

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PSYCHIATRIE, PSYCHOSOMATIK UND PSYCHOTHERAPIE
PROF. DR. R. RUPPRECHT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**PRÄVALENZ VON DYT1-VARIANTEN BEI PATIENTEN MIT
REZIDIVIERENDER MAJOR DEPRESSION**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franziska Heining

2011

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PSYCHIATRIE, PSYCHOSOMATIK UND PSYCHOTHERAPIE
PROF. DR. R. RUPPRECHT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**PRÄVALENZ VON DYT1-VARIANTEN BEI PATIENTEN MIT
REZIDIVIERENDER MAJOR DEPRESSION**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franziska Heining

2011

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Göran Hajak
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ulrich Bogdahn
Tag der mündlichen Prüfung:	20.07.2012

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	8
1.1 Einteilung und Erscheinungsbild der Dystonien	8
1.2 Pathomechanismen der DYT1-Dystonie	11
1.3 Übersicht zur bekannten genetischen Variabilität im DYT1-Gen	12
1.4 Assoziation von DYT1 mit depressiven Störungen	14
1.5 Klinik und Genetik depressiver Störungen	15
2 ZIELE	18
3 METHODEN	19
3.1 Charakterisierung der Stichprobe	19
3.2 DNA-Extraktion	19
3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	20
3.4 Nukleinsäureaufreinigung	21
3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	22
3.6 Sequenzierung von DNA	23
3.7 Auswertung der Sequenzinformation	23
3.8 Evolutionäre Konservierung	23
3.9 Vorhersage intrinsischer ungeordneter Sequenzbereiche	23
3.10 DNA-Krümmungs-Neigungs-Berechnung	24
3.11 Poweranalyse	25
3.12 Hardy-Weinberg-Äquilibrium	25
3.13 Ermittlung des Kopplungsungleichgewichtes	26
4 ERGEBNISSE	27
4.1 Vorkommen der GAG-Deletion und anderer bekannter DYT1-Varianten ...	27
4.2 Prävalenz neu identifizierter Varianten	29
4.3 Funktionalität der Varianten	32
4.3.1 Evolutionäre Konservierung bekannter Varianten	32
4.3.2 Evolutionäre Konservierung neu identifizierter Varianten	35
4.3.3 Vorhersagen intrinsisch ungeordneter Sequenzbereiche und der Auswirkungen auf die Protein-Sekundärstruktur	38
4.3.4 Auswirkungen auf die DNA-Überstruktur und AT-reiche Elemente (ARE)	40
4.4 Kopplungsungleichgewicht und DYT1-Haplotypen	41
4.5 Assoziationsuntersuchung	42

4.6 Poweranalyse	44
4.7 Fallvignetten	44
4.7.1 Variante Leu262Leu	44
4.7.2 Variante Glu310Glu	46
5 DISKUSSION	48
5.1 Vorkommen der GAG-Deletion	48
5.2 Prävalenzraten weiterer bereits bekannter Varianten	49
5.3 Schätzungen zur Prävalenz neu identifizierter Varianten	50
5.4 Mögliche funktionelle Relevanz neu identifizierter Varianten	51
5.4.1 Kodierende Varianten	51
5.4.2 Nicht-kodierende Varianten	54
5.4.3 Auswirkungen auf DNA-Überstruktur und mRNA-Stabilität	54
5.4.4 Kopplungsungleichgewicht und Haplotypen	54
5.5 Zusammenhang von Dystonie und Depression	55
6 ZUSAMMENFASSUNG	57
7 LITERATURVERZEICHNIS	59
8 APPENDIX	71
9 DANKSAGUNG.....	72
10 LEBENSLAUF.....	73

1 EINLEITUNG

1.1 Einteilung und Erscheinungsbild der Dystonien

Unter dem Oberbegriff „Dystonie“ wird eine heterogene Gruppe neurologischer Erkrankungen zusammengefasst, die mutmaßlich auf Veränderungen in den Basalganglien zurückzuführen sind [Wallesch, 2005; Poeck und Hacke, 2006]. Kennzeichnend sind unwillkürliche tonische Kontraktionen von agonistischen und antagonistischen Muskelgruppen mit abnormen Gelenkstellungen und veränderten Bewegungsmustern [Tanabe et al., 2009]. Dystonien werden nach Ätiologie, Lokalisation oder Manifestationsalter klassifiziert [Reichel, 2005].

Nach der Ätiologie lassen sich primäre von sekundären Dystonien abgrenzen. Zu den sekundären Formen zählen dabei u.a. dystone Muskelkontrakturen als Begleitsymptom von Chorea Huntington oder M. Parkinson, bzw. als Folge von Schädel-Hirn-Traumen, Infektionen oder Vergiftungen, aber auch als Nebenwirkungen von bestimmten Arzneimitteln. Die primären Dystonien hingegen bezeichnen eigenständige erbliche Bewegungsstörungen deren Penetranz variieren kann [Klein et al., 2000; Grundmann et al., 2003]. Gegenwärtig sind 18 Genorte bekannt, die charakteristischen Phänotypen entsprechen (Tab.1).

Tab. 1 Charakteristika primärer Dystonien mit identifiziertem Genlocus.¹ (vgl. Kamm 2009)

Locus	Bezeichnung	Vererbungsmodus	Chromosom	klinische Charakteristika	Protein	vermutete Funktion
DYT1 / TOR1A	Dystonia 1, PTD mit frühem Beginn	AD	9q34	früher Beginn in Extremität, meist Ausbreitung	TorsinA	ER-Kernhülle-Membran-Transport, Chaperon, Vesikeltransport
DYT2	Dystonia 2, autosomal rezessive PTD	AR	unbekannt	früher Beginn, später segmentale oder generalisierte Dystonie	unbekannt	unbekannt
DYT3	Dystonia 3, X-chromosomal vererbte Dystonie-Parkinsonismus, „Lubag“	X-chromosomal	Xq13	später Beginn, segmentale oder generalisierte Dystonie mit Parkinson-Syndrom in ca. 40 – 50 %	TAF1	Transkriptionsregulation von Zielgenen, assoziiert mit Zellteilung und -proliferation
DYT4	Dystonia 4, „nicht-DYT1-PTD“	AD	Unbekannt	„Flüster“-Dysphonie	unbekannt	unbekannt
DYT5 / GCH1	Dystonia 5, Dopa-responsive Dystonie, Segawa-Syndrom	AD AR	14q22.1 – 22.2 11 p15.5	Dystonie mit begleitendem oder späterem Parkinson-Syndrom, tageszeitliche Fluktuation, dramatische Besserung auf L-Dopa	GCH1 TH	Schlüsselenzyme im Dopamin-Stoffwechsel
DYT6	Dystonia 6, „gemischte“ PTD mit Beginn im Jugendalter	AD	8 p11.21	segmentale oder generalisierte Dystonie mit Beginn im Jugendalter, häufig spasmodische Dysphonie	THAP1	Transkriptionsregulation von Zielgenen, assoziiert mit Apoptose, Zellteilung u. a.
DYT7	Dystonia 7, fokale PTD mit spätem Beginn	AD	18 p11.3	fokale Dystonie mit spätem Beginn (Torticollis, Blepharospasmus etc.)	unbekannt	unbekannt
DYT8	Dystonia 8, paroxysmale nicht kinesiogene Dystonie (PNKD)	AD	2q35	Anfällen von Dystonie/Choreoathetose, ausgelöst u. a. durch Erschöpfung, Stress, Alkohol, Koffein etc.	MR-1	Detoxifikation von Methylglyoxal
DYT9	Dystonia 9, paroxysmale Choreoathetose mit episodischer Ataxie und Spastik (CSE)	AD	1 p13.3–p21	Anfällen von Dystonie, Parästhesien, Doppelbildern, ausgelöst durch körperliche Anstrengung, Stress etc.; spastische Paraparese im Intervall	unbekannt	unbekannt
DYT10	Dystonia 10, paroxysmale kinesiogene Choreoathetose (PKC)	AD	16 p11.2–q12.1 und 16q13.q22.1	Anfällen von Dystonie/Choreoathetose, ausgelöst durch plötzliche Bewegungen	unbekannt	unbekannt
DYT11	Dystonia 11, Myoklonus-Dystonie (M-D)	AD AD	7q21 11q23.1	schnelle, blitzartig einschließende Bewegungen, Alkoholresponsiv, kombiniert mit verschiedenen Formen von Dystonie	SGCE DRD2	Teil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes
DYT12	Dystonia 12, Dystonie-Parkinsonismus mit plötzlichem Beginn (RDP)	AD	19q12. – q13.2	akuter oder subakuter Beginn von generalisierter Dystonie mit atypischem Parkinsonismus und bulbären Symptomen	ATP1A3	Na ⁺ / K ⁺ -Transporter
DYT13	Dystonia 13, fokale oder segmentale PTD mit frühem Beginn	AD	1 p36.13	fokale oder segmentale Dystonie mit Beginn entweder kraniozervikal oder an den oberen Extremitäten, langsame Progression	unbekannt	unbekannt
DYT14	identisch mit DYT5	AD	14q22.1 – 22.2	identisch mit DYT5	identisch mit DYT5	identisch mit DYT5
DYT15	Dystonia 15, Myoklonus-Dystonie	AD	18 p11	Alkohol-responsive myoklonische Dystonie, kombiniert mit verschiedenen Formen von Dystonie	unbekannt	unbekannt
DYT16	Dystonia 16, Dystonie-Parkinsonismus mit frühem Beginn	AR	2q31.3	früher Beginn, allmähliche Progression zu generalisierter Dystonie, z. T. mit atypischem Parkinson-Syndrom, oft bulbäre Symptome	PRKRA	Aktivierung von Protein-Kinasen als Antwort auf extrazellulären Stress, beteiligt u. a. an Signalübertragung, Zelldifferenzierung und Apoptose

Tab. 1 (Fortsetzung)

Locus	Bezeichnung	Vererbungsmodus	Chromosom	klinische Charakteristika	Protein	vermutete Funktion
DYT17	Dystonia 17, autosomal-rezessive PTD	AR	20 p11.22–q13.12	Beginn im Kindes- bis Jugendalter mit Torticollis, später segmentale oder generalisierte Dystonie mit prominenter spasmodischer Dysphonie	unbekannt	unbekannt
DYT18	Dystonia 18, paroxysmale anstrengungsinduzierte Dystonie (PED)	AD	1 p35–p31.3	Attacken von Dyskinesien oder Dystonie der oberen oder unteren Extremitäten, ausgelöst durch körperliche Anstrengung, früher Beginn, z. T. hämolytische Anämie	SLC2A1	Glukose-Transport über die Blut-Hirn-Schranke

¹ PTD = primäre Torsionsdystonie, AD = autosomal dominant, AR = autosomal rezessiv, ER = endoplasmatisches Retikulum, TAF1 = TATA-binding protein associated factor 1, GCH1 = GTP-Cyclohydrolase 1, TH = Tyrosinhydroxylase, THAP1 = Thanatos-associated-protein domain containing, apoptosis associated protein 1, MR-1 = myofibrillogenesis regulator 1, SGCE = Sarkoglykan-e, PRKRA = protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator, SLC2A1 = solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1.

Abhängig von der Lokalisation der Beschwerden werden fokale, segmentale, multifokale und generalisierte Formen unterschieden, ferner wird nach früh- und späteinsetzenden Dystonieformen (ab 26. Lebensjahr) differenziert [Reichel, 2005].

Die Gesamtprävalenz aller primärer Dystonien wird zwischen 30 und 40 pro 100 000 angegeben [Wallesch, 2005; Masuhr und Neumann, 2007]. Aus Familienstudien ist allerdings bekannt, dass viele Patienten mit subklinischer Symptomatik existieren, damit dürfte die tatsächliche Prävalenz mit großer Wahrscheinlichkeit höher liegen [Schmidt et al., 2008]. Frauen sind im Mittel häufiger betroffen als Männer, erkranken jedoch später [Mumenthaler und Mattle, 2008].

Der Krankheitsverlauf primärer Dystonien kann sehr unterschiedlich sein und umfasst sowohl spontane Remissionen (etwa 1/5 der Patienten mit fokalen Formen), als auch Zunahme fokaler Symptome mit Ausweitung auf andere Körperteile (etwa 1/3 der fokalen Formen) [Mumenthaler und Mattle, 2008]. Im Extremfall kann es durch die dystone Symptomatik zu partiellen Muskelnekrosen kommen, sowie zu schweren Muskelkontrakturen und Skelettdeformitäten, die eine erhebliche Behinderung darstellen können [Masuhr und Neumann, 2007]. Ein früher Erkrankungsbeginn gilt als prognostisch ungünstig [Klein et al., 2000].

Als therapeutische Optionen stehen einerseits Physio- und Ergotherapie zur Verfügung, zusätzlich lokale Injektionen von Botulinumtoxin Typ A oder B in die betroffenen Muskelgruppen [Reichel, 2005]. Hierdurch wird eine vorübergehende Parese der Muskeln zur Beschwerdelinderung

erzeugt. In therapieresistenten Situationen kann die tiefe Hirnstimulation der Basalganglien helfen [Wallesch, 2005].

Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf genetische Charakteristika der erstmals von Oppenheim beschriebenen, früh einsetzenden Torsionsdystonie (DYT1-Typ) [Oppenheim, 1911]. Ihre Symptome beginnen meist vor dem 26sten Lebensjahr, manifestieren sich zunächst fokal in einer Extremität und entwickeln sich im Allgemeinen zur generalisierten Form weiter [Zirn et al., 2008; Grundmann et al., 2003]. Die Erkrankung wurde zurückgeführt auf eine drei Basenpaar-Deletion, die den Verlust eines Glutaminrests am Carboxylende des DYT1-Proteins bedingt [Ozelius et al., 1997]. Sie weist einen autosomal-dominanten Erbgang mit verminderter Penetranz auf [de Carvalho Aguiar und Ozelius, 2002; Grundmann et al., 2003].

1.2 Pathomechanismen der DYT1-Dystonie

Das DYT1 Gen, auch TOR1A genannt, wurde als erstes Dystonie-Gen kartiert [Ozelius et al., 1989]. Es befindet sich auf Chromosoms 9q34 und kodiert für das Protein TorsinA. Dieses wird beim Menschen u.a in Niere, Leber und im Skelettmuskeln exprimiert [Shashidharan et al., 2000]. Im Gehirn dominiert die Expression im Hippocampus, im Cerebellum und in der Substantia nigra pars compacta, in der sich dopaminerge Neurone befinden, die die Basalganglien innervieren [Walker und Shashidharan, 2003]. Während die Funktion von TorsinA in Hippocampus und Cerebellum bislang nicht geklärt ist, rechtfertigt eine Beteiligung der Basalganglien bei der DYT1-Dystonie die Annahme einer Störung der dopaminergen Neurotransmission [Walker und Shashidharan, 2003; Augood et al., 1998]. Für diesen Pathomechanismus spricht auch die durch eine pharmakologische Blockade der Dopamin-Rezeptoren provozierbare akute dystone Symptomatik [Augood et al., 1998] und der erhöhte Dopaminumsatz im Striatum von Patienten mit der GAG-Deletion [Augood et al., 2002]. Welche Rolle TorsinA dabei zukommt ist derzeit noch Gegenstand der Forschung.

Das Protein (TorsinA) besteht aus 332 Aminosäuren [de Carvalho Aguiar und Ozelius, 2002], besitzt eine ATP-Binde-Domäne [Walker und Shashidharan, 2003] und damit Ähnlichkeit mit anderen Proteinen der AAA-Familie („ATPases associated to a variety of cellular activities“). Wegen ihrer strukturellen Verwandtschaft wird diese Familie wiederum mit Proteinen der Hitze-Schock-Protein-HSP-100/Clp-Familie zur AAA+Superfamilie zusammen gefasst [Neuwald et al., 1999; Tanabe et al., 2009]. Ihre Vertreter fungieren als Chaperone, die meist ATP-abhängig die Bildung der Sekundärstruktur neusynthetisierter Polypeptidketten beschleunigen. Darüber hinaus sind sie an vielen weiteren Funktionen beteiligt wie Proteinfaltung, Proteolyse, Regulation des Zytoskeletts, Membrantransport, Vesikelfusion, DNA-Replikation, Regulation der Genexpression, Thermotoleranz und Reaktionen auf zellulären Stress [de Carvalho Aguiar und Ozelius, 2002; Walker und Shashidharan, 2003].

Transgene Mäuse, die kein TorsinA exprimieren versterben innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt [Goodchild et al., 2005].

1.3 Übersicht zur bekannten genetischen Variabilität im DYT1-Gen

Das Spektrum genetischer Varianten mit möglichem Bezug zur früh einsetzenden Torsionsdystonie ist über die Jahre angewachsen. Zusätzlich zur pathogenen GAG-Deletion sind weitere Mutationen und genetische Varianten im DYT1-Gen bekannt geworden (siehe Tab. 5), deren Auswirkungen auf den Phänotyp jedoch gegenwärtig schwer einzuschätzen sind. Diskutiert wird u.a. eine Einflussnahme auf die Penetranz der früh einsetzenden Torsionsdystonie [Szczaluba et al., 2007]. Unklar ist insbesondere die Bedeutung:

- einer 18 Basenpaar-Deletion (F323_Y328del) bei einem Patienten mit früh einsetzender Dystonie und Myoklonus [Leung et al., 2001]. Die Mutation führt zum Verlust von sechs Aminosäuren in der Nähe des Carboxylendes von TorsinA, einschließlich einer mutmaßlichen Phosphorylierungsstelle. Die atypische Symptomatik bei Angehörigen, die

ebenfalls Mutationsträger waren und der zusätzliche Nachweis einer Mutation im SGCE-Gen (DYT11) beim Indexpatienten erschweren jedoch die Beurteilung der Funktionalität [Zirn et al., 2008].

- einer 4 Basenpaar-Deletion (934_937delAGAG) in Exon 5 bei einem mutmaßlich gesunden Blutspender. Durch diese Deletion kommt es zu einer Änderung der Aminosäuresequenz ab Position 312 mit einem vorzeitigen Abbruch an Position 325 (E312STOP325) am Carboxylende von TorsinA. Da der Spender eine neurologische Untersuchung und die Erhebung einer Familienanamnese ablehnte, sind weitere klinische Informationen zur möglichen Funktionalität nicht verfügbar [Kabakci et al., 2004].

