elbert, T., and Pantev, C. (2004). Sensory mapping of lip representation in brass musicians with embouchure dystonia. *Neuroreport*, 15(5):815–818.
- Human Gene Mutation Database. URL <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (letzter Zugriff: 03.07.2016).
- Hutchinson, M., Kimmich, O., Molloy, A., Whelan, R., Molloy, F., Lynch, T., Healy, D. G., Walsh, C., Edwards, M. J., Ozelius, L., Reilly, R. B., and O’Riordan, S. (2013). The endophenotype and the phenotype: temporal discrimination and adult-onset dystonia. *Mov Disord*, 28(13):1766–1774.
- Illumina, I. Sequencing methods review a review of publications featuring illumina @technology. URL http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/research/_reviews/sequencing-methods-review.pdf (letzter Zugriff: 03.06.2016).
- International HapMap-Consortium (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, 449(7164):851–861.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011):931–945.
- Jabusch, H.-C. (2006). Focal dystonia in musicians: From phenomenology to therapy. *Adv Cogn Psychol*, 2:207–220.
- Jabusch, H.-C., Müller, S. V., and Altenmüller, E. (2004). Anxiety in musicians with focal dystonia and those with chronic pain. *Mov Disord*, 19(10):1169–1175.
- Jabusch, H.-C., Zschucke, D., Schmidt, A., Schuele, S., and Altenmüller, E. (2005). Focal dystonia in musicians: treatment strategies and long-term outcome in 144 patients. *Mov Disord*, 20(12):1623–1626.
- Kadota, H., Nakajima, Y., Miyazaki, M., Sekiguchi, H., Kohno, Y., Amako, M., Arino, H., Nemoto, K., and Sakai, N. (2010). An fmri study of musicians with focal dystonia during tapping tasks. *J Neurol*, 257(7):1092–1098.

- Kara, E., Kiely, A. P., Proukakis, C., Giffin, N., Love, S., Hehir, J., Rantell, K., Pandraud, A., Hernandez, D. G., Nacheva, E., Pittman, A. M., Nalls, M. A., Singleton, A. B., Revesz, T., Bhatia, K. P., Quinn, N., Hardy, J., Holton, J. L., and Houlden, H. (2014). A 6.4 mb duplication of the α -synuclein locus causing frontotemporal dementia and parkinsonism: phenotype-genotype correlations. *JAMA Neurol*, 71(9):1162–1171.
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., and Ferlini, C. (2015). Defining mutation and polymorphism in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*, 8:37.
- Kasten, M., Hagenah, J., Graf, J., Lorwin, A., Vollstedt, E.-J., Peters, E., Katalinic, A., Raspe, H., and Klein, C. (2013). Cohort profile: a population-based cohort to study non-motor symptoms in parkinsonism (epipark). *Int J Epidemiol*, 42(1):128–128k.
- Ke, Q., Luo, B., Qi, M., Du, Y., and Wu, W. (2013). Gender differences in penetrance and phenotype in hypokalemic periodic paralysis. *Muscle Nerve*, 47(1):41–45.
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., and Haussler, D. (2002). The human genome browser at ucsc. *Genome Res*, 12(6):996–1006.
- King, N. K. K., Tam, J., Fasano, A., and Lozano, A. M. (2016). The most cited works in essential tremor and dystonia. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*, 6:310.
- Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O’Roak, B. J., Cooper, G. M., and Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*, 46(3):310–315.
- Klein, C., König, I. R., and Lohmann, K. (2012). Exome sequencing for gene discovery: time to set standard criteria. *Ann Neurol*, 72(4):627–628.
- Kowalewski, B., Heimann, P., Ortkras, T., Lüllmann-Rauch, R., Sawada, T., Walkley, S. U., Dierks, T., and Damme, M. (2015). Ataxia is the major neuropathological finding in arylsulfatase g-deficient mice: similarities and dissimilarities to sanfilippo disease (mucopolysaccharidosis type iii). *Hum Mol Genet*, 24(7):1856–1868.
- Kowalewski, B., Lübke, T., Kollmann, K., Braulke, T., Reinheckel, T., Dierks, T., and Damme, M. (2014). Molecular characterization of arylsulfatase g: expression, processing, glycosylation, transport, and activity. *J Biol Chem*, 289(40):27992–28005.
- Krawczak, M., Nikolaus, S., von Eberstein, H., Croucher, P. J. P., El Mokhtari, N. E., and Schreiber, S. (2006). Popgen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community Genet*, 9(1):55–61.
- Kuhlenbäumer, G., Hullmann, J., and Appenzeller, S. (2011). Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Hum Mutat*, 32(2):144–151.
- Kuulasmaa, T. URL www.uku.fi/~kuulasmaa/OligoSoftware<http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp> (letzter Zugriff: 2002).
- Legati, A., Reyes, A., Nasca, A., Invernizzi, F., Lamantea, E., Tiranti, V., Garavaglia, B., Lamperti, C., Ardisson, A., Moroni, I., Robinson, A., Ghezzi, D., and Zeviani, M. (2016). New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by ngs technologies. *Biochim Biophys Acta*, 1857(8):1326–35.

- Leube, B., Rudnicki, D., Ratzlaff, T., Kessler, K. R., Benecke, R., and Auburger, G. (1996). 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*, 5(10):1673–1677.
- Li, B., Krishnan, V. G., Mort, M. E., Xin, F., Kamati, K. K., Cooper, D. N., Mooney, S. D., and Radivojac, P. (2009). Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics*, 25(21):2744–2750.
- Liersch, A. und Asef, D. (2015). Beschäftigung in Kultur und Kulturwirtschaft, Sonderauswertung aus dem Mikrozensus. *Statistisches Bundesamt*, 34.
- Lill, C. M., Schjeide, B.-M. M., Roehr, J. T., Zauft, U., Allen, N. C., Zipp, F., McQueen, M. B., Kavvoura, F. K., Ioannidis, J. P. A., Khoury, M. J., Tanzi, R. E., and Bertram, L. (2010). Correspondence to sand et al. "critical reappraisal of a catechol-o-methyltransferase transversion variant in schizophrenia". *Biol Psychiatry*, 67(7):e45–e48.
- Lim, V. K., Bradshaw, J. L., Nicholls, M. E. R., and Altenmüller, E. (2003). Perceptual differences in sequential stimuli across patients with musician's and writer's cramp. *Mov Disord*, 18(11):1286–1293.
- Lockwood, A. H. (1989). Medical problems of musicians. *N Engl J Med*, 320(4):221–227.
- Lohmann, Katja and Klein, C. (2014). Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics*, 11(4):699–707.
- Lohmann, K., Schmidt, A., Schillert, A., Winkler, S., Albanese, A., Baas, F., Bentivoglio, A. R., Borngräber, F., Brüggemann, N., Defazio, G., Del Sorbo, F., Deuschl, G., Edwards, M. J., Gasser, T., Gómez-Garre, P., Graf, J., Groen, J. L., Grünewald, A., Hagenah, J., Hemmelmann, C., Jabusch, H.-C., Kaji, R., Kasten, M., Kawakami, H., Kostic, V. S., Liguori, M., Mir, P., Münchau, A., Ricchiuti, F., Schreiber, S., Siegesmund, K., Svetel, M., Tijssen, M. A. J., Valente, E. M., Westenberger, A., Zeuner, K. E., Zittel, S., Altenmüller, E., Ziegler, A., and Klein, C. (2014). Genome-wide association study in musician's dystonia: a risk variant at the arylsulfatase g locus? *Mov Disord*, 29(7):921–927.
- Lohmann, K., Uflacker, N., Erogullari, A., Lohnau, T., Winkler, S., Dendorfer, A., Schneider, S. A., Osmanovic, A., Svetel, M., Ferbert, A., Zittel, S., Kühn, A. A., Schmidt, A., Altenmüller, E., Münchau, A., Kamm, C., Wittstock, M., Kupsch, A., Moro, E., Volkmann, J., Kostic, V., Kaiser, F. J., Klein, C., and Brüggemann, N. (2012). Identification and functional analysis of novel thap1 mutations. *Eur J Hum Genet*, 20(2):171–175.
- López González, I., Garcia-Esparcia, P., Llorens, F., and Ferrer, I. (2016). Genetic and transcriptomic profiles of inflammation in neurodegenerative diseases: Alzheimer, parkinson, creutzfeldt-jakob and tauopathies. *Int J Mol Sci*, 17(2):206.
- Manolio, T. A. (2010). Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med*, 363(2):166–176.
- Manolio, T. A., Brooks, L. D., and Collins, F. S. (2008). A hapmap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest*, 118(5):1590–1605.

- Mardis, E. R. (2013). Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 6:287–303.
- Marsden, C. D. and Sheehy, M. P. (1990). Writer’s cramp. *Trends Neurosci*, 13(4):148–153.
- Marshfield Clinic Research Foundation. URL <http://www.research.marshfieldclinic.org> (letzter Zugriff: 23.07.2013).
- Martella, G., Tassone, A., Sciamanna, G., Platania, P., Cuomo, D., Viscomi, M. T., Bonsi, P., Cacci, E., Biagioni, S., Usiello, A., Bernardi, G., Sharma, N., Standaert, D. G., and Pisani, A. (2009). Impairment of bidirectional synaptic plasticity in the striatum of a mouse model of *dyt1* dystonia: role of endogenous acetylcholine. *Brain*, 132(Pt 9):2336–2349.
- Matsui, Takahide and Fukuda, M. (2011). Small gtpase rab12 regulates transferrin receptor degradation: Implications for a novel membrane trafficking pathway from recycling endosomes to lysosomes. *Cell Logist*, 1(4):155–158.
- Matsui, T., Itoh, T., and Fukuda, M. (2011). Small GTPase Rab12 regulates constitutive degradation of transferrin receptor. *Traffic*, 12(10):1432–1443.
- Matsui, T., Noguchi, K., and Fukuda, M. (2014). Dennd3 functions as a guanine nucleotide exchange factor for small GTPase Rab12 in mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 289(20):13986–13995.
- Munetz, M. R. and Benjamin, S. (1988). How to examine patients using the abnormal involuntary movement scale. *Hosp Community Psychiatry*, 39(11):1172–1177.
- MutationTaster. URL <http://www.mutationtaster.org> (letzter Zugriff: 11.02.2016).
- MutPred. URL <http://mutpred.mutdb.org> (letzter Zugriff: 11.02.2016).
- Muzzey, D., Evans, E. A., and Lieber, C. (2015). Understanding the basics of ngs: From mechanism to variant calling. *Curr Genet Med Rep*, 3(4):158–165.
- NCBI, R. C. URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp/_ref.cgi?rs=11655081 (letzter Zugriff: 19.04.2016).
- Nelis, M., Esko, T., Mägi, R., Zimprich, F., Zimprich, A., Toncheva, D., Karachanak, S., Piskácková, T., Balascák, I., Peltonen, L., Jakkula, E., Rehnström, K., Lathrop, M., Heath, S., Galan, P., Schreiber, S., Meitinger, T., Pfeufer, A., Wichmann, H.-E., Melegh, B., Polgár, N., Toniolo, D., Gasparini, P., D’Adamo, P., Klovins, J., Nikitina-Zake, L., Kucinskas, V., Kasnauskiene, J., Lubinski, J., Debniak, T., Limborska, S., Khrunin, A., Estivill, X., Rabionet, R., Marsal, S., Julià, A., Antonarakis, S. E., Deutsch, S., Borel, C., Attar, H., Gagnebin, M., Macek, M., Krawczak, M., Remm, M., and Metspalu, A. (2009). Genetic structure of europeans: a view from the north-east. *PLoS One*, 4(5):e5472.
- Newman, A. M., Bratman, S. V., To, J., Wynne, J. F., Eclov, N. C. W., Modlin, L. A., Liu, C. L., Neal, J. W., Wakelee, H. A., Merritt, R. E., Shrager, J. B., Loo, Jr, B. W., Alizadeh, A. A., and Diehn, M. (2014). An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor dna with broad patient coverage. *Nat Med*, 20(5):548–554.