- einer missense Mutation R288Q bei einer Patientin mit generalisierter Dystonie. Die Mutter der Trägerin weist dieselbe Mutation jedoch keinerlei Symptome auf [Zirn et al., 2008].

Auch das Spektrum der Phänotypen bei Trägern der GAG-Deletion ist entgegen ursprünglichen Annahmen vergleichsweise breit [Opal et al., 2002; Grundmann et al., 2003; Kostić et al. 2006]. Die „klassische“ früh einsetzende Torsionsdystonie beginnt vor dem 26. Lebensjahr in einer Extremität und generalisiert in der Regel innerhalb weniger Jahre [Zirn et al., 2008; Grundmann et al., 2003]. Neben diesem klassischen Krankheitsbild finden sich aber auch andere klinische Korrelate bei Trägern der DYT1-Mutation, sowohl bezüglich der Art der Symptome, als auch des Schweregrades, der Lokalisation und des Erkrankungsalters [Opal et al., 2002; Grundmann et al., 2003; Gambarin et al., 2006].

In einer großen mexikanisch-amerikanischen Familie etwa fanden sich 6 asymptomatische Träger der Mutation. Bei weiteren 5 symptomatischen Trägern variierte das Erkrankungsalter zwischen dem 7. und dem 64. Lebensjahr, wobei teils fokale, teils segmentale und teils schwere multifokale Formen auftraten [Opal et al., 2002].

Die Richtlinien der "Movement Disorders Society" empfehlen die Durchführung eines genetischen Tests zum Nachweis der GAG-Deletion bei allen Dystoniepatienten, mit Krankheitsbeginn vor dem 26. Lebensjahr

und Manifestation in einer Extremität, sowie bei Patienten mit Dystoniebeginn nach dem 26. Lebensjahr wenn diese einen oder mehrere nahe Verwandte mit fröheinsetzender Torsionsdystonie haben [Gasser et al., 2003].

1.4 Assoziation von DYT1 mit depressiven Störungen

Mehrere Autoren berichten, dass Patienten mit primärer Dystonie eine erhöhte Rate von psychiatrischen Störungen aufweisen [Wenzel et al., 1998; Vitek, 2002; Heiman et al., 2002; Gündel et al., 2003]. Die Prävalenz von psychiatrischen Komorbiditäten schwankt dabei je nach Kollektiv zwischen 57,3% [Fabbrini et al., 2010], 65,9% [Vitek, 2002] und 71% [Wenzel et al., 2000]. Insgesamt soll das Lebenszeitrisiko einer psychiatrischen Erkrankung bei Patienten mit Dystonie im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um das 2,6-Fache erhöht sein [Gündel et al., 2001]. Zu den mit Dystonie in Zusammenhang gebrachten Diagnosen zählen u.a. die Panikstörung, die rezidivierende Major Depression, die Sozialphobie und die bipolare affektive Störung [Wenzel et al., 1998]. Die Prävalenz von Depressionen bei Patienten mit Dystonie wird mit 25% [Lauterbach et al., 2004], 30% [Lewis et al., 2008] bzw. 14,5% [Zhang et al., 2010] angegeben. Vor diesem Hintergrund wird auch ein gemeinsamer Pathomechanismus für psychiatrische Erkrankungen und Dystonie diskutiert.

Heiman *et al.* (2004) zufolge stellt die DYT1-Mutation einen Risikofaktor für rezidivierende Major Depression dar. So soll sich ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für das Gemütsleiden sowohl bei manifesten Mutationsträgern finden als auch bei nicht-manifesten Mutationsträgern verglichen mit Nicht-Trägern. Auch ein früheres Auftreten depressiver Symptomatik bei Mutationsträgern im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung wird postuliert. Dagegen sei der Schweregrad der Dystonie kein Prädiktor für das Auftreten einer Depression. Schließlich sei die Assoziation von DYT1-Mutation und Depression spezifisch für diesen Phänotyp und

erstrecke sich nicht auf andere psychiatrische Erkrankungen, darunter bipolare Störungen und Zwangsstörungen [Heiman et al., 2007].

Inwieweit das Erkrankungsrisiko für rezidivierende Major Depression durch die DYT1 GAG-Deletion tatsächlich erhöht wird, ist mangels Replikation der Befunde von Heiman *et al.* (2004, 2007) nur schwer einzuschätzen.

1.5 Klinik und Genetik depressiver Störungen

Depressive Störungen werden nach ICD-10, dem internationalen Klassifikationssystem der WHO, zu den affektiven Störungen gezählt. Es werden unipolare Erkrankungen, mit ausschließlich depressiven Krankheitsepisoden, von bipolaren Erkrankungen unterschieden, bei denen sowohl depressive als auch manische Phasen auftreten [Schulte-Körne und Allgaier, 2008].

Kernsymptome der depressiven Episode oder Major Depression¹ sind gedrückte Stimmung, Freudlosigkeit und Interessenverlust sowie verminderter Antrieb mit eingeschränkter Aktivität. Diese sind oft begleitet von kognitiven Störungen in Form von Konzentrationsstörungen und Grübelzwang, sowie somatischen Beschwerden, wie Schlafstörungen, Appetitverlust und Schmerzen. Die Erkrankung kann als einmalige Episode oder rezidivierend auftreten [Möller et al., 2005].

Depressive Störungen führen zu massiven gesundheitlichen Beeinträchtigungen und rangieren hinsichtlich Mortalität und psychosozialen Funktionseinschränkungen nach dem Herzinfarkt an zweiter Stelle [Murray und Lopez, 1997]. Die Punktprävalenz für unipolare Depressionen wird auf 5% und die Lebenszeitprävalenz auf etwa 12-16% geschätzt [Andlin-Sobocki und Wittchen, 2005]. Frauen sind dabei etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer [Möller et al., 2005]. Welcher Parameter für diese Verteilung verantwortlich ist, ist noch nicht geklärt [Schulte-Körne und Allgaier, 2008; Maier, 2004]. In der akuten Episode

¹ Major Depression, nach dem amerikanischen Klassifikationssystem psychiatrischer Krankheiten DSM-IV, entspricht der depressiven Episode nach ICD-10, dem internationalen Klassifikationssystem der WHO.

sind viele Patienten so stark beeinträchtigt, dass ca. 2-10% eine stationäre Behandlung benötigen [Andlin-Sobocki und Wittchen, 2005]. Aufgrund einer Tendenz zur Zunahme depressiver Erkrankungen [Schulte-Körne und Allgaier, 2008] und aufgrund ihrer Auswirkungen auf sogenannte „qualitätsangepasste“ Lebensjahre (QUALYs) ist prognostiziert worden, dass die unipolaren Depressionen im Jahr 2010 unter allen Erkrankungen zu den stärksten Beeinträchtigungen führen werden [Maier, 2004]. Neben der individuellen Belastung für die Betroffenen stellt die Depression aber auch eine ökonomische Belastung für die Gesellschaft dar. Laut statistischem Bundesamt errechnen sich für 2006 direkte depressionsgebundene Krankheitskosten in Höhe von ca. 5 Milliarden € (60 € je Einwohner). In den Vereinigten Staaten wurden die jährlichen Kosten auf 83,1 Milliarden US \$ geschätzt [Greenberg et al., 2003]. Der größte Anteil entfällt auf Fehltage durch Krankheit, verminderte Arbeitskapazität und Tod [Andlin-Sobocki und Wittchen, 2005].

Als Therapiemöglichkeiten stehen neben Psychotherapie verschiedene Pharmaka zur Verfügung, darunter trizyklische Antidepressiva, selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer und Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer. Allen ist gemeinsam, dass sie die Wiederaufnahme von Neurotransmittern in die Nervenzellen im Gehirn hemmen und somit die Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt anheben. Depressiogene Effekte von Reserpin, das die vesikuläre Speicherung von Dopamin hemmt, zeigen darüber hinaus dass mehrere Transmittersysteme betroffen sind [Ruß und Endres, 2006].

Genetische Einflüsse auf depressive Störungen sind inzwischen gesichert, aber auf molekularer Ebene bislang noch nicht identifiziert [Maier, 2004]. Verwandte depressiver Patienten weisen relativ zur Allgemeinbevölkerung ein drei- bis fünffach erhöhtes Risiko auf, selbst an einer Depression zu erkranken [Schulte-Körne und Allgaier, 2008]. Diese Befunde werden durch die Ergebnisse von Adoptionsstudien bestätigt [Müller und Strohbach, 2005]. Aus Zwillingsstudien gehen Konkordanzraten von 23-50% bei monozygoten und 14-37% bei dizygoten Zwillingen hervor, die

Heritabilität bewegt sich entsprechend zwischen 35 und 70% [Schulte-Körne und Allgaier, 2008; Maier, 2004]. Ein früher Erkrankungsbeginn weist auf eine ausgeprägte familiär-genetische Belastung hin. Trotz deutlicher Prävalenzunterschiede zwischen Männern und Frauen scheinen keine Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der Stärke des genetischen Einflusses zu bestehen [Maier, 2004].

Bei Depressionen handelt es sich um eine sehr komplexe Erkrankung, mit multifaktorieller Genese zu der sowohl genetische Veranlagung als auch Umweltfaktoren beitragen [Schulte-Körne und Allgaier, 2008]. Letztere umfassen u.a Vernachlässigung, Traumatisierung und den Verlust eines geliebten Menschen [Schulte-Körne und Allgaier, 2008; Maier, 2004]. Die „Life-event“-Forschung hat ergeben, dass sich insbesondere bei schwerem, lang andauerndem (sexuellen) Missbrauch das Erkrankungsrisiko erhöht. Dieser Risikofaktor potenziert zugleich familiäre Risikofaktoren und kann sowohl Erkrankungsbeginn als auch den Erkrankungsverlauf ungünstig beeinflussen [Schulte-Körne und Allgaier, 2008].

2 ZIELE

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl die Prävalenz bekannter Varianten als auch das Vorkommen neuer Varianten im DYT1-Gen in einem Kollektiv depressiver Patienten zu untersuchen.

Anschließend sollte ein Vergleich der gefundenen Prävalenzen mit Referenzwerten aus anderen Kollektiven gleicher ethnischer Zugehörigkeit erfolgen.

Schließlich sollten anhand von Sequenzanalysen und klinischen Fallstudien vorläufige Aussagen zur Funktionalität neu identifizierter DYT1-Gen-Varianten getroffen werden.

3 METHODEN

Für die vorliegende Arbeit wurde in einem ersten Schritt DNA aus Blutproben einer Stichprobe depressiver Patienten isoliert. Diese wurde in einem zweiten Schritt amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert. Durch Abgleich der Sequenzinformation mit dem Inhalt von öffentlichen Gendatenbanken wurde anschließend nach bereits bekannten und nach neuen DNA-Varianten im DYT1-Gen gesucht.

3.1 Charakterisierung der Stichprobe

Tab. 2: Anzahl und Durchschnittsalter der Patienten mit Standardabweichung (STD)

	insgesamt	männlich	weiblich
Anzahl Patienten	414	160 (38,6%)	254 (61,4%)
Durchschnittsalter (in Jahren) +/-STD	48,2 +/- 13,2	47,7 +/- 12,8	48,6 +/- 13,5

Insgesamt wurde das Erbmateriale von 414 Patienten untersucht, die unter der Diagnose „rezidivierende Major Depression“ zwischen 1998 und 2005 in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Regensburg stationär oder ambulant behandelt wurden. Davon waren 160 (38,6%) männlich und 254 (61,4%) weiblich. Das Durchschnittsalter lag insgesamt bei 48,2 Jahren (+/- 13,2), bei den männlichen Patienten bei 47,7 (+/- 12,8) Jahren und bei den weiblichen Patienten bei 48,6 (+/- 13,5) Jahren. Alle Patienten hatten im Vorfeld ihr Einverständnis mit den geplanten Untersuchungen erklärt.

3.2 DNA-Extraktion

Zur Vorbereitung der Genotypisierung wurde die DNA aus EDTA-Blut der 414 Patienten isoliert (QIAamp DNA Blood Midi bzw. Maxi Kit, Qiagen, Düsseldorf). Die DNA Konzentration dieser Proben wurde photometrisch

bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt, um Stammlösungen mit einer DNA-Konzentration von 50ng DNA pro 1 µl 1xTE Puffer herzustellen. Unter Verwendung der Stammlösungen wurden 96-well-Mikrotiterplatten für die Durchführung der anschließenden PCR befüllt.

3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (Polymerase Chain Reaction für Polymerase-Ketten-Reaktion) stellt ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten dar. Sie wird seit ihrer Entwicklung durch Mullis *et al.* (1986) für eine Vielzahl von Aufgaben in der Biologie und Medizin herangezogen. So dient sie beispielsweise als diagnostisches Mittel bei Erbkrankheiten, zum Erregernachweis bei Infektionen und in der Forschung zum Klonieren von Genen oder für die Analyse fossiler DNA. Zur Durchführung einer PCR wird die Ausgangs-DNA mit dem zu amplifizierenden Abschnitt (DNA-Matrize) sowie eine hitzebeständige DNA-Polymerase zur Replizierung der DNA (z.B. Taq-Polymerase) mit Mg^{2+} -haltigem Reaktionspuffer benötigt. Als Bausteine für den von der DNA-Polymerase zu synthetisierenden DNA-Strang sind die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) Adenosin, Cytosin, Guanin und Thymin erforderlich sowie zwei Primer/Oligonukleotide, die zu der Sequenz am 5'- bzw. am 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz komplementär sind.

Das Prinzip der PCR-Reaktion lässt sich in drei Schritte aufteilen (Tab. 3): Zunächst werden die beiden Stränge der DNA-Matrize, mittels Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 95°C getrennt (Denaturierung). Anschließend wird die Temperatur auf 50°C - 65°C gesenkt, sodass sich die Primer an die einzelnen DNA-Stränge anlagern (Annealing), wobei die Temperatur von den verwendeten Oligonukleotiden, insbesondere ihrer Länge und ihrem Gehalt an Guanin und Cytosin abhängig ist. Verwendet wird vielfach eine Guanin-Cytosin-Konzentration zwischen 30 und 70%. Anschließend wird die Temperatur auf 72°C angehoben. Dadurch erfolgt eine Aktivierung der DNA-Polymerase, die die angelagerten Primer in 5' → 3'-

Richtung mit Hilfe der bereitgestellten Nukleotide entsprechend der DNA-Matrize ergänzt (Elongation). Bei einer Standard-PCR werden diese drei Schritte ca. 30-40-mal wiederholt. Im vorliegenden Fall wurde in 40 Zyklen amplifiziert.

Die Ansätze für die PCR wurden manuell oder mit Hilfe eines Pipettierroboters (Corbett Robotics, San Francisco, USA) in 96-well-Mikrotiterplatten pipettiert. Pro Ansatz ergab sich jeweils ein Gesamtvolumen von 25 µl (siehe Tab.4).

Tab. 3: Ablauf der PCR-Reaktionsschritte

1. Zyklus	initiale Denaturierung 5 Minuten 95°C	Annealing 30 Sekunden 58°C	Elongation 30 Sekunden 72°C
2.-39. Zyklus	Denaturierung 30 Sekunden 95°C	Annealing 30 Sekunden 58°C	Elongation 30 Sekunden 72°C
40. Zyklus	Denaturierung 30 Sekunden 95°C	Annealing 30 Sekunden 58°C	terminale Elongation 10 Minuten 72°C

Tab. 4: Standard-PCR-Ansatz

Reagenz	Menge
dH ₂ O	19,7 µl
10x Puffer	2,5 µl
dNTP	0,5 µl
DYT1+	0,5 µl
DYT1--	0,5 µl
HotStarTaq	0,2 µl
DNA-Matrize	1 µl

3.4 Nukleinsäureaufreinigung

Die PCR-Amplifikate (847 bp) wurden anschließend für die Sequenzierreaktion aufgereinigt. Dies erfolgte mit zwei alternativen

Methoden, einem säulenbasierten (NucleoSpin® Extract II Kit) bzw. einem enzymbasierten (ExoSAP-IT®) Verfahren.

Bei Verwendung des NucleoSpin® Extract II Kit (MACHEREY-NAGEL) werden 25 µl des PCR-Produkts mit 25 µl des 1xTE Puffers (pH 7,5) und 100 µl NT in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Dann wird eine mitgelieferte Kieselgel-Säule in ein 2 ml Reaktionsgefäß platziert und die Probe auf die Säule überführt. Anschließend wird die Säule für 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. 600 µl NT3 Puffer werden auf die Ionenaustauscher-Säule gegeben, erneut für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um das Sorbens zu trocknen wird die Probe für 2 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Für den abschließenden Elutionsschritt wird die Säule in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, es werden 25 µl NE Puffer dazu pipettiert, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend noch einmal für 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert um das Eluat (DNA-Lösung) zu gewinnen.

Beim Einsatz des Kit ExoSAP-IT® (USB) werden zunächst 10 µl des ExoSAP-IT® zu 25 µl des PCR-Produktes gegeben. Anschließend wird bei 37°C inkubiert um verbliebene Primer und Nukleotide abzubauen. Abschließend erneut bei 80°C inkubiert um ExoSAP-IT® zu deaktivieren. Es handelt sich hierbei um eine Mischung aus Exonuclease I und Shrimp Alkalischer Phosphatase, die einzelsträngige Oligonukleotide bzw. unverbrauchte Nukleotide hydrolisiert.

3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Photometer GeneQuant II (PharmaciaBiotech, Freiburg) wurden 10 µl der gewonnenen DNA zu 40 µl H₂O in eine Quarzküvette pipettiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und auf einen Leerwert (H₂O) bezogen.

3.6 Sequenzierung von DNA

Es erfolgte im nächsten Schritt eine Kapillarsequenzierung beider DNA-Stränge (GENEART, Regensburg). Dazu wurden der Vorwärts-Primer DYT1+ (5'-TGGATGAACAGCACCTTGTT-3') und der Rückwärts-Primer DYT1-- (5'-GGACCATCCTGGGACAGA-3') verwendet.