- Ng, Pauline C. and Henikoff, S. (2006). Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 7:61–80.
- Nibbeling, E., Schaake, S., Tijssen, M. A., Weissbach, A., Groen, J. L., Altenmüller, E., Verbeek, D. S., and Lohmann, K. (2015). Accumulation of rare variants in the arylsulfatase g (arsg) gene in task-specific dystonia. *J Neurol*, 262(5):1340–1343.
- Nitsche, M. A., Nitsche, M. S., Klein, C. C., Tergau, F., Rothwell, J. C., and Paulus, W. (2003). Level of action of cathodal dc polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*, 114(4):600–604.
- Nowak, D. (2014). Trägt intensives Musizieren wesentlich zur Pathogenese der fokalen, aufgabenspezifischen Dystonie des professionellen Musikers bei? Ein systematischer Review. 40.
- Nusbaum, C., Zody, M. C., Borowsky, M. L., Kamal, M., Kodira, C. D., Taylor, T. D., Whittaker, C. A., Chang, J. L., Cuomo, C. A., Dewar, K., FitzGerald, M. G., Yang, X., Abouelleil, A., Allen, N. R., Anderson, S., Bloom, T., Bugalter, B., Butler, J., Cook, A., DeCaprio, D., Engels, R., Garber, M., Gnirke, A., Hafez, N., Hall, J. L., Norman, C. H., Itoh, T., Jaffe, D. B., Kuroki, Y., Lehoczky, J., Lui, A., Macdonald, P., Mauceli, E., Mikkelsen, T. S., Naylor, J. W., Nicol, R., Nguyen, C., Noguchi, H., O’Leary, S. B., O’Neill, K., Piqani, B., Smith, C. L., Talamas, J. A., Topham, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Wain, H. M., Young, S. K., Zeng, Q., Zimmer, A. R., Fujiyama, A., Hattori, M., Birren, B. W., Sakaki, Y., and Lander, E. S. (2005). Dna sequence and analysis of human chromosome 18. *Nature*, 437(7058):551–555.
- Olkkonen, V. M., Dupree, P., Killisch, I., Lütcke, A., Zerial, M., and Simons, K. (1993). Molecular cloning and subcellular localization of three gtp-binding proteins of the rab subfamily. *J Cell Sci*, 106 (Pt 4):1249–1261.
- Online Mendelian Inheritance, i. M. URL <http://www.omim.org/statistics/entry> (letzter Zugriff: 28.03.2016).
- Pearson, T. A. and Manolio, T. A. (2008). How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*, 299(11):1335–1344.
- Pesenti, A., Barbieri, S., and Priori, A. (2004). Limb immobilization for occupational dystonia: a possible alternative treatment for selected patients. *Adv Neurol*, 94:247–254.
- PolyPhen-2. URL <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (letzter Zugriff: 11.02.2016).
- Price, A. L., Zaitlen, N. A., Reich, D., and Patterson, N. (2010). New approaches to population stratification in genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*, 11(7):459–463.
- Priori, A., Pesenti, A., Cappellari, A., Scarlato, G., and Barbieri, S. (2001). Limb immobilization for the treatment of focal occupational dystonia. *Neurology*, 57(3):405–409.
- Protein Atlas, T. H. URL <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000206418-RAB12/tissue> (letzter Zugriff: 04.04.2016).

- Richard, P., Gaudon, K., Fournier, E., Jackson, C., Bauché, S., Haddad, H., Koenig, J., Echenne, B., Hantaï, D., and Eymard, B. (2007). A synonymous chrne mutation responsible for an aberrant splicing leading to congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord*, 17(5):409–414.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., and , A. C. M. G. L. Q. A. C. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the american college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genet Med*, 17(5):405–424.
- Ritz, K., Groen, J. L., Kruisdijk, J. J. M., Baas, F., Koelman, J. H. T. M., and Tijssen, M. A. J. (2009). Screening for dystonia genes *dyt1*, 11 and 16 in patients with writer’s cramp. *Mov Disord*, 24(9):1390–1392.
- Rogan, D. F., Cousins, D. J., and Staynov, D. Z. (1999). Intergenic transcription occurs throughout the human *il-4/il-13* gene cluster. *Biochem Biophys Res Commun*, 255(3):556–561.
- Rosenkranz, K., Butler, K., Williamon, A., and Rothwell, J. C. (2009). Regaining motor control in musician’s dystonia by restoring sensorimotor organization. *J Neurosci*, 29(46):14627–14636.
- Rosset-Llobet, J., Fàbregas-Molas, S., and Pascual-Leone, Á. (2015). Effect of transcranial direct current stimulation on neurorehabilitation of task-specific dystonia: A double-blind, randomized clinical trial. *Med Probl Perform Art*, 30(3):178–184.
- Rosset-Llobet, Jaume und Fàbregas-Molas, S. (2011). Long-term treatment effects of sensory motor retuning in a pianist with focal dystonia. *Med Probl Perform Art*, 26(2):106–107.
- Rydell, G. E., Renard, H.-F., Garcia-Castillo, M.-D., Dingli, F., Loew, D., Lamaze, C., Römer, W., and Johannes, L. (2014). Rab12 localizes to shiga toxin-induced plasma membrane invaginations and controls toxin transport. *Traffic*, 15(7):772–787.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–5467.
- Sardiello, M., Annunziata, I., Roma, G., and Ballabio, A. (2005). Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Hum Mol Genet*, 14(21):3203–3217.
- Saunders-Pullman, R., Soto-Valencia, J., Costan-Toth, C., Shriberg, J., Raymond, D., Derby, C. A., Lipton, R. B., and Bressman, S. B. (2005). A new screening tool for cervical dystonia. *Neurology*, 64(12):2046–2049.
- Schierding, W., Cutfield, W. S., and O’Sullivan, J. M. (2014). The missing story behind genome wide association studies: single nucleotide polymorphisms in gene deserts have a story to tell. *Front Genet*, 5:39.
- Schmidt, A., Altenmüller, E., Jabusch, H.-C., Lee, A., Wiegers, K., Klein, C., and Loh-

- mann, K. (2012). The gag deletion in tor1a (dyl1) is a rare cause of complex musician's dystonia. *Parkinsonism Relat Disord*, 18(5):690–691.
- Schmidt, A., Jabusch, H.-C., Altenmüller, E., Enders, L., Saunders-Pullman, R., Bressman, S. B., Münchau, A., Klein, C., and Hagenah, J. (2011). Phenotypic spectrum of musician's dystonia: a task-specific disorder? *Mov Disord*, 26(3):546–549.
- Schmidt, A., Jabusch, H.-C., Altenmüller, E., Hagenah, J., Brüggemann, N., Hedrich, K., Saunders-Pullman, R., Bressman, S. B., Kramer, P. L., and Klein, C. (2006). Dominantly transmitted focal dystonia in families of patients with musician's cramp. *Neurology*, 67(4):691–693.
- Schmidt, A., Jabusch, H.-C., Altenmüller, E., Hagenah, J., Brüggemann, N., Lohmann, K., Enders, L., Kramer, P. L., Saunders-Pullman, R., Bressman, S. B., Münchau, A., and Klein, C. (2009). Etiology of musician's dystonia: familial or environmental? *Neurology*, 72(14):1248–1254.
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., and Seelow, D. (2014). Mutationtaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*, 11(4):361–362.
- Seibler, P., Djarmati, A., Langpap, B., Hagenah, J., Schmidt, A., Brüggemann, N., Siebner, H., Jabusch, H.-C., Altenmüller, E., Münchau, A., Lohmann, K., and Klein, C. (2008). A heterozygous frameshift mutation in prka (dyl16) associated with generalised dystonia in a german patient. *Lancet Neurol*, 7(5):380–381.
- Statistikamt Nord (2014). Bevölkerungsstand in Schleswig-Holstein 1970-2013. In: *Statistisches Jahrbuch Schleswig-Holstein*, 14. Statistisches Amt für Hamburg und Schleswig-Holstein.
- Statistisches Bundesamtowak (2016). Bildung und Kultur. Studierende an Hochschulen. Vorbericht. In: opez (Hrsg.), *Zusammenfassende Übersichten*, 6. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Steffens, M., Lamina, C., Illig, T., Bettecken, T., Vogler, R., Entz, P., Suk, E.-K., Toliat, M. R., Klopp, N., Caliebe, A., König, I. R., Köhler, K., Ludemann, J., Diaz Lacava, A., Fimmers, R., Lichtner, P., Ziegler, A., Wolf, A., Krawczak, M., Nürnberg, P., Hampe, J., Schreiber, S., Meitinger, T., Wichmann, H.-E., Roeder, K., Wienker, T. F., and Baur, M. P. (2006). Snp-based analysis of genetic substructure in the german population. *Hum Hered*, 62(1):20–29.
- Stenmark, H. (2009). Rab gtpases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(8):513–525.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008). Lc3 and autophagy. *Methods Mol Biol*, 445eue:77–88.
- Tekola Ayele, F., Adeyemo, A., Finan, C., Hailu, E., Sinnott, P., Burlinson, N. D., Aseffa, A., Rotimi, C. N., Newport, M. J., and Davey, G. (2012). Hla class ii locus and susceptibility to podoconiosis. *N Engl J Med*, 366(13):1200–1208.
- Torres-Russotto, Diego und Perlmutter, J. S. (2008). Task-specific dystonias: a review. *Ann N Y Acad Sci*, 1142:179–199.