3.7 Auswertung der Sequenzinformation

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit DNADynamo (BlueTractorSoftware, Großbritannien). Dabei wurde jede erhaltene Sequenz mit der humanen Referenz-Sequenz (GRCh37, Februar 2009) für Position 132576533 bis 132575687 des Chromosoms 9 verglichen und manuell anhand des Chromatogramms nach etwaigen Basenabweichungen durchsucht.

3.8 Evolutionäre Konservierung

Um die Funktionalität polymorpher Sequenzvarianten einzuschätzen, wurde die evolutionäre Konservierung mittels einer phylogenetischen Markov-Modell-basierten Methode berechnet (phastCons), die den Prozess der DNA-Substitution für jede einzelne Base eines Genoms beschreibt und zudem berücksichtigt wie sich dieser Prozess mit der Basenposition ändert. Für das Modell wurden neben der menschlichen Referenzsequenz genomische DYT1-Sequenzen von 31 Säugetieren herangezogen [Siepel et al., 2005].

3.9 Vorhersage intrinsischer ungeordneter Sequenzbereiche

In einem weiteren Schritt wurden zur funktionellen Charakterisierung jene Regionen innerhalb des DYT1-Proteins ermittelt, die eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung flexibler Sekundärstrukturen aufweisen (sog. intrinsische ungeordnete Sequenzbereiche). Diese sind

wichtig für die Proteinerkennung bzw. für die Wechselwirkung zwischen einzelnen Proteinen, oder zwischen Proteinen und DNA. Berücksichtigt wird dabei das Zusammenspiel von Hydrophobizität, Hydrophilie, elektrischer Lösung und sterischen Charakteristika, die sich auf die Proteinfaltung auswirken. Vergleiche von Protonenaustauschraten oder NMR-Parametern mit den Struktursegmenten von Proteinen haben gezeigt, dass einzelne Domänen bereits in frühen Faltungsstadien thermodynamisch abgrenzbar sind. Für die Identifizierung entsprechender Domänen wurde ausgehend von der Aminosäuresequenz hierzu mit einem Algorithmus (DISOPRED2) die konformationelle Flexibilität von DYT1 geschätzt und zur Annotierung der DNA-Abschnitte genutzt [Ward et al., 2004]

3.10 DNA-Krümmungs-Neigungs-Berechnung

Die Berechnungen der Krümmungsneigung von DNA wurde mit dem bend.it-Server durchgeführt, der sich auf die DNase I basierten Krümmungsparameter von Brukner *et al.* (1995) und die Konsensus-Krümmungs-Skala bezieht [Gabrielian und Pongor, 1996]. Das von Brukner vorgeschlagene Trinukleotid-Modell basiert auf der Beobachtung, dass DNase I bevorzugt an DNA-Moleküle bindet, die in Richtung "major groove" gekrümmt oder biegsam sind. Daher können DNase-I-Restriktions-Häufigkeiten an "nackter" DNA als ein quantitatives Maß der Verdichtbarkeit/Komprimierbarkeit oder anisotroper Krümmung interpretiert werden. Diese Parameter und andere Merkmale biegsamer bzw. biegesteifer Sequenzen erlauben bei asymmetrischer Verteilung die Ableitung von Krümmungsindices für definierte DNA-Segmente. Die intrinsische Krümmung wird dann auf Grund der asymmetrisch verteilten Krümmbarkeitswerte in definierten Segmenten berechnet, d.h. Erhöhung von höchst biegsamen und biegesteifen Sequenzen.

Ergänzend zur Analyse der DNA-Flexibilität wurde per Textsuche überprüft inwieweit AT-reiche Motive in den amplifizierten Sequenzbereich enthalten sind und inwieweit diese mit DNA-Sequenzvarianten zusammenfallen.

3.11 Poweranalyse

Zur Berechnung der statistischen Power wurde im Rahmen der Assoziationsuntersuchungen das Programm „PS Power and Sample Size Calculations“ Version 3.0 [Dupont und Plummer, 1998] verwendet.

3.12 Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Für die vorliegende Arbeit erfolgte eine Prüfung auf Konformität aller Genotypfrequenzen mit dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium mit Hilfe des Programms Haploview Version 4.1 (Broad Institute, Cambridge, USA, 2006).

Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium ist eine mathematische Erklärung von Genotyp- und Allelhäufigkeiten innerhalb einer Population, die G.H. Hardy und W. Weinberg 1908/09 unabhängig voneinander ableiteten [Hardy, 1908]. Sie basiert auf fünf grundlegenden Annahmen:

1. Die untersuchte Population ist ausreichend groß.
2. Es besteht kein Genfluss zwischen verschiedenen Populationen.
3. Neumutationen sind vernachlässigbar.
4. Die Individuen paaren sich zufällig.
5. Es besteht keine natürliche Selektion innerhalb der Population.

Sind diese Annahmen erfüllt, bleiben die Genotyp- und Allelfrequenzen über Generationen hinweg weitgehend unverändert. Nach dem Hardy-Weinberg-Modell kann die Häufigkeit der Heterozygoten ermittelt werden: Für ein Allelpaar A und a sei die Häufigkeit von A gleich p und die Häufigkeit von a gleich q. Daraus folgt: $p+q=1$. In der Population können die Genotypen AA, Aa und aa vorkommen. Wenn sie zufallsgemäß untereinander gekreuzt werden, erscheinen in der nachfolgenden

Generation die Genotypen nach der folgenden Regel: $AA=p^2$, $Aa+aA=2pq$, $aa=q^2$ daraus folgt: $p^2+2pq+q^2=(p+q)^2=\text{konstant}$. Abweichungen von den zu erwartenden Häufigkeiten können auf eine Verletzung der zugrunde liegenden Annahmen hinweisen (z.B. zu kleine Stichprobengröße, Auftreten von Neumutationen) oder auch auf Unstimmigkeiten im Prozess der Genotypisierung.

3.13 Ermittlung des Kopplungsungleichgewichtes

Die Software Haploview Version 4.1 gestattet die Berechnung des Kopplungsungleichgewichts (Linkage Disequilibrium, LD) für die untersuchten SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Dabei identifiziert Haploview Gruppen von SNPs, die häufige Haplotypen ergeben. Als Maßzahl für das Kopplungsungleichgewicht dient meist r^2 oder D' [Lewontin, 1964]. Während D' im Vergleich zu r^2 etwas weniger von der Allelfrequenz beeinflusst wird führt es zu Verzerrungen bei der Untersuchung kleinerer Stichproben [Delvin und Risch, 1995]. Für die vorliegende Untersuchung wurden r^2 -Werte errechnet.

4 ERGEBNISSE

Vorgestellt werden die Ergebnisse der DNA-Analysen von 414 Patienten mit rezidivierender Major Depression. Der untersuchte Sequenzbereich auf Chromosom 9 reicht von Base# 132576533 bis Base# 132575687 und kodiert für die Aminosäuren 245 bis 332 sowie für die angrenzende 3'UTR).²

4.1 Vorkommen der GAG-Deletion und anderer bekannter DYT1-Varianten

Es fand sich unter den 414 untersuchten Patienten kein Träger der GAG-Deletion im DYT1-Gen. Dagegen wurden fünf bereits bekannte Varianten in dem untersuchten Genabschnitt bestätigt (rs1182, rs1183, rs35153737, T1422del, rs1045441; Tab.5, Tab.6). Alle fünf Varianten befinden sich im nicht-kodierenden Teil (3' UTR) des untersuchten Amplikons.

Tab. 5: Genotyp- und Allelverteilung bekannter DYT1-Varianten

Position auf Chr9 Basenaustausch (Varianten- bezeichnung, AS-Austausch)	DNA- Strang	Genotypen (%)			Allele (%)		HWE p-Wert (Chi ²)
		MM	Mm	mm	M	m	
132576494 G > A (rs10988523, F252F)	-	414 (100)	0 (0)	0 (0)	828 (100)	0 (0)	1 (0)
132576475 C > G (rs17849354, D259H)	-	414 (100)	0 (0)	0 (0)	828 (100)	0 (0)	1 (0)
132576387 G > A (R288Q)	-	414 (100)	0 (0)	0 (0)	828 (100)	0 (0)	1 (0)
132576344-46 GAG > del (E302del)	-	414 (100)	0 (0)	0 (0)	828 (100)	0 (0)	1 (0)
132576313-16 AGAG > del (E312STOP325)	-	414 (100)	0 (0)	0 (0)	828 (100)	0 (0)	1 (0)

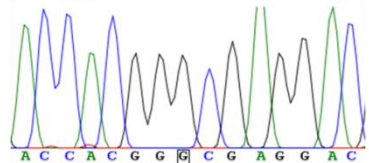
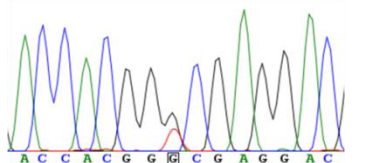
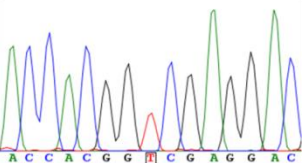
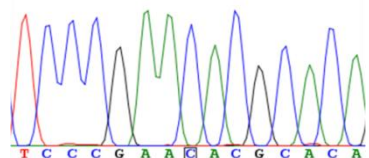
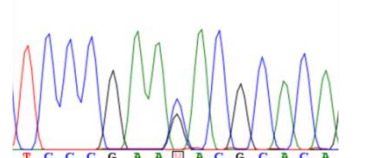
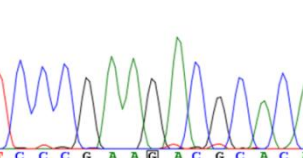
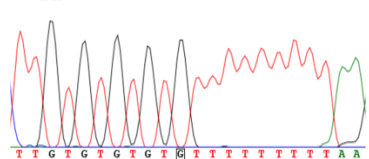
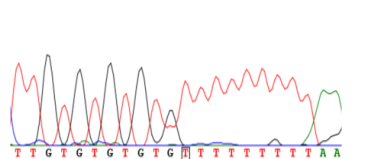
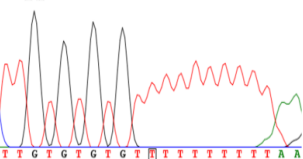
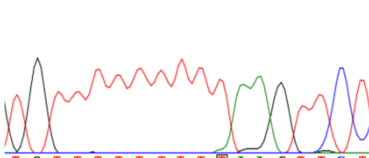
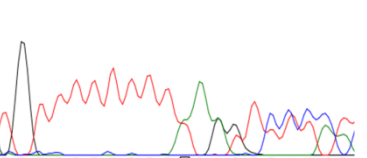

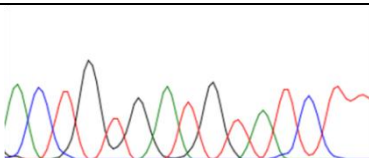
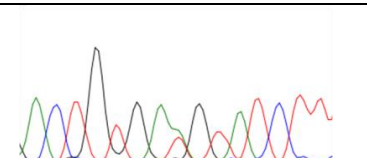
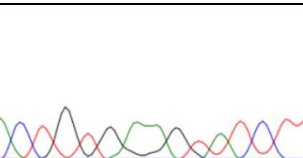
² Alle folgenden Variantenbezeichnungen und Positionsangaben beziehen sich auf die aktuelle Version des humanen Genoms (GRCh37, Februar 2009).

Tab.5: (Fortsetzung)

Position auf Chr9 Basenaustausch (Varianten- bezeichnung, AS-Austausch)	DNA- Strang	Genotypen (%)			Allele (%)		HWE p-Wert (Chi ²)
		MM	Mm	mm	M	m	
132576293 G > A (rs11546836)	-	409 (100)	0 (0)	0 (0)	818 (100)	0 (0)	1 (0)
132576266-83 G > A (F323_Y328del)	-	402 (100)	0 (0)	0 (0)	804 (100)	0 (0)	1 (0)
132576060 G > T (rs 1182)	-	238 (59,8)	138 (34,7)	22 (5,5)	614 (77,1)	182 (22,9)	0,73 (0,1150)
132576037 C > G (rs1183)	-	338 (85,1)	56 (14,1)	3 (0,8)	732 (92,2)	62 (7,8)	0,69 (0,1631)
132576034 C > T (rs55800846)	-	397 (100)	0 (0)	0 (0)	794 (100)	0 (0)	1 (0)
132576024 A > G (rs1045414)	-	394 (100)	0 (0)	0 (0)	788 (100)	0 (0)	1 (0)
132575860 T > C (rs1045440)	-	393 (100)	0 (0)	0 (0)	786 (100)	0 (0)	1 (0)
132575837 G > - (rs35153737)	-	234 (60)	135 (34,6)	21 (5,4)	603 (77,3)	177 (22,7)	0,79 (0,0701)
132575835-6 TT > TCT (rs60745320)	-	387 (100)	0 (0)	0 (0)	774 (100)	0 (0)	1 (0)
132575828 T > - (T1422D)	-	364 (94,8)	20 (5,2)	0 (0)	748 (97,4)	20 (2,6)	0,60 (0,2745)
132575797 T > A (rs1045441)	-	247 (85,2)	41 (14,1)	2 (0,7)	535 (92,2)	45 (7,8)	0,83 (0,435)

M: Wildtyp, m: seltenes Allel ; farbig hinterlegt: in der vorliegenden Stichprobe beobachtete Varianten

Tab.6: Chromatogramme zu bereits bekannten Varianten

rs1182		
		
GG	GT	TT
rs1183		
		
CC	CG	GG
rs35153737		
		
GG	Gdel	deldel
T1422del		
		
TT	Tdel	deldel *
rs1045441		
		
TT	TA	AA

* dieser Genotyp wurde bei depressiven Patienten nicht beobachtet

4.2 Prävalenz neu identifizierter Varianten

In dieser Arbeit wurden sechs neue allelische DYT1-Varianten erstmals identifiziert (Tab.7, Tab.8). Zwei der neu identifizierten Varianten befinden sich im kodierenden Bereich. An der Aminosäureposition 262 (Position 132576464) wurde bei einem Patienten eine Transversion Cytosin zu Adenosin an Position 3 des Triplets beobachtet. Sowohl CTC als auch CTA

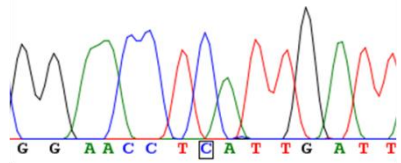
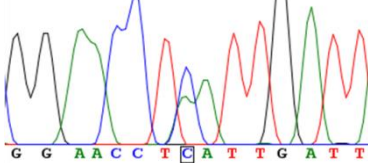
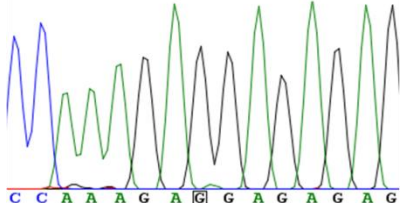
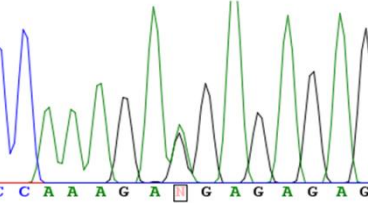
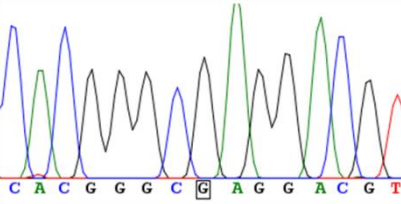
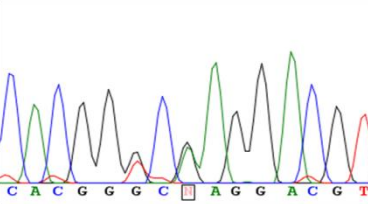
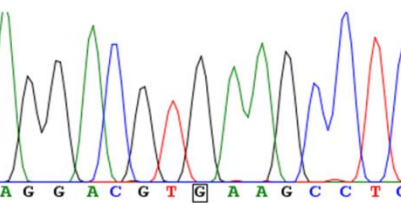
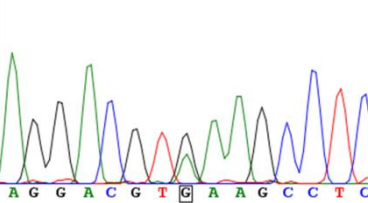
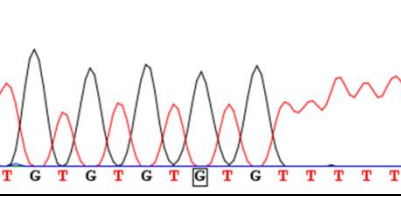
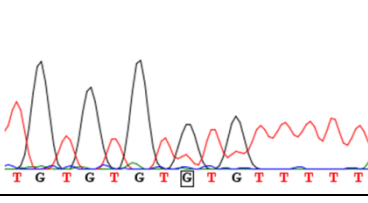
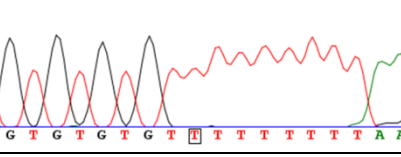
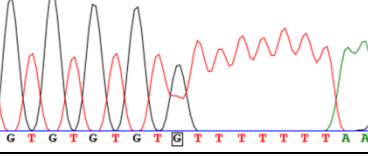
kodieren für Leucin. Bei einem weiteren Patienten wurde an der Aminosäureposition 310 (Position 132576320) eine Transition Guanin zu Adenosin an Position 3 des Triplets beobachtet. Sowohl GAG als auch GAA kodieren für Glutaminsäure. Damit handelt es sich in beiden Fällen um sog. „stumme“ Mutationen. Die übrigen vier neuen Varianten befinden sich im nicht kodierenden Bereich von DYT1, in der 3' UTR.