- Triggs-Raine, B., Dyck, T., Boycott, K. M., Innes, A. M., Ober, C., Parboosingh, J. S., Botkin, A., Greenberg, C. R., and Spriggs, E. L. (2016). Development of a diagnostic dna chip to screen for 30 autosomal recessive disorders in the hutterite population. *Mol Genet Genomic Med*, 4(3):312–321.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., and Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40(15):e115.
- Vassall, K. A., Bamm, V. V., and Harauz, G. (2015). Myelstones: the executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis. *Biochem J*, 472(1):17–32.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huxson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigó, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M.,

- Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., and Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304–1351.
- Verhoeven, K., De Jonghe, P., Coen, K., Verpoorten, N., Auer-Grumbach, M., Kwon, J. M., FitzPatrick, D., Schmedding, E., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Wagner, K., Hartung, H.-P., and Timmerman, V. (2003). Mutations in the small gtp-ase late endosomal protein rab7 cause charcot-marie-tooth type 2b neuropathy. *Am J Hum Genet*, 72(3):722–727.
- Volkman, J. (2012a). Dystonie. In: Wolfgang Oertel, Günther Deuschl, W. P. (ed.), *Parkinson-Syndrome und andere Bewegungsstörungen*, 230. Thieme, Stuttgart.
- Volkman, P. D. J. (2012b). Extrapyramidale Störungen – Dystonie. In: *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
- Wang, Z., Liu, X., Yang, B.-Z., and Gelernter, J. (2013). The role and challenges of exome sequencing in studies of human diseases. *Front Genet*, 4:160.
- Wasserman, N. F., Aneas, I., and Nobrega, M. A. (2010). An 8q24 gene desert variant associated with prostate cancer risk confers differential in vivo activity to a myc enhancer. *Genome Res*, 20(9):1191–1197.
- Wellcome Trust Case Control Consortium (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145):661–678.
- Willems, S. M., Cornes, B. K., Brody, J. A., Morrison, A. C., Lipovich, L., Dauriz, M., Chen, Y., Liu, C.-T., Rybin, D. V., Gibbs, R. A., Muzny, D., Pankow, J. S., Psaty, B. M., Boerwinkle, E., Rotter, J. I., Siscovick, D. S., Vasan, R. S., Kaplan, R. C., Isaacs, A., Dupuis, J., van Duijn, C. M., and Meigs, J. B. (2016). Association of the igf1 gene with fasting insulin levels. *Eur J Hum Genet*, 24(9):1337–43.
- Wilson, G. R., Sim, J. C. H., McLean, C., Giannandrea, M., Galea, C. A., Riseley, J. R., Stephenson, S. E. M., Fitzpatrick, E., Haas, S. A., Pope, K., Hogan, K. J., Gregg, R. G., Bromhead, C. J., Wargowski, D. S., Lawrence, C. H., James, P. A., Churchyard, A., Gao, Y., Phelan, D. G., Gillies, G., Salce, N., Stanford, L., Marsh, A. P. L., Mignogna, M. L., Hayflick, S. J., Leventer, R. J., Delatycki, M. B., Mellick, G. D., Kalscheuer, V. M., D’Adamo, P., Bahlo, M., Amor, D. J., and Lockhart, P. J. (2014). Mutations in rab39b cause x-linked intellectual disability and early-onset parkinson disease with α -synuclein pathology. *Am J Hum Genet*, 95(6):729–735.
- Xu, J., Fotouhi, M., and McPherson, P. S. (2015). Phosphorylation of the exchange factor dennd3 by ulk in response to starvation activates rab12 and induces autophagy. *EMBO Rep*, 16(6):709–718.
- Yang, Y., Muzny, D. M., Xia, F., Niu, Z., Person, R., Ding, Y., Ward, P., Braxton, A., Wang, M., Buhay, C., Veeraraghavan, N., Hawes, A., Chiang, T., Leduc, M., Beuten, J., Zhang, J., He, W., Scull, J., Willis, A., Landsverk, M., Craigen, W. J., Bekheirnia, M. R., Stray-Pedersen, A., Liu, P., Wen, S., Alcaraz, W., Cui, H., Walkiewicz, M., Reid, J., Bainbridge, M., Patel, A., Boerwinkle, E., Beaudet, A. L., Lupski, J. R., Plon, S. E., Gibbs, R. A., and

- Eng, C. M. (2014). Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA*, 312(18):1870–1879.
- Yang, Z. and Wang, K. K. W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci*, 38(6):364–374.
- Zeng, P., Zhao, Y., Qian, C., Zhang, L., Zhang, R., Gou, J., Liu, J., Liu, L., and Chen, F. (2015). Statistical analysis for genome-wide association study. *J Biomed Res*, 29(4):285–297.
- Zeuner, K. E., Shill, H. A., Sohn, Y. H., Molloy, F. M., Thornton, B. C., Dambrosia, J. M., and Hallett, M. (2005). Motor training as treatment in focal hand dystonia. *Mov Disord*, 20(3):335–341.
- Ziegler, A. (2009). Genome-wide association studies: quality control and population-based measures. *Genet Epidemiol*, 33 Suppl 1:S45–S50.

Anhang

A. Diagnostische Tests

Die Durchführung der diagnostischen Tests erfolgte durch Prof. Dr. A. Schmidt. Zum besseren Verständnis der im Abschnitt 2.1 erwähnten Scores sollen diese kurz erläutert werden.

Beth Israel Medical Center Dystonia Screen (BIDS)

Der BIDS ist ein international standardisierter Test, mit dem befragte Personen auf möglich vorhandene Bewegungsstörungen gescreent werden. Die Befragung kann persönlich, oder auch per Telefon oder Post erfolgen. Neben den persönlichen Daten werden vor allem neurologische Erkrankungen und deren Therapie abgefragt. Zusätzlich erfolgt eine Familienanamnese zu den spezifischen Bewegungsstörungen Dystonie, essentieller Tremor, Parkinson, Myoklonus und Ticstörung. Im letzten Teil wird in der allgemeinen Krankengeschichte auch eine Medikation, die möglicherweise die Entstehung einer sekundären Dystonie oder eines Parkinsonsyndroms begünstigt, abgefragt. Wird der Befragte in einer der Kategorien positiv getestet, wird er anschließend neurologisch untersucht, es wird ein Videoprotokoll angefertigt sowie der AIMS und Behinderungsscale durchgeführt (Saunders-Pullman et al., 2005).

Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS)

Die AIMS prüft die Provozierbarkeit und das Ausmaß der Dystonie in neun verschiedenen Körperregionen – Augen, Mund, Sprache, Hals, rechter und linker Arm, Rumpf und rechtes und linkes Bein – ab. Eine Einschätzung von zwei und mehr Punkten detektiert das Vorhandensein einer dystonen Bewegungsstörung (Munetz, 1988).

Dystonie Evaluation - Behinderung

Hierbei wird in den Kategorien Sprache, Schrift, Zuführen von Nahrung, Körperhygiene, Ankleiden und Gehen der Behinderungsgrad der Dystoniepatienten eingeschätzt (Burke et al., 1985).

Gesamteinschätzung:

0 - keine Dystonie vorhanden

1+ - milde Dystonie, geringe funktionelle Beeinträchtigung

2+ - mäßige Dystonie, funktionelle Beeinträchtigung oder deutliche dystone Bewegungen oder Haltungen vorhanden

3+ - schwere Dystonie, Rollstuhl erforderlich oder starke, unangenehme dystone Spasmen vorhanden

B. Phänotyp des mittels GWAS untersuchten Patienten- und Kontrollkollektivs

Tab. B.1.: Phänotyp des Patientenkollektivs

Phase	Phänotyp	Alter in Jahren	Erkrank- ungsalter in Jahren	männl. Geschlecht (%)	positive Familien- anamnese
GWAS	MD	45,2±12,0	34,1±10,4	75,9	22,0
	PopGen	publ.	k.A.	publ.	k.A.
Replikation	MD	44,0 ±12,7	35,6±11,0	70,7	14,7
	Musiker	47,2±8,1	k.A.	50,4	k.A.
1.Validierung	WD	52,8±12,0	48,9±12,4	55,9	20,6
	EPIPARK	69,4±6,4	k.A.	54,0	k.A.
2.Validierung	fokal,segmental	54,4 ±14,0	46,0±14,9	38,0	15,4
	ethn.gematcht	66,3± 11,4	k.A.	43,8	k.A.

k.A. – keine Angaben, publ. – bereits publiziert

Tab. B.2.: Phänotyp der internationalen Probanden

Ethnie	Probanden	Alter in Jahren	Erkrank- ungsalter in Jahren	männl. Geschlecht (%)	positive Familien- anamnese
Niederlande	Pat (n=350)	56,7±13,0	41,9±14,1	33,1	20,1
	Kont (n=913)	77,1±2,5	k.A.	45,0	k.A.
Deutschland	Pat (n=562)	60,2±13,6	46,6±14,8	36,0	20,3
	Kont (n=412)	64,2±7,5	k.A.	49,5	k.A.
Italien	Pat (n=444)	61,3±14,9	48,5±15,3	43,7	12,4
	Kont (n=342)	60,9±16,8	k.A.	41,6	k.A.
Japan	Pat (n=177)	k.A.	43,2±15,6	50,0	k.A.
	Kont (n=199)	42,7±7,8	k.A.	49,1	k.A.
Serbien	Pat (n=113)	58,9±13,8	45,2±12,4	46,0	k.A.
	Kont (n=101)	54,8±15,1	k.A.	36,5	k.A.
Spanien	Pat (n=323)	60,4±14,7	47,7±16,6	29,7	19,8
	Kont (n=266)	61,1±12,3	k.A.	32,7	0

Pat – Patienten; Kont – Kontrollen; k.A. – keine Angaben

C. Überlappende Varianten der Multiplex-MD-Familien

Tab. C.3.: Überlappende Varianten der MD-Familien A, B und C

Überlappung	Familie	Gen	Chr	Position	Allel	Variante	ExAC	CADD	Funktion*
A+B+C	A	FLG	1	152280649	G/C	c.C6713G; p.P2238R	0,067	0,001	Filaggrin, Vernetzung von Keratin- Filamenten
	B+C	FLG	1	152279975	G/C	c.C7387G; p.H2463D; rs113188294	0,009	1,243	
	A	GRIP2	3	14581790	G/A	c.C26T;p.T9I; rs188992337	0,002	12,43	Glutamatrezeptor interagierendes Protein
	B+C	GRIP2	3	14561627	-/G	c.1019_1021insC; p.P340Pfs; rs5846840	1	15,57	
	A	JRK	8	143747023	C/T	c.G455A; p.S152N; rs201592742	0,004	6,766	Jrk Helix-Protein, Assoziation mit kindlicher Epilepsie
	B+C	JRK	8	143746088	CA/-	c.1387_1388 delTG; p.W463Efs; rs33951456	1	5,648	
A+B	A	MARS	12	57908753	C/T	c.C2116T; p.R706C; rs148501787	0,001	35	Methionyl-tRNA Synthetase
	B+C	MARS	12	57909051	C/G	c.C2323G; p.P775A; rs113773319	k.A.	5,246	
	A	CHAC1	15	41247629	A/G	c.A452G; p.K151R; rs147487857	0,011	4,008	Glutathion- spezifische γ -Glutamyl- cyclotransferase
	B	CHAC1	15	41245692	A/G	c.A37G; p.R13G; rs201335601	0,001	26,6	
	A	ZC3H3	8	144620334	C/G	c.G1203C; p.K401N; rs145312531	0,004	25,1	Zinkfinger- Protein
	B	ZC3H3	8	144589985	G/A	c.C1646T; p.S549L; rs149025999	0,004	26,3	
A+C	A	ZNF696	8	144378732	A/G	c.A887G; p.Q296R; rs547770903	0,001	0,041	Zinkfinger- Protein
	B	ZNF696	8	144377951	C/T	c.C106T; p.R36W; rs140398403	0,009	12,57	
	A	LOR	1	153233488	-/GG CGGT	c.63_64ins GGCGGT; p.G21delins GGG; rs150026164	0,177	13,76	Loricrin, Bildung von Hornzellen
	C	LOR	1	153233991	-/CT CTG GCG GCGG	rs11275959**	k.A.	6,629	
	A+C	RAB12	18	8636320	A/G	c.A586G; p.I196V; rs143888944	0,001	16,52	kleine GTPase