Tab. 7: Genotyp- und Allelverteilung neu identifizierter DYT1-Varianten

Position auf Chr9 Basenaustausch (Varianten- bezeichnung)	DNA- Strang	Genotypen (%)			Allele (%)		HWE p-Wert (Chi ²)
		MM	Mm	mm	M	m	
132576464 C > A (Leu262Leu)	-	413 (99,76)	1 (0,24)	0 (0)	827 (99,88)	1 (0,12)	0,98 (0,0006)
132576320 G > A (Glu310Glu)	-	413 (99,76)	1 (0,24)	0 (0)	827 (99,88)	1 (0,12)	0,98 (0,0006)
132576058 G > A (G1192A)	-	395 (99,25)	3 (0,75)	0 (0)	793 (99,62)	3 (0,38)	0,94 (0,0056)
132576050 G > A (G1200A)	-	396 (99,75)	1 (0,25)	0 (0)	793 (99,87)	1 (0,13)	0,98 (0,0006)
132,575,839 G > T (G1411T)	-	391 (99,49)	2 (0,51)	0 (0)	784 (99,75)	2 (0,25)	0,96 (0,0025)
132575835 T > G (T1415G)	-	362 (93,06)	27 (6,94)	0 (0)	751 (96,53)	27 (3,47)	0,48 (0,5028)

M: Wildtyp, m: seltenes Allel

Tab.8: Chromatogramme neu identifizierter Varianten

Leu262Leu		
		
CC	CA	AA *
Glu310Glu		
		
GG	GA	AA *
G1192A		
		
GG	GA	AA *
G1200A		
		
GG	GA	AA *
G1411T		
		
GG	GT	TT *
T1415G		
		
TT	TG	GG *

* diese Genotypen wurden bei depressiven Patienten nicht beobachtet

4.3 Funktionalität der Varianten

4.3.1 Evolutionäre Konservierung bekannter Varianten

Die in dieser Arbeit amplifizierte humane DNA-Sequenz wurde zunächst mit den jeweiligen orthologen Sequenzen von fünf anderen Primaten verglichen um einen Eindruck der evolutionären Konservierung zu gewinnen. Dabei zeigte sich für alle bereits bekannten Varianten eine vollständige Konservierung (Tab.9). In einem zweiten Schritt wurde der Grad der evolutionären Konservierung einzelner Varianten bei 31 Säugetieren mit dem „phastCons score“ erfasst, wobei 0 für nicht konserviert und 1 für stark konserviert steht (Tab.10). Der „phastCons score“ liegt für bekannte Varianten zwischen 0 und 0,00208661 und weist somit außerhalb der Ordnung Affen bzw. Halbaffen keine bzw. nur eine sehr geringe Konservierung der jeweiligen Base nach.

Tab.9: orthologe DNA-Sequenz im Bereich bekannter DYT1-Gen-Varianten:
polymorphe Basen sind farbig dargestellt

rs1182 G > T	DNA-Sequenz
Mensch	ACCACGGGCGAGGAC
Schimpanse	ACCACGGGCGAGGAC
Orang-Utan	ACCATGGGCGAGGAC
Gorilla	ACCACGGGCGAGGAC
Rhesusaffe	ACCACGGGCAAGGAC
Seidenaffe	ACCACGGGCGAGGAC
rs1183 C > G	DNA-Sequenz
Mensch	TCCCGAACACGCACA
Schimpanse	TCCCAAACACGCACA
Orang-Utan	TCCCAAACACGCACA
Gorilla	TCCCAAACACGCACA
Rhesusaffe	TCCCAAACACGCACA
Seidenaffe	TCCCGAGCCCTCAGA
rs35153737 G > -	DNA-Sequenz
Mensch	TGTGTGTGTTTTTTT
Schimpanse	TGTGTGTGTGTTT-T
Orang-Utan	TGTGTGTGTTTTT-T
Gorilla	TGTGTGTG-TTTTTT
Rhesusaffe	TGTGTGTGTTT---T
Seidenaffe	TGTGTGTG---TTTT
T1422D	DNA-Sequenz
Mensch	TTTTTTTTTAAGTTCT
Schimpanse	GTTT-TTTAAGTTCT
Orang-Utan	TTTT-TTTAAGTTCC
Gorilla	TTTTTTTTTAAGTTCT
Rhesusaffe	TT---TTTAAGTTCC
Seidenaffe	--TTTTTTTAAGTTCC
rs1045441 T > A	DNA-Sequenz
Mensch	ACTGTGATGTATCTT
Schimpanse	ACTGTGATGTATCTT
Orang-Utan	ACTGTGATGTATCTT
Gorilla	ACTGTGATGTATCTT
Rhesusaffe	ACTGTGATGTATCTT
Seidenaffe	ACTGTGATGTATCTT

Tab.10: „phastCons score“ bekannter DYT1-Gen-Varianten:

Variante(n)bezeichnung	phastCons score
rs10988523	1
rs17849354	0,992126
R288Q	0,96063
E302del	0,992126
E312STOP325	1
rs11546836	1
F323_Y328del	zwischen 0,110236 und 0,992126
rs1182	0
rs1183	0
rs55800846	0
rs1045414	0
rs1045440	0
rs35153737	0,00208661
rs60745320	0,00417323
T1422D	0
rs1045441	0

In der vorliegenden Stichprobe nachgewiesene Varianten sind farbig markiert. Für die Berechnung dienten die Referenzwerte von insgesamt 31 Säugetieren.

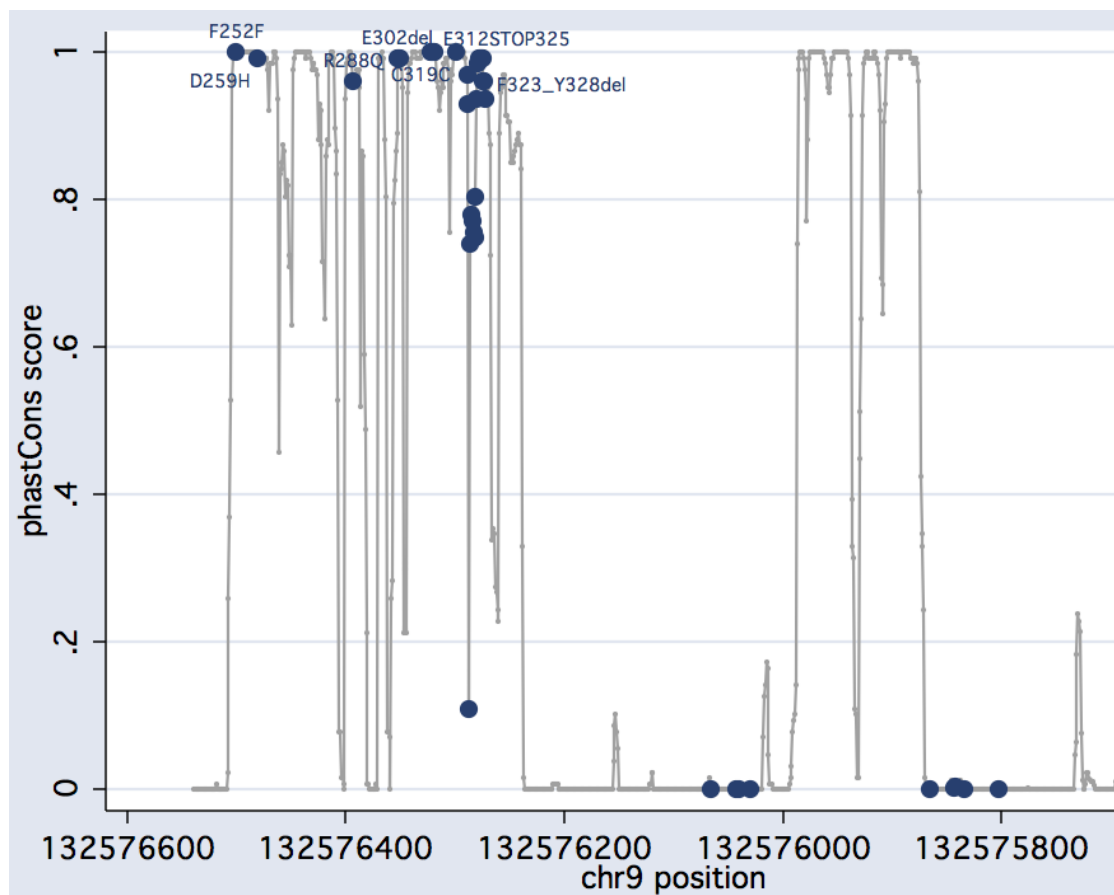


Abb.1: Evolutionäre Konservierung bekannter DYT1-Gen-Varianten: Aufgetragen ist der Grad der Konservierung (phastCons score, y-Achse) gegen die physikalische Position der Varianten auf Chromosom 9 (x-Achse). Die Darstellung entspricht dem amplifizierten Sequenzbereich. Nur die kodierenden Varianten sind beschriftet, die Varianten im 3'UTR-Bereich sind als unbeschriftete Punkte eingetragen und alle schwach konserviert.

4.3.2 Evolutionäre Konservierung neu identifizierter Varianten

Bezogen auf erstmals beschriebene Varianten ergaben sich Hinweise auf vergleichbare Substitutionen bei Rhesusaffen (G1192A) bzw. bei Schimpansen (T1415G) (Tab.11). Der „phastCons score“ deutet dagegen für die beiden kodierenden Varianten Leu216Leu und Glu310Glu auf eine vollständige bzw. nahezu vollständige Konservierung (Tab.12, Abb.2), die sich auch beim Vergleich mit fünf Primatensequenzen darstellen lässt (Tab.11). Für die neu identifizierten Varianten in der 3'UTR zeigt sich anhand des „phastCons score“ keine bzw. nur eine sehr geringe evolutionäre Konservierung (Tab.12, Abb.2).

Tab.11: orthologe DNA-Sequenz im Bereich neu identifizierter Varianten:
polymorphe Basen sind farbig dargestellt

Leu262Leu	DNA-Sequenz
Mensch	GGAACCTCATTGATT
Schimpanse	GGAACCTCATTGATT
Orang-Utan	GGAACCTCATTGATT
Gorilla	GGAACCTCATTGATT
Rhesusaffe	GGAACCTCATTGATT
Seidenaffe	GGAACCTCATTGATT
Glu310Glu	DNA-Sequenz
Mensch	CCAAAGAGGAGAGAG
Schimpanse	CCAAAGAGGAGAGAG
Orang-Utan	CCAAAGAGGAGAGAG
Gorilla	CCAAAGAGGAGAGAG
Rhesusaffe	CCAAAGAGGAGAGAG
Seidenaffe	CCAAAGAGGAGAGAG
G1192A	DNA-Sequenz
Mensch	CACGGGCGAGGACGT
Schimpanse	CACGGGCGAGGACGT
Orang-Utan	CACGGGCGAGGACGT
Gorilla	CACGGGCGAGGACGT
Rhesusaffe	CACGGGCAAGGACGT
Seidenaffe	CACGGGCGAGGACGT
G1200A	DNA-Sequenz
Mensch	AGGACGTGAAGCCTC
Schimpanse	AGGACGTGAAGCCTC
Orang-Utan	AGGACGTGAAGCCTC
Gorilla	AGGACGTGAAGCCTC
Rhesusaffe	AGGACGTGAAGCCTC
Seidenaffe	AGGACAGGAGGCCTC
G1411T	DNA-Sequenz
Mensch	TGTGTGTGTGTTTTT
Schimpanse	TGTGTGTGTGTGTTT
Orang-Utan	TGTGTGTGTGTTTTT
Gorilla	TGTGTGTGTG-TTTT
Rhesusaffe	TGTGTGTGTGTTT--
Seidenaffe	TGTGTGTGTG---TT
T1415G	DNA-Sequenz
Mensch	TGTGTGTTTTTTTTT
Schimpanse	TGTGTGTGTTT-TTT
Orang-Utan	TGTGTGTTTTT-TTT
Gorilla	TGTGTG-TTTTTTTT
Rhesusaffe	TGTGTGTTT---TTT
Seidenaffe	TGTGTG---TTTTTT

Tab.12: „phastCons score“ neu identifizierter Varianten
als Maß für die evolutionäre Konservierung

Variantensequenz	phastCons score
Leu262Leu	0,92126
Glu310Glu	1
G1192A	0
G1200A	0
G1411T	0
T1415G	0,00417323

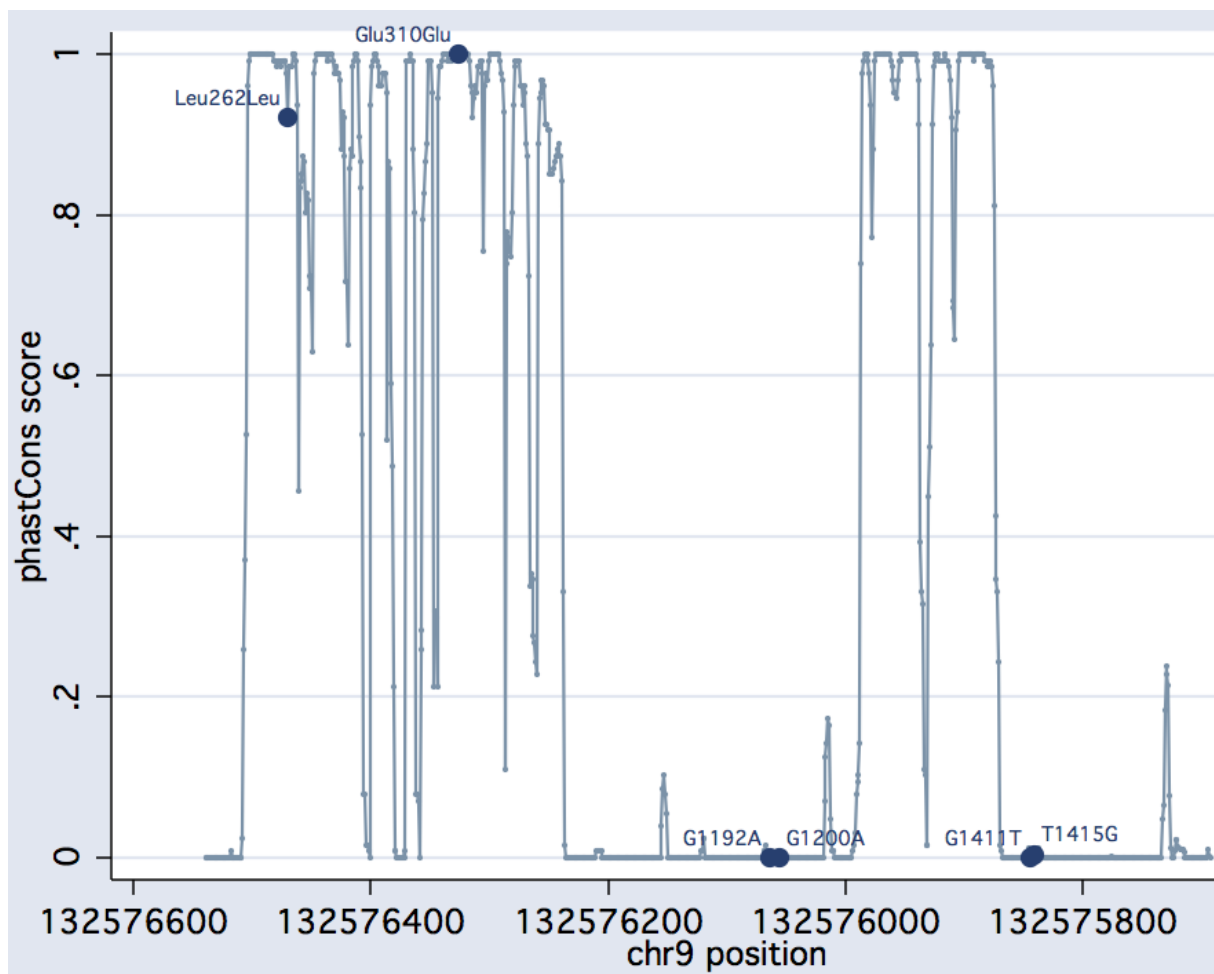


Abb.2: Evolutionäre Konservierung neuer DYT1-Gen-Varianten: Aufgetragen ist der Grad der Konservierung (phastCons score, y-Achse) gegen die physikalische Position der Varianten auf Chromosom 9 (x-Achse). Der dargestellte Sequenzbereich entspricht dem amplifizierten DNA-Abschnitt.

4.3.3 Vorhersagen intrinsisch ungeordneter Sequenzbereiche und der Auswirkungen auf die Protein-Sekundärstruktur

Zur Beurteilung von Auswirkungen polymorpher Sequenzbereiche auf die intrinsische Unordnung (Abb.3, Abb.4) und auf die Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen (Abb.5) wurden in silico-Vorhersagen eingesetzt (DISOPRED2). Hierbei wird die Wahrscheinlichkeit dafür angegeben, dass der untersuchte Bereich in Lösung oder als sog. „random coil“ vorliegt. Den Angaben zufolge befinden sich die Varianten Leu262Leu und Glu310Glu beide in geordneten Sequenzbereichen.



Abb. 3: Vorhersage möglicher intrinsischer Unordnung (qualitativ):

Conf: Maßzahl der intrinsischen Unordnung (9=ungeordnet, 0=geordnet), pred: Vorhersage ungeordneter Bereiche (Sterne repräsentieren ungeordnete, Punkte geordnete Sequenzbereiche), AA: Aminosäuresequenz; Farbig markiert sind die neu identifizierten Varianten Leu262Leu und Glu310Glu.

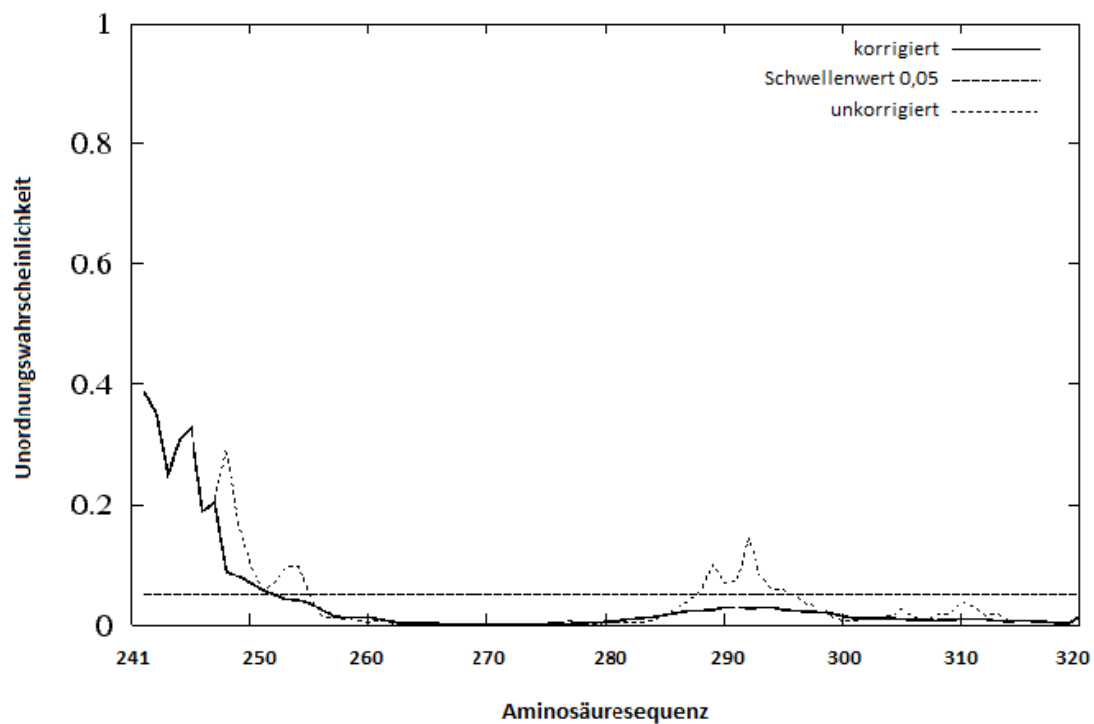


Abb.4: Vorhersage intrinsischer Unordnung (quantitativ): Aufgetragen ist auf der Abszisse die Aminosäuresequenz von DYT1 und auf der Ordinate die Wahrscheinlichkeit der Unordnung auf einer Skala von 0 bis 1.

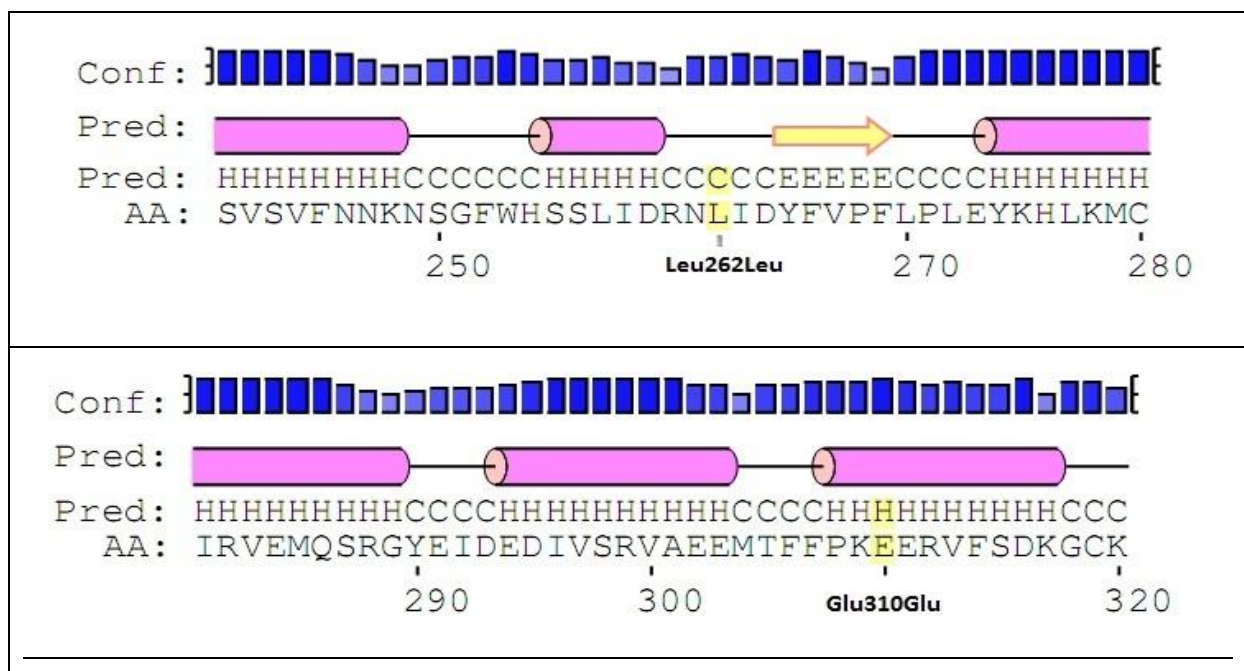


Abb.5: Vorhersage der Sekundärstruktur für den amplifizierte Sequenzbereich von DYT1:

Conf: Vorhersagewahrscheinlichkeit, pred: Vorhersage von Sekundärstrukturen (α -Helix: H, pink; β -Faltblatt: E, gelb; Windung/Coil: C, schwarz), AA: Aminosäuresequenz; Farbig markiert sind die neu identifizierten Varianten Leu262Leu und Glu310Glu.

4.3.4 Auswirkung auf die DNA-Überstruktur und AT-reiche Elemente (ARE)

Die Untersuchung der axialen DNA-Flexibilität ergab keine Übereinstimmung von Überstrukturen mit den Positionen von DYT1-Sequenzvarianten, ausgenommen T1422D. An dieser Position zeigt sich im DNA-Krümmungs-Index (Abb.6) ein relatives Maximum.

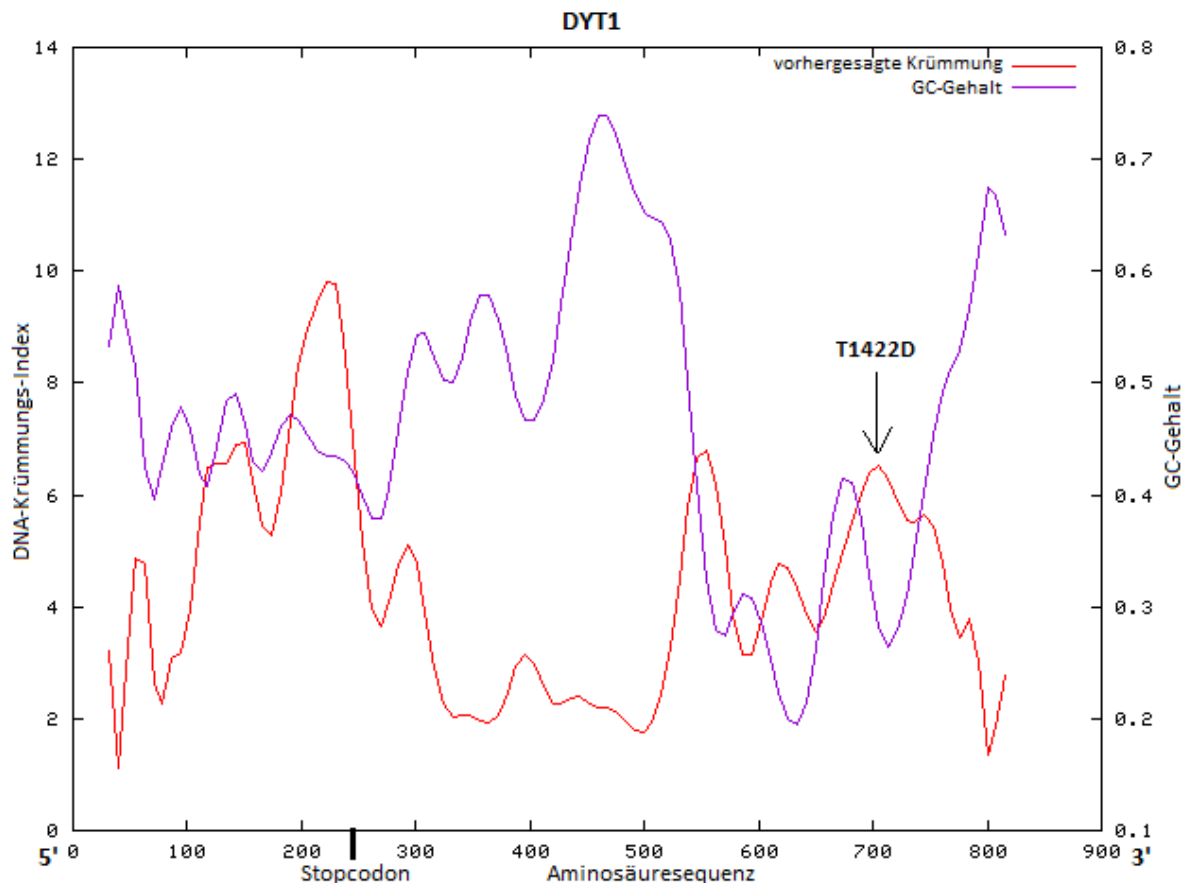


Abb.6: DNA-Krümmungs-Index und relativer GC-Gehalt im Bereich der amplifizierten DYT1-Sequenz. Auf der Abszisse ist die Position der Varianten im Amplikon von 5' nach 3' angegeben: 70=Leu262Leu, 214=Glu310Glu, 474=rs1182, 476=G1182A, 484=G1200A, 497=rs1183, 695=G1411T, 697=rs35153737, 699=T1415G, 706=T1422D (Pfeil), 737=rs1045441.

Die Suche nach AT-reichen Elementen im Bereich der amplifizierten DYT1-Gensequenz erbrachte insgesamt 4 Motive. Keine der Sequenzvarianten konnte diesen Motiven zugeordnet werden.

4.4 Kopplungsungleichgewicht und DYT1-Haplotypen

Die Bestimmung des Kopplungsungleichgewichts mit Haploview ergab lediglich für die SNP-Paare rs1182 und rs35153737 bzw. rs1183 und rs1045441 ein hohes Kopplungsungleichgewicht mit $r^2 > 0,95$ (Abb. 7).

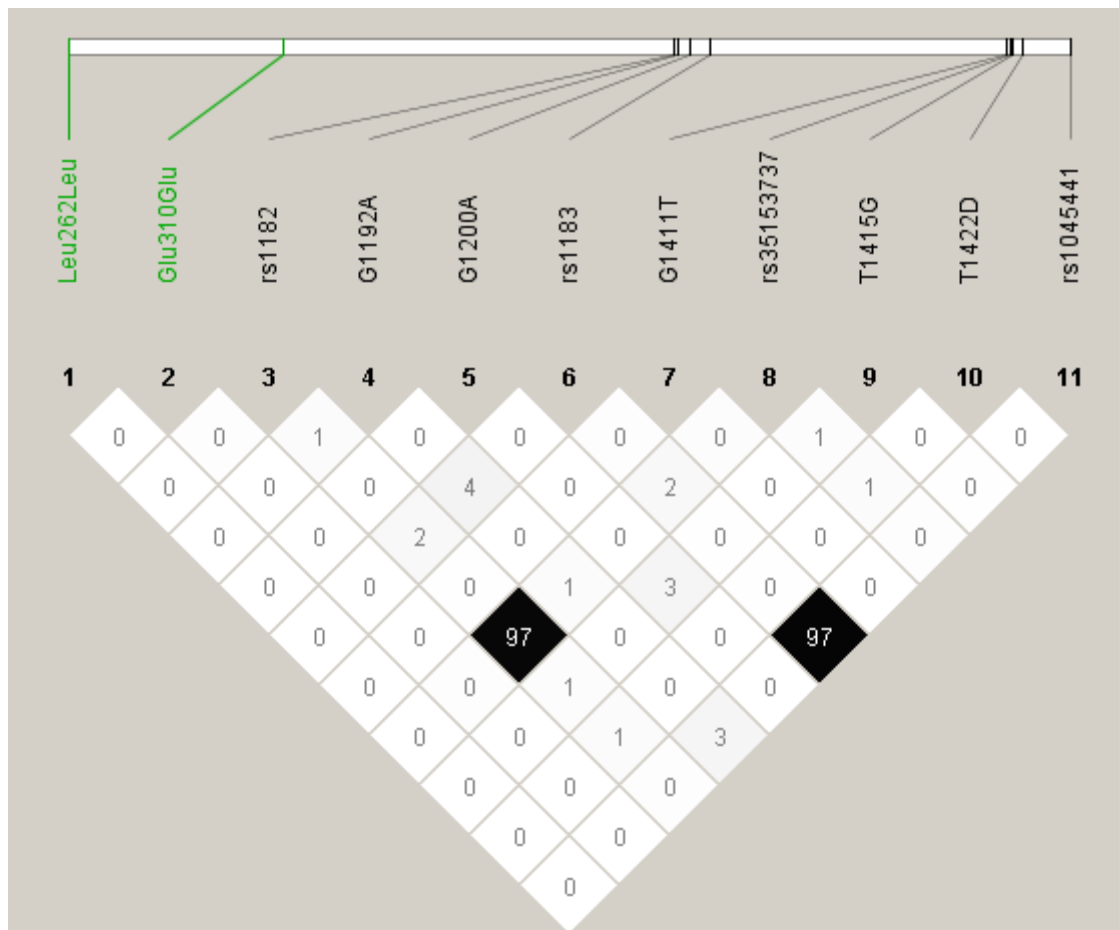


Abb. 7: Schematische Darstellung des Kopplungsungleichgewichts (LD): Abgebildet ist in der unteren Bildhälfte die DNA-Blockstruktur des amplifizierten Sequenzbereiches (errechnet wurden als Maßzahl des LD r^2 -Werte zwischen 0,00 und 0,97). Die physikalische Position der Varianten ist maßstabsgetreu in der oberen Bildhälfte dargestellt.

Für das SNP-Paar rs1182 (G oder T) und rs35153737 (G oder Del) ergeben sich 4 theoretisch mögliche Haplotypen: GG, GDel, TG und TDel. Beobachtet wurden in der Stichprobe nur 2 Haplotypen: GG und TDel. Für den Haplotyp GG lag die relative Häufigkeit bei 0,768 und für den Haplotyp TDel bei 0,227.

Für das SNP-Paar rs1183 (C oder G) und rs1045441 (T oder A) ergeben sich ebenfalls 4 mögliche Haplotypen: CT, CA, GT und GA. Beobachtet wurden in der Stichprobe erneut nur 2 Haplotypen: CT und GA. Für den

Haplotyp CT lag die relative Häufigkeit bei 0,920 und für den Haplotyp GA bei 0,078.

4.5 Assoziationsuntersuchung

Für zwölf Varianten wurden Referenzallelfrequenzen in kaukasischen Populationen gefunden (Tab. 13). Diese Werte stammen aus sieben Studien und einer Gendatenbank. Ausgeschlossen wurden Studien in anderen Ethnien (z.B. Jamora et al., 2006; Naiya et al., 2006) und DYT1-Studien, die sich auf andere DNA-Abschnitte bezogen (z.B. Risch et al., 2007). Für die Varianten rs1183 und rs1045441 fanden sich keine Literaturstellen, ersatzweise wurden Referenzwerte der Gendatenbank dbSNP entnommen. Insgesamt standen damit 28872 Kontrollchromosomen zur Verfügung. Nach Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche erreichten die Unterschiede in der Allelfrequenz bei Patienten mit rezidivierender Major Depression relativ zu Kontrollfrequenzen keine Signifikanz.

Tab. 13: Referenzfrequenzen für DYT1-Varianten in kaukasischen Kontrollpopulationen

DYT1-Variante (seltenes Allel^a)	gesunde Kontrollpersonen (Anzahl)	Referenz	Häufigkeit des seltenen Allels in Kontroll- Kollektiven	Vergleich der Häufigkeit des seltenen Allels bei Kontrollen und Patienten mit rez. Major Depression p (p_{corr.})
rs10988523 _(T)	Europäisch (60)	dbSNP, ss19032613	0,000	n.s.
	US-Amerikanisch (150) ^b	Xiao <i>et al.</i> 2009	0,000	n.s.
rs17849354 _(C)	US-Amerikanisch (150) ^b	Xiao <i>et al.</i> 2009	0,000	n.s.
L262L _(786A)	Europäisch (812)	Kabakci <i>et al.</i> 2004	0,000	n.s.
R288Q _(863A)	US-Amerikanisch (150) ^b	Xiao <i>et al.</i> 2009	0,000	n.s.
E302del _(delGAG)	US-Amerikanisch (150) ^b	Xiao <i>et al.</i> 2009	0,000	n.s.
	Europäisch (812)	Kabakci <i>et al.</i> 2004	0,000	n.s.
	Deutsch (521)	Kamm <i>et al.</i> 2006	0,000	n.s.
	Französisch (12000) ^c	Frédéric <i>et al.</i> 2007	0,00004	n.s.
E310E _(930A)	US-Amerikanisch (150) ^b	Xiao <i>et al.</i> 2009	0,000	n.s.
E312STOP325 (delAGAG)	Europäisch (812)	Kabakci <i>et al.</i> 2004	0,0006	n.s.
rs11546836 _(T)	US-Amerikanisch (150) ^b	Xiao <i>et al.</i> 2009	0,000	n.s.
F323_Y328del (del18bp)	Europäisch (812)	Kabakci <i>et al.</i> 2004	0,000	n.s.
rs1182 _(T)	Deutsch (521)	Kamm <i>et al.</i> 2006	0,244	n.s.
	Deutsch (254)	Hague <i>et al.</i> 2006	0,177	0,025 (0,625)
	Kaukasisch (46)	dbSNP, ss43890027	0,210	n.s.
	Kaukasisch (36)	dbSNP, ss123594382	0,236	n.s.
	Isländisch (99)	Clarimon <i>et al.</i> 2005	0,157	0,026 (0,650)
	US-Amerikanisch (242) ^d	Clarimon <i>et al.</i> 2007	0,221	n.s.
rs1183 _(G)	Europäisch (60)	dbSNP, ss10540562	0,075	n.s.
	Europäisch (24)	dbSNP, ss23585341	0,062	n.s.
	Kaukasisch (36)	dbSNP, ss123594377	0,069	n.s.
rs1045441 _(A)	Europäisch (60)	dbSNP, ss2160149	0,075	n.s.
	Kaukasisch (36)	dbSNP, ss123594365	0,069	n.s.