Tab. C.3.: Überlappende Varianten der MD-Familien A, B und C: Fortsetzung

Über- lappung	Familie	Gen	Chr	Position	Allel	Variante	ExAC	CADD	Funktion*
B+C	A	SYNE2	14	64593458	C/T	c.C13850T; p.T4617I; rs148582250	0,001	10,88	Spektrin, nukleäres Zytoskelett
	C	SYNE2	14	64560091	TG/CA	c.12001subCA	k.A.	22,3	
	B	AOC2	17	40997761	C/T	c.C1118T; p.T373M; rs143214815	6,589e-05	12,77	Kupfer enthaltende Amniooxidase
	C	AOC2	17	40997461	G/A	c.G818A; p.R273Q; rs35508987	0,007	11,62	
	B+C	BCAM	19	45316704	T/A	c.T611A; p.M204K; rs28399656	0,01	24,3	Basallzell- adhäsionsmolekül, Glykoprotein der Lutheran Blut- gruppe
	B	BRPF3	6	36185759	A/G	c.A3055G; p.S1019G; rs145016452	0,002	17,5	Bromodomäne mit PHD Finger
	C	BRPF3	6	36193085	G/A	c.G3223A; p.E1075K; rs142171063	0,008	32	
	B+C	C1QTNF4	11	47612213	GAAG/ TGAA	c.147insTTCA	k.A.	20,4	C1q und Tumor- nekrosefaktor verwandtes Protein
	B	CCDC40	17	78055757	CT/TG GAAC AACA CAGG	c.1889insTG	k.A.	3,218	superspiralisierte Domäne 40, motile Zilienfunktion
	C	CCDC40	17	78063948	ACGC ACAC AGGC ACGT GCAC/-	c.2843_74del; p.948_58del	k.A.	7,595	
	B	CCDC116	22	21988548	GCT/ CTG	c.310insCTG	k.A.	25,2	superspiralisierte Domäne 116
	C	CCDC116	22	21991307	A/G	c.A1790G; p.D597G; rs150451119	0,001	6,712	
	B+C	CNTNAP 3B	9	43861081	T/G	c.T1955G; p.L652R; rs62536501	0,541	0,016	Contactin assozi- iertes Protein
	B	DEPDC5	22	32206512	G/A	c.G1330A; p.G444R; rs201394709	0,001	23	DEP Domäne 5, G-Protein Signalkaskade
	C	DEPDC5	22	32302266	G/AC	c.4295delinsAC	k.A.	35	
	B	DGKZ	11	46388933	G/A	c.G254A; p.S85N; rs141189455	0,001	20,9	Diacylglycerol- kinase
	C	DGKZ	11	46388881	C/A	c.C202A; p.P68T; rs147007748	0,006	14,36	
	B	DIS3L	15	66618536	G/A	c.G2035A; p.E679K c.G2276A; p.R759H; rs35711894	8,242 e-06	23,3	Exoribonuklease
	C	DIS3L	15	66621382	G/A		0,006	33	
	B	GRK7	3	141497506	G/C	c.G380C; p.S127T; rs35318124	0,004	0,99	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase

Tab. C.3.: Überlappende Varianten der MD-Familien A, B und C: Fortsetzung

Über- lappung	Familie	Gen	Chr	Position	Allel	Variante	ExAC	CADD	Funktion*
	C	GRK7	3	141499528	G/C	c.G925C; p.E309Q; rs55824414	0,004	0,003	
	B	KIAA0020	9	2811527	T/C	c.T1469C; p.L490S	5,766 e-05	32	RNA-bindendes Protein
	C	KIAA0020	9	2828726	A/T	c.T905A; p.L302X; rs137936878	0,001	40	
	B	MLL4	19	36211375	AAG/-	c.1126_28del; p.376_76del	0,029	6,253	Lysinmethyl- transferase
	C	MLL4	19	36211464	TCTG/ CCCC	c.1215subCCCC	k.A.	0,057	
	B+C	NES	1	156642155	C/G	c.G1825C; p.E609Q; rs114406081	0,008	14,09	Nestin, Neurofi- lament
	B	NPHS1	19	36341311	T/A	c.A563T; p.N188I; rs145125791	0,006	16,84	Nephrin, Zellad- häsionsmolekül der Niere
	C	NPHS1	19	36336918	G/T	c.C1619A; p.A540E; rs149598144	0,001	2,061	
	B	POLQ	3	121208887	T/G	c.A2891C; p.E964A; rs3218633	0,006	0,066	DNA- Polymerase
	C	POLQ	3	121208704	TTT/-	c.3072del; p.1024del	0,015	12,73	
	B	RFTN1	3	16358524	-/TCT	c.1548insAGA	k.A.	7,451	Raftlin, Lipidtransport
	C	RFTN1	3	16358529	-/CTC TTGG	c.1543insCCA AGAG; p.D515fs	k.A.	24,5	
	B	SLC26A3	7	107414570	A/G	c.T1802C; p.I601T; rs35776303	0,002	7,120	SLC-Transporter
	C	SLC26A3	7	107432347	A/-	c.310delT; p.Y104fs	k.A.	23,5	
	B+C	SVEP1	9	113169630	TG/CA	c.8249subTG	k.A.	0,003	von-Willebrand- Faktor Typ A
	B+C	TSPYL6	2	54482704	GGGC CC/-	c.580_585del; p.194_95del	0,143	0,878	Zusammenbau des Nukleosoms
	B+C	TTC23	15	99768881	G/T	c.C37A; p.L13I	k.A.	23,7	Tetratricopeptid
	B	WDR81	17	1630526	A/C	c.A2273C; p.Q758P	k.A.	0,001	transmembra- näres Protein
	C	WDR81	17	1631213	TTG/ GTA	c.2960insGTA	k.A.	14,71	
	B	ZFHX3	16	72992246	G/C	c.C1799G; p.A600G	k.A.	22,9	Zinkfinger Homöobox, Transkriptions- faktor
	C	ZFHX3	16	72831029	G/T	c.C2810A; p.P937Q	k.A.	4,505	

k.A. – keine Angaben; *<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Stand: 28.03.16); **c.566delinsCTCTGGCGGCGG;
p.Y189delinsYSGGG