^a alle Allele beziehen sich auf den Chr9 Minus-Strang^b >90% Kaukasier^c Neugeborene, Gesundheitsstatus unbekannt^d ethnischer Hintergrund nicht spezifiziert

n.s.= nicht signifikant

p_{corr} = Irrtumswahrscheinlichkeit nach Bonferroni-Korrektur

4.6 Poweranalyse

Eine Powersimulation für die GAG-Deletion ergab bei Zugrundelegen der Prävalenzzahlen zu 13483 Kontrollpersonen aus früheren Studien und des eigenen Patientenkollektivs die erforderliche Stichprobengröße. Demnach bedarf es zur Falsifizierung der fraglichen Assoziation von GAG-Deletion und rezidivierender Major Depression mit einer Power von 0.8 eines Kollektivs von über 60000 Patienten (>120000 Allelen, Abb. 8). Dagegen liefert die vorliegende Stichprobengröße bereits eine Power von >0.9 für die Falsifizierung einer Assoziation von Major Depression mit der häufigen DYT1-Genvariante rs1182.

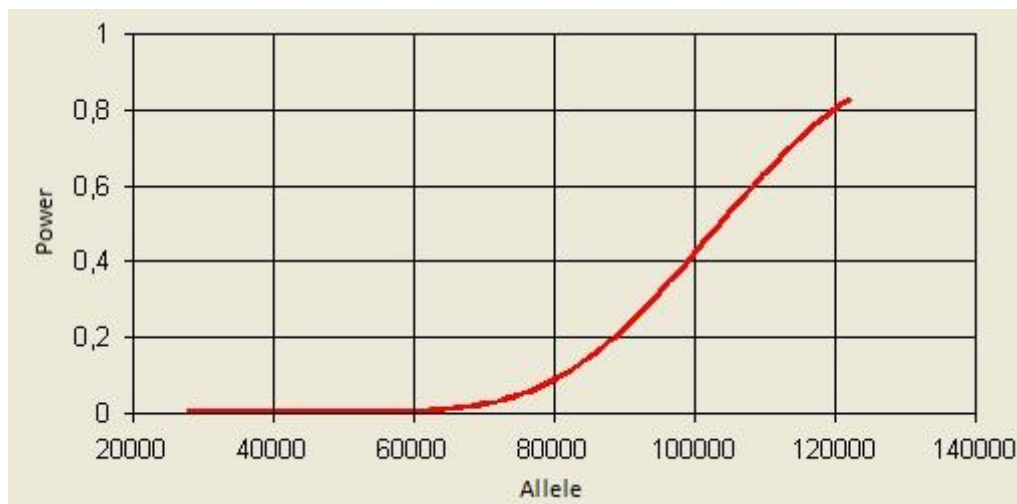


Abb. 8: Powersimulation: Aufgetragen ist die statistische Power (y-Achse) gegen die Anzahl zu untersuchender Allele (2N) im Patientenkollektiv (x-Achse).

4.7 Fallvignetten

4.7.1 Variante Leu262Leu

Einzige Trägerin der Mutation Leu262Leu war eine 55-jährige Hausfrau, deren Bruder sich im Alter von 30 Jahren suizidiert hatte und deren Mutter ebenfalls an Depressionen gelitten haben soll.

Der Symptombeginn der Gemüteserkrankung wurde von der Patientin selbst auf das 52. Lebensjahr datiert. Eine erste depressive Verstimmung sei zunächst wieder abgeklungen, nach einem halben Jahr aber mit Tagesschwankungen und vegetativer Begleitsymptomatik wiedergekehrt.

Der Aufnahme in die Klinik war eine erneute einwöchige, ausgeprägte depressive Symptomatik mit Schlafstörungen, Angst, Anspannung, innerer Unruhe und einem ausgeprägten Grübelzwang vorausgegangen.

Mit Ausnahme einer Hypothyreose wurden keine somatischen Vorerkrankungen angegeben. Der neurologische Untersuchungsbefund und die cerebrale Bildgebung waren unauffällig. Insbesondere wurden keine dystonieartigen Beschwerden festgehalten. Lediglich in der TMS-Untersuchung zeigte sich eine verlängerte „cortical silent period“ (CSP, Abb.9)

Durch Gabe von Amitriptylin in Kombination mit Valproinsäure wurde eine rasche Besserung erzielt. Nebenwirkungen dieser Therapie wurden nicht beschrieben. Die Patientin konnte nach einmonatiger stationärer Behandlung stabilisiert nach Hause entlassen werden.

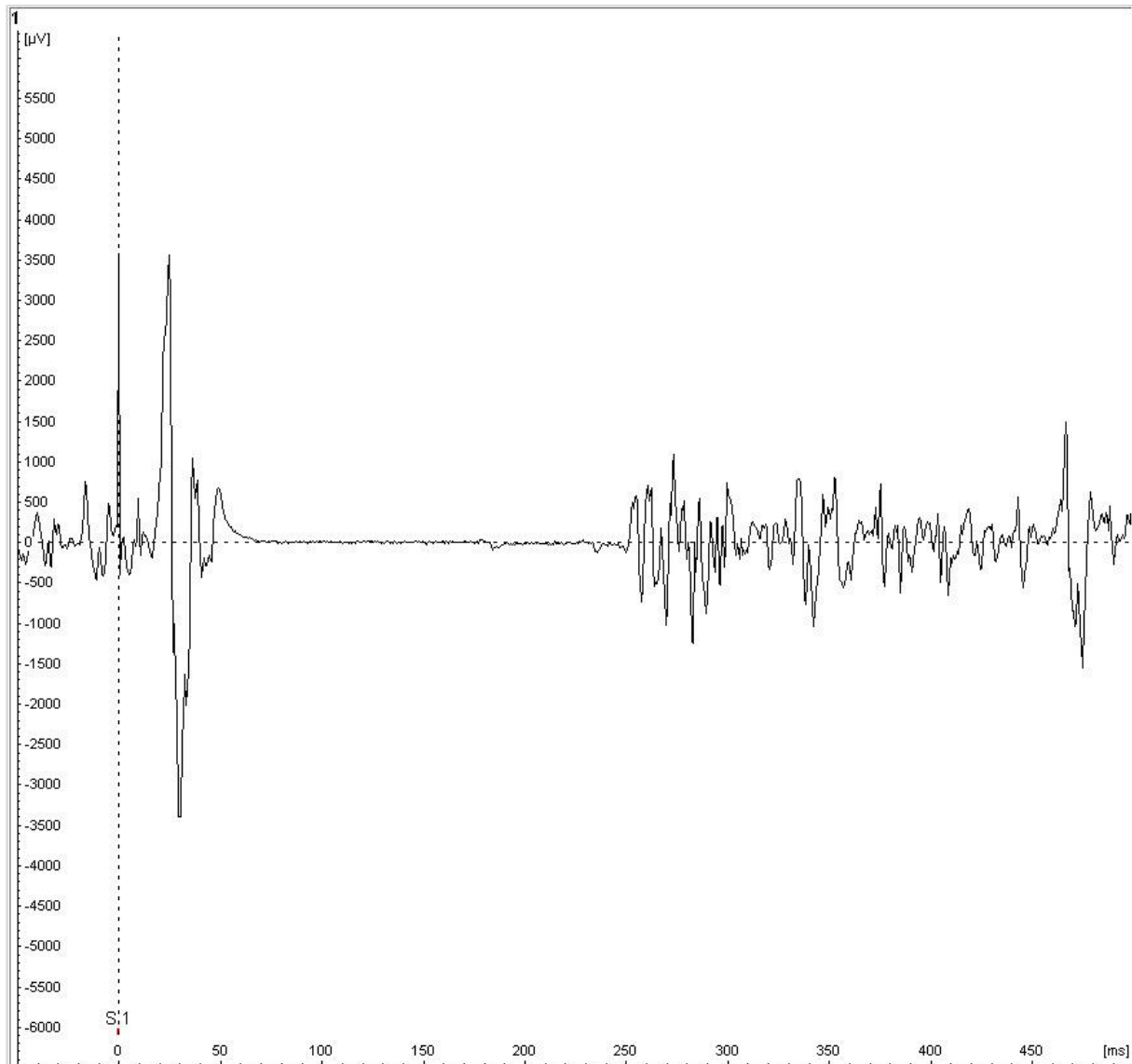


Abb. 9: CSP (kortikale Innervationsstille): Die CSP bezeichnet die Minderung der EMG-Aktivität in einem tonisch aktiven Muskel ausgelöst durch TMS des kontralateralen motorischen Kortex. Die Dauer der CSP wird i.d.R. vom Stimulationsartefakt (S1) bis zum Wiederbeginn kontinuierlicher EMG-Aktivität gemessen und beträgt hier ca. 250ms.

4.7.2 Variante Glu310Glu

Einzigste Trägerin der Mutation Glu310Glu war eine 38-jährige Mutter von zwei Kindern, die die Schule und eine Ausbildung zur Näherin abgebrochen hatte.

Ihre psychiatrische Familienanamnese soll soweit eruierbar unauffällig gewesen sein.

Zur stationären Aufnahme ins Bezirksklinikum Regensburg hatte eine mehrwöchige depressive Symptomatik geführt. Angegeben wurden zu diesem Zeitpunkt Durchschlafstörungen, Erschöpfungsgefühl, Antriebs- und Freudlosigkeit, sowie Appetitverlust, neben partnerschaftlichen Spannungen, zudem generalisierte Gelenk-, Bauch- und Kopfschmerzen. Der Symptombeginn wurde in Beziehung gesetzt zum Auszug des Ehemanns aus dem gemeinsamen Haus. In der Folge war es zur Einnahme eines Beruhigungsmittels in suizidaler Absicht gekommen und zu einer oberflächlichen Selbstverletzung an den Pulsadern.

Somatische Vorerkrankungen wurden nicht festgehalten, der körperliche Untersuchungsbefund ergab keinen Tremor, keine Dyskinesien und einen unauffälligen Reflexstatus. Die cerebrale Bildgebung (CCT) war ebenfalls unauffällig. Die psychopathologische Symptomatik besserte sich innerhalb weniger Tage nach Behandlung mit einem Benzodiazepin. Neben Amitryptilin erhielt die Patientin transcorticale Magnetstimulation. Sie wurde wieder stabilisiert innerhalb eines Monats nach Hause entlassen.

5 DISKUSSION

5.1 Vorkommen der GAG-Deletion

Die vorliegende Untersuchung liefert erstmals Angaben zur Prävalenz von 11 DYT1-Genvarianten in einem Kollektiv aus Patienten mit rezidivierender Major Depression.

Bei bisherigen Erhebungen zur Prävalenz der GAG-Deletion handelt es sich in der Mehrzahl um Studien an Risikokollektiven mit Dystonie [Grundmann et al., 2003; Hjermind et al., 2002; Valente et al., 1998] bzw. mit anderen Erkrankungen der Basalganglien wie z.B. M. Parkinson [Yang et al., 2009; Leung et al., 2001]. In die Angaben zur Prävalenz fließen darüber hinaus sowohl Daten zu Asiaten [Jamora et al., 2006; Naiya et al., 2006] als auch Daten zu Europäern ein [Gambarin et al., 2006; Kostić et al., 2006; Lebre et al., 1999] bzw. Ergebnisse aus gemischten Stichproben oder Stichproben mit unklarer ethnischer Zusammensetzung [Xiao et al., 2009]. Unter den populationsbasierten Studien finden sich ferner nur bei einem Teil Angaben zur Mutationsprävalenz in Kontrollkollektiven ohne neurologische Symptomatik. Für den Vergleich mit den hier ermittelten Prävalenzraten eignen sich primär Angaben zu kaukasischen, neurologisch unauffälligen Kontrollpopulationen: Mit 1/9000 wird die höchste Rate von Mutationsträgern für Ashkenazi-Juden angegeben [Klein et al., 2000], während die entsprechende Prävalenz für die Allgemeinbevölkerung in Europa zwischen 1/330000 und 1/200000 Einwohner betragen soll [Kamm et al., 2006]. Ausgehend von einer umfangreichen Untersuchung aller in französischen Spezialambulanzen registrierten Dystonie-Patienten mit DYT1-Deletion und deren Verwandten schätzen Frédéric *et al.* (2008) die Krankheitsprävalenz in der Allgemeinbevölkerung auf mindestens 1/770000 und die Mutationsprävalenz auf mindestens 1/590000. Wenngleich präzise Angaben nur schwer zu gewinnen sind ist die GAG-Deletion damit eine extrem seltene genetische Variante. Im Gegensatz dazu steht die ungleich höhere Prävalenz von Major Depression (ca. 1/20), so dass das Nicht-Auffinden der Deletion bei der hier untersuchten Stichprobe im Bereich

des Erwarteten zu liegen kommt. Zugleich widerspricht das Ergebnis den Darstellungen von Heiman *et al.* (2004) wonach bis zu 79,6% der Patienten mit rezidivierender Major Depression als Träger der GAG-Deletion in Betracht kommen sollen.

5.2 Prävalenzraten weiterer bereits bekannter Varianten

Betrachtet man neben der GAG-Deletion weitere DYT1-Varianten, die in früheren Studien bereits Gegenstand von Erhebungen zur Prävalenz bei Gesunden waren, so kommen wiederum einige für Referenzzwecke nicht in Betracht weil sie außerhalb der hier untersuchten Region liegen, etwa D216H [Risch *et al.*, 2007] oder A82A [Clarimon *et al.*, 2007]. Für den amplifzierten Sequenzbereich konnten insgesamt Vergleichswerte zu 11 zusätzlichen DYT1-Genvarianten in kaukasischen Kontrollkollektiven ermittelt werden (siehe Tab.13). Aufgrund unterschiedlicher Stichprobengrößen und -zusammensetzung (Alter, Geschlecht, Nationalität) gelten Einschränkungen bzgl. der Vergleichbarkeit mit dem eigenen Kollektiv. Der größte Datensatz betrifft dabei die Variante rs1182, mit 2396 ausgewerteten Kontrollchromosomen. Die Häufigkeit des seltenen T-Allels für rs1182 (in dieser Arbeit 0,229) lässt sich gut mit der Prävalenz bei anderen Autoren vergleichen (Häufigkeiten zwischen 0,210 und 0,244). Eine abweichende Angabe ($f_T=0,157$) findet sich bei Clarimon *et al.* (2005). Dieser Unterschied lässt sich u. U. dadurch erklären, dass sich die Literaturangabe auf eine isländische Inselpopulation bezieht, die sich eigenständig entwickelt hat. Auch bei Hague *et al.* (2006) liegt die Prävalenz niedriger ($f_T=0,177$). Da keine Angaben zum Verfahren der Typisierung vorliegen, ist unklar inwieweit hier methodische Unterschiede zu Verzerrungen der Resultate geführt haben könnten.

In früheren Arbeiten ist mehrfach ein modulierender Einfluss von rs1182 auf verschiedene Phänotypen postuliert worden, so auf den Krankheitsverlauf oder auf das Erkrankungsrisiko bei anderen Formen von Dystonie [Defazio *et al.*, 2009]. Letztlich bleiben diese Befunde aber

umstritten [Clarimon et al., 2005; Hague et al., 2006; Kamm et al., 2006]. Eine objektive Einschätzung möglicher Effekte von rs1182 wird zusätzlich dadurch erschwert, dass der Trägerstatus für die GAG-Deletion nicht immer miterfasst wurde [Clarimon et al., 2007]. Bezogen auf rezidivierende Major Depression ergeben sich jedoch keine Anhaltspunkte für einen signifikanten Effekt von rs1182 auf das Erkrankungsrisiko. Diese Aussage wird durch eine Power von $> 0,99$ gestützt, wenn die vorhandenen Referenzdaten eingesetzt werden. Ähnliches gilt für die übrigen bereits bekannten Varianten zu denen Vergleichswerte bei Gesunden existieren (rs10988523, rs17849354, rs11546836, rs1183, rs55800846, rs1045414, rs1045440).

5.3 Schätzungen zur Prävalenz neu identifizierter Varianten

Zum Zweck einer Schätzung von Prävalenzen neu identifizierter Varianten in der Allgemeinbevölkerung eignen sich Angaben zu kaukasischen, neurologisch unauffälligen Populationen, bei denen ein systematisches Mutations-Screening des DYT1-Gens durchgeführt wurde. Diese Voraussetzungen treffen lediglich auf zwei Studien zu [Kabakci et al., 2004 und Xiao et al., 2009]. Darin finden sich keine Anhaltspunkte für das Vorkommen dieser Varianten: entsprechend lässt sich ableiten, dass deren Prävalenz in Kontrollpopulationen unterhalb 0,001 liegt. Zu berücksichtigen sind erneut die Unterschiede hinsichtlich der Stichprobenzusammensetzung und darüber hinaus die Nutzung verschiedener Screening-Protokolle zum Nachweis von Sequenzvarianten: Hierunter fallen das „high resolution melting“ Verfahren bei Xiao *et al.* (2009); und „single strand conformation polymorphism“ (SSCP) -Assays bei Kabakci *et al.* (2004).

Für die Identifizierung neuer Varianten liefert derzeit die DNA-Sequenzierung die besten Ergebnisse, alternative Verfahren sind weniger sensitiv; So beträgt die Sensitivität für SSCP zwischen 75-98% [Scoggan und Bulman, 2003]. Allerdings bedarf es auch bei DNA-Sequenzierungen einer systematischen manuellen Sequenzanalyse um falsch negative

Ergebnisse zu vermeiden und Artefakte zu identifizieren. In Abhängigkeit von der Qualität der Chromatogramme, der verwendeten Software und der Erfahrung des Auswerterers können Varianten übersehen werden. Somit ist nicht auszuschließen, dass einzelne hier neu identifizierte Varianten in früheren Studien bereits vorkamen ohne gezählt zu werden. Diese Vermutung gilt insbesondere für die vergleichsweise häufige Variante T1415G (Allelfrequenz in dieser Arbeit 0,0347). In einer Reihe von Studien finden sich Hinweise dafür, dass auch bei Screening-Untersuchungen an Patientenkollektiven die manuelle Auswertung von Chromatogrammen unterblieben ist (z.B. Jamora et al. 2006). Damit bleibt offen inwieweit die Sequenzinformation der vorliegenden Studie ein Spezifikum bei rezidivierenden Depressionen darstellt oder auch bei entsprechend gründlicher Auswertung in anderen Stichproben anzutreffen gewesen sein könnte.