D. Primertabellen

Tab. D.4.: Primer für die Validierung gefundener Varianten der MD-Familien

Gen	Vorwärts- (F) und Rückwärtsprimer (R)	Größe (bp)	Annealing- temperatur (°C)
AOC2	(F)GGCCCTCTACCATAACATCTC (R)ACACTCCTGGACACTGACTTC	424	60
BCAM	(F)GGAGGTGCCCGTAGAGATG (R)CCTGAGGTCAGAGGTCAAAGG	336	58
BRPF3	(F)GGAAAGGAGAGGGAAAAGGAAG (R)CAAGGCAGGGGAGATAGGAG	286	58
BRPF3	(F)ATCACCCAAGACCCATTTC (R)CCTGTAAGCATCAGCACTACTC	467	56
C1QTNF4	(F)CCAGCCGTGAAGGAGAAGA (R)GCAGGGCTGGGAAGAGAAC	353	60
CCDC40	(F)GGCAATGGGTGAGATTTC (R)TGCTGTGTGTGTCCTGTGTTC	378	58
CCDC116	(F)CCTGCCCCCTGTGACATAC (R)GCTGGATGGGTAGTTGTTGG	418	60
CHAC1	(F)GGGTGGCATGTTAGGATAGGAG (R)CAGACGCAGCAAGTATTCAAGG	356	60
CHAC1	(F)TGAGAAGCAGAATCCGAAGTTG (R)CCGTACCCGAAAATCCACA	358	58
CNTNAP3B	(F)CGTGACGTCGCAAAAG (R)CGCTGAACGTCTCTCAAC	635	54
DEPDC5	(F)AGGAGCTACGGGCAGAGTTG (R)TGGTGAGCATGGTGTGTAGG	282	60
DGKZ	(F)AGGAGGTGGGAGGAAGTAGG (R)CCCTCTCCCAAGACAAACC	354	60
DGKZ	(F)CAGGAGGTGGGAGGAAGTAG (R)CTCTCCCAGCTGCCTTTAG	268	60
DIS3L	(F)ATGAAGCAGCCCAAGAACTAC (R)CCCTCAAAAGAGGAATACCG	451	58
DIS3L	(F)GCTTCTGAAACGTGTCCAAAAC (R)TGCCATTAACAAGCGGTGTACTAC	469	59
FLG	(F)GTGTCCACTGTCTCTGACTG (R)ATCAGGAGATGGCTCTAGG	471	56
FLG	(F)GCCCACCAGTGAGTGTCTA (R)GACGTTTCAGGGTCTTTCCT	425	58
GRIP2	(F)CCAGAGGGATCTATGTGTTTCAG (R)CATGCCACCTTCAAAGACC	355	58
GRIP2	(F)CTTCCCACCCTCAGTTGCT (R)GGAGACCACATCCTGTCCAT	322	59
GRK7	(F)AGCAGCCCTTTCATTGTCTC (R)CTCTCCCCTCCTTTCCAAC	370	58
JRK	(F)CGGTCTCATCAGCGTTGTA (R)TCGAGAAGGCCAAGGACTT	231	57
JRK	(F)CCTGGAGGGCTTCAACCTT (R)AGCCCCACAACAAGTCCTTT	413	58
KIAA0020	(F)CCTTCCTCCTTTGAATGTC (R)CTCCACAAGGATATACAGCA	313	55

Tab. D.4.: Primer für die Validierung gefundener Varianten der MD-Familien: Fortsetzung

Gen	Vorwärts- (F) und Rückwärtsprimer (R)	Größe (bp)	Annealing- temperatur (°C)
LOR*	(F)CACGACGTTGTAAACGAC GGCTCTGGCTGTTTCTCC (R)GACCCCCCTCCGTAACCTC	329	55
MARS	(F)ACTTCCCCTCTTTTTTCCAC (R)AGCCACTTTATGCCTTTAGC	425	58
MARS	(F)GTGAGGCTGACAGGTAGGTAAG (R)GCTGCATGGCAAGAGTATC	341	59
MLL4	(F)GGTCAAGGTCAAGGTCAACA (R)TGGAGGGGATGGTAGAGGT	360	58
MLL4	(F)AGCTGGATGACGAGGAAGA (R)TGGAGGGGATGGTAGAGGT	257	58
NES	(F)CCTCCTCATCCCCTACTTCTG (R)GGACTCCCAGGTTCTTTTG	458	60
NPHS1	(F)TGGGGGGTTGTTTCAGTTTC (R)AACCCAGCAAGGAGTTGAGAAG	338	58
NPHS1	(F)TTGGCCAGGATCGTCA (R)GAAATCTGGGAGCACCTTCT	359	54
POLQ	(F)TCCGTTTTCTTCTCATCTAAGG (R)TGGGAATCAAGAACATCAGAC	345	56
POLQ	(F)TCCGTTTTCTTCTCATCTAAGG (R)TGGGAATCAAGAACATCAGAC	345	56
RAB12	(F)GAGCGTCAGTGGGACTTTC (R)GCGCCTGAGCACAACCTAC	351	58
RFTN1	(F)AGGGTAGGTAACACACAACAC (R)CCAGAGACAAACAACAAGC	441	56
SLC26A3	(F)AGCTCAGTAACTGACTTACCCA (R)GAAACCATTGACAAATCCAG	345	55
SVEP1	(F)CTGAGACTGGGGGTGAACTG (R)CCTACTGCTCCTGAAAATGGC	361	58
SYNE2	(F)AGGTCAGAGCTCATTCATTGTC (R)CAGAAGAGTCTCATCATTTCCC	380	58
SYNE2	(F)GGCATCTAGTAGAGCAAGAAG (R)GGGATGGAAAGTAAACACAC	498	57
TSPYL6	(F)CATGAATCTGCCCCAACCTG (R)TGCCTCGCTGACAACCTGAC	398	58
TTC23	(F)TTCACAGAGGTGGAGTTTC (R)AATCAGCAGGTCAGTAGTAGC	317	56
WDR81	(F)ACGGCCTGGTATCTGTTTG (R)CCATCCATGGGAATCTCC	341	56
ZC3H3	(F)GAGCTCAGCAGATCCATTAGG (R)CCCCAGCAAGTACAAGTG	330	59
ZC3H3	(F)AAGCTGGCCTCCTATTTGGTG (R)CTGTGCCCTGGGTTTTCTCTAC	377	61
ZNF696	(F)ACCGGGGAGAGGCTGTA (R)CCGGTGCTGGATGAGG	310	57
ZNF696	(F)CCTCGACTCACGTTCTCTTAC (R)TCTGTCTCCAGTTTTCTCAG	289	59
ZFH3	(F)CCCTGGTGCCAACTCTTTC (R)CCTCCTCTCCCTTTCTACATCC	388	58

*Fluoreszenzmarkierte M13-Primer für die LiCOR-Analyse

Tab. C.5.: Primer der *RAB12*-Sequenzierung

Exon	Vorwärts- (F) und Rückwärtsprimer (R)	Größe (bp)	Annealing-temperatur (°C)
1	(F)GATGCTGCTGCCGCTACT (R)CCCATCCCCGAAAGACTC	623	58
2	(F)TAGACCGATCACTCAGGATAAG (R)CTCTCTCTTGATGGAAACACTG	463	58
3	(F)TCAGGTCAAAGGGAAATAGGG (R)GCAGCTGGATGTAGTGGAATG	552	59
4	(F)AACAGCCAAGAGCATTGT (R)TAAAGGAGCACGAAGTCA	493	51
5	(F)GAGCGTCAGTGGGACTTTC (R)GCGCCTGAGCACAACACTAC	351	58
6	(F)AAAGGTCTTCATCTGTGTCA (R)TTGGAGGGAAATAGGTAAC	563	53
cDNA	(F)CTGCTTCCCTTCCTCCTCT (R)GCCTGGTGATTTCTCTGTCC	764	59

Tab. C.6.: Primer der Validierungsphase der GWAS

SNP	Vorwärts- (F) und Rückwärtsprimer (R)	Größe (bp)	Annealing-temperatur (°C)
rs11655081	(F)TGAAGACATTCCTCCTGCCTCT (R)ATGGCCTCCTGGATCTGCCTT	144	57

E. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt zu haben. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, nicht vorher oder gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation vorgelegt zu haben. Desweiteren erkläre ich, mich noch nie einem anderen Promotionsverfahren unterzogen zu haben.

Lübeck, den

F. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Christine Klein für das Überlassen dieses spannenden Themas sowie der zur Bearbeitung nötigen Mittel. Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann für die Einarbeitung in die Methoden und gute Betreuung bedanken – stets im unermüdlichen Willen, das Beste aus mir und dem Thema herauszuholen.

Auch möchte ich mich bei der Universität zu Lübeck für die Förderung durch das Promotionsstipendium „Exzellenzmedizin“ bedanken, durch das ich vor allem finanziell während meiner Dissertation unterstützt wurde.

Für die gute Einarbeitung und enge Betreuung im Labor danke ich besonders Susen Schaake sowie Heike Pawlack, Thora Lonau und Karin Wiegers. Zudem gilt mein Dank allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Neurogenetik Lübeck, vor allem Prof. Dr. med. Alexander Schmidt, Karen Grütz und Eva Koschmidder für die freundliche und unterstützende Zusammenarbeit.

Meinen Freunden danke ich für ihre Anteilnahme und Zuversicht, die mir die Kraft gab, auch bei Misserfolgen nicht aufzugeben. Namentlich möchte ich Grischa und Maximilian nennen, die mich versiert durch das Neuland $\LaTeX$ führten.

Mein besonderer Dank aber gilt meiner Familie, die mir erst das Medizinstudium ermöglichte und mir die Liebe zur Musik mit auf den Weg gab.

G. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 12. November 1988

Geburtsort: Potsdam

AUSBILDUNG

- | | |
|-----------------|--|
| seit 08/2016 | Assistenzärztin der Neurologie, Charité – Campus Virchow-Klinikum und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Kurt-Singer-Institut für Musikphysiologie und Musiker-gesundheit, Hochschule für Musik Hanns Eisler, Berlin |
| 10/2008–12/2015 | Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck |
| 08/2001–06/2008 | Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Otto-Brenner-Gymnasium, Frankfurt/Oder |

PRAKTISCHES JAHR

- | | |
|-----------------|---|
| 08–10/2015 | Wahltertial Neurologie, National Hospital of Neurology and Neurosurgery, London |
| 06–08/2015 | Wahltertial Neurologie, Westküstenklinikum, Heide |
| 03–06/2015 | Internistisches Tertial, UKSH, Campus Lübeck |
| 11/2014–03/2015 | Chirurgisches Tertial, UKSH, Campus Lübeck |

FAMULATUREN

- | | |
|---------|--|
| 09/2013 | Neurologie, UKSH, Campus Lübeck |
| 02/2012 | Psychosomatik, AHG Klinik Schweriner See, Lübstorf |
| 09/2011 | Gynäkologie, Klinikum Frankfurt/Oder |
| 02/2011 | Teilnahme am Neurokompetenzzentrum in den Fachbereichen Neuroradiologie, Neu-rochirurgie, Neurologie und Strahlentherapie, Klinikum Frankfurt/Oder |

DOKTORARBEIT

07/2012–11/2016 Doktorandin am Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann, Thema: „*Identifikation genetischer Ursachen der Musikerdystonie*“

AUSZEICHNUNGEN

11/2013 Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Neurologie: „*Musician’s dystonia: Identification of the first genetic cause by genome sequencing?*“

10/2012-05/2014 Promotionsstipendiatin „Lübecker Exzellenzmedizin“ der Universität zu Lübeck

PUBLIKATIONEN

Borngräber, F., Schmidt, A., Jabusch, H.C., Kasten, M., Altenmüller, E., Klein, C., Lohmann, K.: Wenn der letzte Vorhang fällt: Erste genetische Ursache der Musikerdystonie mittels Genomsequenzierung identifiziert?; *Uni im Dialog in Lübeck*, 2013.

Borngräber, F., Schmidt, A., Jabusch, H.C., Kasten, M., Altenmüller, E., Klein, C., Lohmann, K.: Musician’s dystonia: Identification of the first genetic cause by genome sequencing?; *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie in Dresden*, 2013.

Lohmann, K., Schmidt, A., Schillert, A., Winkler, S., Albanese, A., Baas, F., Bentivoglio, A.R., **Borngräber, F.**, Brüggemann, N., Defazio, G., Del Sorbo, F., Deuschl, G., Edwards, M.J., Gasser, T., Gómez-Garre, P., Graf, J., Groen, J.L., Grünewald, A., Hagenah, J., Hemmelmann, C., Jabusch, H.C., Kaji, R., Kasten, M., Kawakami, H., Kostic, V.S., Liguori, M., Mir, P., Münchau, A., Ricchiuti, F., Schreiber, S., Siegesmund, K., Svetel, M., Tijssen, M.A.J., Valente, E.M., Westenberger, A., Zeuner, K.E., Zittel, S., Altenmüller, E., Ziegler, A., und Klein, C. (2014): Genome-wide association study in musician’s dystonia: a risk variant at the arylsulfatase g locus?; *Mov Disord* (29) 921-927.

Borngräber F., Koschmidder E., Schmidt A., Weißbach A., Jabusch, H.C., Kasten, M., Altenmüller, E., Klein, C., Lohmann, K.: Musikerdystonie: erste genetische Ursache mittels Genomsequenzierung identifiziert?; *Symposium der Deutschen Gesellschaft für Musikphysiologie und Musikermedizin Berlin*, 2016.

Koschmidder, E.*, **Borngräber, F.***, Schmidt, A., Rakovic, A., Braenne, I., Weißbach, A., Größer, L., Schaa-ke, S., Müller, M., Manzoor, H., Jabusch, H.C., Alvarez-Fischer, D., Kasten, M., Kostic, V., Gasser, T., Zeuner, K., Altenmüller, E., Klein, C., Lohmann, K. (2016): Functional characterization of rare RAB12 variants and their role in Musician’s dystonia; *Eur J Hum Genet.*, eingereicht. *gleichberechtigte Erstautoren