5.4 Mögliche funktionelle Relevanz neu identifizierter Varianten

In der untersuchten Stichprobe wurden 6 neu identifizierte Varianten beobachtet, wovon sich zwei im kodierenden Bereich (Leu262Leu, Glu310Glu) und vier im nicht-kodierenden (3'UTR-) Bereich (G1192A, G1200A, G1411T, T1415G) befinden. Der Grad der evolutionären Konservierung kann dabei als Maßzahl für die Funktionalität der Sequenzvarianten dienen [Gaidatzis et al., 2007]. Die beiden kodierenden Varianten sind mit Werten von 0,92 und 1 (phastCons) stark konserviert, während die nicht-kodierenden Varianten mit Werten zwischen 0 und 0,004 nur sehr schwach konserviert sind.

5.4.1 Kodierende Varianten

Bei den beiden kodierenden Varianten Leu262Leu und Glu310Glu handelt es sich um sog. stumme Mutationen, die keine Änderung der Aminosäuresequenz bewirken. Lange Zeit wurde angenommen, dass stumme Mutationen funktionell inert und auch für die Ätiologie von

Erkrankungen vernachlässigbar sind [Harrigan et al., 2008]. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass die Funktionalität einer Mutation nicht auf den durch sie bewirkten Aminosäureaustausch begrenzt sein muss. Alternative Wirkmechanismen betreffen die Geschwindigkeit der Translation [Soares, 2007] und alternatives Spleißen [Mankodi und Ashizawa, 2003; Cartegni et al., 2002]. Zudem kann es durch stumme Mutationen zum Einbau seltener Codons kommen, die zu einer untypischen Faltung des kodierten Proteins und dadurch zu einer Fehlfunktion führen können [Chamary und Hurst, 2009]. So sind auch beim Menschen zahlreiche Phänotypen auf stumme Mutationen zurückzuführen, etwa das Marfan-Syndrom, die Phenylketonurie und die familiäre adenomatöse Polyposis [Chamary und Hurst, 2009]. Im Einzelfall bedarf es zur Beurteilung der Funktionalität spezieller Testmodelle (z.B. einer Charakterisierung der Proteinstabilität nach heterologer Expression). Die Vorhersage intrinsischer Unordnung mittels DISOPRED2 zeigt, dass sich die Varianten Leu262Leu und Glu310Glu mit großer Wahrscheinlichkeit in geordneten Sequenzbereichen befinden, die nicht unmittelbar für eine Wechselwirkung zwischen Protein und DNA relevant sind. Ergänzende Hinweise auf die Funktionalität können auch klinische Zusatzinformationen liefern. Ein mögliches Indiz stellt für die Variante Leu262Leu eine verlängerte kortikale Innervationsstille (engl.: cortical silent period, CSP) dar. Diese postexzitatorische Pause in der elektromyographischen Ableitung eines willkürlich innervierten Muskels gibt Auskunft über die Integrität inhibitorischer Mechanismen im kontralateralen Motorkortex, und gilt somit als Marker für die intrakortikale Inhibition (Abb. 10).

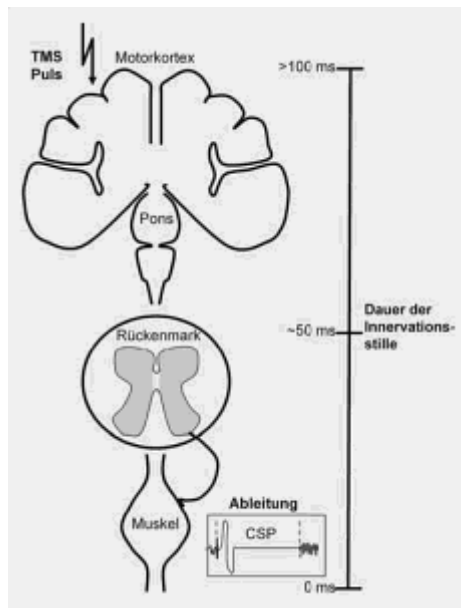


Abb. 10: Schematische Zeichnung des motorischen Systems: Die Ableitung zeigt im unteren Teil ein MEP (motorisch evoziertes Potenzial) und nachfolgend eine Innervationsstille (CSP) im EMG des vorgespannten Zielmuskels. Der Zeitbalken am rechten Rand des Diagramms gibt die zu erwartende Dauer der Innervationsstille in Abhängigkeit vom Reizort an. (vgl. Siebner und Ziemann, 2007)

Studien zur CSP bei Patienten mit Dystonie kommen dabei zu unterschiedlichen Ergebnissen. Stinear und Byblow (2005) fanden keinen Unterschied in der Dauer der CSP bei Patienten mit fokaler Hand-Dystonie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Dagegen fanden Rona *et al.* (1998) und Chen *et al.* (1997) eine verkürzte CSP-Dauer bei Dystonie-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Pullman *et al.* (1996) wiederum fanden eine verlängerte CSP bei Patienten mit fokaler Arm-Dystonie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Keine dieser Untersuchungen gibt Auskunft über einen möglichen Effekt von DYT1-Genvarianten auf die CSP. Auch bezüglich Depression liefert der hier erhobene Befund keine spezifische Information: Zwar zeigen Untersuchungen an unbehandelten Patienten mit Depression in der Regel eine verkürzte CSP [Siebner und Ziemann, 2007], die verlängerte kortikale Innervationsstille bei der hier vorgestellten Patientin (Fallvignette 1) könnte aber auf die Einnahme von Antidepressiva zurückzuführen sein [Langguth *et al.*, 2007] und ist nicht notwendigerweise durch die Mutation bedingt.

5.4.2 Nicht-kodierende Varianten

Für die vier neu identifizierten nicht-kodierenden Varianten in der 3'UTR besteht unabhängig von der vergleichsweise niedrigen evolutionären Konservierung dennoch die Möglichkeit einer Funktionalität. In Betracht kommt ein Einfluss auf die Polyadenylierung der mRNA, auf die mRNA-Stabilität, auf deren Export aus dem Zellkern und auch auf die Translationseffizienz [Schaaf und Zschocke, 2008].

5.4.3 Auswirkungen auf DNA-Überstruktur und mRNA-Stabilität

Die Basensequenz eines DNA-Stranges begünstigt bzw. erschwert lokale Krümmungen, die durch physikalische und geometrische Berechnungen geschätzt werden können (Samori und Zuccheri, 2005). Abschnitte mit starker Krümmung weisen eine erhöhte Affinität zu Core-Histonen auf und dienen vermutlich auch zur Platzierung bzw. zur Synchronisierung von Nukleosomen. Für die neu identifizierten Varianten wurden keine Effekte auf geschätzte lokale DNA-Krümmungsindices beobachtet. Auch wurden keine Effekte auf die mRNA-Stabilität vorhergesagt. So liegt keine der gefundenen Varianten in einem AT-reichen Element, das den mRNA-Umsatz beeinflussen könnte. Zur experimentellen Verifizierung dieses Ergebnisses können in Folgestudien ggf. noch "pulse-chase mRNA decay"-Assays oder Exoribonuklease-Assays eingesetzt werden.

5.4.4 Kopplungsungleichgewicht und Haplotypen

In Anbetracht des ausgeprägten Kopplungsungleichgewichts zwischen den SNP-Paaren rs1182 und rs35153737 bzw. rs1183 und rs1045441 kann die Anzahl der Marker bei Genotypisierungen von DYT1 ohne nennenswerten Informationsverlust reduziert werden. Anstelle der hier eingesetzten elf Marker erlaubt dies eine Beschränkung auf neun Marker, vorausgesetzt, dass der ethnische Hintergrund mit dem hier untersuchten Kollektiv übereinstimmt. Mangels Vergleichswerten zu DYT1-Haplotypen im amplifizierten Bereich bei Kontrollpersonen lassen sich gegenwärtig keine näheren Aussagen treffen bzgl. einer möglichen DYT1-Haplotyp-Assoziation mit rezidivierender Major Depression.

5.5 Zusammenhang von Dystonie und Depression

Der von Heiman *et al.* (2004) postulierte Zusammenhang zwischen der DYT1-Deletion und Major Depression konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Unter den 414 Patienten mit Major Depression fand sich kein Träger dieser Mutation. Heiman *et al.* (2004) geben eine Prävalenz von 24,4% für Depressionen bei Patienten mit Dystonie an. Unter den depressiven Patienten wiederum waren 79,6% Träger der DYT1-Deletion. Selbst wenn berücksichtigt wird, dass der Anteil depressiver Patienten in dem von Heiman *et al.* (2004) untersuchten Kollektiv um das 4,8-fache über dem Erwartungswert von ca. 5% lag [Schulte-Körne und Allgaier, 2008] wären demnach bis zu 68 Mutationsträger (16,4%) in der eigenen Stichprobe abzuleiten gewesen. Für diese Diskrepanz kommen mehrere mögliche Ursachen in Betracht.

Denkbar wäre einerseits, dass keine Assoziation der GAG-Deletion mit Major Depression und damit keine Assoziation von DYT1-Dystonie und Major Depression existiert. Tatsächlich bezieht sich die Mehrzahl der Fallberichte (u.a. alle Berichte vor 1997) zu komorbider Depression auf Patienten mit Dystonie deren DYT1 Trägerstatus nicht überprüft wurde. Hinzu kommt, dass bislang keine Kopplungsbefunde zu Chromosom 9q34 bei Major Depression vorliegen [Middeldorp *et al.*, 2009] und dass die Befunde von Heiman *et al.* (2004) bislang durch keine andere Arbeitsgruppe repliziert wurden. Aufgrund der erheblichen Einschränkungen im Alltag von erkrankten Mutationsträgern muss ferner bezweifelt werden, dass die von Heiman *et al.* (2004) als „verblindet“ bezeichneten Untersucher keine Kenntnisse von der Dystoniesymptomatik bei ihren Interviewpartnern erlangen konnten. Damit dürften die Ergebnisse in Richtung einer vermeintlichen Assoziation von Dystonie und Depression verzerrt worden sein.

Alternativ zu diesem Erklärungsmodell wäre denkbar, dass eine Assoziation der DYT1-Deletion und Major Depression existiert, aber übersehen wurde weil sie durch andere Faktoren unkenntlich gemacht wurde. Hierfür spräche der mögliche Stellenwert anderer Varianten im

DYT1-Gen als Modulatoren der Penetranz bzw. des Krankheitsverlaufs von Dystonie [Defazio et al., 2009; Risch et al., 2007]. Dem steht jedoch entgegen, dass es keine Hinweise auf eine Stratifizierung innerhalb der eigenen Stichprobe gibt (HWE für alle Varianten erfüllt), dass in beiden Studien gleiche diagnostische Kriterien angewendet wurden und dass auch die der Deletion benachbarten Varianten keine Assoziation mit Depression im Vergleich zu Kontrollpopulationen zeigen.

Um das Fehlen einer Assoziation von GAG-Deletion und rezidivierender Major Depression mit ausreichender Sicherheit zu belegen, bedürfte es den eigenen Berechnungen zufolge einer ungleich größeren epidemiologischen Studie mit Fallzahlen von über 60000 depressiven Patienten und über 1950000 gesunden Kontrollpersonen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt überwiegen jedoch die Argumente gegen den postulierten Zusammenhang beider Störungen und gegen eine duale Rolle der GAG-Deletion als genetischer Risikofaktor sowohl von Torsionsdystonie als auch von rezidivierender Major Depression.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die DYT1-Dystonie stellt eine seltene, autosomal dominante Erkrankung dar, die durch eine Mutation im DYT1-Gen hervorgerufen wird. Vor dem Hintergrund einer scheinbaren Häufung von rezidivierender Major Depression bei Trägern dieser Mutation wurde in der vorliegenden Studie erstmals die Prävalenz von DYT1-Genvarianten bei Major Depression geprüft. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst eine systematische Sequenzierung des kritischen DYT1-Genabschnitts bei 414 Patienten mit der Diagnose einer rezidivierenden Major Depression. Dabei wurden sechs neue Varianten beschrieben, darunter zwei seltene kodierende Substitutionen (Leu262Leu und Glu310Glu) in einem evolutionär stark konservierten Teilabschnitt von Exon 5. Bestätigt wurde auch das Vorkommen von fünf bereits bekannten Polymorphismen. Dagegen wurden weder die DYT1-Mutation noch sieben weitere, vorbeschriebene allelische Varianten beobachtet. Zwar sprechen in silico-Analysen der neu identifizierten Varianten insbesondere im Fall der Glu310Glu-Variante für eine mögliche Funktionalität, da diese der krankheitsassoziierten GAG-Deletion eng benachbart ist. Die Durchsicht von Krankengeschichten ergab jedoch weder bei der Trägerin der Leu262Leu-Variante noch bei der Trägerin der Glu310Glu-Variante Anhaltspunkte für das Vorliegen dystonieähnlicher Beschwerden.

In einem zweiten Schritt wurden Referenzwerte aus der Literatur bzw. aus Gendatenbanken herangezogen um die mögliche Assoziation einzelner Allele mit Major Depression zu untersuchen. Nach Gegenüberstellung der Prävalenzen von 11 allelischen Varianten aus der eigenen Stichprobe und der entsprechenden Prävalenzraten bei gesunden Kontrollpersonen und einer Korrektur für multiple Vergleiche ließen sich keine signifikanten Abweichungen vom Erwartungswert bei Major Depression festhalten. Die Ergebnisse von Poweranalysen unterstützen die Aussage einer negativen Assoziation häufiger DYT1-Varianten mit der Gemüteserkrankung, in Bezug auf sehr seltene DYT1-Mutationen war die Aussagekraft erwartungsgemäß gering.

In der Zusammenschau erweitern die hier vorgestellten Ergebnisse das Spektrum bekannter Varianten im DYT1-Gen, liefern aber im Gegensatz zu einer früheren Studie keinerlei Hinweise auf eine Assoziation mit rezidivierender Major Depression. Aufgrund der extremen Seltenheit von DYT1-Mutationsträgern lässt sich ein modulierender Einfluss der GAG-Deletion auf das Erkrankungsrisiko nicht ohne erheblichen Aufwand grundsätzlich ausschließen. Dennoch spricht eine Reihe zusätzlicher Indizien gegen eine gemeinsame Ätiopathogenese von Dyt1-Dystonie und Major Depression. Hierzu zählen einerseits die stark unterschiedlichen Erbgänge beider Erkrankungen und andererseits die inzwischen gesammelten klinischen Erfahrungen. Weder antidepressive Medikation noch andere antidepressive Interventionen (Elektrokrampftherapie) vermochten bislang Dystoniesymptome nachhaltig zu lindern und führten in vielen Fällen sogar zu einer Beschwerdezunahme. In der Praxis ist damit auch weiterhin keine Rationale für eine prophylaktische Gabe von Antidepressiva bei Patienten mit familiär gehäufte Dystonie abzuleiten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Andlin-Sobocki P., Wittchen H.U. (2005) Cost of affective disorders in Europe. *European Journal of Neurology* 12(1): 34-38

Augood S.J., Penney J.B. Jr, Friberg I.K., Breakefield X.O., Young A.B., Ozelius L.J., Standaert D.G. (1998) Expression of the Early-Onset Torsion Dystonia Gene (DYT1) in Human Brain. *Annals of Neurology* 43(5): 669-673

Augood S.J, Hollingsworth Z., Albers D.S., Yang L., Leung J.C., Muller B., Klein C., Breakefield X.O., Standaert D.G. (2002) Dopamine transmission in DYT1 dystonia: a biochemical and autoradiographical study. *Neurology* 59(3): 445-448

Brukner I., Sanchez R., Suck D., Pongor, S. (1995) Sequence dependent bending propensity of DNA as revealed by DNase I: Parameters for trinucleotides. *The EMBO Journal* 14(8): 1812-1818

Cartegni L., Chew S.L., Krainer A.R. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature reviews genetics* 3(4): 285-296

Chamary J.V., Hurst L.D. (2009) The Price of silent Mutations. *Scientific American* 300(6): 46-53

Chen R., Wassermann E., Caños M., Hallett M. (1997) Impaired inhibition in writer's cramp during voluntary muscle activation. *Neurology* 49(4): 1054-1059

Clarimon J., Asgeirsson H., Singleton A., Jakobsson F., Hjalton H., Hardy J., Sveinbjornsdottir S. (2005) Torsin A Haplotype Predisposes to Idiopathic Dystonia. *Annals of Neurology* 57(5): 765-767

Clarimon J., Brancati F., Peckham E., Valente E.M., Dallapiccola B., Abruzzese G., Girlanda P., Defazio G., Berardelli A., Hallett M., Singleton A.B. (2007). Assessing the Role of DRD5 and DYT1 in two different Case-Control Series with Primary Blepharospasm. *Movement Disorders* 22(2): 162-166

De Carvalho Aguiar P.M., Ozelius L.J. (2002) Classification and genetics of dystonia. *THE LANCET Neurology* 1(5): 316-32

Defazio G., Matarin M., Peckham E.L., Martino D., Valente E.M., Singleton A., Crawley A., Aniello M.S., Brancati F., Abbruzzese G., Girlanda P., Livrea P., Hallett M., Berardelli A. (2009) The TOR1A polymorphism rs1182 and the risk of spread in primary blepharospasm. *Movement Disorders* 24(4): 613-616

Delvin B., Risch N. (1995) A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 29(2): 311-322

Dupont W.D., Plummer W.D. Jr. (1998) Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Controlled Clinical Trials* 19(6): 589-601

Fabbrini G., Berardelli I., Moretti G., Pasquini M., Bloise M., Colosimo C., Biondi M., Berardelli A. (2010) Psychiatric disorders in adult-onset focal dystonia: a case-control study. *Movement Disorders* 25(4): 459-465

Frédéric M., Lucarz E., Monino C., Saquet C., Thorel D., Claustres M., Tuffery-Giraud S., Collod-Bérout G. (2007) First Determination of the Incidence of the Unique TOR1A Gene Mutation, c.907delGAG, in a Mediterranean Population. *Movement Disorders* 22(6): 884-888

Frédéric M., Clot F., Cif L., Blanchard A., Dürr A., Vuillaume I., Lesca G., Kreisler A., Davin C., Besnard T., Rousset F., Thorel D., Saquet C., Mechin D., Ozelius L., Agid Y., Barroso B., Chabrol B., Chan V., Clanet M., Coubes C., Destee A., Nguyen K., Vial C., Vidailhet M., Xie J., Sablonniere B., Calender A., Brice A., Roubertie A., Coubes P., Claustres M., Tuffery-Giraud S., Collod-Beroud G. (2008) Is the early-onset torsion dystonia (EOTD) linked to TOR1A gene as frequent as expected in France? *Neurogenetics* 9(2): 143-150

Gabrielian A., Pongor S. (1996) Correlation of intrinsic DNA curvature with DNA property periodicity. *FEBS Letters* 393(1): 65-68

Gaidatzis D., van Nimwegen E., Hausser J., Zavolan M. (2007) Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics* 8(1): 69

Gambarin M., Valente E.M., Liberini P., Barrano G., Bonizzato A., Padovani A., Moretto G., Fiorio M., Dallapiccola B., Smania N., Fiaschi A., Tinazzi M. (2006) Atypical Phenotypes and Clinical Variability in a Large Italian Family with DYT1-Primary Torsion Dystonia. *Movement Disorders* 21(10): 1782-1784

Gasser T., Bressman S., Dürr A., Higgins J., Klockgether T., Myers R.H. (2003) State of the art review: molecular diagnosis of inherited movement disorders. Movement Disorders Society task force on molecular diagnosis. *Movement Disorders* 18(1): 3-18

Goodchild R.E., Kim C.E., Dauer W.T. (2005) Loss of the Dystonia-associated Protein TorsinA selectively disrupts the Neuronal Nuclear Envelope. *Neuron* 48(6): 923-932

Greenberg P.E., Kessler R.C., Birnbaum H.G. (2003) The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000? *The Journal of Clinical Psychiatry* 64(12): 1465-1475

Grundmann K., Laubis-Herrmann U., Bauer I., Dressler D., Vollmer-Haase J., Bauer P., Stuhmann M., Schulte T., Schöls L., Topka H., Riess O. (2003) Frequency and Phenotypic Variability of the GAG Deletion of the DYT1 Gene in an Unselected Group of Patients With Dystonia. *Archives of Neurology* 60(9): 1266-1270

Gündel H., Wolf A., Xidara V., Busch R., Ceballos-Baumann A.O. (2001) Social phobia in spasmodic torticollis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 71(4): 499-504

Gündel H., Wolf A., Xidara V., Busch R., Ladwig K.H., Jacobi F., von Rad M., Ceballos-Baumann A.O. (2003) High psychiatric comorbidity in spasmodic torticollis: a controlled study. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 191(7): 465-473

Hague S., Klaffke S., Clarimon J., Hemmer B., Singleton A., Kupsch A., Bandmann O. (2006) Lack of association with TorsinA haplotype in German patients with sporadic dystonia. *Neurology* 66(6): 951-952

Hardy G.H. (1908) Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28: 49-50

Harrigan P.R., Sheen C.W., Gill V.S., Wynhoven B., Hudson E., Lima V.D., Lecocq P., Aguirre R., Poon A.F., Sluis-Cremer N. (2008) Silent mutations are selected in HIV-1 reverse transcriptase and affect enzymatic efficiency. *AIDS* 22(18): 2501-2508

Heiman (2002) Psychiatric Manifestations of the DYT1 Dystonia Gene. *Columbia University, New York*

Heiman G.A., Ottman R., Saunders-Pullman R.J., Ozelius L.J., Risch N.J., Bressman S.B. (2004) Increased risk for recurrent major depression in DYT1 dystonia mutation carriers. *Neurology* 63(4): 631-637

Heiman G.A., Ottman R., Saunders-Pullman R.J., Ozelius L.J., Risch N.J., Bressman S.B. (2007) Obsessive-Compulsive Disorder is not a Clinical Manifestation of the DYT1 Dystonia Gene. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 144B(3): 361–364

Hjermind L.E., Werdelin L.M., Sørensen S.A. (2002) Inherited and de novo mutations in sporadic cases of DYT1-dystonia. *European Journal of Human Genetics* 10(3): 213-216

Jamora R.D., Tan E.K., Liu C.P., Kathirvel P., Burgunder J.M., Tan L.C. (2006) DYT1 mutations amongst adult primary dystonia patients in Singapore with review of literature comparing East and West. *Journal of the Neurological Science* 247(1): 35-37

Kabakci K., Hedrich K., Leung J.C., Mitterer M., Vieregge P., Lencer R., Hagenah J., Garrels J., Witt K., Klostermann F., Svetel M., Friedman J., Kostić V., Bressman S.B., Breakefield X.O., Ozelius L.J., Pramstaller P.P., Klein C. (2004) Mutations in DYT1: Extension of the phenotypic and mutational spectrum. *Neurology* 62(3): 395-400

Kamm C. (2006) Early onset torsion dystonia (Oppenheim's dystonia). *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1: 48

Kamm C., Asmus F., Mueller J., Mayer P., Sharma M., Muller U.J., Beckert S., Ehling R., Illig T., Wichmann H.E., Poewe W., Mueller J.C., Gasser T. (2006) Strong genetic evidence for association of TOR1A/TOR1B with idiopathic dystonia. *Neurology* 67(10): 1857-1859

Kamm C. (2009) Genetik der Dystonien. *Fortschritte der Neurologie und Psychiatrie* 77(1): 32–36

Keaveney M., Parker M.G., Gannon F. (1993) Identification of a functional role for the 3' region of the human oestrogen receptor gene. *Journal of Molecular Endocrinology* 10(2): 143-152

Klein C., Brin M.F., de Leon D., Limborska S.A., Ivanova-Smolenskaya I.A., Bressman S.B., Friedman A., Markova E.D., Risch N.J., Breakefield X.O., Ozelius L.J. (1998) De novo mutations (GAG deletion) in the DYT1 gene in two non-Jewish patients with early-onset dystonia. *Human Molecular Genetics* 7(7): 1133-1136

Klein C., Kann M., Kis B., Pramstaller P.P., Breakefield X.O., Ozelius L.J., Vieregge P. (2000) Genetik der Dystonien. *Der Nervenarzt*, 71(6): 432-441

Kostić V.S., Svetel M., Kabakci K., Ristić A., Petrović I., Schüle B., Kock N., Djarmati A., Romac S., Klein C. (2006) Intrafamilial phenotypic and genetic heterogeneity of dystonia. *Journal of the Neurological Sciences* 250(1-2): 92-96

Langguth B., Landgrebe M., Frank E., Sand P., Hajak G., Eichhammer P. (2007) Effekte von Amitriptylin auf die neuronale Erregbarkeit - Hinweise auf die Modulation neuroplastischer Prozesse? *Psychiatrische Praxis* 34(1): 13-14

Lauterbach E.C., Freeman A., Vogel R.L. (2004) Differential DSM-III psychiatric disorder prevalence profiles in dystonia and Parkinson's disease. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 16(1): 29-36

Lebre A.S., Durr A., Jedynek P., Ponsot G., Vidailhet M., Agid Y., Brice A. (1999) DYT1 mutation in French families with idiopathic torsion dystonia. *Brain* 122(1): 41-45

Leung J.C., Klein C., Friedman J., Vieregge P., Jacobs H., Doheny D., Kamm C., DeLeon D., Pramstaller P.P., Penney J.B., Eisengart M., Jankovic J., Gasser T., Bressman S.B., Corey D.P., Kramer P., Brin M.F., Ozelius L.J., Breakefield X.O. (2001) Novel Mutation in the TOR1A (DYT1) gene in atypical, early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. *Neurogenetics* 3(3): 133-143

Lewis L., Butler A., Jahanshahi M. (2008) Depression in focal, segmental and generalized dystonia. *Journal of Neurology* 255(11):1750-1755

Lewontin R.C. (1964) The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 49: 49-67

Maier W. (2004) Genetik der Depressionen: Gegenwärtiger Erkenntnisstand und Perspektiven. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 47(5): 487-492

Mankodi A., Ashizawa T. (2003) Echo of silence: Silent mutations, RNA splicing, and neuromuscular diseases. *Neurology* 61(10): 1330-1331

Masuhr K.F., Neumann M. (2007) Neurologie. *Thieme, Stuttgart*

Middeldorp C.M., Sullivan P.F., Wray N.R., Hottenga J.J., de Geus E.J., van den Berg M., Montgomery G.W., Coventry W.L., Statham D.J., Andrews G., Slagboom P.E., Boomsma D.I., Martin N.G. (2009) Suggestive linkage on chromosome 2,8 and 17 for lifetime major depression. *American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics* 150B(3): 352-358

Möller H-J., Laux G., Deister A. (2005) Psychiatrie und Psychotherapie. *Thieme, Stuttgart*

Müller N., Strohbach D. (2005) DEPRESSIONEN – Krankheitsbild und Therapie. *Govi-Verlag, Eschborn*

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 24:17-27

Mumenthaler M., Mattle H. (2008) Neurologie. *Thieme, Stuttgart*

Murray C.J., Lopez A.D. (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349(9064):1498–1504

Naiya T., Biswas A., Neogi R., Datta S., Misra A.K., Das S.K., Ray K., Ray J. (2006) Clinical characterization and evaluation of DYT1 gene in Indian primary dystonia patients. *Acta Neurologica Scandinavica* 114(3): 210 - 215

Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research* 9(1): 27-43

Opal P., Tintner R., Jankovic J., Leung J., Breakefield X.O., Friedman J., Ozelius L. (2002) Intrafamilial Phenotypic Variability of the DYT1 Dystonia: From Asymptomatic TOR1A Gene Carrier Status to Dystonic Storm. *Movement Disorders* 17(2): 339-345

Oppenheim H. (1911) Über eine eigenartige Krampf-krankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica progressiva, Dystonia musculorum deformans). *Neurologisches Zentralblatt* 30: 1090–110

Ozelius L.J., Kramer P.L., Moskowitz C.B., Kwiatkowski D.J., Brin M.F., Bressman S.B., Schuback D.E., Falk C.T., Risch N., de Leon D. (1989) Human gene for torsion dystonia located on chromosome 9q32-q34. *Neuron* 2(5): 1427-1434

Ozelius L.J., Hewett J.W., Page C.E., Bressman S.B., Kramer P.L., Shalish C., de Leon D., Brin M.F., Raymond D., Corey D.P., Fahn S., Risch N.J., Buckler A.J., Gusella J.F., Breakefield X.O. (1997) The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nature Genetics* 17(1): 40-48

Poeck K., Hacke W. (2006) Neurologie. Springer, Berlin

Pullman S. L., Ford B., Elibol B., Uncini A., Su P. C., Fahn S. (1996) Cutaneous electromyographic silent period findings in brachial dystonia. *Neurology* 46(2): 503-508

Reichel G. (2005) Therapy Guide Spasticity - Dystonia. *uni-med, Bremen*

Risch N.J., Bressman S.B., Senthil G., Ozelius L.J. (2007) Intragenic Cis and Trans modification of genetic susceptibility in DYT1 torsion dystonia. *American Journal of Human Genetics* 80(6): 1188-1193

Rona S, Berardelli A, Vacca L, Inghilleri M, Manfredi M. (1998) Alterations of motor cortical inhibition in patients with dystonia. *Movement Disorders* 13(1): 118-124

Ruß A., Endres S. (2006) Arzneimittel pocket plus. *Börm Bruckmeier Verlag, Grünwald*

Samorì B., Zuccheri G. (2005) DNA-Codes für die Nanowissenschaften. *Angewandte Chemie* 117(8): 1190-1206

Schaaf C., Zschocke J. (2007) Basiswissen Humangenetik. *Springer, Berlin*

Schmidt A., Schneider S.A., Hagenah J., Klein C. (2008) Dystonien. *Der Nervenarzt* 79(2): 53-66

Schulte-Körne G., Allgaier A.K. (2008) Genetik depressiver Störungen. *Zeitschrift für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie*, 36(1): 27-43

Scoggan K.A., Bulman D.E. (2003) Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis (SSCP) and Sequencing for Ion Channel Gene Mutations. *Methods of molecular biology* 217: 143-151

Shashidharan P., Kramer B.C., Walker R.H., Olanow C.W., Brin M.F. (2000) Immunohistochemical localization and distribution of torsinA in normal human and rat brain. *Brain Research* 853(2): 197–206

Siebner H., Ziemann U. (2007) Das TMS-Buch: Transkranielle Magnetstimulation. *Springer, Heidelberg*

Siepel A., Bejerano G., Pedersen J.S., Hinrichs A.S., Hou M., Rosenbloom K., Clawson H., Spieth J., Hillier L.W., Richards S., Weinstock G.M., Wilson R.K., Gibbs R.A., Kent W.J., Miller W., Haussler D. (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research* 15(8): 1034-1050

Soares C. (2007) Codon Spell Check – Silent Mutation are not so silent after. *Scientific American* 296(5): 23-24

Stinear C.M., Byblow W.D. (2005) Task-Dependent Modulation of Silent Period Duration in Focal Hand Dystonia. *Movement Disorder* 20(9): 1143-1151

Szczaluba K., Jurek M., Milewski M., Friedman A., Kadziolka B., Szolna A., Bal J., Mazurczak T. (2007) Clinical characteristics of carriers of a GAG deletion in the DYT1 gene amongst Polish patients with primary dystonia. *European Journal of Neurology* 14(6): 659-662

Tanabe L.M., Kim C.E., Alagem N., Dauer W.T. (2009) Primary dystonia: molecules and mechanisms. *Nature Reviews Neurology* 5(11): 598-609

Valente E.M., Warner T.T., Jarman P.R., Mathen D., Fletcher N.A., Marsden C.D., Bhatia K.P., Wood N.W. (1998) The role of DYT1 in primary torsion dystonia in Europe. *Brain* 121(12): 2335-2339

Vitek J.L. (2002) Pathophysiology of dystonia: a neuronal model. *Movement Disorders* 17(3): 49-62

Walker R.H., Shashidharan P. (2003) Developments in the Molecular Biology of DYT1 Dystonia. *Movement Disorders* 18(10): 1102-1107

Wallesch K.W. (2005) Neurologie Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis. *Elsevier, München*

Ward J.J., Sodhi J.S., McGuffin L.J., Buxton B.F., Jones D.T. (2004) Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *Journal of Molecular Biology* 337(3): 635-645

Wenzel T., Schnider P., Wimmer A., Steinhoff N., Moraru E., Auff E. (1998) Psychiatric comorbidity in patients with spasmodic torticollis. *Journal of Psychosomatic Research* 44(6): 687-690

Wenzel T., Schnider P., Griengl H., Birner P., Nepp J., Auff E. (2000) Psychiatric disorders in patients with blepharospasm - a reactive pattern? *Journal of Psychosomatic Research* 48(6): 589-91

Xiao J., Bastian R.W., Perlmutter J.S., Racette B.A., Tabbal S.D., Karimi M., Paniello R.C., Blitzer A., Batish S.D., Wszolek Z.K., Uitti R.J., Hedera P., Simon D.K., Tarsy D., Truong D.D., Frei K.P., Pfeiffer R.F., Gong S., Zhao Y., LeDoux M.S. (2009) High-throughput mutational analysis of TOR1A in primary dystonia. *BMC Medical Genetics* 10: 24

Yang J.F., Wu T., Li J.Y., Li Y.J., Zhang Y.L., Chan P. (2009) DYT1 mutations in early onset primary torsion dystonia and Parkinson disease patients in Chinese populations. *Neuroscience Letters* 450(2):117-121

Zhang S.S., Fang D.F., Hu X.H., Burgunder J.M., Chen X.P., Zhang Y.W., Shang H.F. (2010) Clinical feature and DYT1 mutation screening in primary dystonia patients from South-West China. *European Journal of Neurology* 17(6): 846-851

Zirn B., Grundmann K., Huppke P., Puthenparampil J., Wolburg H., Riess O., Müller U. (2008) Novel TOR1A mutation p.Arg288Gln in early-onset dystonia (DYT1). *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 79(12): 1327-1330

8 APPENDIX

Materialien und verwendete Geräte

Primer

DYT1+ :5'-TGGATGAACAGCACCTTGTT-3'

DYT1--: 5'-GGACCATCCTGGGACAGA-3'

Gebrauchsfertige Reaktionskits

QIAamp DNA Blood Midi bzw. Maxi Kit (Qiagen, Düsseldorf)

NucleoSpin® Extract II Kit (MACHEREY-NAGEL)

ExoSAP-IT® (USB)

Reaktionsgefäße

0,5ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

2 ml Reaktionsgefäße 3810 (Eppendorf, Hamburg)

TubePlates® 96 SoftTubes® (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)

Geräte

Photometer GeneQuant II, (PharmaciaBiotech, Freiburg)

Pipettierroboter (Corbett Robotics, San Francisco, USA)

Thermocycler Genius (Techne Inc., Burlington, USA)

Vortexer Reax2000 (Heidolph, Schwabach)

Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus, Hanau)

Zentrifuge Megafuge 2.0R (Heraeus, Hanau)

Software

DNADynamo (BlueTractorSoftware, Companies Act in England and Wales)

PS Power and Sample Size Calculations, Version 3.0, (William D. Dupont and Walton D. Plummer, Jr.)

Haploview, Version 4.1 (Broad Institute, Cambridge, USA, 2006)

bend.it® Server (©kristian 1998,

http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna/bend_it.html)

DISOPRED2 (<http://bioinf4.cs.ucl.ac.uk:3000/disopred>)

9 DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation habe ich an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Regensburg angefertigt. Mein Dank gilt allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. emer. Dr. Klein dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Hajak für die Überlassung des aktuellen und interessanten Themas.

Herrn Dr. Sand für die umfangreiche Betreuung bei den experimentellen Arbeiten im Labor und der anschließenden statistischen Auswertung.

Dem gesamten Laborteam für die gute Zusammenarbeit.

10 LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Franziska Antonia Heining

geboren am 19.08.1985 in Weiden i.d.Opf.

Familienstand: ledig

Schulbildung

1992-1996	Volksschule Mantel
1996-2005	Kepler Gymnasium Weiden
	Abschluss: Abitur

Studium

2005-2007	Studium der vorklinischen Medizin an der Universität Regensburg
Sept. 2007	erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit Okt. 2007	Studium der klinischen Medizin an der Universität Regensburg
April 2008	Famulatur im Bezirkskrankenhaus Wöllershof, Fachklinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik
März 2010	Famulatur in der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Regensburg
Oktober 2010 – Februar 2011	Praktisches Jahr in der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Regensburg
Oktober 2011	zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung