

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

**Molekulargenetische Untersuchungen des *ANO10*- und des
ADCY5-Gens zur Erforschung komplexer, seltener
Bewegungsstörungen genetischer Ursache**

Inauguraldissertation

zur

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

vorgelegt von
Christoph Max
aus Salzgitter

Lübeck 2019

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Sc. (Universität Belgrad) Ana Westenberger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nils Homann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.9.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.9.2020

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Bewegungsstörungen.....	1
1.1.1	<i>Zerebelläre Ataxien: Hereditäre Formen</i>	2
1.1.1.1	Autosomal-dominante zerebelläre Ataxien.....	3
1.1.1.2	Autosomal-rezessive zerebelläre Ataxien.....	4
1.1.1.3	Mutationen im <i>ANO10</i> -Gen als Ursache erblich bedingter Ataxien.....	5
1.1.1.4	Ataxieforschung: Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	5
1.1.2	<i>Paroxysmale Dyskinesien und komplexe Hyperkinesien</i>	8
1.1.2.1	Überblick: Paroxysmale Dyskinesien.....	8
1.1.2.2	Paroxysmale kinesiogene Dyskinesie durch Mutationen im <i>PRRT2</i> -Gen.....	8
1.1.2.3	Komplexe Hyperkinesien: Myoklonus-Dystonie-Syndrom aufgrund von <i>SGCE</i> -Genmutationen.....	9
1.1.2.4	<i>ADCY5</i> -assoziierte Dyskinesien.....	9
1.2	Herangehensweisen beim Erforschen genetischer Erkrankungen.....	11
1.2.1	<i>Sequenzierungen der nächsten Generation</i>	11
1.2.2	<i>Konventionelle Verfahren (Sanger-Sequenzierung)</i>	13
1.3	Annahmen und Ziele der Arbeit.....	14
2	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1	Patienten.....	15
2.1.1	<i>Patienten mit zerebellärer Ataxie und deren Familienmitglieder</i>	15
2.1.2	<i>Patienten für Analysen des ADCY5-Gens</i>	17
2.1.2.1	Patientenkollektiv für <i>ADCY5</i> -Screening.....	17
2.1.2.2	Externe Patienten für <i>ADCY5</i> -Genanalysen.....	18
2.2	Material.....	20
2.2.1	<i>Chemikalien</i>	20
2.2.2	<i>Oligonukleotide</i>	20
2.2.3	<i>Enzyme</i>	21
2.2.4	<i>Kits</i>	21
2.2.5	<i>Lösungen</i>	21
2.2.6	<i>Geräte</i>	21
2.2.7	<i>Software</i>	22
2.3	Methoden.....	23
2.3.1	<i>DNA-Extraktion</i>	23
2.3.2	<i>Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung</i>	24
2.3.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	24
2.3.4	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	26

2.3.5	<i>DNA-Sequenzierung</i>	26
2.3.6	<i>Haplotypanalyse</i>	29
2.3.7	<i>In-silico-Methoden</i>	30
2.3.7.1	WES-Datensatz: Filterungsschritte.....	30
2.3.7.2	Generieren der Primer	30
2.3.7.3	DNA-Sequenzanalysen	31
2.3.7.4	Vergleich von humanen Aminosäuresequenzen mit anderen Spezies.....	31
2.3.7.5	Datenbanken.....	32
2.3.7.6	Vorhersageprogramme	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Genetische Analysen der Roma-Familien DI und DII	33
3.1.1	<i>Aus dem WES-Datensatz hervorgegangene Kandidatengene</i>	33
3.1.2	<i>Gezielte Analysen des ANO10-Gens für Mitglieder von DI und DII und weitere an zerebellärer Ataxie erkrankte Individuen</i>	35
3.1.3	<i>Haplotypanalysen der c.1150_1151delTT Mutationsträger</i>	37
3.1.4	<i>Berechnete CADD-Scores für alle bekannten ANO10-Mutationen</i>	39
3.2	Molekulargenetische Resultate der <i>ADCY5-Genanalysen</i>	40
3.2.1	<i>Screening des Patientenkollektivs</i>	40
3.2.2	<i>Untersuchungen der externen Proben</i>	41
3.2.2.1	Sequenzierungsanalysen des <i>ADCY5-Gens</i>	41
3.2.2.2	Mosaikform der c.1252C>G Substitution in Familie K5.....	44
3.2.2.3	Haplotypanalysen der c.1252C>T <i>ADCY5-Mutationsträger</i> aus den Familien K1, K2 und K3.....	46
4	DISKUSSION	48
4.1	Homozygote Gründermutation im <i>ANO10-Gen</i> als häufige Ursache zerebellärer Ataxien in der Bevölkerungsgruppe der Roma	48
4.2	Klinisches und genetisches Spektrum <i>ADCY5</i> -assoziierter Bewegungsstörungen	51
4.2.1	<i>Alternierende Hemiplegie des Kindesalters als weitere Erscheinungsform ADCY5-assoziierter Dyskinesien</i>	51
4.2.2	<i>Mutationsspektrum und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen von ADCY5-assozierten Dyskinesien</i>	55
4.3	Ausblick.....	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	62
6	LITERATURVERZEICHNIS	64
7	ANHANG	75
7.1	Tabellen.....	75
7.2	Abbildungen	79
7.3	Klinische Informationen der Mutationsträger	80

7.3.1	<i>Detaillierte Fallbeschreibungen aller Patienten mit ADCY5-Mutation</i>	80
7.3.2	<i>Klinische Informationen der Betroffenen aus den Familien DI und DII</i>	90
7.4	Kenndaten zum Ethikvotum	91
7.5	Eidesstattliche Erklärung	91
7.6	Danksagung	92
7.7	Lebenslauf	93
7.8	Publikationsliste	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Klassischer Stammbaum bei autosomal-dominantem Erbgang.	3
Abbildung 1.2 Klassischer Stammbaum bei autosomal-rezessivem Erbgang.	4
Abbildung 1.3 cMRT-Schnittbilder von betroffenen Individuen.	7
Abbildung 1.4 Charakteristische Symptomatik und klinische Zeichen der Syndrome, die von Mutationen in den Genen <i>SGCE</i> , <i>ADCY5</i> und <i>PRRT2</i> hervorgerufen werden und deren Überschneidungen.	11
Abbildung 2.1 Stammbäume der Familien DI und DII.	16
Abbildung 2.2 Stammbäume der Familien K1, K2, K3 und K5.	19
Abbildung 3.1 Stammbäume der Familien DI, DII und B mit den Ergebnissen der Gen- und Haplotypanalysen.	36
Abbildung 3.2 Chromatogramme der mutierten und der Wildtyp-Sequenz der Region des <i>ANO10</i> -Gens, welche an die CDS-Positionen 1150 und 1151 grenzt.	37
Abbildung 3.3 Ausschnitt aus den Haplotypanalysen der <i>ANO10</i> -Mutationsträger.	38
Abbildung 3.4 Chromatogramme der mutierten und der Wildtyp-Sequenz der Regionen des <i>ADCY5</i> -Gens um CDS-Position 3045 (links) bzw. 3074 (rechts).	40
Abbildung 3.5 Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz des humanen <i>ADCY5</i> -Proteins für die Positionen p.1012 bis p.1028 und <i>Alignment</i> mit den Sequenzen anderer Spezies.	41
Abbildung 3.6 Stammbäume der Familien K1, K2, K3 und K5 mit Mutationsstatus der untersuchten Familienmitglieder.	42
Abbildung 3.7 Chromatogramme der mutierten und der Wildtyp-Sequenz der Region des <i>ADCY5</i> -Gens um CDS-Position 1252.	43
Abbildung 3.8 Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz des humanen <i>ADCY5</i> -Proteins um Position p.418 und <i>Alignment</i> mit den Sequenzen anderer Spezies.	44
Abbildung 3.9 Gegenüberstellung der einzelnen Chromatogramme für die c.1252C>G Mutationsträger aus Familie K5.	45
Abbildung 3.10 Auszug aus den Haplotypanalysen der c.1252C>T <i>ADCY5</i> -Mutationsträger.	47
Abbildung 4.1 Charakteristische Symptomatik und klinische Zeichen der Syndrome, die von Mutationen in den Genen <i>SGCE</i> , <i>PRRT2</i> , <i>ADCY5</i> und <i>ATPIA3</i> hervorgerufen werden und deren Überschneidungen.	53

Abbildung 4.2 Schematischer Aufbau des ADCY5-Proteins mit Lage bekannter Mutationen einschließlich der im Rahmen dieser Arbeit detektierten Varianten.	59
Abbildung 7.1 Der genetische Code.....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Reaktionsansatz einer Standard-PCR.	24
Tabelle 2.2 Reaktionsansatz der Sequenz-PCR.....	27
Tabelle 3.1 WES-Datensatz für Individuen aus Familie DI und DII nach Filterungsschritten.	34
Tabelle 3.2 CADD-Scores und Anzahl der Mutationsträger in der ExAC-Datenbank für alle bisher beschriebenen <i>ANO10</i> -Mutationen.	39
Tabelle 3.3 Entdeckte Missense-Mutationen des <i>ADCY5</i> -Gens und deren prognostizierte Pathogenität und CADD-Scores.	45
Tabelle 3.4 Ermittelte <i>Repeat</i> -Längen von Trägern der <i>ADCY5</i> -Mutation c.1252C>T für die verwendeten Marker.	46
Tabelle 4.1 Diagnostische Kriterien der klassischen AHC, angewendet für die beiden <i>ADCY5</i> -Mutationsträger mit AHC-Phänotyp.	51
Tabelle 4.2 Chronologische Auflistung aller bisher in der Literatur beschriebenen <i>ADCY5</i> -Mutationen einschließlich der in dieser Arbeit gefundenen Genvarianten.	56
Tabelle 7.1 Details zu verwendeten Primern.	75
Tabelle 7.2 Verwendete Mikrosatelliten.	77
Tabelle 7.3 Genombezeichnungen und zugehörige Gene der Proteinsequenzen für miteinander verglichene Spezies.	78
Tabelle 7.4 Klinische Merkmale aller lebenden Familienmitglieder mit homozygoter c.1150_1151delTT <i>ANO10</i> -Mutation.	90

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
ADCA	<i>Autosomal dominant cerebellar ataxia</i> (Autosomal-dominante zerebelläre Ataxie)
<i>ADCY5</i>	Kodierendes Gen der humanen Adenylatcyclase 5
AHC	<i>Alternating hemiplegia of childhood</i> (Alternierende Hemiplegie des Kindesalters)
<i>ANO10</i>	Kodierendes Gen von humanem Anoctamin 10
ARCA	<i>Autosomal recessive cerebellar ataxia</i> (Autosomal-rezessive zerebelläre Ataxie)
ATP	Adenosintriphosphat
<i>ATP1A3</i>	Kodierendes Gen der Alpha-3 Untereinheit der humanen Natrium-Kalium-ATPase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
ca.	circa
CADD	<i>Combined annotation-dependent depletion</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CDS	<i>Coding sequence</i> (kodierende Sequenz)
CHOR	Chorea
cMRT	Kranielle Magnetresonanztomographie
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dup	Duplikation
DYT	Dystonie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMG	Elektromyographie
ENG	Elektroneurographie
engl.	Englisch
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
fs	Frameshift
G	Guanin
g	Gramm
geb.	geboren
Hi-Di	<i>Highly deionized</i> (stark deionisiert)
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
L	Liter
m	Milli (10 ⁻³)

M	Mega (10^6)
MDS	Myoklonus-Dystonie-Syndrom
min	Minute
mol	Maßeinheit der Stoffmenge
n	Nano (10^{-9})
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> (Sequenzierung der nächsten Generation)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PED	<i>Paroxysmal exercise-induced dyskinesia</i> (Paroxysmale anstrengungsinduzierte Dyskinesie)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PKD	Paroxysmale kinesio gene Dyskinesie
PNKD	Paroxysmale <i>nicht</i> -kinesio gene Dyskinesie
PP _i	Pyrophosphat
<i>PRRT2</i>	Kodierendes Gen des humanen <i>Proline-rich transmembrane protein 2</i>
PxMD	<i>Paroxysmal movement disorder</i> (Paroxysmale Bewegungsstörung)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
s	Sekunde
SCA	<i>Spinocerebellar ataxia</i> (Spinozerebelläre Ataxie)
<i>SGCE</i>	Kodierendes Gen von humanem Sarcoglycan Epsilon
SIFT	<i>Sorting Intolerant from Tolerant</i>
T	Thymin
T _a	<i>Annealing</i> -Temperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA
t _E	Elongationszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (Einheit zur Angabe der Enzymaktivität)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WES	<i>Whole-exome sequencing</i> (Exom-Sequenzierung)
μ	Mikro (10^{-6})

Abkürzungen von Aminosäuren und Nukleinbasen. Drei aufeinanderfolgende Nukleinbasen („Triplet“) kodieren jeweils für eine Aminosäure; siehe auch Abbildung 7.1 des Anhangs. Wenn nicht gesondert darauf hingewiesen ist, sind Aminosäuren in dieser Arbeit im Dreibuchstabencode dargestellt.

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode	Nukleinbase	Abkürzung
Alanin	Ala	A	Adenin	A
Arginin	Arg	R	Cytosin	C
Asparagin	Asn	N	Guanin	G
Asparaginsäure	Asp	D	Thymin	T
Cystein	Cys	C		
Glutamin	Gln	Q		
Glutaminsäure	Glu	E		
Glycin	Gly	G		
Histidin	His	H		
Isoleucin	Ile	I		
Leucin	Leu	L		
Lysin	Lys	K		
Methionin	Met	M		
Phenylalanin	Phe	F		
Prolin	Pro	P		
Serin	Ser	S		
Threonin	Thr	T		
Tryptophan	Trp	W		
Tyrosin	Tyr	Y		
Valin	Val	V		
Stopcodon	Ter	*		

Systematik bei der Darstellung von Mutationen:

Lokalisation	Beispiel	Erläuterung
- auf DNA-Ebene	c.1252C>T	Austausch von Cytosin durch Thymin an Nukleotidposition 1252 der proteinkodierenden Sequenz
- auf Protein-Ebene	p.Arg418Trp	Austausch von Arginin durch Tryptophan an Aminosäureposition 418 der Proteinsequenz

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei molekulargenetischen Projekten, die seltene, neurodegenerative Bewegungsstörungen untersuchen. Der erste Teil beschäftigt sich mit zwei Roma-Familien, die an einer erblichen Ataxie-Unterform erkrankt sind, dessen genetische Ursache mithilfe von Sequenzierungen der nächsten Generation (engl. *next-generation sequencing*, NGS) in Kombination mit konventionellen Verfahren (Sanger-Sequenzierung) erforscht wurde. Hier verlief die Untersuchungskette somit vom Patientenkollektiv zum krankheitsverursachenden Gen. Beim zweiten Teil verhielt es sich genau umgekehrt: In diesem Fall stand zu Beginn des Projekts das Gen *ADCY5* und dessen bekannte Mutationen, welche sich in den letzten Jahren als monogenetische Ursache für eine Untergruppe hyperkinetischer Bewegungsstörungen herauskristallisiert hatten. Daraufhin wurde ein Kollektiv von Patienten¹, deren Symptome mit den bisherigen, klinischen Beschreibungen dieser Erkrankung vereinbar waren, auf Veränderungen in diesem Gen untersucht.

Der folgende Abschnitt soll zunächst einen kurzen Überblick über das Thema Bewegungsstörungen liefern (Kapitel 1.1). Hierbei befasst sich Kapitel 1.1.1 mit den verschiedenen bisher beschriebenen Formen hereditärer Ataxien. Anschließend wird in Kapitel 1.1.2 auf paroxysmale Dyskinesien eingegangen und das damit seit Kurzem in Zusammenhang stehende *ADCY5*-Gen vorgestellt. In Kapitel 1.2 werden verschiedene Herangehensweisen beim Erforschen genetischer Ursachen von Krankheiten erläutert. Abschließend werden die Annahmen und Ziele dieser Arbeit präsentiert (Kapitel 1.3).

1.1 Bewegungsstörungen

Der medizinische Begriff Bewegungsstörung ist ein Oberbegriff für alle neurologischen Syndrome, die entweder durch einen Überschuss oder eine Verminderung von willkürlichen oder unwillkürlichen Bewegungsabläufen charakterisiert sind, ohne dass dabei eine Spastik oder eine Lähmung vorliegt. Gemäß dieser Definition werden

¹ Anmerkung: Zur Vereinfachung der Lesbarkeit wird in dieser Arbeit auf *gegenderte* Formulierungen verzichtet. Es wird durchgehend das männliche Geschlecht verwendet, jedoch sind jeweils alle Geschlechter gemeint.

Bewegungsstörungen in zwei Hauptgruppen eingeteilt: Die Hyperkinesien mit gesteigerten Bewegungen und die Hypokinesien mit Bewegungsarmut. Die Klassifikation beruht somit auf dem klinischen Erscheinungsbild der Syndrome. Die jeweilige Ätiologie ist darin jedoch nicht berücksichtigt (Fahn, 2011).

Viele bisher bekannte Bewegungsstörungen sind genetisch bedingt. Die Neurogenetik erforscht dabei als Teilgebiet der Neurologie die molekulargenetischen Ursachen dieser Bewegungsstörungen (Fahn et al., 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an zwei Krankheitsbildern geforscht, die beide den Hyperkinesien zugerechnet werden: Der erste Teil behandelte eine Unterform einer zerebellären Ataxie und der zweite Teil eine Erkrankung aus der Gruppe der paroxysmalen Dyskinesien. Auf beide Krankheitsgruppen soll im Folgenden weiter eingegangen werden.

1.1.1 Zerebelläre Ataxien: Hereditäre Formen

Die erblich bedingten Ataxien stellen eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Bewegungsstörungen dar, welche durch ein Kleinhirnsyndrom als Hauptmanifestation charakterisiert sind. Typische Symptome dieses Syndroms sind Gleichgewichtsstörungen, eine verschlechterte Koordination von Gang- und Extremitätenbewegungen, Dysarthrie und eine Störung der Augenbewegungen (Finsterer, 2009). Der Begriff Ataxie stammt aus dem Griechischen (*a* - nicht/un-; *taxis* - Ordnung), bedeutet also „ohne Ordnung“ und fasst die beschriebenen Symptome zusammen (Barboi, 2000). Pathophysiologisch findet sich eine langsam fortschreitende Degeneration des Kleinhirns und des *Tractus spinocerebellaris* des Rückenmarks, welche eine variable Ausprägung der oben genannten Symptome hervorruft (Espinós und Palau, 2009). Von den Patienten mit erblichen Ataxien ist zwar eine beträchtliche Anzahl der betroffenen Personen weiterhin ohne genetische Diagnose, jedoch haben hier neue Sequenzierungsverfahren die Erforschung der genetischen Ursachen in den letzten Jahren immens vorangetrieben (Hersheson et al., 2012; Pyle et al., 2015).

Obwohl sich die einzelnen klinischen Erscheinungsbilder (Phänotypen) oftmals in großem Maße überschneiden, ist eine eindeutige Klassifizierung der einzelnen Unterformen durch eine Zuordnung in die verschiedenen Vererbungsmuster dennoch möglich. Die erblichen Ataxie-Formen werden entweder autosomal-dominant, autosomal-rezessiv,

X-chromosomal oder mitochondrial vererbt (Jayadev und Bird, 2013). Im Folgenden wird jedoch nur auf die autosomal-dominanten und autosomal-rezessiven Formen eingegangen, da für die vorliegende Arbeit nur diese relevant sind.

1.1.1.1 Autosomal-dominante zerebelläre Ataxien

Bei autosomal-dominant vererbten Erkrankungen genügt ein mutiertes Allel eines Gens (eine heterozygote Mutation), welches sich auf einem der Autosomen (alle Chromosomen bis auf die Geschlechtschromosomen) befindet, um die jeweilige Krankheit zu verursachen (Buselmaier und Tariverdian, 2006). Das Vererbungsmuster bei autosomal-dominantem Erbgang wird in Abbildung 1.1 veranschaulicht.

Die autosomal-dominanten zerebellären Ataxien (engl. *autosomal dominant cerebellar ataxias*, ADCAs) lassen sich weiter in spinocerebelläre Ataxien (engl. *spinocerebellar ataxias*, SCAs) und episodische Ataxien unterteilen. Außerdem wird eine Ataxie-Form aus der Gruppe der spastischen Ataxien autosomal-dominant vererbt. Zurzeit sind insgesamt 43 verschiedene Formen von ADCAs bekannt, für die genetische Informationen vorliegen (Bird, 2018). In der Regel liegt hierbei der Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter. Klinisch stehen eine voranschreitende Gangataxie und eine Atrophie des Kleinhirns im Vordergrund (Bird, 2018).

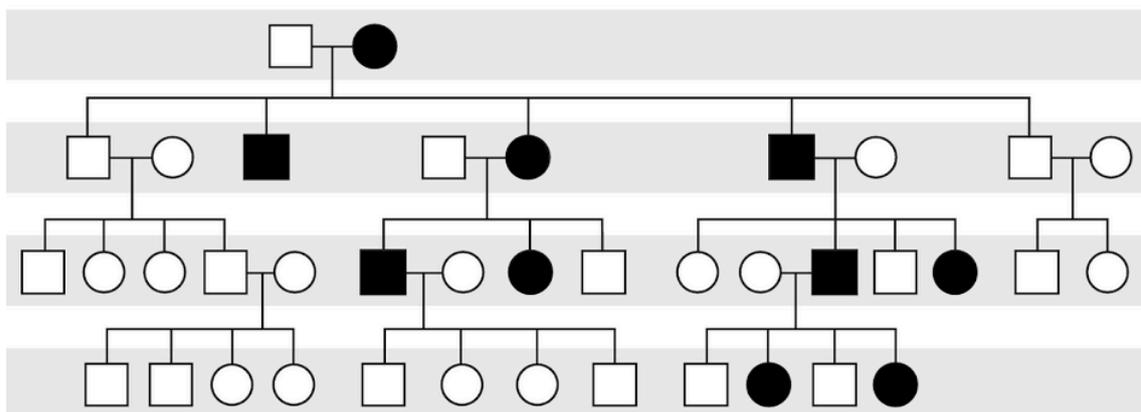


Abbildung 1.1 Klassischer Stammbaum bei autosomal-dominantem Erbgang. Bei dieser Art der Vererbung findet man in jeder Generation mindestens eine betroffene Person (heterozygote Mutationsträger) und jede dieser Personen hat typischerweise ein erkranktes Elternteil. Statistisch erkranken 50 % der Nachkommen, wobei männliche und weibliche Personen gleichermaßen betroffen sind (Buselmaier und Tariverdian, 2006). Schwarze Symbole - betroffene Familienmitglieder; Weiße Symbole - *nicht*-betroffene Familienmitglieder; Quadratische Symbole - männliche Personen; Kreise - weibliche Personen. (adaptiert von Nussbaum et al., 2016)

1.1.1.2 Autosomal-rezessive zerebelläre Ataxien

Bei autosomal-rezessiv vererbten Erkrankungen sind zwei Mutationen, jeweils eine auf beiden Allelen (maternal und paternal) nötig, um den jeweiligen Phänotyp hervorzurufen. Sind beide Genkopien von derselben Mutation betroffen, spricht man von einem homozygoten Genotyp, die Kombination zweier unterschiedlicher Mutationen wird als *compound*-heterozygoter Genotyp bezeichnet. Individuen, die nur auf einem Allel eine pathologische Mutation tragen (heterozygote Mutationsträger) sind in der Regel nicht von der Erkrankung betroffen, also phänotypisch unauffällig (Buselmaier und Tariverdian, 2006). Abbildung 1.2 zeigt den klassischen Stammbaum einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung.

Die autosomal-rezessiven zerebellären Ataxien (engl. *autosomal recessive cerebellar ataxias*, ARCAs) ähneln im klinischen Erscheinungsbild größtenteils den dominanten Ataxie-Formen. Im Gegensatz zu den ADCAs erkranken Betroffene jedoch meist bereits vor dem 25. Lebensjahr (Embiruçu et al., 2009). Die ARCAs sind klinisch und genetisch noch heterogener als die ADCAs: Für insgesamt 56 Formen ist der Genlocus oder das krankheitsverursachende Gen bereits bekannt. Hinzu kommen weitere 5 Formen aus der Gruppe der spastischen Ataxien, die autosomal-rezessiv vererbt werden (Bird, 2018). Aufgrund der großen genetischen Vielfalt, der Überschneidungen zwischen den zugehörigen Phänotypen sowie des häufig geringeren Informationsgehalts aus der Familienanamnese ist die Diagnosefindung hier oftmals komplizierter als bei den ADCAs.

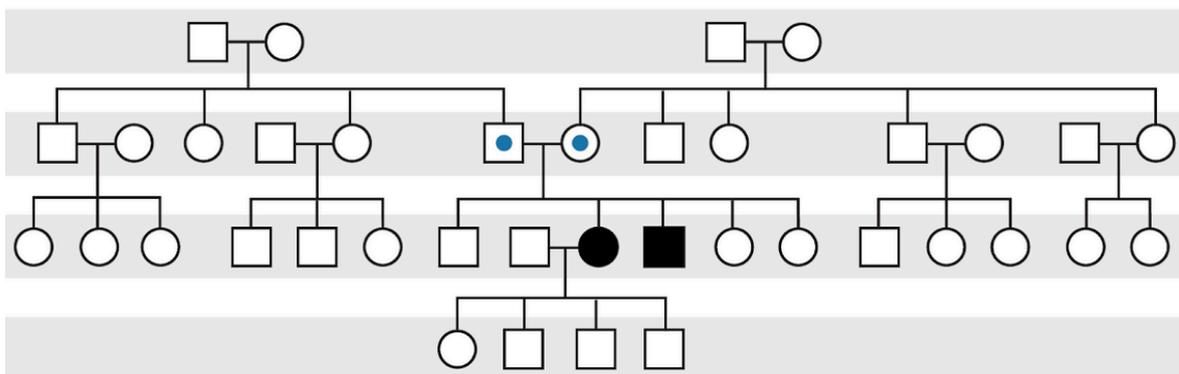


Abbildung 1.2 Klassischer Stammbaum bei autosomal-rezessivem Erbgang. Charakteristisch für eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung ist, dass nicht jede Generation erkrankte Familienmitglieder aufweist. Personen, bei denen die Mutation in heterozygotem Zustand vorliegt, sind hierbei phänotypisch gesund. Die Kinder von zwei heterozygoten Mutationsträgern erkranken jedoch mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 %. Beide Geschlechter erkranken in gleichem Maße (Buselmaier und Tariverdian, 2006). Schwarze Symbole - betroffene Familienmitglieder; Weiße Symbole - *nicht*-betroffene Familienmitglieder; Symbole mit blauem Punkt - heterozygote Mutationsträger; Quadratische Symbole - männliche Personen; Kreise - weibliche Personen. (adaptiert von Nussbaum et al., 2016)

Die Familienanamnese ergibt oftmals jedoch keinen so umfangreichen Stammbaum wie in Abbildung 1.2. In solchen Fällen ist die richtige genetische Einordnung folglich erschwert. Ist zum Beispiel in der gesamten Familie nur ein Kind zweier *nicht*-erkrankter Eltern von der Erkrankung betroffen, spricht man von einem sporadischen Fall, das heißt, es handelt sich um das einzige betroffene Individuum in der Familie. Hierbei kommt zwar eine ARCA als Ursache in Frage, in Betracht zu ziehen wäre jedoch ebenfalls eine neu entstandene, sogenannte *de-novo*-Mutation in dominanter Form, eine ADCA mit unvollständiger Penetranz (siehe dazu 1.2.1) sowie eine erworbene, *nicht*-genetische Ataxie-Form (Bird, 2018).

1.1.1.3 Mutationen im ANO10-Gen als Ursache erblich bedingter Ataxien

Auf der Suche nach DNA-Veränderungen, die Ataxien auslösen können, wurden kürzlich durch Exom-Sequenzierungen (engl. *whole-exome sequencing*, WES) von Ataxie-Patienten krankheitsverursachende Mutationen in weiteren Genen entdeckt, darunter *ANO10* (Vermeer et al., 2010). Das Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 und kodiert für das Transmembranprotein Anoctamin 10, welches zur Familie der calciumaktivierten Chloridkanäle gehört (Hartzell et al., 2009). Das *ANO10*-Gen stellte sich in mehreren Familien (unter anderem in einer Roma-Familie aus Serbien) als genetische Ursache einer speziellen ARCA-Form heraus (Vermeer et al., 2010). Klinisch ist dieser Subtyp gekennzeichnet durch Gangataxie, Dysarthrie, gesteigerte Reflexe, eine gestörte Koordination der Extremitäten, einen vertikalen Fixationsnystagmus mit hypermetrischen Sakkaden und eine Beteiligung der unteren Motoneurone (Vermeer et al., 2010). Zudem besteht die Vermutung, dass die in der Roma-Familie gefundene Mutation c.1150_1151delTT von einem einzigen, genetischen Gründerindividuum ausging (Chamova et al., 2012).

1.1.1.4 Ataxieforschung: Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Eine Untersuchung von insgesamt 75 Familien mit verschiedenen Formen von Ataxien, welche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Nataša Dragašević-Mišković unter Leitung von Prof. Vladimir S. Kostić (Klinik für Neurologie, Medizinische Fakultät, Klinisches Zentrum von Serbien, Universität Belgrad, Serbien) entstand (Dragašević et al., 2006), brachte unter anderem zwei Roma-Familien (DI und DII) hervor, welche in Abschnitt 2.1.1 detailliert vorgestellt werden. Die klinischen Befunde der erkrankten

Mitglieder dieser Familien waren mit gängigen Beschreibungen von SCAs vereinbar (Paulson, 2009; Anheim et al., 2012). Aufgrund des Vererbungsmusters mit erkrankten Individuen in aufeinanderfolgenden Generationen wurde bei beiden Familien von einem autosomal-dominanten Erbgang ausgegangen. Daher wurden zunächst die acht häufigsten Formen von autosomal-dominant vererbten Ataxien (SCA1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 und 17) bzw. die damit assoziierten Mutationen ausgeschlossen.

Über einen Zeitraum von zehn Jahren führten Spezialisten für Bewegungsstörungen bei zwölf der dreizehn betroffenen Mitglieder der zwei Familien ausführliche neurologische Untersuchungen durch. Alle Betroffenen erhielten zudem ophthalmologische Untersuchungen. Bei einigen Erkrankten wurden Elektromyographien (EMG), Elektroneurographien (ENG) und kranielle Magnetresonanztomographien (cMRT) durchgeführt: Die EMG- und ENG-Untersuchungen ergaben bei fünf Patienten aus Familie DI Anzeichen einer Erkrankung der unteren Motoneurone. Alle Patienten, bei denen eine cMRT-Untersuchung durchgeführt wurde, zeigten eine hochgradige Kleinhirnatrophie und hyperintense Läsionen in den Kleinhirnhemisphären in der T2-Gewichtung, welche auf eine Gliose hinweisen (siehe Abbildung 1.3). Bei Patientin Sr260 aus Familie DI wurde eine beidseitige Verkalkung der Basalganglien festgestellt.

Weitere Befunde aus den durchgeführten Untersuchungen sind in Tabelle 7.4 des Anhangs zusammengestellt. Für die späteren molekulargenetischen Untersuchungen wurden den 12 Betroffenen und darüber hinaus 34 *nicht*-erkrankten Familienmitgliedern Blutproben entnommen.

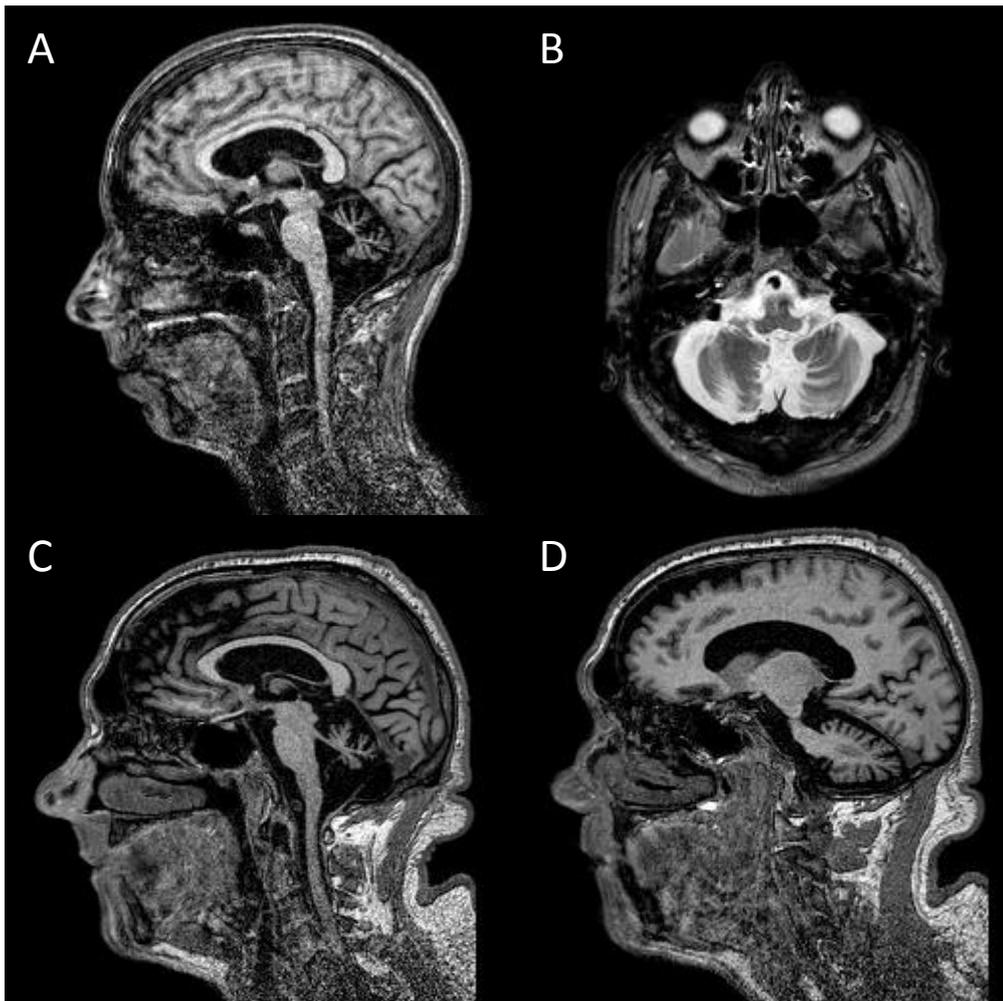


Abbildung 1.3 cMRT-Schnittbilder von betroffenen Individuen. **A.** Hochgradige Kleinhirnatrophie (exemplarisches Schnittbild, gefunden bei den Patienten Sr265, Sr116, Sr271, Sr270, Sr339 und Sr345, T1 sagittal), **B.** Kleinhirnatrophie und hyperintense Läsionen in der rechten Kleinhirnhemisphäre (exemplarisches Schnittbild, gefunden bei den Patienten Sr265, Sr116, Sr271, Sr270, Sr339 und Sr345, T2 axial), **C.** Hochgradige Kleinhirnatrophie und abgeflachte Basis des Pons (Patient Sr265, T1 sagittal), **D.** Frontalhirnatrophie (Patient Sr265, T1 sagittal). (Dragašević-Mišković et al., 2016)

Unter Annahme einer autosomal-dominanten Vererbung wurde für die Roma-Familie DII das vermeintlich krankheitsverursachende Gen durch eine Kopplungsanalyse mithilfe von 412 Mikrosatelliten auf eine 42,5 Mbp große Region des langen Arms von Chromosom 15 eingegrenzt (Weissbach et al., 2010).

1.1.2 Paroxysmale Dyskinesien und komplexe Hyperkinesien

1.1.2.1 Überblick: Paroxysmale Dyskinesien

Die paroxysmalen Dyskinesien sind eine Untergruppe der Hyperkinesien und durch einen episodischen Charakter der Symptome gekennzeichnet. Es handelt sich um seltene Erkrankungen, die meist eine genetische Ursache haben und autosomal-dominant vererbt werden. Während wiederkehrender, kurzer Attacken zeigen betroffene Patienten pathologische Bewegungsmuster wie Dystonie, Chorea oder Ballismus. Das Bewusstsein ist während der Attacken in der Regel erhalten (Bhatia, 2011). Dystonie bezeichnet anhaltende bzw. repetitive Muskelkontraktionen, die zu dauerhaften Fehlhaltungen oder Verdrehungen und wiederkehrenden Bewegungen führen. Bei Chorea handelt es sich um schnelle, unregelmäßige, *nicht*-rhythmische, unwillkürliche Bewegungen, die von einem Körperteil ins Andere wandern und zufällig auftreten. Sind hierbei proximale Muskelgruppen betroffen, entstehen schleudernde Bewegungen mit großer Amplitude, welche als Ballismus klassifiziert werden (Fahn et al., 2009). Oftmals weisen paroxysmale Dyskinesien eine Kombination dieser Symptome auf und häufig überschneiden sich die einzelnen Phänotypen im klinischen Erscheinungsbild (Marras et al., 2016). Unterschieden werden die Krankheitsbilder dieser Gruppe anhand der Trigger, welche die Attacken auslösen können:

1. Paroxysmale kinesiogene Dyskinesie (PKD) - Trigger: Plötzliche Bewegungen
2. Paroxysmale *nicht*-kinesiogene Dyskinesie (PNKD) - Trigger: Kaffee, Alkohol
3. Paroxysmale anstrengungsinduzierte Dyskinesie (engl. *paroxysmal exercise-induced dyskinesia*, PED) - Trigger: Längere körperliche Belastungen

In der Vergangenheit konnten Mutationen in verschiedenen Genen als Ursache der oben genannten Krankheitsbilder entdeckt werden. Zu ihnen gehören: *PRRT2*, *MRI*, *KCNMA* und *SLC2A1* (Erro et al., 2014).

1.1.2.2 Paroxysmale kinesiogene Dyskinesie durch Mutationen im *PRRT2*-Gen

Eine für die vorliegende Arbeit relevante Erkrankung ist unter anderem die paroxysmale kinesiogene Dyskinesie (PKD): Sie manifestiert sich durch Attacken unwillkürlicher Bewegungen, die sowohl choreiforme als auch dystone Anteile aufweisen und dazu

neigen, zu generalisieren. Die Attacken werden typischerweise durch plötzliche, willkürliche Bewegungen ausgelöst und dauern in der Regel maximal eine Minute an (siehe Abbildung 1.4, S. 11). Beim Großteil der Betroffenen zeigen sich Dutzende bis Hunderte solcher Anfälle pro Tag. Die Hälfte der Patienten berichtet von einer sensorischen Aura, welche den Attacken vorausgeht. Das Erkrankungsalter liegt meist vor dem 18. Lebensjahr, wobei die Häufigkeit der Anfälle nach der Pubertät normalerweise abnimmt. Die Bewegungsstörung wird autosomal-dominant vererbt und ist mit Mutationen im Gen *PRRT2* assoziiert, welches für das *proline-rich transmembrane protein 2* kodiert (Erro et al., 2014). Nach den aktuellen Empfehlungen zur Klassifikation von Bewegungsstörungen genetischer Ursache wird die PKD neben weiteren Erkrankungen, die durch Mutationen im *PRRT2*-Gen verursacht werden, den primär paroxysmalen Bewegungsstörungen zugeordnet und als PxMD-*PRRT2* bezeichnet (Marras et al., 2016).

1.1.2.3 Komplexe Hyperkinesien: Myoklonus-Dystonie-Syndrom aufgrund von *SGCE*-Genmutationen

Ein weiteres für diese Arbeit relevantes Krankheitsbild stammt aus der Gruppe der komplex hyperkinetischen Bewegungsstörungen: Das sogenannte Myoklonus-Dystonie-Syndrom (MDS) ist durch einen frühen Krankheitsbeginn und eine Kombination aus Myoklonien – kurze, unwillkürliche Zuckungen eines Muskels oder einer Muskelgruppe (Fahn et al., 2009) – und dystonen Bewegungen gekennzeichnet, zeigt dabei jedoch keine paroxysmalen Elemente. Klassischerweise sind die Muskeln der oberen Extremität, des Rumpfs und des Nackens betroffen. Die Gesichts- und die Beinmuskulatur ist in der Regel ausgespart (siehe Abbildung 1.4, S. 11). Die genetisch bedingten MDS-Fälle werden durch Mutationen im *SCGE*-Gen hervorgerufen (Zimprich et al., 2001), welches für das Protein Sarcoglycan Epsilon kodiert. Bei den hereditären Fällen erfolgt die Vererbung autosomal-dominant. Laut den aktuellen Empfehlungen wird das MDS den kombinierten Dystonien zugerechnet und mit dem Symbol DYT-*SGCE* abgekürzt (Marras et al., 2016).

1.1.2.4 *ADCY5*-assoziierte Dyskinesien

Im Jahr 2012 wurde erstmals das Gen *ADCY5* als Ursache einer gemischt-hyperkinetischen Bewegungsstörung mit paroxysmalen Elementen beschrieben (Chen et al., 2012). Aufgrund der Symptomatik der bis heute mit dem Gen in Verbindung gebrachten Phänotypen wurde das *ADCY5*-Gen daraufhin als weiterer Kandidat für die Gruppe der

paroxysmalen Dyskinesien vorgeschlagen (Friedman et al., 2016). Mutationen im *ADCY5*-Gen führen zu einem breiten Spektrum von hyperkinetischen Bewegungsstörungen, die durch unterschiedliche Kombinationen von choreiformen, dystonen und myoklonischen Bewegungen gekennzeichnet sind (siehe Abbildung 1.4). Von den Dyskinesien können die Extremitäten, der Nacken und die Gesichtsmuskulatur betroffen sein. Die Symptome können einen paroxysmalen Charakter aufweisen oder durchgehend präsent sein und in bestimmten Situationen exazerbieren (Shaw et al., 2015). Anders als bei den oben genannten paroxysmalen Dyskinesien sind die Auslöser hier Stress und innere Unruhe, aber auch während des Schlafs und insbesondere beim Aufwachen treten die Symptome häufig verstärkt auf. Die Erkrankung beginnt meist im Säuglingsalter, in einigen Fällen jedoch erst im Kindesalter oder in der Jugend. In schwerwiegenden Fällen wurde eine verzögerte psychomotorische Entwicklung beobachtet und bei einigen Betroffenen zeigte sich als weiteres Symptom eine axiale Hypotonie (Schneider und Bird, 2016). Nach der aktuellen Klassifikation werden die von *ADCY5*-Genmutationen hervorgerufenen Phänotypen sowohl den kombiniert-choreiformen Erkrankungen, als auch den kombinierten Dystonien zugeordnet und als CHOR/DYT-*ADCY5* bezeichnet (Marras et al., 2016).

Das *ADCY5*-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 3 und kodiert für die Adenylatcyclase 5, ein membranständiges Protein, das die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) und Pyrophosphat (PP_i) katalysiert (Kamenetsky et al., 2006). Das cAMP fungiert in den Zellen als sogenannter *second messenger*, der essentiell für diverse molekulare Signalwege ist (Chen et al., 2012). Die Tatsache, dass das Gen besonders stark im Striatum exprimiert wird (Matsuoka et al., 1997), weist auf eine wichtige Rolle des Gens bei der Modulation von Bewegungsabläufen hin.

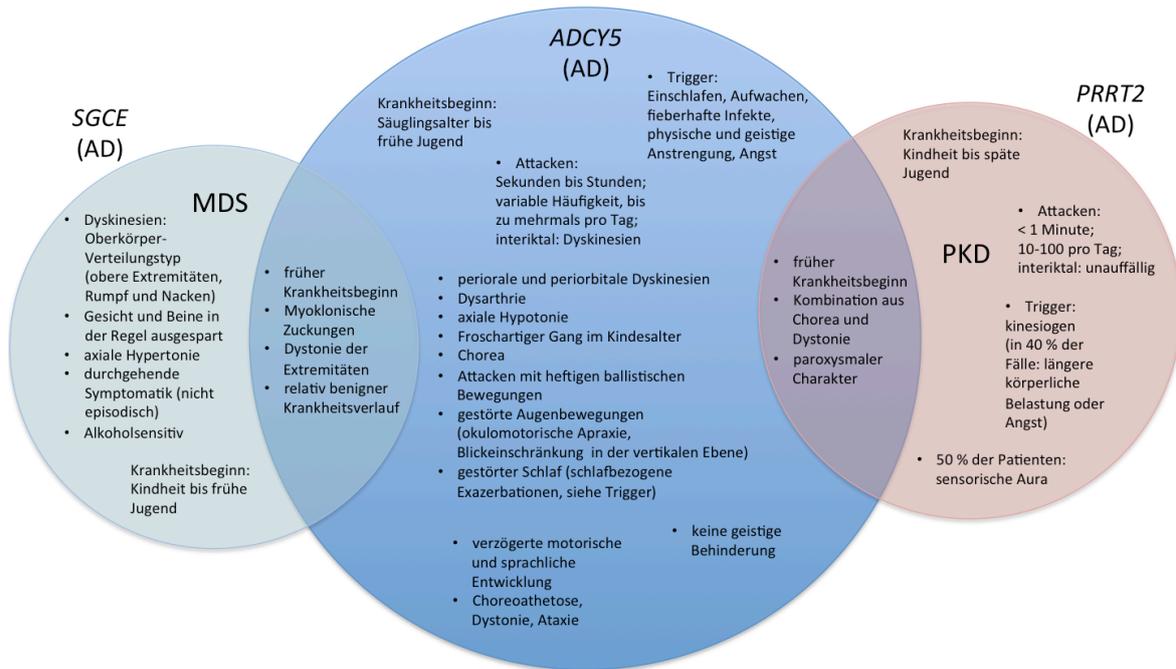


Abbildung 1.4 Charakteristische Symptomatik und klinische Zeichen der Syndrome, die von Mutationen in den Genen *SGCE*, *ADCY5* und *PRRT2* hervorgerufen werden und deren Überschneidungen. Die drei dargestellten gemischt-hyperkinetischen Bewegungsstörungen zeichnen sich durch einen frühen Krankheitsbeginn aus, werden alle autosomal-dominant vererbt und überschneiden sich zum Teil in ihren Symptomen. AD - Autosomal-dominant; MDS - Myoklonus-Dystonie-Syndrom; PKD - Paroxysmale kinesio-gene Dyskinesie. (Eigene Darstellung. Klinische Informationen: Gerrits et al., 2006; Grünewald et al., 2008; Erro et al., 2014; Chang et al., 2016; Carecchio und Mencacci, 2017; Douglas et al., 2017; Blumkin et al., 2018).

1.2 Herangehensweisen beim Erforschen genetischer Erkrankungen

1.2.1 Sequenzierungen der nächsten Generation

Mit der Etablierung neuer Sequenziertechniken und insbesondere dem NGS wurde das Auffinden von krankheitserregenden Mutationen und somit die Entdeckung krankheitsbezogener Gene bedeutend vereinfacht (Lohmann und Klein, 2014). Das NGS ist durch parallele Sequenzierungen Millionen kleiner Fragmente und die darauffolgende computergestützte Zusammensetzung dieser Fragmente eine leistungsstarke und kostengünstige Methode, um das gesamte Genom eines Individuums zügig und unvoreingenommen zu analysieren (Behjati und Tarpey, 2013). Die genetische Untersuchung des Exoms spielt dabei eine besondere Rolle: Das Exom als proteinkodierender Teil des Genoms macht weniger als 2 % des gesamten genetischen Materials eines Menschen aus (Bamshad et al., 2011). Gleichzeitig entfallen über 85 % aller heute bekannten Mutationen, welche genetisch bedingte Erkrankungen hervorrufen,

auf das Exom (Chastain, 2015). Deshalb hat vor allem die Anwendung von WES die Entdeckung pathogener Mutationen maßgeblich vereinfacht und damit die Verknüpfung von Erkrankungen zu konkreten Genen erleichtert. Das Verfahren kommt umso mehr zum Tragen, wenn die zu untersuchenden Erkrankungen eine große klinische und genetische Heterogenität aufweisen und dadurch das Stellen der richtigen klinischen Diagnose erschwert ist (Yang et al., 2013). Dies ist bei paroxysmalen Dyskinesien und erblichen Ataxie-Formen der Fall (Hersheson et al., 2012; Erro et al., 2014). Für Letztere wurde in einer Studie mithilfe eines WES-Ansatzes für 41 % der untersuchten Fälle die ursächliche Mutation gefunden (Pyle et al., 2015). Ähnliche Werte ergab eine WES-Studie mit Dystonie-Patienten, bei der in 37 % der Fälle eine molekulargenetische Diagnose gestellt werden konnte, darunter eine bis dahin nicht bekannte *ADCY5*-Mutation (Zech et al., 2016).

Das Auffinden der krankheitsverursachenden Mutation in einer Familie kann jedoch durch Phänomene wie der unvollständigen Penetranz, der variablen Expressivität oder dem Vorhandensein von Phänokopien erschwert sein. Von einer unvollständigen Penetranz spricht man, wenn eine Mutation in weniger als 100 % der Fälle zur Erkrankung führt: Ein Teil der Mutationsträger erkrankt aufgrund von modifizierenden Faktoren im Genom oder Umwelteinflüssen nicht. Variable Expressivität beschreibt interindividuelle Unterschiede im Ausprägungsgrad eines krankheitsassoziierten Phänotyps bei identischem Genotyp. Auch hier spielen die Zusammensetzung des restlichen Genoms und Umwelteinflüsse eine Rolle (Griffiths et al., 2000). Eine genetische Ursache für variable Expressivität ist der sogenannte Mosaikismus (Gottlieb et al., 2001): Er beschreibt das Vorliegen von genetisch unterschiedlichen Zellen im selben Gewebe eines Individuums. Eine Mutation, die zu einem Zeitpunkt nach der Befruchtung entsteht, führt dazu, dass nur ein Teil der Zellen des Individuums die Mutation aufweist. Der Zeitpunkt, an dem die Mutation stattfindet, bestimmt das Ausmaß des Mosaikismus (Nussbaum et al., 2016). Als Phänokopien werden Individuen innerhalb einer Familie bezeichnet, die einen ähnliches klinisches Erscheinungsbild wie die erkrankten Mutationsträger zeigen, dabei jedoch die konkrete genetische Veränderung selbst nicht aufweisen. Mutationen in anderen Genen, unbekannte genetische Veränderungen oder durch Umweltfaktoren hervorgerufene, *nicht*-genetische Ursachen führen hierbei zu einem klinischen Erscheinungsbild, das den Phänotyp der betroffenen Familienmitglieder imitiert (Klein et al., 2011).

Darüber hinaus ist in geographisch oder kulturell isolierten Populationen die genetische Vielfalt verringert und damit für einige Mutationen, die autosomal-rezessive Erkrankungen hervorrufen, die Heterozygotenfrequenz erhöht. Dies wiederum kann dazu führen, dass in bestimmten Fällen das Vererbungsmuster fälschlicherweise als autosomal-dominant eingestuft wird, was das Finden der genetischen Ursache in den betroffenen Familien erschwert (Kobayashi et al., 2003).

1.2.2 Konventionelle Verfahren (Sanger-Sequenzierung)

Anders als bei den neuen Sequenzieretechniken werden mithilfe von klassischen Sanger-Sequenzierungen (siehe auch 2.3.5) kleinere Genabschnitte (in der Regel einzelne Exons weniger Gene) analysiert. Eine Anwendung ist daher besonders bei Erkrankungen mit eindeutigem Phänotyp und wenigen bekannten, krankheitsverursachenden Genen sinnvoll (Neveling et al., 2013).

Jedoch auch im Rahmen von WES-Studien identifizierte Kandidatengene und deren Varianten müssen durch konventionelle Verfahren re-sequenziert werden, um falsch-positive von richtig-positiven Varianten zu unterscheiden (Lohmann und Klein, 2014). Schließlich ist es wichtig, krankheitsverursachende Gene, die zum ersten Mal einer bestimmten Erkrankung zugeordnet wurden, in weiteren Studien zu bestätigen. Dies geschieht in der Regel in Form von *Screening*-Untersuchungen, bei denen das jeweilige Gen durch Sanger-Sequenzierung analysiert wird. Studienteilnehmer solcher *Screenings* sind Patienten, bei denen eine erbliche Ursache der Erkrankung wahrscheinlich ist, jedoch bislang keine genetische Ursache gefunden werden konnte (Carecchio et al., 2017). Beurteilt wird hierbei unter anderem das Vorhandensein von pathologischen DNA-Veränderungen und deren jeweilige Häufigkeit bei erkrankten Patienten, die Verteilung der Mutationen innerhalb der proteinkodierenden Anteile des Gens, das klinische Spektrum der vorhandenen Phänotypen und Korrelationen zu den jeweiligen Genvarianten sowie die Penetranz der einzelnen Varianten. Diese Informationen dienen dazu, das gesamte klinische und genetische Spektrum einer Erkrankung zu erfassen und mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelationen aufzudecken (Westenberger, 2015).

1.3 Annahmen und Ziele der Arbeit

- a) Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, unter Annahme einer monogenetisch vererbten Erkrankung, die molekulargenetische Ursache einer potentiell bislang nicht bekannten Ataxie-Unterform bei zwei erkrankten Roma-Familien aus Serbien zu finden. Dazu wurden im Vorfeld der hier ausgeführten Untersuchungen Exom-Sequenzierungen (WES) bei fünf betroffenen Familienmitgliedern durchgeführt und anschließend im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit den daraus gewonnenen Datensätzen durch erwartungsfreie *in-silico*-Analysen in Kombination mit Stammbaumanalysen und schließlich mithilfe von konventionellen DNA-Sequenzierungen die Krankheitsursache erforscht.
- b) Der zweite Teil der Arbeit hatte zum Ziel, das Spektrum und die Häufigkeit von *ADCY5*-Mutationen bei Patienten mit hyperkinetischen Bewegungsstörungen ungeklärter Ursache zu erforschen, um dadurch die Mutationsvielfalt und das klinische Ausmaß von *ADCY5*-assoziierten Dyskinesien weiter aufzuklären. Hierzu wurden für insgesamt 116 Patienten, die jeweils an einer ungeklärten, gemischt-hyperkinetischen Bewegungsstörung erkrankt waren und klinisch mit den bisher publizierten Fällen *ADCY5*-positiver Patienten übereinstimmten oder Überschneidungen mit diesen aufwiesen, alle Exons des *ADCY5*-Gens sequenziert und anschließend computergestützt auf pathologische Veränderungen analysiert. Durch Unterschiede im Phänotyp oder zusätzliche Symptome der potentiellen Mutationsträger sollte das klinische Spektrum der *ADCY5*-assoziierten Dyskinesien erweitert werden. Für diesen Teil der Arbeit wurden DNA-Proben von 108 einzelnen Individuen im Rahmen eines *Screenings* sowie von acht weiteren Patienten aus vier Familien untersucht.

2 Patienten, Material und Methoden

Das folgende Kapitel befasst sich mit den Patienten, für welche die genetischen Untersuchungen durchgeführt wurden, sowie mit den dabei verwendeten Materialien und Methoden.

2.1 Patienten

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden aus venösem Blut extrahierte DNA-Proben von Patienten verwendet, welche entweder an einer zerebellären Ataxie oder an einer gemischt-hyperkinetischen Bewegungsstörung ungeklärter Ursache erkrankt sind. Die Diagnose wurde in allen Fällen von einem Spezialisten für Bewegungsstörungen gestellt. Allen Patienten, für die im Rahmen dieser Arbeit molekulargenetische Analysen stattfanden, wurde eine anonymisierte Patientenkennummer zugeordnet. Diese wurde in der gesamten Arbeit verwendet und ist in den Stammbäumen der nachfolgend vorgestellten Familien jeweils unter dem Symbol der Personen angegeben. Von allen Patienten oder deren Eltern liegt eine schriftliche Einwilligungserklärung vor. Für alle Teilstudien wurde eine Stellungnahme der Ethikkommission der Universität zu Lübeck eingeholt (siehe Anhang, Abschnitt 7.4).

2.1.1 Patienten mit zerebellärer Ataxie und deren Familienmitglieder

In diesem Teil der Arbeit wurde das Erbgut der Familienmitglieder zweier von Ataxie betroffenen Roma-Familien aus Serbien untersucht: Familie DI mit zehn erkrankten Individuen in zwei aufeinanderfolgenden Generationen und Familie DII mit drei erkrankten Individuen ebenfalls in zwei aufeinanderfolgenden Generationen (siehe Abbildung 2.1).

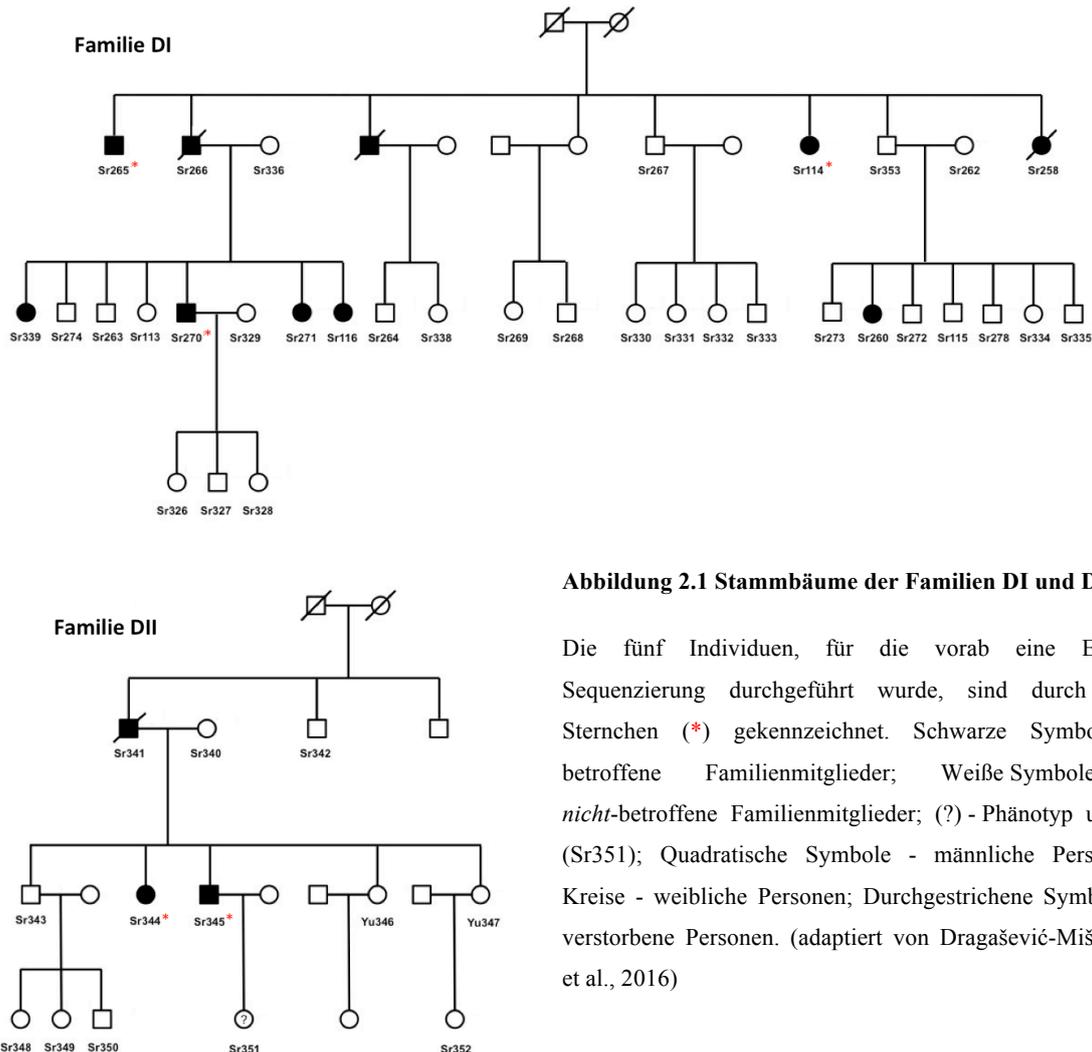


Abbildung 2.1 Stammbäume der Familien DI und DII.

Die fünf Individuen, für die vorab eine Exom-Sequenzierung durchgeführt wurde, sind durch rote Sternchen (*) gekennzeichnet. Schwarze Symbole - betroffene Familienmitglieder; Weiße Symbole - nicht-betroffene Familienmitglieder; (?) - Phänotyp unklar (Sr351); Quadratische Symbole - männliche Personen; Kreise - weibliche Personen; Durchgestrichene Symbole - verstorbene Personen. (adaptiert von Dragašević-Mišković et al., 2016)

Alle betroffenen Mitglieder der beiden Familien stellten sich mit vertikalem oder horizontalem Fixationsnystagmus, Dysarthrie, leicht- bis mittelgradiger Ataxie der Extremitäten und mittelgradiger bis starker Gangataxie vor. Detaillierte Informationen zu den Symptomen und Befunden der erkrankten Familienmitglieder sind in Abschnitt 7.3.2 des Anhangs tabellarisch aufgelistet. Die Betroffenen beider Familien zeigten eine ähnliche klinische Symptomatik. Beide Familien tragen denselben Nachnamen und haben denselben Heimatort. Eine gemeinsame Abstammung wurde jedoch von beiden Familien bestritten.

Auch wenn das genaue erstmalige Auftreten der Symptome nicht in allen Fällen zu ermitteln war, berichteten die meisten Patienten, dass die Gangunsicherheit im Alter von ca. 18 Jahren bereits bestand. Die Erkrankung war langsam fortschreitend, sodass die Patienten bei den Verlaufskontrollen jeweils ca. zehn Jahre nach der Erstuntersuchung weiterhin selbstständig laufen konnten (Altersbereich bei Erstuntersuchung: 16-65 Jahre).

Für fünf der erkrankten Individuen erfolgten im Vorfeld Exom-Sequenzierungen (WES) (drei aus Familie DI und zwei aus Familie DII, siehe Abbildung 2.1). Diese wurden von der Firma Atlas Biolabs GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die dabei generierten Daten wurden dann im Rahmen dieser Arbeit gefiltert und analysiert (siehe 2.3.7.1), um die krankheitsverursachende Mutation der betroffenen Familienmitglieder zu finden. Von 47 Familienmitgliedern lag genetisches Material für die hier durchgeführten, weiterführenden Analysen vor.

Nachdem die genetische Ursache der Erkrankung bei den oben genannten Familien ergründet werden konnte, wurden anschließend weitere Personen durch gezielte Genanalysen mithilfe von Sanger-Sequenzierungen auf die gefundene Mutation untersucht: Zwei an zerebellärer Ataxie erkrankte Brüder einer weiteren Roma-Familie (SCN72 & SCN73) und sechs an zerebellärer Ataxie erkrankte Individuen mit Roma-Herkunft, bei denen die Erkrankung sporadisch aufgetreten war. Für diese sechs Patienten wurden die Analysen freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Kostić durchgeführt.

Ferner wurden für die drei Roma-Familien und eine weitere Familie aus Bulgarien, bei der Chamova et al. (2012) dieselbe Mutation gefunden hatten (Familie B), zur weiteren Beurteilung Haplotypanalysen durchgeführt.

2.1.2 Patienten für Analysen des *ADCY5*-Gens

Für die in den folgenden Abschnitten aufgeführten Patienten wurden jeweils alle 21 proteinkodierenden Exons des *ADCY5*-Gens sequenziert. Anschließend wurden alle Varianten, die dabei entdeckt wurden, einer *in-silico*-Analyse unterzogen.

2.1.2.1 Patientenkollektiv für *ADCY5*-Screening

Eingeschlossen waren 108 Patienten, davon 79 *SGCE*-negative MDS-Patienten (40 männlich, 39 weiblich, durchschnittlicher Erkrankungsbeginn: 17,2 Jahre), 19 *PRRT2*-negative PKD-Patienten (10 männlich, 9 weiblich, durchschnittlicher Erkrankungsbeginn: 12,0 Jahre) sowie 10 Patienten, die an einer persistierenden,

generalisierten, hyperkinetischen Bewegungsstörung unklarer Genese erkrankt waren (5 männlich, 5 weiblich).

Die Patienten dieses Kollektivs wurden von Mitarbeitern der Klinik für Neurologie, Universität zu Lübeck, der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck, der Schwerpunktpraxis Neuropädiatrie, Lübeck, der Klinik für Neurologie, Charité, Humboldt-Universität, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, oder der Klinik für Neuropädiatrie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden untersucht.

2.1.2.2 Externe Patienten für *ADCY5*-Genanalysen

Darüber hinaus wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Florence C. F. Chang unter Leitung von Dr. Victor S. C. Fung (Station für Bewegungsstörungen, Klinik für Neurologie, Westmead Hospital, Sydney, Australien) acht Individuen aus vier Familien mit einer hyperkinetischen Bewegungsstörung ungeklärter Ursache in die hier durchgeführten molekulargenetischen Analysen des *ADCY5*-Gens aufgenommen (siehe Abbildung 2.2). Detaillierte Fallbeschreibungen der einzelnen Patienten finden sich unter Abschnitt 7.3.1 des Anhangs. Außerdem wurden die Eltern des Individuums K3-1 sowie die Mutter und der Großvater mütterlicherseits des Individuums K5-1 gezielt auf die jeweilige Mutation untersucht. Die Genanalysen für die Individuen K5-2 und K5-3 wurden dabei von C. Krause im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt. Für die Mutationsträger einer Variante, die bei insgesamt drei Patienten gefunden wurde, fand zusätzlich eine Haplotypanalyse statt.

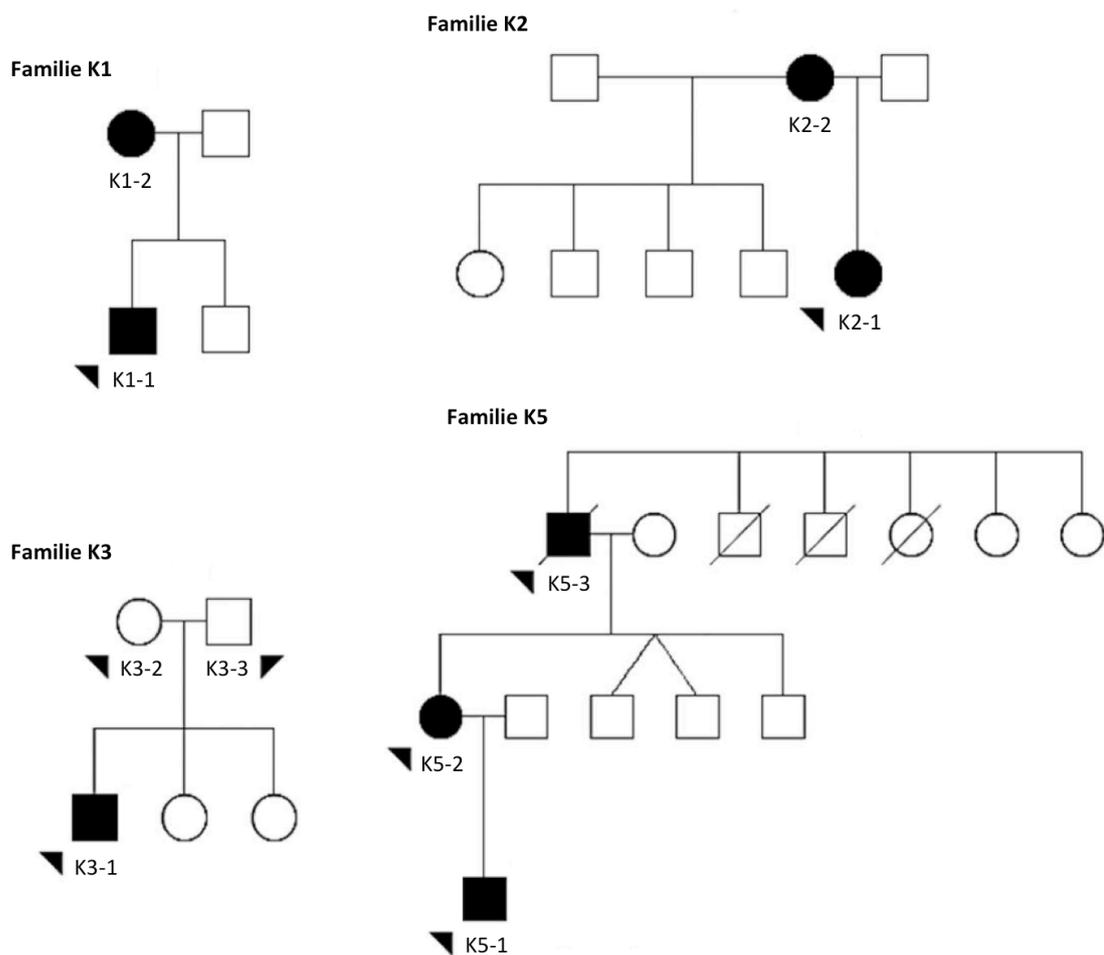


Abbildung 2.2 Stammbäume der Familien K1, K2, K3 und K5. Für die mit schwarzem Dreieck markierten Individuen wurden im Rahmen dieser Arbeit genetische Analysen durchgeführt. Schwarze Symbole - betroffene Familienmitglieder; Weiße Symbole - *nicht*-betroffene Familienmitglieder; Quadratische Symbole - männliche Personen; Kreise - weibliche Personen; Durchgestrichene Symbole - verstorbene Personen. (adaptiert von Chang et al., 2016)

2.2 Material

Die Materialien, die für die Durchführung der Untersuchungen verwendet wurden, sind nachstehend zusammen mit dem jeweiligen Hersteller bzw. Entwickler aufgelistet.

2.2.1 Chemikalien

<i>Midori Green</i>	Nippon Genetics Europe
Wasser, HPLC-grade	Avantor Performance Materials
Glycerin	Sigma-Aldrich
Agarose	Biozym Scientific
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Formamid, Hi-Di	Applied Biosystems
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	MP Biomedicals
Borsäure	Merck
Magnesiumchlorid	MP Biomedicals
<i>Gene Scan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0</i>	Applied Biosystems
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	MP Biomedicals
Betain 5 mol/L	Sigma-Aldrich
Wasser, <i>Ampuwa®</i>	Fresenius Kabi
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis
Xylencyanol	Sigma-Aldrich
Formamid	Sigma-Aldrich
Natriumacetat 5 mol/L	Sigma-Aldrich
PCR-Puffer (10x) für Taq-Polymerase	MP Biomedicals
<i>POP-7-Polymer</i>	Applied Biosystems
Sequenz-Puffer (5x) für <i>Sequencing Standard Kit</i>	Applied Biosystems
<i>BigDye® Terminator v3.1</i>	

2.2.2 Oligonukleotide

Primer	Eurofins Genomics
Mikrosatelliten	Eurofins Genomics
DNA-Leiter, 100 bp (Längenstandard)	New England Biolabs
FAM-M13F	Eurofins Genomics

2.2.3 Enzyme

Taq-Polymerase 250 U / 5 U/ μ L	MP Biomedicals
Exonuklease I (Exo I) 20000 U / 20 U/ μ L	Thermo Fisher Scientific
Wärmeempfindliche, alkalische Phosphatase (FastAP) 1000 U / 1 U/ μ L	Thermo Fisher Scientific

2.2.4 Kits

PCR-Kit <i>GC-rich PCR System</i> v16	Roche Diagnostics
DNA-Extrahierungskit <i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	Qiagen
<i>Sequencing Standard Kit BigDye® Terminator</i> v3.1	Applied Biosystems

2.2.5 Lösungen

TBE-Puffer (10x)	108 g TRIS 55 g Borsäure 7,4 g EDTA 829,6 mL <i>Ampuwa®</i> Wasser
EDTA 0,5 mol/L (pH 8)	14,61 g EDTA 85,39 mL <i>Ampuwa®</i> Wasser
Formamid-Ladepuffer	47,5 mL Formamid 2 mL EDTA 0,5 mol/L 0,01 g Bromphenolblau
Glycerin-Ladepuffer (10x)	10 mL Glycerin 19,2 mL <i>Ampuwa®</i> Wasser 0,8 mL EDTA 0,5 mol/L 0,01 g Bromphenolblau oder 0,01 g Xylencyanol

2.2.6 Geräte

Kapillarelektrophoresegeräte:

- *3130 xl Genetic Analyzer* Applied Biosystems
- *3500 xL Genetic Analyzer* Applied Biosystems

Thermocycler:

- *MJ Mini™* Bio-Rad Laboratories
- *Flex Cycler* Analytik Jena
- *PTC-100* MJ Research
- *PTC-200* MJ Research
- *Mastercycler® pro* Eppendorf

Zentrifugen:

- | | |
|--------------------------|-----------|
| - <i>Centrifuge 5804</i> | Eppendorf |
| - <i>Biofuge Pico</i> | Heraeus |
| - <i>Biofuge A</i> | Heraeus |
| - <i>Combi-Spin</i> | Biosan |
| - <i>MPS 1000</i> | Labnet |

Pipetten:

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| - <i>Research®</i> | Eppendorf |
| - <i>Research® plus</i> | Eppendorf |
| - <i>Reference®</i> | Eppendorf |
| - <i>Finnpipette</i> | Thermo Fisher Scientific |
| - <i>Proline®</i> | Labsystems |
| - <i>Labmate</i> | Biohit Oyj |
| - <i>Picus®</i> | Sartorius |

Sonstige Geräte:

- | | |
|--|-----------------------|
| - Nukleinsäuremessgerät <i>ND-1000</i> | Peqlab Biotechnologie |
| - Geldokumentationsgerät <i>DH-50</i> | Biostep |
| - Vortexmischer <i>lab dancer</i> | IKA Werke |

2.2.7 Software

- | | |
|---|---------------------------------|
| <i>Sequencing Analysis v5.3.1</i> | Applied Biosystems |
| <i>Sequencing Analysis v5.4</i> | Applied Biosystems |
| <i>Data Collection Software v3.0</i> | Applied Biosystems |
| <i>3500 Data Collection Software v1.0</i> | Applied Biosystems |
| <i>GeneMapper Software v4.0</i> | Applied Biosystems |
| <i>ND-1000 v3.8.1</i> | Peqlab Biotechnologie |
| <i>BioDocAnalyze</i> | Biometra |
| <i>Sequencher Demo v5.1</i> | Gene Codes Corporation |
| <i>4Peaks v1.7.1</i> | A. Griekspoor und Tom Groothuis |

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, PCR-Platten, Eppendorfgefäße etc. wurden von den Firmen Sarstedt und Starlab bezogen.

2.3 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die Methoden erläutert, welche in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kamen. Die Untersuchungen fanden in den Laboren des Instituts für Neurogenetik der Universität zu Lübeck statt.

2.3.1 DNA-Extraktion

Größtenteils lagen die zur Durchführung der nachfolgenden Untersuchungen benötigten DNA-Proben bereits vor. Diese wurden vorab von Mitarbeitern des Instituts für Neurogenetik der Universität zu Lübeck nach Standardprotokollen aus Patientenblut isoliert. Für einzelne Patienten musste jedoch zunächst DNA-Material aus venösem EDTA-Blut extrahiert werden, bevor die weiteren Analysen durchgeführt werden konnten. Dies geschah mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit nach folgendem Protokoll:

- 20 µL Qiagen Proteinase K vorlegen und 200 µL EDTA-Blut, 4 µL RNase A und 200 µL AL-Puffer dazugeben (15 s auf den Vortexmischer)
- Inkubation für 15 min bei 56 °C
- Kurz zentrifugieren
- 200 µL Ethanol hinzufügen (15 s auf den Vortexmischer)
- Kurz zentrifugieren
- In ein QIAamp Spin Column überführen
- Zentrifugieren bei 8000 UpM für 1 min
- Column in ein neues 2 mL Eppendorf-Gefäß
- 500 µL AW1 Puffer hinzugeben
- Zentrifugieren bei 8000 UpM für 1 min
- Column in ein neues 2 mL Eppendorf-Gefäß
- 500 µL AW2 Puffer hinzugeben
- Zentrifugieren bei 13000 UpM für 3 min
- Column in ein neues 2 mL Eppendorf-Gefäß
- Zentrifugieren bei 13000 UpM für 1 min
- Column in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß
- 200 µL HPLC Wasser hinzufügen
- Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur
- Zentrifugieren bei 8000 UpM für 1 min

Die so gewonnenen DNA-Proben wiesen Konzentrationen von ca. 34 ng/µL auf.

2.3.2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nukleinsäuremessgerät *ND-1000* nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz: Nacheinander wird dabei in je 1 μL der zu untersuchenden Probe und 1 μL der Trägerlösung die Absorption von Licht bestimmter Wellenlängen gemessen. Die Konzentration der Probe wird anschließend mithilfe des Programms *ND-1000* errechnet.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) findet eine *in-vitro*-Amplifizierung von DNA-Abschnitten statt (Mullis und Faloona, 1987). Sie kam in allen Versuchsteilen zum Einsatz, da die Ausgangskonzentration in den DNA-Proben der Patienten für die weiteren Versuche um mehrere Zehnerpotenzen zu gering war. Ein typischer Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.1 gezeigt. Neben den Reaktionsgefäßen mit Patienten-DNA wurde immer eine Negativkontrolle mit angesetzt, um später gegebenenfalls eine Verunreinigung ausschließen zu können.

Tabelle 2.1 Reaktionsansatz einer Standard-PCR. F - Vorwärts (engl. *forward*); R - Rückwärts (engl. *reverse*).

Reagenz	Konzentration	Volumen [μL]
Genomische DNA	$\approx 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$	5
PCR-Puffer	10x	1
dNTPs	1 $\text{pmol}/\mu\text{L}$	2
F-Primer	10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$	0,5
R-Primer	10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$	0,5
Taq-Polymerase	5 $\text{U}/\mu\text{L}$	0,07
HPLC-grade Wasser		0,93
Gesamt		10

Die Reaktion findet in sogenannten Thermocyclern statt und lässt sich in folgende Abschnitte aufteilen:

Denaturierung: Das Erhitzen des Reaktionsgemischs auf 95 °C bewirkt das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen der Patienten-DNA, sodass diese anschließend in Form von Einzelsträngen vorliegt.

Primer-Anlagerung: Nun können sich die Primer, welche so gewählt sind, dass sie komplementär zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz sind, an die Einzelstränge anlagern (*annealing*). Die hierbei verwendete *annealing*-Temperatur T_a

hängt von Länge und Nukleotidzusammensetzung der Primer ab und lag bei den verwendeten Primern zwischen 60 und 65 °C (siehe Tabelle 7.1 des Anhangs).

Elongation: Bei 72 °C synthetisiert die Taq-Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*) an den 3'-Enden der Primer einen komplementären DNA-Strang. Als Substrate dienen ihr dabei die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), welche gleichzeitig die Energie für die Elongation liefern.

Dieser Zyklus wird insgesamt 35 Mal wiederholt. Da neu synthetisierte DNA-Stränge jeweils als neue Matrize für den nächsten Zyklus fungieren, findet die Amplifizierung exponentiell statt und erzeugt dadurch genug Kopien der gewünschten Sequenz für den nächsten Versuchsteil. Die Elongationszeit t_E ist proportional zur Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, da die Taq-Polymerase mit einer konstanten Geschwindigkeit von ca. 60 dNTPs pro Sekunde arbeitet. Das allgemeine Schema sieht dann wie folgt aus:

Reaktionsschritt		Zeit	Temperatur [°C]
Anfangsdenaturierung		5 min	95
35 Zyklen:	Denaturierung	30 s	95
	Primer-Anlagerung	30 s	T_a (60-65)
	Elongation	t_E (30-60 s)	72
Endelongation		10 min	72
Lagerung			4

Bei noch nicht etablierten Primern musste die *annealing*-Temperatur zunächst experimentell (zum Teil durch eine Gradienten-PCR) ermittelt werden. Auch die genaue Zusammensetzung des Reaktionsgemischs variierte je nach Primer. So wurde für einige PCRs die eingesetzte Primer- oder DNA-Menge angepasst oder der Reaktionsansatz durch spezielle Zusätze wie Betain, Magnesiumchlorid oder DMSO ergänzt. In einigen Fällen wurde das *GC-rich* PCR System v16 verwendet, um den gewünschten Abschnitt zu amplifizieren.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese schließt sich an die PCR aus Abschnitt 2.3.3 an und kontrolliert deren Erfolg. Zunächst werden 3 μL des PCR-Produkts mit 3 μL Ladepuffer (1x) versetzt. Nun werden die Proben einschließlich Negativkontrolle neben 6 μL der 100 bp DNA-Leiter in die Ladetaschen eines Agarosegels aufgetragen. Dieses wird daraufhin in eine mit TBE-Puffer (1x) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und senkrecht zu den aufgetragenen Proben eine Spannung von 120 V angelegt. Durch die Spannung und die Netzstruktur des Gels werden DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung der Größe nach aufgetrennt, wobei die kleinsten Fragmente mit der größten Geschwindigkeit zur Anode wandern. Der Vorgang dauert je nach Größe der zuvor amplifizierten Sequenz 20 bis 40 Minuten. Abschließend wird das Gel mithilfe des Geldokumentationsgeräts *DH-50* unter ultraviolettem Licht betrachtet und mithilfe einer Digitalkamera und der Bildverarbeitungssoftware *BioDocAnalyze* ausgewertet. DNA-Fragmente stellen sich hierbei als Banden dar. Die den Patientenproben zugehörigen Banden werden nun mit den Banden der DNA-Leiter verglichen und können so einer bestimmten Fragmentlänge zugeordnet werden. Die PCR war erfolgreich, wenn bei den Patientenproben ausschließlich die Bande mit der erwarteten Länge zu sehen ist und die Negativkontrolle keine Bande aufweist. Diese Konstellation schließt eine unspezifische Primer-Anlagerung und eine Verunreinigung der verwendeten Reagenzien aus.

Das für die Elektrophorese benötigte Agarosegel wurde nach folgendem Protokoll hergestellt:

- Lösen von 4,5 g Agarose in 300 mL TBE-Puffer (1x)
- Aufkochen der Lösung in einer Mikrowelle
- Zugabe von 15 μL Midori Green (fluoreszierender Farbstoff)
- Abkühlen auf ca. 60 °C
- Gießen des flüssigen Gels in eine mit Aussparungen versehene Kammer, sodass ein Gel mit ca. 15 μL großen Ladetaschen entsteht
- Abkühlen bei Raumtemperatur und dadurch Aushärten des Gels

2.3.5 DNA-Sequenzierung

In diesem Versuchsteil wird die Basenabfolge des zuvor amplifizierten DNA-Abschnitts entschlüsselt. Die hier verwendete Technik beruht auf der von Sanger et al. (1977) entwickelten Didesoxymethode, welche von Prober et al. (1987) ergänzt und abgeändert wurde. Vor der eigentlichen Sequenzreaktion findet eine enzymatische Aufreinigung des

PCR-Produkts aus Abschnitt 2.3.3 statt. Dafür werden die 7 μL PCR-Produkt mit 1 μL einer 1:2 Mischung der Enzyme Exonuklease I (Exo I) und der wärmeempfindlichen, alkalischen Phosphatase (FastAP) versetzt. Exo I dient der Verdauung der im Ansatz enthaltenen Primer und Oligonukleotide. FastAP entfernt überschüssige dNTPs. Im Thermocycler findet dieser Schritt mit folgendem Programm statt:

Reaktionsschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Inkubation	15	37
Enzyminaktivierung	15	85
Lagerung		4

Anschließend wird mit 2 μL des auf diese Weise aufgereinigten PCR-Produkts die Sequenz-PCR durchgeführt. Den allgemeinen Ansatz hierfür zeigt Tabelle 2.2:

Tabelle 2.2 Reaktionsansatz der Sequenz-PCR. F - Vorwärts (engl. *forward*); R - Rückwärts (engl. *reverse*).

Reagenz	Konzentration	Volumen [μL]
Aufgereinigtes PCR-Produkt		2
Sequenz-Puffer	5x	1,5
F- oder R-Primer	10 pmol/ μL	0,5
Sequencing Standard Kit BigDye® Terminator v3.1		1
HPLC-grade Wasser		5
Gesamt		10

Ähnlich wie bei der Standard-PCR enthält das hier verwendete Kit eine thermostabile Polymerase, welche mit der amplifizierte Sequenz als *template* am 3'-Ende des sich komplementär anlagernden Primers Nukleotide anfügt. Anders als bei der Standard-PCR sind hier jedoch neben dNTPs auch ddNTPs (Didesoxyribonukleosidtriphosphate) enthalten. Diese sind nach Basen eingeteilt je mit einem von vier verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert und besitzen am C3-Atom des Zuckers anstelle einer Hydroxylgruppe nur ein Wasserstoffatom. Jedes Mal, wenn während der Elongation ein ddNTP von der Polymerase eingebaut wird, führt dies zum Kettenabbruch. Da der Einbau von ddNTPs zufällig geschieht, entstehen während dieses Schrittes Produkte jeder möglichen Länge.

Das verwendete Programm am Thermocycler sieht dabei wie folgt aus:

Reaktionsschritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]
Anfangsdenaturierung	60	96
25 Zyklen:		
Denaturierung	10	96
Primer-Anlagerung	5	60
Elongation	t_E (60-120)	60
Lagerung		4

Die Reaktion findet hierbei linear statt, da nur ein Primer verwendet wird. Für DNA-Abschnitte bis 500 bp Länge wurde eine Elongationszeit von 60 Sekunden gewählt, darüber eine Elongationszeit von 120 Sekunden. Anschließend wird das Produkt der Sequenz-PCR einer Natriumacetat-Fällung unterzogen:

- Zugabe von 50 μ L Ethanol, 2 μ L 5 mol/L Natriumacetat-Lösung und 10 μ L HPLC-*grade* Wasser
- Inkubation für 15 min abgedunkelt bei Raumtemperatur
- Zentrifugieren bei 3700 UpM für 45 min
- Überstand dekantieren

Dem folgt ein Wasch-Schritt mit 70 % Ethanol:

- Zugabe von 49 μ L Ethanol und 21 μ L HPLC-*grade* Wasser
- Zentrifugieren bei 3700 UpM für 30 min
- Überstand dekantieren
- Trocknen des *Pellets* für 15 min bei 55 °C auf dem Thermocycler

Die DNA-Sequenzen im *Pellet* werden nun in 15 μ L Hi-Di Formamid gelöst und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die so gewonnenen Fragmente wurden anschließend mithilfe der Kapillarelektrophoresegeräte *3130 xl Genetic Analyzer* und *3500 xL Genetic Analyzer* aufgetrennt. Automatisiert werden dabei je 16 Proben (*3130 xl*) bzw. 24 Proben (*3500 xL*) gleichzeitig in mit POP-7-Polymer gefüllte Kapillare injiziert. Durch die angelegte Spannung bewegen sich nun die DNA-Fragmente unterschiedlichster Länge durch das Polymer in den Kapillaren in Richtung Anode. Kurz vor Erreichen der Anode durchlaufen die Fluoreszenz-markierten Fragmente einen Laser, welcher den jeweiligen Farbstoff anregt. Die vier möglichen, emittierten Wellenlängen sind Nukleotid-spezifisch, werden nacheinander registriert und in digitale, farbliche Kurven (sogenannte Chromatogramme) umgewandelt. Die Geräte erreichen dabei eine Messgenauigkeit, die es ermöglicht, zwischen Längenunterschieden von einem einzigen Nukleotid zu differenzieren. Auf diese

Weise erhält man die Basenabfolge des untersuchten DNA-Abschnitts. Diese wurde anschließend computergestützt analysiert (siehe 2.3.7.3).

2.3.6 Haplotypanalyse

Die Haplotypanalyse beginnt mit einer modifizierten PCR. Die verwendeten Primer sind standardisiert und umgeben sogenannte Mikrosatelliten, welche jeweils einem bestimmten Genlokus zugeordnet werden können. Dem Vorwärts-Primer wird hierbei jeweils am 5'-Ende die FAM-M13F Sequenz 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3' angehängt. Zwischen den verwendeten Primern liegen Sequenzen, die durch kurze, sich wiederholende Abschnitte von zwei bis sieben Nukleotiden charakterisiert sind, welche als *Repeats* bezeichnet werden. Gemessen wird bei diesem Verfahren in einer Kapillarelektrophorese die Länge des amplifizierten Produkts, welche sich durch Vergleich mit den standardisierten CEPH-Kontrollen 1331-01 und 1331-02 für jeden Mikrosatelliten einer *Repeat*-Anzahl zuordnen lässt. Diese können interindividuell variieren und wurden in dieser Arbeit für Individuen bestimmt, welche dieselbe Mutation aufwiesen, jedoch aus unterschiedlichen Familien stammen. So konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Mutationen jeweils unabhängig voneinander in den einzelnen Familien entstanden waren oder ob sie von einem gemeinsamen Gründerindividuum ausgingen.

Die Haplotypanalysen wurden zunächst im Labor nach Standardprotokollen mit verschiedenen Thermocyclern und dem Kapillarelektrophoresegerät *3130 xl Genetic Analyzer* durchgeführt und anschließend computergestützt mithilfe des Programms *GeneMapper* analysiert. Für die Haplotypanalysen wurden einerseits Mikrosatelliten verwendet, die das untersuchte Gen umgeben (D3S3685, D3S3559 und D3S3624 für *ANO10*; D3S1269, D3S3636, D3S3573 und D3S3674 für *ADCY5*) und solche, die inmitten des Gens liegen (D3S3678 und D3S3647 für *ANO10*; D3S1267 für *ADCY5*). Die genauen Primer-Sequenzen und weitere Informationen zu den verwendeten Mikrosatelliten sind in Tabelle 7.2 des Anhangs zusammengestellt.

2.3.7 *In-silico-Methoden*

Im nächsten Abschnitt werden alle computergestützten Verfahren und Analysen beschrieben, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

2.3.7.1 *WES-Datensatz: Filterungsschritte*

Ausgangspunkt für das erste Projekt dieser Arbeit war eine tabellarische Auflistung aller während des WES der fünf Individuen der Roma-Familie detektierten Varianten. Diese wurden zuvor von Dr. rer. nat. Ingrid Brænne (Institut für Kardiogenetik, Universität zu Lübeck) aus den Daten des WES mithilfe des Programms *Annovar* (Wang et al., 2010) beschriftet.

Insgesamt lagen 8663 Varianten vor. Ausgeschlossen wurden zunächst alle Varianten mit Allelfrequenzen über 0,01 und alle Varianten aus *nicht*-konservierten DNA-Regionen. Die Werte für die Allelfrequenzen entstammten hierbei den Datenbanken *1000 Genomes Project* (Auton et al., 2015) und *Exome Variant Server* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). Für die weiteren Analysen wurden nun ausschließlich alle Missense-, Nonsense- und Frameshift-Varianten berücksichtigt, die alle fünf sequenzierten Patienten-Exome gemein hatten. Dies geschah zunächst unter Annahme eines dominanten Erbgangs (ein Allel mutiert), im Verlauf auch unter Berücksichtigung eines rezessiven Erbgangs (beide Allele mutiert).

2.3.7.2 *Generieren der Primer*

Die Nukleotidsequenzen der für die PCRs benötigten Primer wurden computergestützt mithilfe des Programms *Primer3Plus* (Untergasser et al., 2007) generiert und anschließend von der Firma Eurofins Genomics hergestellt. Die Primer wurden stets so gewählt, dass die Exons jeweils mit Exon-Intron-Übergängen amplifiziert wurden.

Jeder einzelne Primer sollte keine Wasserstoffbrückenbindungen mit sich selbst oder dem jeweils zugehörigen Primer des Primer-Paars ausbilden. Außerdem sollte das 3'-Ende möglichst ein Guanin (G) oder ein Cytosin (C) sein, da so eine bessere Anlagerung an die Matrize zustande kommt und die Polymerase dadurch besser binden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Primer generiert a) für alle Exons des *ADCY5*-Gens und b) für einzelne Exons von Genen, die aus der Filterung des WES-Datensatzes hervorgingen. Die Eigenschaften der verwendeten Primer sind in Tabelle 7.1 des Anhangs detailliert aufgelistet.

2.3.7.3 DNA-Sequenzanalysen

Die digitalisierte Basenabfolge der amplifizierten DNA-Abschnitte wurde mit verschiedenen Programmen analysiert. Die Qualität des Datensatzes wurde zunächst mit dem Programm *Sequencing Analysis* beurteilt. Die einzelnen Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm *4Peaks*, jedoch hauptsächlich mit dem Programm *Sequencher* auf DNA-Veränderungen untersucht. Verglichen wurden die Sequenzen dabei mit dem humanen Referenzgenom GRCh37/hg19 (*Assembly* Februar 2009, aktualisierte Version) entnommen aus der *Ensembl*-Datenbank (Zerbino et al., 2018). Für die Analyse der *ANO10*-Sequenzen wurde das Transkript NM_001204831 verwendet, für die Analyse der *ADCY5*-Sequenzen das Transkript NM_183357. Weitere Identifikationsnummern von Transkripten, die im Laufe dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3.1 (siehe S. 34) aufgeführt. Die während der Analysen detektierten Varianten wurden mithilfe der unten genannten Datenbanken und Vorhersageprogramme auf ihre potentielle Pathogenität untersucht und gegebenenfalls per Sanger-Sequenzierung noch einmal bestätigt.

2.3.7.4 Vergleich von humanen Aminosäuresequenzen mit anderen Spezies

Zur Veranschaulichung der evolutionären Konservierung einzelner Aminosäurepositionen und der umgebenden Proteinsequenz wurden die jeweiligen humanen Sequenzen denen anderer Spezies gegenübergestellt. Diese sogenannten *Alignments* wurden mit der BLAST/BLAT-Funktion (Kent, 2002; Johnson et al., 2008) der *Ensembl*-Datenbank erstellt (Zerbino et al., 2018). Details zu den miteinander verglichenen Sequenzen sind in Tabelle 7.3 des Anhangs aufgelistet.

2.3.7.5 Datenbanken

2.3.7.5.1 Datenbank ExAC

Das *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) ist eine Datenbank, welche die Daten der Exom-Sequenzierungen von 60.706 *nicht*-verwandten Individuen verschiedener Ethnien enthält. Die hier zusammengeführten Informationen stammen aus einer Vielzahl von groß angelegten, krankheitsspezifischen und populationsgenetischen Sequenzierungsprojekten (Lek et al., 2016). Die in der ExAC-Datenbank hinterlegten Allelfrequenzen fungierten als Referenzwerte und wurden neben den verwendeten Vorhersageprogrammen als Kriterium bei der Interpretation von detektierten Mutationen herangezogen. Außerdem wurden die ExAC-Allelfrequenzen aller bisher in der Literatur beschriebenen *ANO10*-Mutationen in dieser Arbeit zusammengetragen.

2.3.7.5.2 Datenbank dbSNP

Die *Single Nucleotide Polymorphism* Datenbank (dbSNP) diente als Nachschlagewerk für alle DNA-Sequenzvarianten, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden. Sie enthält weitergehende Informationen zu humanen Einzelnukleotid-Varianten und weiteren Sequenz-Veränderungen in Introns und Exons (Sherry et al., 2001).

2.3.7.6 Vorhersageprogramme

Um die potentiellen Auswirkungen der gefundenen Mutationen näher zu beziffern, wurden verschiedene Hilfsprogramme eingesetzt. Nach jeweils eigenem Algorithmus treffen diese eine Aussage über die mögliche Pathogenität und funktionelle Relevanz einer Genveränderung. Für die detektierten Mutationen wurden die Programme *MutationTaster* (Schwarz et al., 2014), *Combined annotation-dependent depletion v1.3* (CADD) (Rentzsch et al., 2019), *Polymorphism Phenotyping v2* (*PolyPhen-2*) (Adzhubei et al., 2010) und *Sorting Intolerant from Tolerant* (SIFT) (Kumar et al., 2009) verwendet. Die letzten beiden sind ausschließlich bei Missense-Mutationen anwendbar und wurden folglich nur in solchen Fällen genutzt. Das Programm CADD wurde im ersten Teil der Arbeit außerdem verwendet, um die Pathogenität aller bislang in der Literatur beschriebenen *ANO10*-Mutationen zu quantifizieren.

3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen vorgestellt. In Kapitel 3.1 werden die Daten der Analyse der Roma-Familien und weitere damit zusammenhängende Ergebnisse präsentiert. Kapitel 3.2 zeigt die Ergebnisse der *ADCY5*-Genanalysen und der damit verbundenen Untersuchungen.

3.1 Genetische Analysen der Roma-Familien DI und DII

3.1.1 Aus dem WES-Datensatz hervorgegangene Kandidatengene

Die in 2.3.7.1 beschriebenen Filterungsschritte des WES-Datensatzes, brachten insgesamt 20 Varianten hervor (siehe Tabelle 3.1). Die einzelnen Gene wurden nun mithilfe der OMIM-Datenbank (<https://omim.org/>) sowie der *PubMed*-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) einer Literaturrecherche unterzogen.

Aufgrund des vermuteten Vererbungsmusters geschah dies zunächst für die dominanten Varianten. Nach der erwarteten funktionellen Relevanz priorisiert wurde mithilfe von Sanger-Sequenzierungen Gen für Gen der Mutationsstatus zunächst für jeweils 36 Familienmitglieder von DI und DII überprüft. Jedoch stimmte dieser für keine der untersuchten, in Tabelle 3.1 hellgrau markierten, Varianten annähernd mit dem Krankheitsstatus überein.

Daraufhin wurde nun auch eine autosomal-rezessive Vererbung in Betracht gezogen. Während der Literaturrecherche fand sich hierbei die beim WES detektierte homozygote c.1150_1151delTT Variante des *ANO10*-Gens (in Tabelle 3.1 dunkelgrau markiert) in einer Publikation über eine an zerebellärer Ataxie erkrankte Roma-Familie aus Serbien mit derselben Mutation (Vermeer et al., 2010), was diese Variante zur wahrscheinlichsten potentiellen genetischen Ursache für die Erkrankung in den Familien DI und DII machte.

Die anschließend durchgeführte *in-silico*-Analyse stuft die c.1150_1151delTT Variante als potentiell krankheitsverursachend ein (*MutationTaster: disease causing*, mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,0; *CADD-Score: 34,0*; *ExAC-Allelfrequenz: 0*).

Tabelle 3.1 WES-Datensatz für Individuen aus Familie DI und DII nach Filterungsschritten. Aufgelistet sind alle seltenen Varianten (Häufigkeit des selteneren Allels < 0,01) aus dem WES-Datensatz, welche die analysierten Individuen Sr114, Sr265, Sr270, Sr344 und Sr345 gemein hatten und nicht durch die Filterungsschritte ausgeschlossen wurden. Der obere Teil der Tabelle beinhaltet alle gemeinsamen dominanten Varianten (Mutationen auf einem der beiden Allele), der untere die rezessiven (selbe Mutation auf beiden Allelen). Varianten, für die der Mutationsstatus für die Mitglieder der Familien DI und DII überprüft wurde, sind hell- bzw. dunkelgrau hinterlegt. dbSNP rs# - Referenz-Identifikationsnummer der *Single Nucleotide Polymorphism* Datenbank; del - Deletion; fs - Frameshift; Ter - Stopcodon; dup - Duplikation; n. v. - nicht vorhanden. (adaptiert von Dragašević-Mišković et al., 2016)

Name des Gens	Art der Mutation	Transkript	Mutation (DNA-Ebene; Protein-Ebene)	dbSNP rs#	Anzahl mutierter Allele				
					Sr114	Sr265	Sr270	Sr344	Sr345
<i>KCNJ12;KCNJ18</i>	Missense-Mutation	NM_001194958	c.C554T; p.Ala185Val	rs73979896	1	1	1	1	1
<i>CLASP2</i>	Missense-Mutation	NM_001207044	c.C2684T; p.Thr895Ile	rs187113660	1	1	1	1	1
<i>TRANK1</i>	Missense-Mutation	NM_014831	c.G739A; p.Val247Ile	n. v.	1	1	1	1	1
<i>C11orf21</i>	Missense-Mutation	NM_001142946	c.G3A; p.Met1Ile	rs188839109	1	1	1	1	1
<i>OR13D1</i>	Missense-Mutation	NM_001004484	c.A424G; p.Thr142Ala	rs139937095	1	1	1	1	1
<i>CDC27</i>	Frameshift Deletion	NM_001114091	c.714delT; p.Ala238fs	rs112848754	1	1	1	1	1
<i>MUC2</i>	Frameshift Deletion	NM_002457	c.4621delA; p.Thr1541fs	n. v.	1	1	1	1	1
<i>ZNF528</i>	Missense-Mutation	NM_032423	c.G1328C; p.Gly443Ala	rs61978639	1	1	2	1	1
<i>CCDC66</i>	Missense-Mutation	NM_001012506	c.G1672A; p.Glu558Lys	rs4681904	2	2	1	1	1
<i>YES1</i>	Missense-Mutation	NM_005433	c.C107T; p.Pro36Leu	n. v.	1	2	2	1	1
<i>DHX30</i>	Missense-Mutation	NM_138615	c.C2641T; p.Pro881Ser	n. v.	2	2	1	1	1
<i>MYH11</i>	Missense-Mutation	NM_002474	c.G5226C; p.Glu1742Asp	rs144421849	2	2	1	1	1
<i>P4HTM</i>	Missense-Mutation	NM_177938	c.A679G; p.Ile227Val	rs140290144	2	2	2	1	1
<i>HHATL</i>	Nonsense Mutation	NM_020707	c.C1240T; p.Arg414Ter	rs199499695	2	2	1	2	2
<i>ANO10</i>	Frameshift Deletion	NM_001204831	c.1150_1151del; p.Leu384AsnfsTer91	n. v.	2	2	2	2	2
<i>HRNR</i>	Frameshift Deletion	NM_001009931	c.1delA; p.Met1fs	rs34061715	2	2	2	2	2
<i>CCR8</i>	Missense-Mutation	NM_005201	c.T268C; p.Phe90Leu	n. v.	2	2	2	2	2
<i>CHST15</i>	Frameshift Deletion	NM_001270765	c.1366delC; p.Arg456fs	rs5788645	2	2	2	2	2
<i>C21orf62</i>	Missense-Mutation	NM_001162496	c.T543A; p.Phe181Leu	rs74617086	2	2	2	2	2
<i>CLTCL1</i>	Frameshift Insertion	NM_001835	c.3601dupG; p.Val1201fs	rs11386977	2	2	2	2	2

3.1.2 Gezielte Analysen des *ANO10*-Gens für Mitglieder von DI und DII und weitere an zerebellärer Ataxie erkrankte Individuen

Die anschließenden, gezielten Sequenzierungen von Exon 6 des *ANO10*-Gens für die Familienmitglieder beider Roma-Familien zur Überprüfung, ob der Genotyp jeweils mit dem Krankheitsstatus übereinstimmt, bestätigte die c.1150_1151delTT Mutation in homozygoter Form bei acht von neun Erkrankten in der Familie DI und bei allen drei Erkrankten in Familie DII. Folglich wurde eine Phänokopie entdeckt: Patientin Sr260, die eine leichtgradige Gang- und Extremitätenataxie zeigte, bei der sich jedoch in der Bildgebung ebenfalls eine Verkalkung der Basalganglien gezeigt hatte, welche die Symptome erklären würde. Zusätzlich fand sich die Deletion in heterozygotem Zustand bei achtzehn *nicht*-erkrankten Individuen der Familie DI und sieben der Familie DII (siehe Abbildung 3.2, S. 37). Hervorzuheben ist, dass auch zwei eingeheiratete Personen (Sr336 und Sr340) heterozygote Träger der Deletion sind. Der Mutationsstatus aller analysierten Individuen ist in Abbildung 3.1 neben dem jeweiligen Symbol vermerkt (Dragašević-Mišković et al., 2016).

Durch gezielte Genanalysen wurde anschließend dieselbe c.1150_1151delTT Mutation in homozygotem Zustand zusätzlich bei zwei Brüdern einer weiteren Roma-Familie aus Serbien nachgewiesen (SCN72 und SCN73). Außerdem fanden die Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Kostić die Deletion bei drei der sechs zusätzlichen Patienten mit zerebellärer Ataxie, bei denen die Erkrankung sporadisch aufgetreten war.

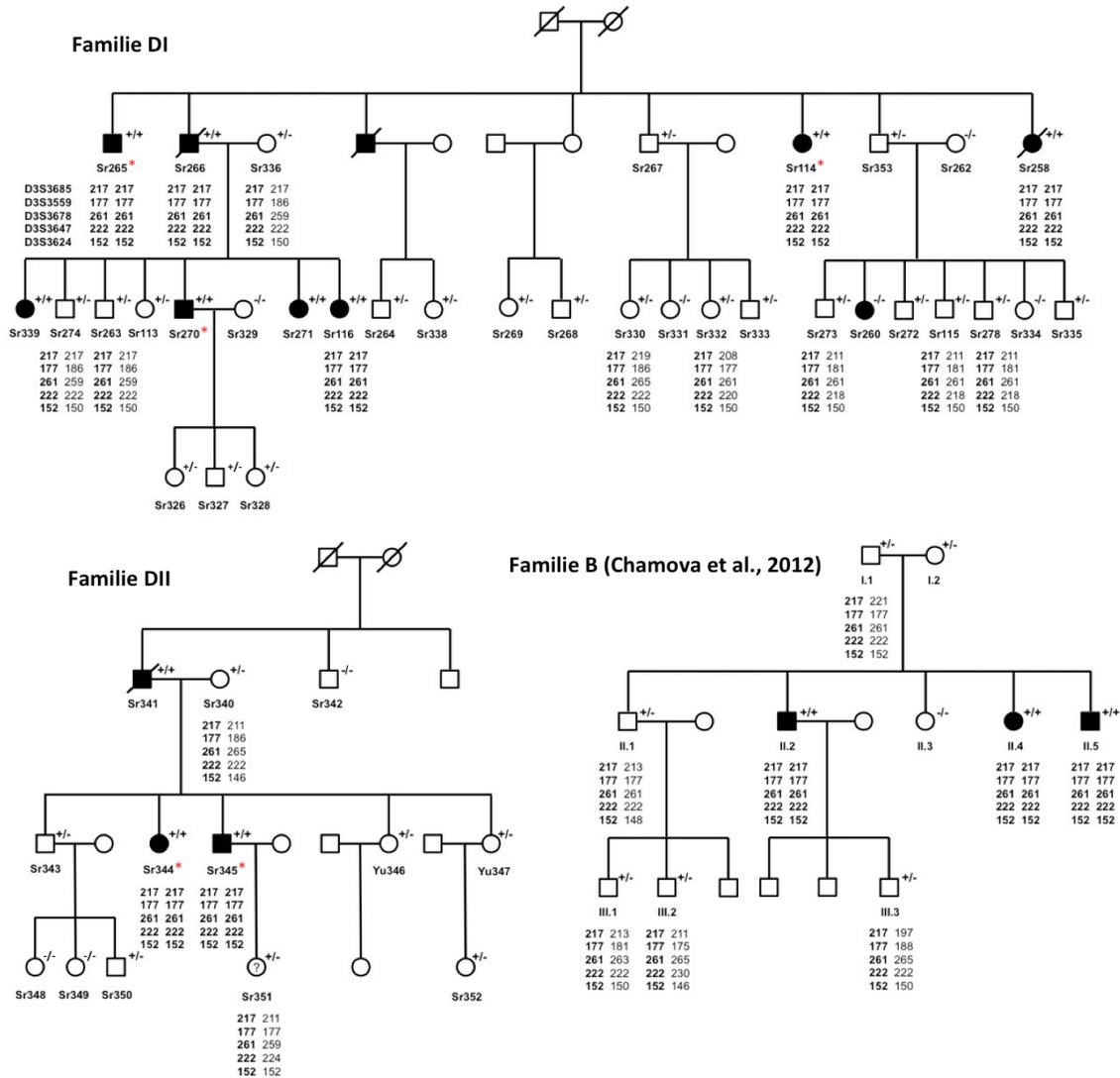
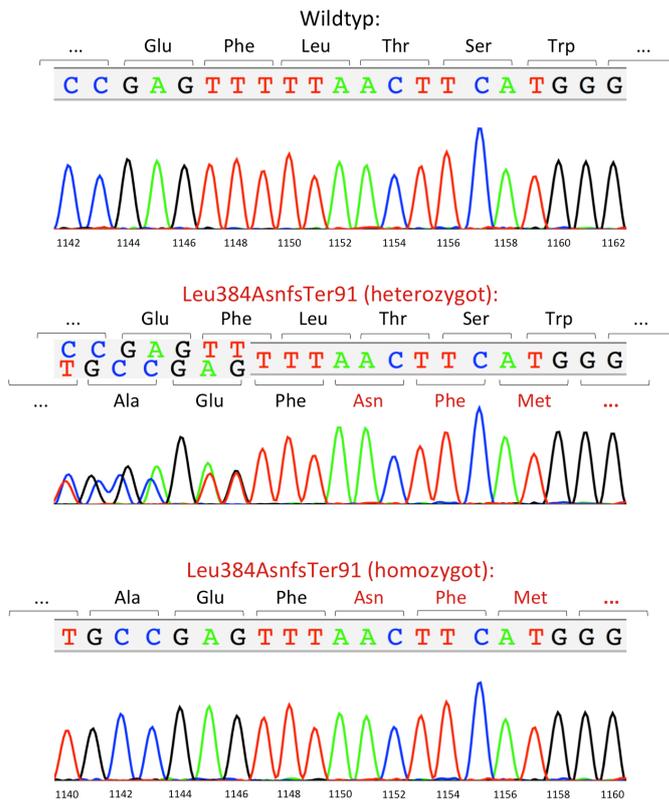


Abbildung 3.1 Stammbäume der Familien DI, DII und B mit den Ergebnissen der Gen- und Haplotypanalysen. Für alle Familienmitglieder, bei denen eine molekulargenetische Untersuchung von Exon 6 des *ANO10*-Gens durchgeführt wurde, ist der Status der c.1150_1151delTT Mutation vermerkt (“+/+” - homozygote Mutationsträger; “+/-“ - heterozygote Mutationsträger; “-/-“ - Wildtyp). Die mithilfe von WES analysierten Individuen sind durch rote Sternchen (*) markiert. Die ermittelten *Repeat*-Längen für die Mikrosatelliten D3S3685, D3S3559, D3S3678, D3S3647 und D3S3624 sind unter dem Symbol der jeweiligen Person aufgeführt. Der krankheitsassoziierte Haplotyp (217, 177, 261, 222, 152) ist fett gedruckt. Die Analyse zweier Brüder einer weiteren Roma-Familie aus Serbien (SCN72 & SCN73) ergab ebenfalls die c.1150_1151delTT Mutation in homozygotem Zustand sowie den krankheitsassoziierten Haplotyp (hier nicht abgebildet). Schwarze Symbole - betroffene Familienmitglieder; Weiße Symbole - *nicht*-betroffene Familienmitglieder; (?) - Phänotyp unklar (Sr351); Quadratische Symbole - männliche Personen; Kreise - weibliche Personen; Durchgestrichene Symbole - verstorbene Personen. (adaptiert von Dragašević-Mišković et al., 2016)



Sequenz-PCR der *Reverse-Primer* verwendet wurde (siehe Tabelle 7.1, S. 75). Durch die Deletion zweier Basenpaare verschiebt sich das Leseraster (Frameshift), wodurch ab Proteinposition 384 falsche Aminosäuren kodiert werden (Asn, Phe, Met, ...). Schließlich entsteht durch die Deletion 91 Positionen weiter in 5'→3'-Richtung ein Stoppcodon, wodurch es zu einem vorzeitigen Kettenabbruch kommt (hier nicht abgebildet). CDS - *coding sequence* (kodierende Sequenz). (Eigene Darstellung)

Abbildung 3.2 Chromatogramme der mutierten und der Wildtyp-Sequenz der Region des *ANO10*-Gens, welche an die CDS-Positionen 1150 und 1151 grenzt. Dargestellt sind die Basen, welche für die Proteinposition 384 und die angrenzenden Aminosäuren kodieren. Horizontale, eckige Klammern kennzeichnen die einzelnen Basentriplets und damit das Leseraster. Oben ist die Wildtyp-Sequenz der Region zu sehen; darunter der gleiche Genabschnitt mit der c.1150_1151delTT Mutation, wie sie bei heterozygoten Mutationsträgern gefunden wurde und unten das Chromatogramm eines erkrankten Individuums, bei dem die c.1150_1151delTT Mutation in homozygotem Zustand vorliegt. In der Mitte ist die Überlagerung von Wildtyp- und mutierter Sequenz zu erkennen. Sie zeigt sich links der Mutation (in Richtung 5'-Ende), da für die

3.1.3 Haplotypanalysen der c.1150_1151delTT Mutationsträger

Die Haplotypanalysen aller drei serbischen Familien und der bulgarischen Familie (Familie B) (Chamova et al., 2012) ergaben für alle Mutationsträger einen gemeinsamen Haplotyp, der für alle homozygoten Träger in homologer Form vorlag (fettgedruckt hervorgehoben in Abbildung 3.1). Am Beispiel des Mikrosatellitenmarkers D3S3678 ist in Abbildung 3.3 ein exemplarischer Ausschnitt einer solchen Haplotypanalyse dargestellt.

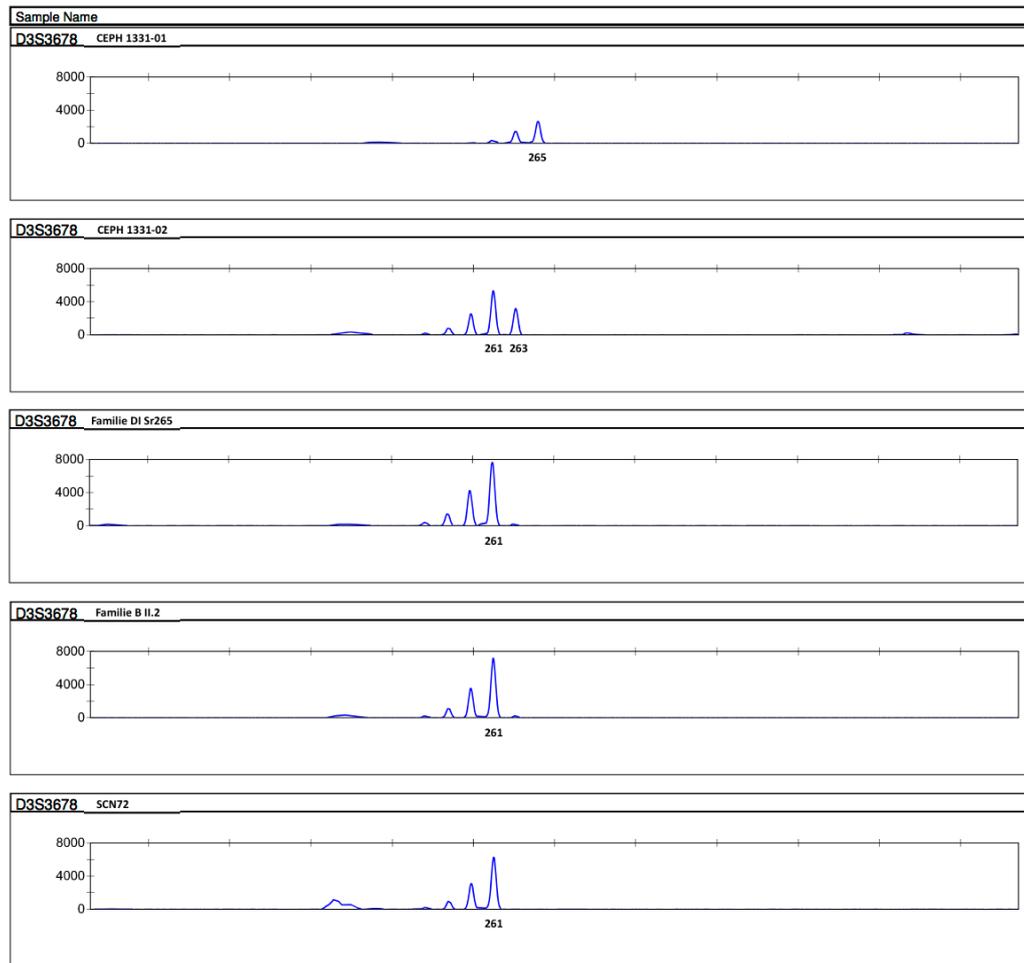


Abbildung 3.3 Ausschnitt aus den Haplotypenanalysen der *ANO10*-Mutationsträger. Gezeigt sind die Chromatogramme von drei homozygoten Trägern der c.1150_1151delTT *ANO10*-Mutation aus den verschiedenen Familien und von den CEPH-Kontrollen 1331-01 und 1331-02 für den Marker D3S3678. Es ist deutlich zu erkennen, dass die drei homozygoten Mutationsträger dieselbe *Repeat*-Länge in homologer Form aufweisen.

3.1.4 Berechnete CADD-Scores für alle bekannten ANO10-Mutationen

Tabelle 3.2 CADD-Scores und Anzahl der Mutationsträger in der ExAC-Datenbank für alle bisher beschriebenen ANO10-Mutationen. Für alle bekannten ANO10-Varianten ist jeweils der berechnete CADD-Score und die aus der ExAC-Datenbank abgerufene Allelfrequenz aufgeführt (Anzahl mutierter Allele im Verhältnis zur Gesamtanzahl der in der Datenbank hinterlegten Allele). ExAC - *Exome Aggregation Consortium*; del - Deletion; fs - Frameshift; Ter - Stopcodon; dup - Duplikation; ex - Exon. (adaptiert von Dragašević-Mišković et al., 2016)

Mutation 1				Mutation 2				Quelle
DNA-Ebene	Protein-Ebene	CADD	ExAC	DNA-Ebene	Protein-Ebene	CADD	ExAC	
c.1150_1151delTT	p.Leu384AsnfsTer91	34,0	0	c.1150_1151delTT	p.Leu384AsnfsTer91	34,0	0	(Vermeer et al., 2010)
c.1476+1G>T	p.Ser432_Leu492del (ex.9del)	26,9	0	c.1604delT	p.Leu535Ter	35,0	0	(Vermeer et al., 2010)
c.1529T>G	p.Leu510Arg	28,9	0	c.1529T>G	p.Leu510Arg	28,9	0	(Vermeer et al., 2010)
c.609C>G	p.Tyr203Ter	40,0	0	c.609C>G	p.Tyr203Ter	40,0	0	(Maruyama et al., 2014)
c.132dupA	p.Asp45ArgfsTer9	28,3	51/ 115742	c.1144G>T	p.Glu382Ter	47,0	0	(Balreira et al., 2014)
c.132dupA	p.Asp45ArgfsTer9	28,3	51/ 115742	c.1843G>A	p.Asp615Asn	28,3	42/ 121114	(Balreira et al., 2014)
c.132dupA	p.Asp45ArgfsTer9	28,3	51/ 115742	c.512T>C	p.Phe171Ser	31,0	2/ 121200	(Renaud et al., 2014)
c.132dupA	p.Asp45ArgfsTer9	28,3	51/ 115742	c.1009T>G	p.Phe337Val	26,9	0	(Renaud et al., 2014)
c.132dupA	p.Asp45ArgfsTer9	28,3	51/ 115742	ex.12del	p.His600_Gln638del	n/a	n/a	(Renaud et al., 2014)
c.685G>T	p.Gly229Trp	33,0	0	c.1291C>T	p.Gln431Ter	43,0	0	(Renaud et al., 2014)
c.1214delT	p.Leu405Ter	35,0	0	c.1476+1G>T	p.Ser432_Leu492del (ex.9del)	26,9	0	(Renaud et al., 2014)
c.1668+1G>A	p.Gly493_Gln556del (ex.10del)	26,8	0	c.1668+1G>A	p.Gly493_Gln556del (ex.10del)	26,8	0	(Renaud et al., 2014)
ex.12del	p.His600_Gln638del	n/a	n/a	ex.12del	p.His600_Gln638del	n/a	n/a	(Renaud et al., 2014)
c.132dupA	p.Asp45ArgfsTer9	28,3	51/ 115742	c.132dupA	p.Asp45ArgfsTer9	28,3	51/ 115742	(Fogel et al., 2014; Minnerop und Bauer, 2015)
c.493_494dup	p.Ile166AlafsTer3	35,0	0	c.493_494dup	p.Ile166AlafsTer3	35,0	0	(Yoshida et al., 2014)

3.2 Molekulargenetische Resultate der *ADCY5*-Genanalysen

3.2.1 Screening des Patientenkollektivs

Bei der Analyse aller Exons des *ADCY5*-Gens wurden in der Gruppe der *SGCE*-negativen MDS-Patienten keine Mutationen gefunden. Auch in der Gruppe der *PRRT2*-negativen PKD-Patienten konnten keine pathogenen *ADCY5*-Varianten nachgewiesen werden. In der Gruppe von Patienten mit persistierender, generalisierter Hyperkinesie unklarer Genese wurden hingegen bei zwei männlichen Patienten die folgenden heterozygoten Missense-Mutationen gefunden: c.3045C>A; p.Asp1015Glu (Exon 17) bei Patient L-3482 und c.3074A>T; p.Glu1025Val (Exon 18) bei Patient L-9494 (siehe Abbildung 3.4). Für beide Patienten war die weitere Familienanamnese unbekannt.

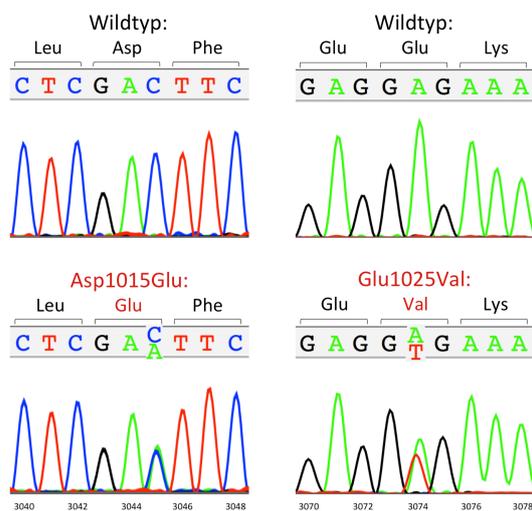


Abbildung 3.4 Chromatogramme der mutierten und der Wildtyp-Sequenz der Regionen des *ADCY5*-Gens um CDS-Position 3045 (links) bzw. 3074 (rechts). Dargestellt sind die Basen, welche für die Proteinposition 1015 (links) bzw. 1025 (rechts) und die jeweils angrenzenden Aminosäuren kodieren. Horizontale, eckige Klammern kennzeichnen die einzelnen Basentriplets und damit das Leseraster. Die Chromatogramme auf der linken Seite zeigen die heterozygote Substitution, wie sie bei Patient L-3482 gefunden wurde (c.3045C>A, p.Asp1015Glu), und die zugehörige Wildtyp-Sequenz. Die Chromatogramme auf der rechten Seite zeigen die heterozygote Mutation von Patient L-9494 (c.3074A>T, p.Glu1025Val) und die entsprechende Wildtyp-Sequenz. CDS - coding sequence (kodierende Sequenz). (Eigene Darstellung)

Beide Mutationen sind evolutionär stark konserviert (siehe Abbildung 3.5), werden von *in-silico*-Analyseprogrammen als krankheitsverursachend eingestuft und haben hohe CADD-Scores (siehe Tabelle 3.3, S.45). Darüber hinaus sind sie in den mehr als 60.000 Exomen der ExAC-Datenbank nicht verzeichnet.

Spezies	Proteinsequenz																
Mensch:	A	R	L	D	F	L	W	K	L	Q	A	T	E	E	K	E	E
- Missense-Mutation p.Asp1015Glu:				E													
- Missense-Mutation p.Glu1025Val:														V			
Rhesusaffe:	A	R	L	D	F	L	W	K	L	Q	A	T	E	E	K	E	E
Hauskatze:	A	R	L	D	F	L	W	K	L	Q	A	T	E	E	K	E	E
Maus:	A	R	L	D	F	L	W	K	L	Q	A	T	E	E	K	E	E
Bankivahuhn:	A	R	L	D	F	L	W	K	L	Q	A	T	E	E	K	E	E
Kugelfisch:	A	R	L	D	F	L	W	K	L	Q	A	T	E	E	K	E	E
Zebrabärbling:	A	R	L	D	F	L	W	K	L	Q	A	T	E	E	K	E	E
Tropischer Krallenfrosch:	A	R	L	D	F	L	W	K	L	Q	A	T	E	E	K	E	E
Taufliege:	Y	R	L	D	F	I	W	K	L	Q	A	T	E	E	K	E	D
Fadenwurm:	S	R	Y	D	F	I	W	K	L	Q	A	L	D	E	Q	L	Q

Abbildung 3.5 Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz des humanen ADCY5-Proteins für die Positionen p.1012 bis p.1028 und Alignment mit den Sequenzen anderer Spezies. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz der Region des ADCY5-Proteins, welche beide Mutationen enthält, die durch das *Screening* entdeckt wurden. Sowohl die Asparaginsäure (D) an Position 1015 (linker roter Kasten), die infolge der c.3045C>A Mutation durch Glutaminsäure (E) ausgetauscht wird, als auch die Glutaminsäure (E) an Position 1025 (rechter roter Kasten), die aufgrund der c.3074A>T Mutation durch Valin (V) ausgetauscht wird, zeigen jeweils in verschiedenen Spezies eine starke, evolutionäre Konservierung. Das bedeutet, dass diese Aminosäuren im Laufe der Evolution weitgehend unverändert blieben. Zum Zwecke einer besseren Übersichtlichkeit wurde in dieser Abbildung der Einbuchstabencode zur Darstellung der Aminosäuren verwendet. (adaptiert von Westenberger et al., 2017)

3.2.2 Untersuchungen der externen Proben

3.2.2.1 Sequenzierungsanalysen des ADCY5-Gens

Die genetischen Analysen der Individuen K1-1, K2-1 und K3-1 ergaben in allen drei Fällen folgende heterozygote Missense-Mutation im *ADCY5*-Gen: c.1252C>T, p.Arg418Trp (Exon 2). Für Patient K3-1 wurde hierbei eine *de-novo*-Entstehung nachgewiesen, indem die Mutation bei dessen Eltern (K3-2 und K3-3) ausgeschlossen werden konnte. Für die Fälle von K1-1 und K2-1 standen die weiteren Familienmitglieder (einschließlich der in beiden Fällen phänotypisch erkrankten Mutter) nicht für genetische Tests zur Verfügung. Für die drei Betroffenen der Familie K5 erbrachten die durchgeführten Genanalysen die heterozygote Missense-Mutation c.1252C>G, p.Arg418Gly (Exon 2). Der Mutationsstatus der einzelnen Individuen ist in den

Stammbäumen der Abbildung 3.6 neben dem jeweiligen Symbol vermerkt. Die Chromatogramme aus den zugehörigen Sequenzanalysen sind in Abbildung 3.7 gezeigt.

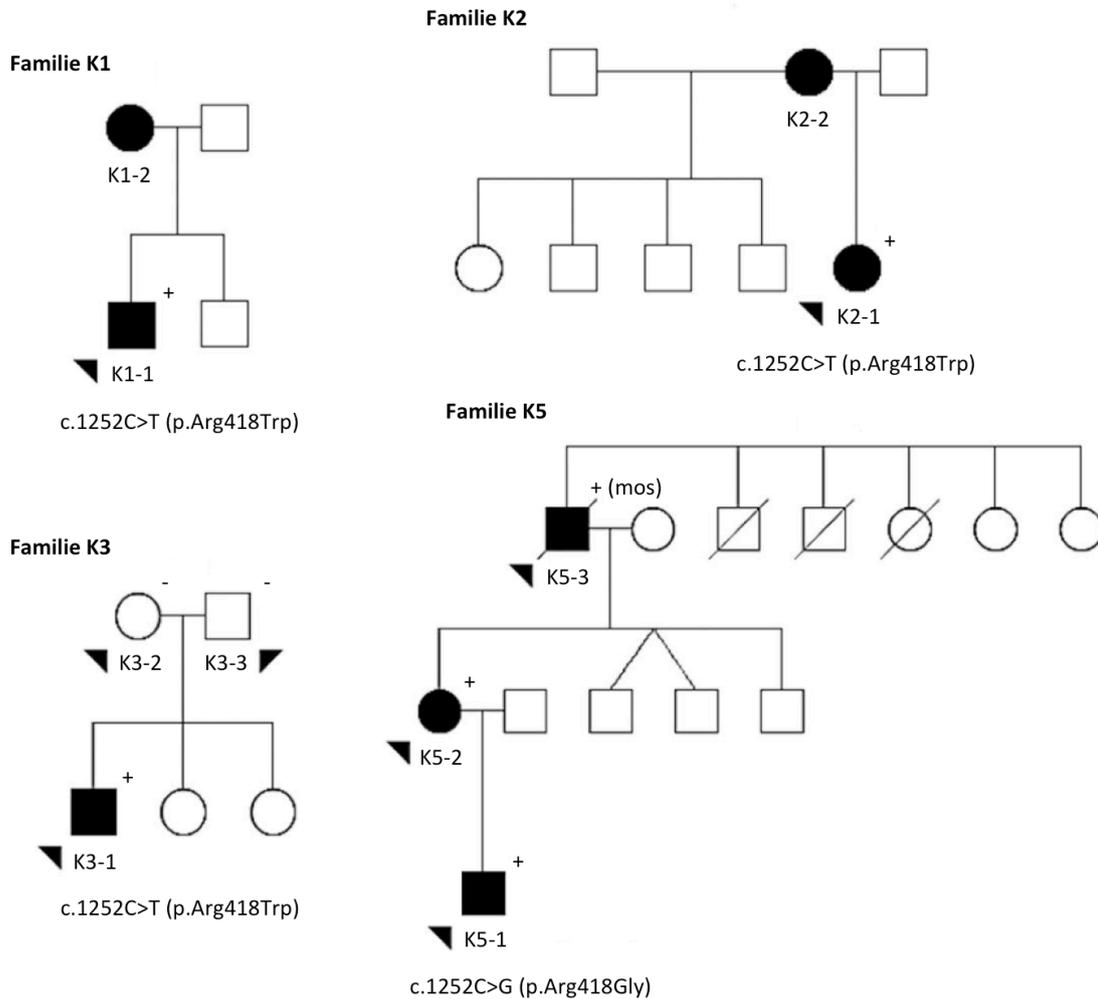


Abbildung 3.6 Stammbäume der Familien K1, K2, K3 und K5 mit Mutationsstatus der untersuchten Familienmitglieder. Für die Personen, bei denen molekulargenetische Analysen des *ADCY5*-Gens durchgeführt wurden (durch schwarze Dreiecke markiert), ist der jeweilige Mutationsstatus vermerkt. “+“ - Mutationsträger; “-“ - Person nicht von der Mutation betroffen; mos - Mosaikform der Mutation. Die genaue Mutationsbezeichnung ist für die einzelnen Familien jeweils unterhalb des Stammbaums aufgeführt. Schwarze Symbole - betroffene Familienmitglieder; Weiße Symbole - *nicht*-betroffene Familienmitglieder; Quadratische Symbole - männliche Personen; Kreise - weibliche Personen; Durchgestrichene Symbole - verstorbene Personen. (adaptiert von Chang et al., 2016)

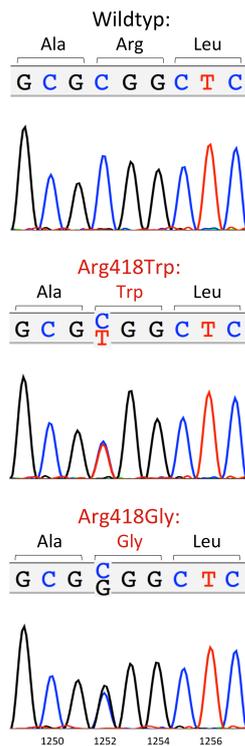


Abbildung 3.7 Chromatogramme der mutierten und der Wildtyp-Sequenz der Region des *ADCY5*-Gens um CDS-Position 1252. Gezeigt sind die Basen, welche für die Proteinposition 418 und die angrenzenden Aminosäuren kodieren. Horizontale, eckige Klammern kennzeichnen die einzelnen Basentriplets und damit das Leseraster. Oben ist die Wildtyp-Sequenz der Region zu sehen; in der Mitte das Chromatogramm der c.1252C>T Substitution in heterozygoter Form, wie sie bei den Patienten K1-1, K2-1 und K3-1 vorliegt, und unten das Chromatogramm der heterozygoten Mutation c.1252C>G, wie sie bei Patient K5-1 und dessen Mutter K5-2 gefunden wurde. Für die Chromatogramme der Analyse des Patienten K5-3 siehe Abbildung 3.9 (S. 45). CDS - *coding sequence* (kodierende Sequenz). (Eigene Darstellung)

Die in diesen vier Familien gefundenen Mutationen betreffen auf DNA-Ebene beide die Position c.1252 (siehe Abbildung 3.7) und sie resultieren jeweils in einer veränderten Aminosäure an Proteinposition 418, welche evolutionär stark konserviert ist (siehe Abbildung 3.8). Von den verwendeten Vorhersageprogrammen werden beide Mutationen als krankheitsverursachend eingestuft und es ergaben sich hohe Werte bei den für sie berechneten *CADD-Scores* (siehe Tabelle 3.3, S. 45). Zudem sind auch diese zwei Varianten in der Exom-Datenbank ExAC nicht aufgeführt.

Spezies	Proteinsequenz
Mensch:	E T R E C I Q A R L H S Q R E N Q
- Missense-Mutation p.Arg418Trp:	E T R E C I Q A W L H S Q R E N Q
- Missense-Mutation p.Arg418Gly:	E T R E C I Q A G L H S Q R E N Q
Rhesusaffe:	E T R E C I Q A R L H S Q R E N Q
Hauskatze:	E T R E C I Q A R L H S Q R E N Q
Maus:	E T R E C I Q A R L H S Q R E N Q
Bankivahuhn:	E T R E C I Q A R L H S Q R E N Q
Kugelfisch:	E T R E C I Q A R L H S Q R E N Q
Zebraärbling:	E T R E C I Q A R L H S Q R E N Q
Tropischer Krallenfrosch:	E T R E C I Q A R L H S Q R E N Q
Taufliege:	E T R Q C I E A R L R T Q R E N Q
Fadenwurm:	E T R K C V Q S R M L L D K E M H

Abbildung 3.8 Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz des humanen ADCY5-Proteins um Position p.418 und Alignment mit den Sequenzen anderer Spezies. Gezeigt ist die Sequenz der Region des ADCY5-Proteins um Position 418. Das Arginin (R) an dieser Position zeigt in verschiedenen Spezies eine starke, evolutionäre Konservierung. Das bedeutet, dass diese Aminosäure im Laufe der Evolution weitgehend unverändert blieb. Die bei den Genanalysen der oben genannten Patienten gefundenen Mutationen führen beide zu einem Aminosäureaustausch an dieser Proteinposition: Die c.1252C>T Mutation hat einen Austausch von Arginin zu Tryptophan (W) zur Folge, die c.1252C>G Mutation führt zu einem Austausch des Arginins durch Glycin (G). Zum Zwecke einer besseren Übersichtlichkeit wurde in dieser Abbildung der Einbuchstabencode zur Darstellung der Aminosäuren verwendet. (Eigene Darstellung. Die Sequenzen entstammen der *Ensembl*-Datenbank, siehe 2.3.7.4)

3.2.2.2 Mosaikform der c.1252C>G Substitution in Familie K5

In Familie K5 waren alle betroffenen Familienmitglieder heterozygote Träger der c.1252C>G Mutation (siehe Abbildung 3.6, S. 42). Während sich jedoch bei der Kapillarelektrophorese für Individuum K5-1 und dessen Mutter (K5-2) sowohl das Cytosin (C, Wildtyp) als auch das Guanin (G, mutiert) an der Position c.1252 mit annähernd gleicher Signalstärke darstellten, zeigten die Chromatogramme des betroffenen Großvaters (K5-3) für unterschiedliche Gewebeproben an derselben CDS-Position hauptsächlich das Signal für das Wildtyp-Allel und nur ein schwaches Signal für das mutierte Allel (siehe Abbildung 3.9). Diese Konstellation ist vereinbar mit einem Mosaikismus: Anders als bei den nachfolgenden Generationen der Familie enthält bei Individuum K5-3 vermutlich nur ein Teil der Zellen die krankheitsverursachende Substitution, was das schwächere Signal in der Kapillarelektrophorese erklären würde. Dazu passt ebenfalls, dass die Symptome bei K5-3 schwächer ausgeprägt waren als bei den

beiden anderen betroffenen Familienmitgliedern. Das genaue Ausmaß des Mosaikismus konnte jedoch nicht näher bestimmt werden, da die hier durchgeführte Sanger-Sequenzierung keine quantitative Messung ermöglicht.

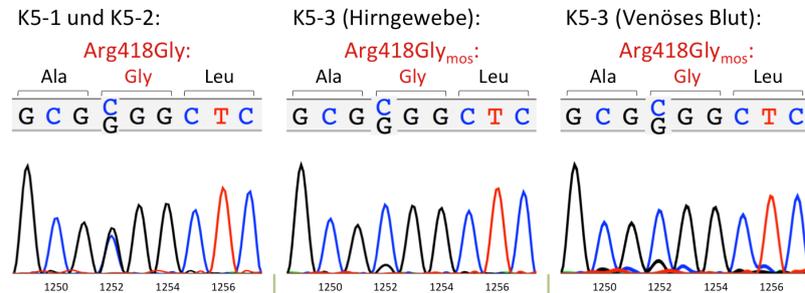


Abbildung 3.9 Gegenüberstellung der einzelnen Chromatogramme für die c.1252C>G Mutationsträger aus Familie K5. Gezeigt ist jeweils der Ausschnitt der DNA-Sequenz des *ADCY5*-Gens um CDS-Position 1252, welcher für die Proteinposition 418 und die angrenzenden Aminosäuren kodiert. Horizontale, eckige Klammern kennzeichnen die einzelnen Basentriplets und damit das Leseraster. Links ist die Sequenz mit der heterozygoten c.1252C>G Substitution (p.Arg418Gly) zu sehen, wie sie bei Patient K5-1 und dessen Mutter K5-2 detektiert wurde. Hierbei stellen sich das Referenznukleotid (Cytosin, C) und das mutierte Nukleotid (Guanin, G) mit annähernd gleicher Signalstärke dar. Die beiden Chromatogramme rechts davon zeigen jeweils die Mosaikform der c.1252C>G Substitution, wie sie bei Individuum K5-3 (Großvater mütterlicherseits von K5-1) in verschiedenen Gewebeproben nachgewiesen wurde. Hier zeigt sich an Position c.1252 in beiden Fällen ein deutlich schwächeres Signal für Guanin als für Cytosin. mos - Mosaikform; CDS - coding sequence (kodierende Sequenz). (Eigene Darstellung)

Tabelle 3.3 Entdeckte Missense-Mutationen des *ADCY5*-Gens und deren prognostizierte Pathogenität und CADD-Scores. Hinter den vorhergesagten Auswirkungen durch die Aminosäuresubstitution ist in Klammern jeweils der errechnete Score aufgeführt.

Mutation (DNA-Ebene; Protein-Ebene)	<i>MutationTaster</i>	<i>PolyPhen2</i>	SIFT	CADD
c.3045C>A; p.Asp1015Glu	<i>Disease causing</i> (0,999984731)	<i>Possibly damaging</i> (0,870)	<i>Damaging</i> (0,04)	28,9
c.3074A>T; p.Glu1025Val	<i>Disease causing</i> (0,999999997)	<i>Possibly damaging</i> (0,688)	<i>Damaging</i> (0,00)	32,0
c.1252C>T; p.Arg418Trp	<i>Disease causing</i> (0,999999841)	<i>Probably damaging</i> (0,998)	<i>Damaging</i> (0,00)	34,0
c.1252C>G; p.Arg418Gly	<i>Disease causing</i> (0,999999527)	<i>Probably damaging</i> (0,980)	<i>Damaging</i> (0,00)	29,1

3.2.2.3 Haplotypanalysen der c.1252C>T ADCY5-Mutationsträger aus den Familien K1, K2 und K3

Die Haplotypanalysen der Träger der c.1252C>T Mutation (K1-1, K2-1 und K3-1) ergaben keinen gemeinsamen Haplotyp für die drei Individuen (siehe *Repeat*-Längen in Tabelle 3.4). Exemplarisch für den Mikrosatellitenmarker D3S3674 zeigt Abbildung 3.10 einen Auszug aus diesen Untersuchungen.

Tabelle 3.4 Ermittelte *Repeat*-Längen von Trägern der *ADCY5*-Mutation c.1252C>T für die verwendeten Marker.

Die durchgeführten Haplotypanalysen zeigen für die analysierten Mikrosatelliten keinen gemeinsamen Haplotyp zwischen den betroffenen Individuen. n. v. - nicht vorhanden.

Mikrosatellit	Patient					
	K1-1		K2-1		K3-1	
	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
D3S1267	n. v.	n. v.	155	155	133	147
D3S1269	204	208	206	206	204	204
D3S3573	166	168	166	168	166	168
D3S3636	182	192	180	190	182	182
D3S3674	197	197	191	201	187	189

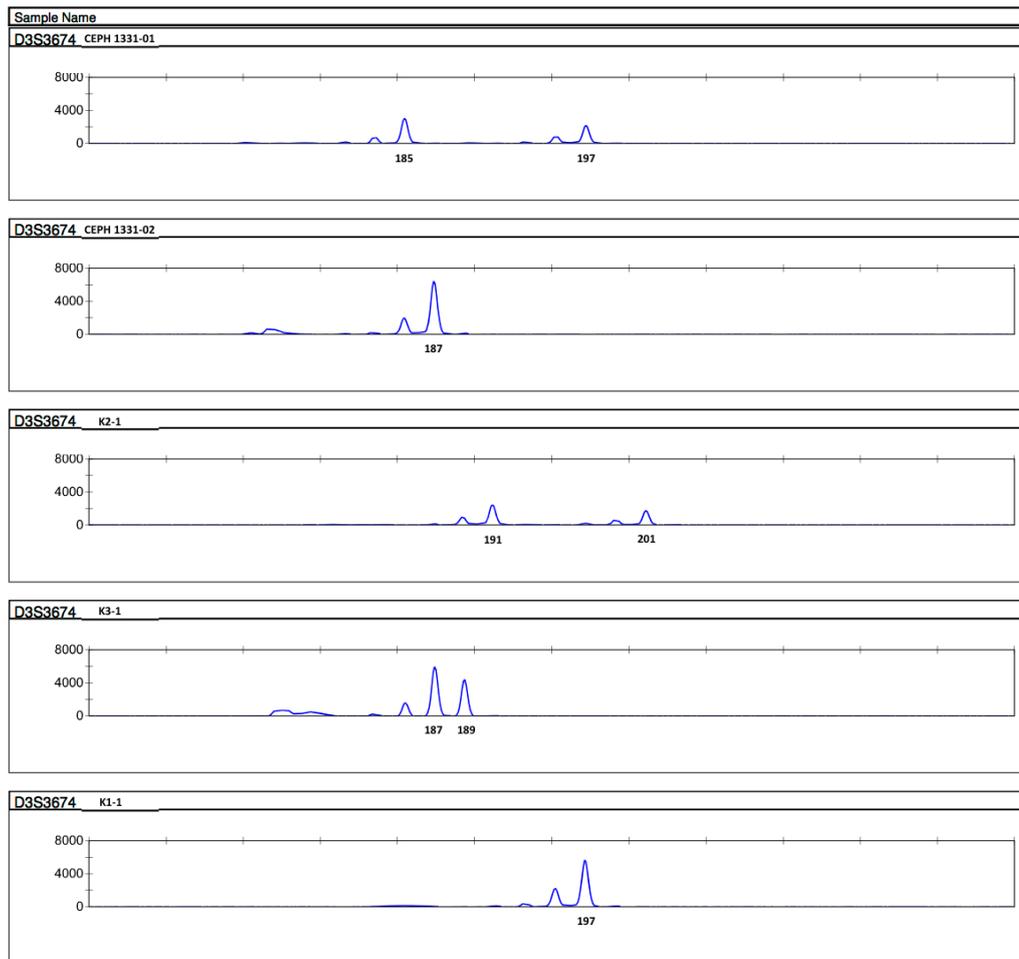


Abbildung 3.10 Auszug aus den Haplotypanalysen der c.1252C>T *ADCY5*-Mutationsträger. Gezeigt sind die Chromatogramme der drei c.1252C>T *ADCY5*-Mutationsträger und der CEPH-Kontrollen 1331-01 und 1331-02 für den Marker D3S3674. Alle Mutationsträger unterscheiden sich für diesen Marker in ihren *Repeat*-Längen.

4 Diskussion

4.1 Homozygote Gründermutation im *ANO10*-Gen als häufige Ursache zerebellärer Ataxien in der Bevölkerungsgruppe der Roma

Durch die große Anzahl von krankheitsverursachenden Genen ist das Finden der genetischen Diagnose bei ARCA oftmals erschwert. Auch wenn schon zahlreiche Gene bekannt sind, erklären diese immer noch nicht alle Fälle, die innerhalb der Gruppe der Ataxien aus klinischen Gesichtspunkten zusammengehören (Hersheson et al., 2012). Es wird angenommen, dass für 40 % aller ARCA-Fälle noch immer keine genetische Ursache feststeht (Sailer und Houlden, 2012). Indes zeigen vorangegangene Studien (Pyle et al., 2015) und die vorliegende Arbeit, dass WES bei genetisch heterogenen Erkrankungen für das Ermitteln der krankheitsverursachenden Mutation hilfreich sein kann.

In beiden Familien, die hier untersucht wurden, befanden sich mehrere erkrankte Individuen in aufeinanderfolgenden Generationen. Deshalb wurde angenommen, dass die krankheitsverursachende Mutation autosomal-dominant vererbt wurde. Dies führte zu Fehlern bei der zuvor von der Arbeitsgruppe durchgeführten Kopplungsanalyse, bei der das vermeintlich krankheitsverursachende Gen dadurch fälschlicherweise auf eine Region von Chromosom 15 eingegrenzt wurde (Weissbach et al., 2010). Ein dem Anschein nach dominanter Erbgang erschwert bei rezessiv vererbten Erkrankungen das Bestimmen der genetischen Ursache (Lücking et al., 2001; Kobayashi et al., 2003). Mithilfe von NGS findet die Suche nach Mutationen unvoreingenommen statt. Die WES-Daten halfen im hier beschriebenen Fall das Vererbungsmuster noch einmal zu überdenken und die Möglichkeit einer rezessiv vererbten Mutation in Betracht zu ziehen. Obwohl eine Neu-Analyse auch mithilfe von Kopplungsversuchen möglich gewesen wäre, erleichtert WES durch die Verfügbarkeit eines kompletten Satzes möglicher Varianten insbesondere das Filtern der Kandidatengene und somit letztlich das Ermitteln der genetischen Ursache. Diese Flexibilität ist ein Vorteil von NGS gegenüber traditionellen Verfahren. Zudem können Phänokopien oder die Möglichkeit einer unvollständigen Penetranz leichter berücksichtigt werden.

In der Literatur existieren mehrere Fälle von rezessiven Erkrankungen, bei denen zunächst eine dominante Vererbungsform angenommen wurde. Dies kommt zum Beispiel vor bei 1) Familien mit Verwandtenehen (Illarioshkin et al., 2000), 2) Genen, bei denen die Quote heterozygoter Mutationsträger innerhalb der Normalbevölkerung hoch ist (de La Faille et al., 2011) und 3) kleineren Familien mit jeweils einem betroffenen Elternteil und einem oder mehreren betroffenen Kindern (Lücking et al., 2001; Isackson et al., 2005). Im Falle der hier beschriebenen Familien DI und DII waren alle Personen der ersten Generation heterozygot für die c.1150_1151delTT Deletion. Dies und das Einheiraten zweier heterozygoter Mutationsträger (Sr336 und Sr340) führte dazu, dass in aufeinanderfolgenden Generationen zum Teil mehrere Individuen homozygot für die Mutation waren. Darüber hinaus deuten der homozygote Mutationsstatus der beiden Brüder einer weiteren Roma-Familie und die drei sporadischen Fälle auf eine überdurchschnittlich hohe Heterozygotenfrequenz hin. Die Zusammenschau dieser Befunde legt nahe, dass die genetische Vielfalt in dieser Bevölkerungsgruppe herabgesetzt ist. Zudem wurden in der Vergangenheit bereits Gründermutationen bei Roma-Familien aus Osteuropa gefunden (Ivanov et al., 2014; Chamova et al., 2015). Deshalb sollten in dieser genetisch homogenen Bevölkerungsgruppe rezessiv vererbte Genveränderungen als Krankheitsursache in Betracht gezogen werden, auch bei einem dem Anschein nach dominanten Vererbungsmuster.

Der erste Bericht, der die Verbindung zwischen ARCA und dem *ANO10*-Gen herstellte, brachte drei verschiedene Genveränderungen hervor: Eine homozygote Missense-Mutation bei einer niederländischen Familie, eine *compound*-heterozygote Mutationen bei einer französischen Familie und die homozygote c.1150_1151delTT Deletion bei einer Roma-Familie aus Serbien (Vermeer et al., 2010). Nachfolgende Studien entdeckten weitere Mutationen bei französischen und japanischen Patienten (Maruyama et al., 2014; Renaud et al., 2014).

Die klinische Symptomatik der hier beschriebenen Familien entspricht genau dem Phänotyp der ursprünglich beschriebenen Roma-Familie aus Serbien (Vermeer et al., 2010) und der bulgarischen Roma-Familie, bei der später dieselbe Frameshift-Mutation gefunden wurde (Chamova et al., 2012).

Ferner deuten die hier durchgeführten Haplotypenanalysen darauf hin, dass alle Mutationsträger aus diesen vier Familien einen gemeinsamen Vorfahren besitzen, in welchem die Gründermutation entstand: Für alle Mutationsträger ergab sich bei den verwendeten Mikrosatelliten derselbe Haplotyp. Im Gegensatz zur Manifestationsform in diesen Familien zeigen Patienten ohne Roma-Herkunft einen späteren Krankheitsbeginn und eine Vielzahl anderer neurologischer Symptome (Vermeer et al., 2010; Balreira et al., 2014; Maruyama et al., 2014; Renaud et al., 2014). Bis auf zwei Ausnahmen erkrankten alle *ANO10*-Mutationsträger, die eine andere als die c.1150_1151delTT Deletion aufwiesen, erst nach dem 20. Lebensjahr. Die Ausnahmen bilden ein Patient mit hochgradiger Ataxie, Krampfanfällen und Coenzym-Q10-Mangel, der im Alter von 7 Jahren erkrankte (Balreira et al., 2014), sowie ein weiterer Patient mit einem Krankheitsbeginn im 17. Lebensjahr (Renaud et al., 2014). Demgegenüber manifestierte sich die Erkrankung bei den Patienten, welche die Roma-Gründermutation aufweisen, in neun von elf Fällen vor dem 20. Lebensjahr. Demnach könnte es sich hierbei also innerhalb der *ANO10*-Mutationsträger um einen eigenständigen „Roma-Subtyp“ handeln.

Das spezifische klinische Erscheinungsbild der *ANO10*-Mutationsträger aus Roma-Familien hat zu der Hypothese geführt, dass die unterschiedlichen Phänotypen die Auswirkungen der verschiedenen Funktionsstörungen auf Proteinebene widerspiegeln (Renaud et al., 2014). Es besteht die Theorie, dass die *Nicht*-Roma-Mutationen aufgrund einer teilweise erhaltenen Proteinfunktion einen späteren Erkrankungsbeginn zur Folge haben könnten (Balreira et al., 2014). Jedoch lassen die berechneten CADD-Scores aller bislang beschriebenen *ANO10*-Mutationen (siehe Tabelle 3.2, S. 39) diesbezüglich keinen Zusammenhang erkennen: Weder das Erkrankungsalter, noch die Schwere der Erkrankung oder das Vorliegen weiterer neurologischer Befunde korrelierte mit der prognostizierten Pathogenität der Mutationen. Hierbei ist zu beachten, dass die Aussagekraft dieser Analyse durch die Heterogenität der Krankheit selbst (abgesehen von der Roma-Variante), die geringe Anzahl von Patienten und die Unterschiede bei der klinischen Befundung stark eingeschränkt ist. Sofern das Ausmaß der Änderung der Proteinstruktur nicht der Haupteinflussfaktor ist, könnten möglicherweise die Genexpression modifizierende Faktoren, die für die Roma-Bevölkerung spezifisch sind, den Phänotyp mitprägen. Zur Überprüfung dieser Hypothese bedarf es weiterer Nachforschung.

4.2 Klinisches und genetisches Spektrum *ADCY5*-assoziierter Bewegungsstörungen

4.2.1 Alternierende Hemiplegie des Kindesalters als weitere Erscheinungsform *ADCY5*-assoziierter Dyskinesien

Die hier vorgelegte Arbeit beschreibt eine paroxysmale Lähmung als neuen Phänotyp im klinischen Spektrum von Erkrankungen, die durch Mutationen im *ADCY5*-Gen hervorgerufen werden können (siehe Abbildung 4.1, S. 53). Beide Patienten, die aus dem *Screening* hervorgingen (L-3482 und L-L9494), zeigten plötzliche Attacken von Bewegungsunfähigkeit. Diese führten in beiden Fällen zu der Verdachtsdiagnose einer alternierenden Hemiplegie des Kindesalters (engl. *alternating hemiplegia of childhood*, AHC). Einen Überblick über die Diagnosekriterien der AHC gibt Tabelle 4.1. Darin ist zudem dokumentiert, welche der Kriterien für die oben genannten Patienten erfüllt waren.

Tabelle 4.1 Diagnostische Kriterien der klassischen AHC, angewendet für die beiden *ADCY5*-Mutationsträger mit AHC-Phänotyp. (adaptiert von Sweney et al., 2009)

Kriterien für die Diagnosestellung	L-3482	L-9494
Erste Symptome vor dem 18. Lebensmonat?	nicht bekannt	Ja
Wiederholt hemiplegische Attacken, welche beide Körperhälften betreffen können?	Ja	Ja
Andere paroxysmale Störungen (beinhaltet tonische und dystone Phasen, okulomotorische Auffälligkeiten und autonome Besonderheiten während der Anfälle oder unabhängig davon)?	Paroxysmale Chorea	Paroxysmale Dystonie
Episoden bilateraler Hemiplegie oder Tetraplegie als Generalisierung einer hemiplegischen Attacke oder gesondert (bilateral während der gesamten Attacke)?	Ja	Ja
Sofortiges Verschwinden der Symptome beim Einschlafen, welche beim Aufwachen wieder auftreten können?	Nein	Nein
Nachweis einer Entwicklungsverzögerung und neurologische Auffälligkeiten (einschließlich Choreoathetose, Dystonie und Ataxie)?	Ja	Ja

Interessanterweise ist die Verbesserung der Symptome beim Schlafen das einzige Kriterium, was die beiden beschriebenen Mutationsträger nicht erfüllen. Diese Erkenntnis deckt sich mit den bisherigen Beschreibungen von *ADCY5*-assozierten Krankheitsbildern, bei denen häufig ein Auftreten der Symptome während des Einschlafens und beim

Erwachen beobachtet wurde (Blumkin et al., 2018). Möglicherweise ist das Vorhandensein nächtlicher, paroxysmaler Dyskinesien ein entscheidendes Merkmal *ADCY5*-assoziierter Dyskinesien und hilft bei der Abgrenzung zu anderen paroxysmalen, hyperkinetischen Bewegungsstörungen (Friedman et al., 2016).

Bislang wurde das Krankheitsbild AHC ausschließlich mit Mutationen im *ATPIA3*-Gen assoziiert (siehe Abbildung 4.1). Pathologische Veränderungen dieses Gens sind für die betroffenen Individuen L-3482 und L-L9494 jedoch bereits vorab ausgeschlossen worden. Die Erkrankungen, die mit *ATPIA3* in Verbindung gebracht werden konnten, weisen eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation auf. Es existieren mindestens fünf verschiedene Manifestationsformen, abhängig von der jeweiligen *ATPIA3*-Mutation: 1) Dystonie-Parkinsonismus mit rapidem Beginn (engl. *rapid-onset dystonia-parkinsonism*, RDP) (Sweney et al., 2015), 2) AHC (Sweney et al., 2015), 3) Zerebelläre Ataxie, Areflexie, Pes cavus, Opticusatrophie, Sensorineurale Schwerhörigkeit (CAPOS-Syndrom) (Sweney et al., 2015), 4) *catastrophic early life epilepsy, episodic prolonged apnea, and postnatal microcephaly* (Paciorkowski et al., 2015) und 5) Ataxie des Kindesalters mit rapidem Beginn (engl. *childhood rapid-onset ataxia*) (Schirinzi et al., 2018).

Die AHC im klinischen Erscheinungsbild der hier beschriebenen Mutationsträger legt nahe, dass *ADCY5*-Mutationen als genetische Ursache bei Patienten mit ungeklärter AHC in Frage kommen, was eine molekulargenetische Analyse des *ADCY5*-Gens bei Patienten mit diesem Phänotyp rechtfertigt.

Die Individuen mit Mutationen der Position c.1252 (Familien K1, K2, K3 und K5) zeigten klinische Erscheinungsbilder, die mit den bisherigen Beschreibungen von Trägern dieser Mutationen größtenteils übereinstimmten (Shaw et al., 2015). Die Haplotypanalysen, welche für die drei c.1252C>T Mutationsträger durchgeführten wurden, haben jeweils unterschiedliche Haplotypen ergeben, was darauf hindeutet, dass die Mutationen in den jeweiligen Familien unabhängig voneinander entstanden sind. Auch für beide von Chen et al. (2015) beschriebenen Familien mit c.2176G>A Mutationen konnten Haplotypanalysen zeigen, dass die Mutationen in den zwei Familien unabhängig voneinander entstanden sein müssen. Gründermutationen wurden für das *ADCY5*-Gen bislang nicht beschrieben.

Die vier im Rahmen dieser Arbeit entdeckten Missense-Mutationen im *ADCY5*-Gen, von denen drei Mutationen zum Zeitpunkt der Entdeckung noch nicht in der Literatur beschrieben worden waren, sind basierend auf den folgenden drei Punkten jeweils mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit krankheitsverursachend: 1) dem Grad der evolutionären Konservierung, 2) der prognostizierten Pathogenität und funktionellen Bedeutung (hohe CADD-Scores) und 3) dem Nichtvorhandensein in der umfangreichsten, öffentlich zugänglichen Exom-Datenbank ExAC. Darüber hinaus lag das *ADCY5*-Gen im Hinblick auf das Tolerieren funktioneller, genetischer Veränderungen bei einer durchgeführten Betrachtung aller humanen Gene unterhalb der ersten Perzentile (Petrovski et al., 2013).

Beide während des *Screenings* entdeckten *ADCY5*-Mutationsträger stammten aus der Gruppe von Patienten mit persistierender, generalisierter Hyperkinesie unklarer Genese. In den Kohorten *SGCE*-negativer MDS-Patienten und *PRRT2*-negativer PKD-Patienten wurden keine *ADCY5*-Mutationen gefunden. Dies könnte darauf hindeuten, dass *ADCY5*-Mutationen nur in wenigen Fällen (Chang et al., 2016; Douglas et al., 2017) die Ursache dieser komplexen Bewegungsstörungen sind. Um eine konkretere Aussage treffen zu können, bedarf es *ADCY5*-Analysen bei weiteren Patienten, die von diesen Bewegungsstörungen betroffen sind und bei denen bisherige genetische Untersuchungen ohne Ergebnis waren.

4.2.2 Mutationsspektrum und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen von *ADCY5*-assozierten Dyskinesien

Alle bis heute publizierten *ADCY5*-Genvarianten sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Davon sind vier Mutationen wiederkehrend: p.Ala726Thr, p.Arg418Trp, p.Arg418Gln und p.Arg418Gly. Das bedeutet, dass diese jeweils in mindestens zwei Familien gefunden wurden, zwischen denen keine Verwandtschaft bestand. Die Missense-Variante p.Arg418Trp wurde dabei mit Abstand am häufigsten beschrieben: Sie fand sich in über der Hälfte aller untersuchten Familien (27/52) als krankheitsverursachende Mutation (siehe Tabelle 4.2).

Bei allen in der Literatur beschriebenen hereditären Fällen wurde die Mutation autosomal-dominant vererbt, für viele der sporadischen Fälle konnte eine *de-novo*-Entstehung der Genveränderung als Krankheitsursache ausgemacht werden (Carecchio und Mencacci, 2017). Auch in dieser Arbeit fand sich bei einer der untersuchten Familien eine autosomal-dominante Vererbung einer Mutation (Familie K5) und in einem sporadischen Fall konnte eine *de-novo*-Entstehung der entsprechenden Mutation nachgewiesen werden (Familie K3). In den restlichen Fällen standen die weiteren betroffenen Familienmitglieder nicht für genetische Analysen zur Verfügung (Familien K1 und K2 und Individuen L-3482 und L-9494).

Darüber hinaus wurde für zwölf publizierte Fälle eine Mosaikform der jeweiligen *ADCY5*-Mutation beschrieben (siehe „mos“ in Tabelle 4.2). Mosaikformen können dabei die Ursache von intrafamiliären Unterschieden im Phänotyp sein, was die klinische Heterogenität der Erkrankung erhöht. Sie führen in der Regel zu einer geringeren Ausprägung der Symptome (Chen et al., 2014; Chen et al., 2015; Mencacci et al., 2015; Carecchio et al., 2017). In einer Familie führte der Mosaikismus dazu, dass sich bei einem Individuum gar keine Symptome der Erkrankung äußerten (Waalkens et al., 2018). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde bei einem Patienten die Mosaikform einer *ADCY5*-Mutation entdeckt: Auch hier hatte die Mosaikform der c.1252C>G Mutation bei Patient K5-3 einen milderen Phänotyp zur Folge.

Tabelle 4.2 Chronologische Auflistung aller bisher in der Literatur beschriebenen *ADCY5*-Mutationen einschließlich der in dieser Arbeit gefundenen Genvarianten. Varianten im *ADCY5*-Gen, die auch oder ausschließlich im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden, sind mit roten Sternchen (*) gekennzeichnet. Mit Ausnahme einer *compound*-heterozygoten Mutation (Barrett et al., 2017), lagen alle publizierten *ADCY5*-Mutationen in einem heterozygoten Zustand vor. ^(a) - Einschließlich Mitgliedern von Familien, die anamnestisch oder klinisch an derselben Bewegungsstörung erkrankt sind, für die jedoch keine genetischen Analysen durchgeführt werden konnten; n. v. - nicht verfügbar; del - Deletion; c.-h. - *compound*-heterozygot; mos - Mosaikform.

Mutation		Betroffene Individuen		Fälle			Quelle	
DNA-Ebene	Protein-Ebene	Mutation nachgewiesen	Insgesamt (*)	Familien	Familienanamnese			
					positiv	negativ		n. v.
c.2176G>A	p.Ala726Thr	18	32	3	3	-	-	(Chen et al., 2012; Chen et al., 2015; Tunc et al., 2017)
c.1252C>T *	p.Arg418Trp	29 (mos: 7)	32	27	5	20	2	(Chen et al., 2014; Chen et al., 2015; Mencacci et al., 2015; Chang et al., 2016; Dy et al., 2016; Carecchio et al., 2017; Meijer et al., 2017; Tunc et al., 2017; Zech et al., 2017; Kamate und Mittal, 2018; Waalkens et al., 2018)
c.2088+1G>A	Haploinsuffizienz	2	2	1	1	-	-	(Carapito et al., 2015)
c.1253G>A	p.Arg418Gln	8 (mos: 1)	8	8	-	7	1	(Chen et al., 2015; Chang et al., 2016; Carecchio et al., 2017; Tunc et al., 2017; Blumkin et al., 2018; Waalkens et al., 2018)
c.3086T>A	p.Met1029Lys	4 (mos: 1)	4	1	1	-	-	(Chen et al., 2015)
c.2159T>C	p.Leu720Pro	1	1	1	-	1	-	(Chen et al., 2015)
c.1313G>C	p.Arg438Pro	1	1	1	-	1	-	(Chen et al., 2015)
c.1252C>G *	p.Arg418Gly	5 (mos: 2)	5	2	2	-	-	(Chang et al., 2016; Carecchio et al., 2017)
c.2080_2088del	p.Lys694_Met696del	1	1	1	-	1	-	(Dy et al., 2016)
c.1378A>T	p.Ile460Phe	1	1	1	-	1	-	(Zech et al., 2016)
c.2180G>A	p.Arg727Lys	2	2	1	1	-	-	(Zech et al., 2016)
c.3045C>A *	p.Asp1015Glu	1	1	1	-	-	1	(Westenberger et al., 2017)
c.3074A>T *	p.Glu1025Val	1	1	1	-	-	1	(Westenberger et al., 2017)
c.3086T>G	p.Met1029Arg	4	5	1	1	-	-	(Douglas et al., 2017)
c.2722G>A	p.Glu908Lys	2 (mos: 1)	2	1	1	-	-	(Waalkens et al., 2018)
c.409_428del20 + c.3037C>T (c.-h.)	p.Gly137CysfsTer184 + p.Arg1013Cys (c.-h.)	2	2	1	1	-	-	(Barrett et al., 2017)
Summe		82 (mos: 12)	100	52	16	31	5	

Die Tatsache, dass nur 16 der 52 bisher publizierten Fälle eine positive Familienanamnese aufwiesen (siehe Tabelle 4.2), macht deutlich, dass die Möglichkeit einer krankheitsverursachenden Mutation im *ADCY5*-Gen auch bei negativer Familienanamnese in Erwägung gezogen werden sollte.

Für die Mutationen p.Ala726Thr und p.Arg418Trp sind bereits funktionelle Studien durchgeführt worden (Chen et al., 2014): Dabei zeigte sich vor allem bei Aktivierung (über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor) für die mutierten ADCY5-Formen jeweils eine signifikant höhere cAMP-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp-ADCY5. Bei der basalen Aktivität sowie bei der Expression bestand hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen mutiertem und Wildtyp-ADCY5. Diese Ergebnisse sind mit einem *gain-of-function*-Effekt vereinbar (erhöhte ADCY5-Aktivität). Zwischen den beiden Missense-Mutationen bestand untereinander keine statistisch signifikante Differenz der Enzymaktivität. Dennoch scheint der *gain-of-function*-Effekt zwischen den beiden Varianten zu variieren: Die Mutation p.Arg418Trp ruft in der Regel ein schwerwiegenderes klinisches Erscheinungsbild hervor als die p.Ala726Thr Variante (Carecchio und Mencacci, 2017). Dies deutet darauf hin, dass bei Erkrankungen, die durch Mutationen im *ADCY5*-Gen verursacht werden, eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation besteht. Die Art der *ADCY5*-Mutation legt womöglich – zumindest teilweise – den Phänotyp fest.

Die von Chen et al. (2014) erlangten Erkenntnisse passen zu den an *ADCY5-Knockout*-Mäusen durchgeführten Experimenten (Iwamoto et al., 2003). Die Mäuse mit abgeschaltetem *ADCY5* zeigten hierbei passenderweise eine dem Morbus Parkinson ähnliche Bewegungsstörung mit Symptomen wie Bradykinesie und einer beeinträchtigten Koordination, also eine hypokinetische Symptomatik.

Widersprüchlich zu den zuvor geschilderten Beobachtungen sind von Carapito et al. (2015) beschriebene Versuchsergebnisse: Die hierbei durchgeführten RNA-Analysen einer heterozygoten c.2088+1G>A Mutation an der 5'-Speißstelle zwischen Exon 8 und Intron 8 ließen als Pathomechanismus eine Haploinsuffizienz vermuten. Dabei kann das Genprodukt des gesunden Allels den Ausfall des veränderten Allels nicht ausreichend kompensieren und es ergibt sich ein *loss-of-function*-Effekt (Buselmaier und Tariverdian, 2006). Noch ist der Mechanismus nicht verstanden, wie die einzelnen Mutationen auf molekularer bzw. zellulärer Ebene zur Ausbildung der Krankheitssymptome führen. Hier bedarf es weiterer funktioneller Studien.

Mit Ausnahme von zwei kürzlich publizierten Varianten (Barrett et al., 2017; Waalkens et al., 2018) befinden sich alle in der Literatur beschriebenen *ADCY5*-Mutationen in den

zytoplasmatischen Domänen C1 und C2 (siehe Abbildung 4.2). Die vier im Rahmen der vorgelegten Arbeit entdeckten Mutationen liegen im C1a- bzw. im C2a-Teil dieser beiden Proteindomänen. Bei Aktivierung über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor bilden C1 und C2 gemeinsam das aktive Zentrum des Enzyms aus, in welchem sich die Bindungsstelle für das Substrat ATP sowie das katalytische Zentrum befindet (Chen et al., 2015).

Die hier gefundenen Mutationen eingeschlossen, beeinträchtigen die folgenden *ADCY5*-Mutationen die Position 418 des Proteins: c.1252C>T, p.Arg418Trp (27 Familien); c.1253G>A, p.Arg418Gln (8 Familien) und c.1252C>G, p.Arg418Gly (2 Familien). Das sind zusammen ca. 71 % aller beschriebenen Familien (37/52) und deutet darauf hin, dass das Arginin an dieser Stelle eine besondere funktionelle Bedeutung für das Protein hat (Carecchio und Mencacci, 2017). Darüber hinaus wurde die Missense-Mutation p.Ala726Thr in drei verschiedenen Familien beschrieben (Chen et al., 2012; Chen et al., 2015; Tunc et al., 2017). Dies und die in einem weiteren hereditären Fall beschriebene p.Arg727Lys Mutation, welche die direkt benachbarte Aminosäure betrifft (Zech et al., 2016), sprechen dafür, dass dieser Proteinabschnitt ebenfalls eine bedeutende Rolle für die Funktionsfähigkeit des Enzyms haben könnte.

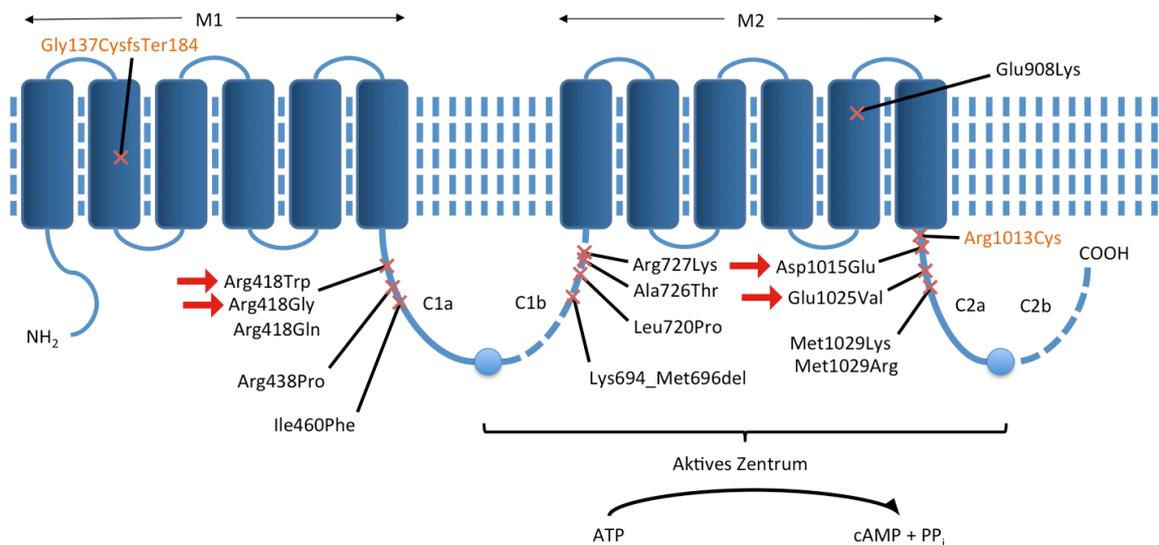


Abbildung 4.2 Schematischer Aufbau des ADCY5-Proteins mit Lage bekannter Mutationen einschließlich der im Rahmen dieser Arbeit detektierten Varianten. Dargestellt sind die einzelnen Proteindomänen und die Positionen aller bislang in der Literatur beschriebenen *ADCY5*-Mutationen. Die während dieser Arbeit bei den vorgestellten Patienten detektierten Missense-Varianten sind mit roten Pfeilen markiert. Anzumerken ist, dass die Mutationen p.Asp1015Glu und p.Glu1025Val bislang ausschließlich im Rahmen der hier durchgeführten Analysen entdeckt worden sind. Das Protein besteht aus zwei hexahelicalen, transmembranären Domänen, M1 und M2, und zwei zytoplasmatischen Domänen, C1 und C2. Im aktiven Zentrum findet die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) und Pyrophosphat (PP_i) statt. Die zytoplasmatisch gelegenen Mutationen sind unterhalb der Membran vermerkt, Mutationen, welche die Domänen M1 oder M2 betreffen, oberhalb. Mit Ausnahme einer *compound*-heterozygoten Mutation (orange hervorgehoben), lagen alle publizierten *ADCY5*-Mutationen in einem heterozygoten Zustand vor. Nicht dargestellt ist die von Carapito et al. (2015) gefundene c.2088+1G>A Mutation an der 5'-Speißstelle zwischen Exon 8 und Intron 8 des *ADCY5*-Gens. Für Literaturangaben bezüglich der einzelnen Mutationen siehe Tabelle 4.2, S. 56. (Mit freundlicher Genehmigung von C. Krause, MSc, modifiziert und aktualisiert)

Zwei der hier gefundenen Mutationen (p.Arg418Trp und p.Arg418Gly) liegen im C1a-Teil der ersten zytoplasmatischen Domäne des Proteins und haben unterschiedliche Aminosäuresubstitutionen an Position 418 zur Folge. Die beiden anderen Mutationen (p.Asp1015Glu und p.Glu1025Val) beeinträchtigen jeweils den C2a-Teil der zweiten zytoplasmatischen Domäne und liegen nur zehn Aminosäuren voneinander entfernt. Vermutlich zeigen die beiden Träger dieser Mutationen (L-3482 und L-9494) deshalb ein ähnliches klinisches Erscheinungsbild mit AHC-ähnlichen Symptomen.

4.3 Ausblick

In den letzten Jahren haben sich neue Sequenziertechniken als effektive Methode beim Identifizieren von pathologischen Mutationen bei seltenen genetischen Erkrankungen etabliert (Lee et al., 2014). Auch in dieser Arbeit konnte durch die Kombination von Exom- und konventionellen Sanger-Sequenzierungen eine Mutation im *ANO10*-Gen als molekulargenetische Ursache einer zerebellären Ataxie bei zwei serbischen Familien gefunden werden. Durch das *Screening* eines Patientenkollektivs mit gemischt-hyperkinetischen Bewegungsstörungen auf *ADCY5*-Genveränderungen konnte im zweiten Teil der Arbeit für acht Patienten die krankheitsverursachende Mutation identifiziert werden. Hierbei ist zu bemerken, dass die erste in diesem Gen entdeckte Mutation ebenfalls aus einer Exom-Sequenzierung hervorging (Chen et al., 2012). In den letzten Jahren wurden teilweise unabhängig voneinander weitere *ADCY5*-Mutationen bei Patienten mit komplexen Hyperkinesien identifiziert, wobei die phänotypischen Ähnlichkeiten der einzelnen Patienten zum Teil erst nach dem Finden der genetischen Ursache aufgefallen waren (Chen et al., 2014). Dieser Vorgang wird als *reverse* Phänotypisierung bezeichnet und stellt gewissermaßen eine Umkehr der herkömmlichen Herangehensweise bei genetisch bedingten Bewegungsstörungen dar, bei der zunächst eine klinische Diagnose gestellt wird, um anschließend einzelne, konkrete Gene zu untersuchen (Schulze und McMahon, 2004).

Insgesamt können neue Sequenziertechniken zusammen mit Gen-Datenbanken sowie Zentren für seltene Erkrankungen zu einer besseren Patientenversorgung beitragen. So kann in vielen Fällen eine diagnostische „Odyssee“ vermieden oder zumindest abgekürzt und die richtige Diagnose gestellt werden (Lohmann und Klein, 2014). Diese ist häufig eine Erleichterung für den Patienten und stellt die Grundlage für genetische Beratungen dar. Die Therapieoptionen sind jedoch für viele Bewegungsstörungen häufig auch nach Diagnosestellung limitiert. Bei *ADCY5*-assoziierten Dyskinesien führten medikamentöse Therapien mit Clonazepam, Clobazam bzw. Methylphenidat zu einer Verbesserung der Symptome (Chang et al., 2016; Tübing et al., 2018). Einige *ADCY5*-Mutationsträger profitierten von einer tiefen Hirnstimulation (Chang et al., 2016; Dy et al., 2016; Meijer et al., 2017).

Die in der vorgelegten Arbeit entdeckten Mutationen stellen für die bearbeiteten Erkrankungen zusammen mit den in den letzten Jahren publizierten Informationen eine

Basis für ein besseres Verständnis der jeweiligen Pathophysiologie und für die Entwicklung zukünftiger Behandlungsstrategien dar. Auf dem Weg dorthin sind jedoch weitere genetische, aber auch funktionelle und schließlich klinische Studien nötig.

5 Zusammenfassung

Autosomal-rezessiv vererbte Ataxien sind eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von Bewegungsstörungen mit Kleinhirnsyndrom beginnend im Kindesalter. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte auf Grundlage von Datensätzen aus vorab durchgeführten Exom-Sequenzierungen mithilfe einer ergebnisoffenen *in-silico*-Analyse und konventionellen Sanger-Sequenzierungen eine homozygote c.1150_1151delTT Mutation im Gen *Anoctamin 10* als Krankheitsursache der an einer autosomal-rezessiven zerebellären Ataxie erkrankten Individuen zweier serbischer Roma-Familien ausgemacht werden. Ein dem Anschein nach dominantes Vererbungsmuster hatte zuvor die Diagnosefindung erschwert. Mehrere *nicht*-betroffene Mitglieder der zwei Roma-Familien sowie zwei angeheiratete Personen stellten sich als heterozygote Träger derselben Deletion heraus, was für eine eingeschränkte genetische Vielfalt innerhalb dieser Population spricht. Anschließend konnte die c.1150_1151delTT Mutation zusätzlich bei zwei Individuen einer weiteren Roma-Familie aus Serbien in homozygotem Zustand nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf konnten Haplotypanalysen für die homozygoten Mutationsträger der drei serbischen Familien und der Betroffenen einer weiteren Roma-Familie aus Bulgarien, bei denen Chamova et al. (2012) dieselbe Deletion gefunden hatten, zeigen, dass die c.1150_1151delTT Mutation auf ein Gründerindividuum zurückzuführen ist, in dem die pathologische Genveränderung entstanden sein muss.

Gemischt-hyperkinetische Bewegungsstörungen mit paroxysmalen Anteilen werden unter anderem durch Mutationen im *Adenylatcyclase 5*-Gen hervorgerufen. Beim zweiten Teil der Arbeit konnten durch die Sequenzierungen aller kodierenden Abschnitte dieses Gens für 116 Patienten mit gemischt-hyperkinetischen Bewegungsstörungen und anschließender *in-silico*-Analyse der detektierten Varianten vier verschiedene pathologische Mutationen identifiziert werden: 1) c.3045C>A, 2) c.3074A>T, 3) c.1252C>G und 4) c.1252C>T. Die ersten drei dieser Missense-Mutationen waren zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben worden, sodass das Mutationsspektrum von *Adenylatcyclase 5*-assoziierten Dyskinesien hierdurch erweitert wurde. Für einen sporadischen Fall konnte die *de-novo*-Entstehung einer Mutation nachgewiesen werden und bei einem hereditären Fall wurde eine autosomal-dominante Vererbung sowie die Mosaikform einer Mutation gefunden. Darüber hinaus zeigten zwei Mutationsträger klinisch neben persistierenden

Dyskinesien Symptome einer alternierenden Hemiplegie des Kindesalters: Dieser Phänotyp war zuvor noch nicht im Zusammenhang mit *Adenylatcyclase 5*-Genmutationen bekannt, was wiederum das klinische Spektrum der Erkrankung erweiterte.

Um die zugrundeliegenden Pathomechanismen beider Krankheitsbilder besser zu verstehen und letzten Endes Therapieoptionen für die Betroffenen zu entwickeln, bedarf es weiterer genetischer, funktioneller und schließlich klinischer Studien.

6 Literaturverzeichnis

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010): A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7: 248–249
- Anheim M, Tranchant C, Koenig M (2012): The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med* 366: 636–646
- Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR (2015): A global reference for human genetic variation. *Nature* 526: 68–74
- Balreira A, Boczonadi V, Barca E, Pyle A, Bansagi B, Appleton M, Graham C, Hargreaves IP, Rasic VM, Lochmüller H, Griffin H, Taylor RW, Naini A, Chinnery PF, Hirano M, Quinzii CM, Horvath R (2014): ANO10 mutations cause ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *J Neurol* 261: 2192–2198
- Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J (2011): Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 12: 745–755
- Barboi AC (2000): Cerebellar ataxia. *Arch Neurol* 57: 1525–1527
- Barrett MJ, Williams ES, Chambers C, Dhamija R (2017): Autosomal recessive inheritance of ADCY5-related generalized dystonia and myoclonus. *Neurol Genet* 3: 193
- Behjati S, Tarpey PS (2013): What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 98: 236–238
- Bhatia KP (2011): Paroxysmal dyskinesias. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 26: 1157–1165
- Bird TD (2018): Hereditary Ataxia Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, Amemiya A (Hrsg.): *GeneReviews* [Internet]. University of Washington, Seattle, Seattle (WA)
- Blumkin L, Lerman-Sagie T, Westenberger A, Ben-Pazi H, Zerem A, Yosovich K, Lev D (2018): Multiple Causes of Pediatric Early Onset Chorea-Clinical and Genetic Approach. *Neuropediatrics* 49: 246–255
- Bresch C, Hausmann R (1972): Der Genetische Code. In: *Klassische und molekulare Genetik*. 3. Aufl., Springer, Berlin, 243–278

- Buselmaier W, Tariverdian G (2006): Formale Genetik. In: Humangenetik. 4. Aufl., Springer, Heidelberg, 175–224
- Carapito R, Paul N, Untrau M, Le Gentil M, Ott L, Alsaleh G, Jochem P, Radosavljevic M, Le Caignec C, David A, Damier P, Isidor B, Bahram S (2015): A de novo ADCY5 mutation causes early-onset autosomal dominant chorea and dystonia. *Mov Disord* 30: 423–427
- Carecchio M, Mencacci NE (2017): Emerging Monogenic Complex Hyperkinetic Disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17: 97
- Carecchio M, Mencacci NE, Iodice A, Pons R, Panteghini C, Zorzi G, Zibordi F, Bonakis A, Dinopoulos A, Jankovic J, Stefanis L, Bhatia KP, Monti V, R'Bibo L, Veneziano L, Garavaglia B, Fusco C, Wood N, Stamelou M, Nardocci N (2017): ADCY5-related movement disorders: Frequency, disease course and phenotypic variability in a cohort of paediatric patients. *Parkinsonism Relat Disord* 41: 37–43
- Chamova T, Florez L, Guergueltcheva V, Raycheva M, Kaneva R, Lochmüller H, Kalaydjieva L, Tournev I (2012): ANO10 c.1150_1151del is a founder mutation causing autosomal recessive cerebellar ataxia in Roma/Gypsies. *J Neurol* 259: 906–911
- Chamova T, Guergueltcheva V, Gospodinova M, Krause S, Cirak S, Kaprelyan A, Angelova L, Mihaylova V, Bichev S, Chandler D, Naydenov E, Grudkova M, Djukmedzhiev P, Voit T, Pogoryelova O, Lochmüller H, Goebel HH, Bahlo M, Kalaydjieva L, Tournev I (2015): GNE myopathy in Roma patients homozygous for the p.I618T founder mutation. *Neuromuscul Disord* 25: 713–718
- Chang FCF, Westenberger A, Dale RC, Smith M, Pall HS, Perez-Dueñas B, Grattan-Smith P, Ouvrier RA, Mahant N, Hanna BC, Hunter M, Lawson JA, Max C, Sachdev R, Meyer E, Crimmins D, Pryor D, Morris JGL, Münchau A, Grozeva D, Carss KJ, Raymond L, Kurian MA, Klein C, Fung VSC (2016): Phenotypic insights into ADCY5-associated disease. *Mov Disord* 7: 1033–1040
- Chastain EC (2015): Targeted Hybrid Capture Methods. In: Kulkarni S, Pfeifer J (Hrsg.): *Clinical Genomics*. Academic Press, Amsterdam, 37–55
- Chen D-H, Méneret A, Friedman JR, Korvatska O, Gad A, Bonkowski ES, Stessman HA, Doummar D, Mignot C, Anheim M, Bernes S, Davis MY, Damon-Perrière N, Degos B, Grabli D, Gras D, Hisama FM, Mackenzie KM, Swanson PD, Tranchant C, Vidailhet M, Winesett S, Trouillard O, Amendola LM, Dorschner MO, Weiss M, Eichler EE, Torkamani A, Roze E, Bird TD, Raskind WH (2015): ADCY5-related

- dyskinesia: Broader spectrum and genotype–phenotype correlations. *Neurology* 85: 2026–2035
- Chen Y-Z, Friedman JR, Chen D-H, Chan GC-K, Bloss CS, Hisama FM, Topol SE, Carson AR, Pham PH, Bonkowski ES, Scott ER, Lee JK, Zhang G, Oliveira G, Xu J, Scott-Van Zeeland AA, Chen Q, Levy S, Topol EJ, Storm D, Swanson PD, Bird TD, Schork NJ, Raskind WH, Torkamani A (2014): Gain-of-function ADCY5 mutations in familial dyskinesia with facial myokymia. *Ann Neurol* 75: 542–549
- Chen Y-Z, Matsushita MM, Robertson P, Rieder M, Girirajan S, Antonacci F, Lipe H, Eichler EE, Nickerson DA, Bird TD, Raskind WH (2012): Autosomal dominant familial dyskinesia and facial myokymia: single exome sequencing identifies a mutation in adenylate cyclase 5. *Arch Neurol* 69: 630–635
- Douglas AGL, Andreoletti G, Talbot K, Hammans SR, Singh J, Whitney A, Ennis S, Foulds NC (2017): ADCY5-related dyskinesia presenting as familial myoclonus-dystonia. *Neurogenetics* 18: 111–117
- Dragašević NT, Čuljković B, Klein C, Ristić A, Keckarević M, Topisirović I, Vukosavić S, Svetel M, Kock N, Stefanova E, Romac S, Kostić VS (2006): Frequency analysis and clinical characterization of different types of spinocerebellar ataxia in Serbian patients. *Mov Disord* 21: 187–191
- Dragašević-Mišković N, Domingo A, Dobričić V, Max C, Braenne I, Petrović I, Grütz K, Pawlack H, Tournev I, Kalaydjieva L, Svetel M, Lohmann K, Kostić VS, Westenberger A (2016): Seemingly dominant inheritance of a recessive ANO10 mutation in romani families with cerebellar ataxia. *Mov Disord* 31: 1929–1931
- Dy ME, Chang FCF, Jesus SD, Anselm I, Mahant N, Zeilman P, Rodan LH, Foote KD, Tan W-H, Eskandar E, Sharma N, Okun MS, Fung VSC, Waugh JL (2016): Treatment of ADCY5-associated dystonia, chorea, and hyperkinetic disorders with deep brain stimulation: A multicenter case series. *J Child Neurol* 31: 1027–1035
- Embiruçu EK, Martyn ML, Schlesinger D, Kok F (2009): Autosomal recessive ataxias: 20 types, and counting. *Arq Neuropsiquiatr* 67: 1143–1156
- Erro R, Sheerin U-M, Bhatia KP (2014): Paroxysmal dyskinesias revisited: a review of 500 genetically proven cases and a new classification. *Mov Disord* 29: 1108–1116
- Espinós C, Palau F (2009): Genetics and pathogenesis of inherited ataxias and spastic paraplegias. In: Espinós C, Felipe V, Palau F (Hrsg.): *Inherited Neuromuscular Diseases*. Springer, Dordrecht, 263–296
- Fahn S (2011): Classification of movement disorders. *Mov Disord* 26: 947–957

- Fahn S, Greene PE, Ford B, Bressman SB, Frucht SJ (2009): Movement Disorders. In: Rosenberg RN (Hrsg.): Atlas of Clinical Neurology. 3. Aufl., Current Medicine Group, Philadelphia, 341–394
- Fernandez M, Raskind W, Wolff J, Matsushita M, Yuen E, Graf W, Lipe H, Bird T (2001): Familial dyskinesia and facial myokymia (FDFM): a novel movement disorder. *Ann Neurol* 49: 486–492
- Finsterer J (2009): Ataxias with autosomal, X-chromosomal or maternal inheritance. *Can J Neurol Sci* 36: 409–428
- Fogel BL, Lee H, Deignan JL, Strom SP, Kantarci S, Wang X, Quintero-Rivera F, Vilain E, Grody WW, Perlman S, Geschwind DH, Nelson SF (2014): Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia. *JAMA Neurol* 71: 1237–1246
- Friedman JR, Méneret A, Chen D-H, Trouillard O, Vidailhet M, Raskind WH, Roze E (2016): ADCY5 mutation carriers display pleiotropic paroxysmal day and nighttime dyskinesias. *Mov Disord* 31: 147–148
- Gerrits MCF, Foncke EMJ, de Haan R, Hedrich K, van de Leemput YLC, Baas F, Ozelius LJ, Speelman JD, Klein C, Tijssen M a. J (2006): Phenotype-genotype correlation in Dutch patients with myoclonus-dystonia. *Neurology* 66: 759–761
- Gottlieb B, Beitel LK, Trifiro MA (2001): Somatic mosaicism and variable expressivity. *Trends Genet* 17: 79–82
- Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (2000): Penetrance and expressivity. In: *An Introduction to Genetic Analysis* [Internet]. 7. Aufl., W. H. Freeman, New York
- Grünewald A, Djarmati A, Lohmann-Hedrich K, Farrell K, Zeller JA, Allert N, Papengut F, Petersen B, Fung V, Sue CM, O’Sullivan D, Mahant N, Kupsch A, Chuang RS, Wiegers K, Pawlack H, Hagenah J, Ozelius LJ, Stephani U, Schuit R, Lang AE, Volkmann J, Münchau A, Klein C (2008): Myoclonus-dystonia: significance of large SGCE deletions. *Hum Mutat* 29: 331–332
- Gutmann L (1991): AAEM Minimonograph #37: Facial and Limb Myokymia. *Muscle Nerve* 14: 1043–1049
- Hartzell HC, Yu K, Xiao Q, Chien L-T, Qu Z (2009): Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Physiol* 587: 2127–2139
- Hersheson J, Haworth A, Houlden H (2012): The inherited ataxias: Genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics. *Hum*

Mutat 33: 1324–1332

- Illarioshkin SN, Bagieva GK, Klyushnikov SA, Ovchinnikov IV, Markova ED, Ivanova-Smolenskaya IA (2000): Different phenotypes of Friedreich's ataxia within one „pseudo-dominant“ genealogy: relationships between trinucleotide (GAA) repeat lengths and clinical features. *Eur J Neurol* 7: 535–540
- Isackson PJ, Tarnopolsky M, Vladutiu GD (2005): A novel mutation in the PYGM gene in a family with pseudo-dominant transmission of McArdle disease. *Mol Genet Metab* 85: 239–242
- Ivanov IS, Azmanov DN, Ivanova MB, Chamova T, Pacheva IH, Panova MV, Song S, Morar B, Yordanova RV, Galabova FK, Sotkova IG, Linev AJ, Bitchev S, Shearwood A-MJ, Kancheva D, Gabrikova D, Karcagi V, Guerguelcheva V, Geneva IE, Bozhinova V, Stoyanova VK, Kremensky I, Jordanova A, Savov A, Horvath R, Brown MA, Tournev I, Filipovska A, Kalaydjieva L (2014): Founder p.Arg 446* mutation in the PDHX gene explains over half of cases with congenital lactic acidosis in Roma children. *Mol Genet Metab* 113: 76–83
- Iwamoto T, Okumura S, Iwatsubo K, Kawabe J-I, Ohtsu K, Sakai I, Hashimoto Y, Izumitani A, Sango K, Ajiki K, Toya Y, Umemura S, Goshima Y, Arai N, Vatner SF, Ishikawa Y (2003): Motor dysfunction in type 5 adenylyl cyclase-null mice. *J Biol Chem* 278: 16936–16940
- Jayadev S, Bird TD (2013): Hereditary ataxias: overview. *Genet Med* 15: 673–683
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL (2008): NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 36: W5–W9
- Kamate M, Mittal N (2018): ADCY5-related dyskinesia. *Neurol India* 66: S141–S142
- Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J, Steegborn C (2006): Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* 362: 623–639
- Kent WJ (2002): BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 12: 656–664
- Klein C, Chuang R, Marras C, Lang AE (2011): The curious case of phenocopies in families with genetic Parkinson's disease. *Mov Disord* 26: 1793–1802
- Kobayashi T, Matsumine H, Zhang J, Imamichi Y, Mizuno Y, Hattori N (2003): Pseudo-autosomal dominant inheritance of PARK2: Two families with parkin gene mutations. *J Neurol Sci* 207: 11–17
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009): Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4: 1073–1081

- de La Faille R, Vallet M, Venisse A, Nau V, Collet-Gaudillat C, Houillier P, Jeunemaitre X, Vargas-Poussou R (2011): A pseudo-dominant form of Gitelman's syndrome. *NDT Plus* 4: 386–389
- Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, Das K, Toy T, Harry B, Yourshaw M, Fox M, Fogel BL, Martinez-Agosto JA, Wong DA, Chang VY, Shieh PB, Palmer CGS, Dipple KM, Grody WW, Vilain E, Nelson SF (2014): Clinical exome sequencing for genetic identification of rare mendelian disorders. *JAMA* 312: 1880–1887
- Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won H-H, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG, Exome Aggregation Consortium (2016): Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536: 285–291
- Lohmann K, Klein C (2014): Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 11: 699–707
- Lücking CB, Bonifati V, Periquet M, Vanacore N, Brice A, Meco G (2001): Pseudo-dominant inheritance and exon 2 triplication in a family with parkin gene mutations. *Neurology* 57: 924–927
- Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, Mercimek-Mahmutoglu S, Ebrahimi-Fakhari D, Warner TT, Durr A, Assmann B, Lohmann K, Kostic V, Klein C (2016): Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov Disord* 31: 436–457
- Maruyama H, Morino H, Miyamoto R, Murakami N, Hamano T, Kawakami H (2014): Exome sequencing reveals a novel ANO10 mutation in a Japanese patient with

- autosomal recessive spinocerebellar ataxia. *Clin Genet* 85: 296–297
- Matsuoka I, Suzuki Y, Defer N, Nakanishi H, Hanoune J (1997): Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *J Neurochem* 68: 498–506
- McCann H, Fung VSC, Klein C, Halliday GM (2015): Unusual α -synuclein and cerebellar pathologies in a case of hereditary myoclonus-dystonia without SGCE mutation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41: 837–842
- McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (2019): Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. URL: <https://omim.org/> [Aufruf am: 15. Juli 2015]
- Meijer IA, Miravite J, Kopell BH, Lubarr N (2017): Deep Brain Stimulation in an Additional Patient With ADCY5-Related Movement Disorder. *J Child Neurol* 32: 438–439
- Mencacci NE, Erro R, Wiethoff S, Hersheson J, Ryten M, Balint B, Ganos C, Stamelou M, Quinn N, Houlden H, Wood NW, Bhatia KP (2015): ADCY5 mutations are another cause of benign hereditary chorea. *Neurology* 85: 80–88
- Minnerop M, Bauer P (2015): Autosomal recessive cerebellar ataxia 3 due to homozygote c.132dupA mutation within the ANO10 gene. *JAMA Neurol* 72: 238–239
- Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335–350
- National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health (2019): PubMed. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> [Aufruf am: 11. Mai 2019]
- Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, Hoefsloot LH, Kamsteeg E-J, Mensenkamp AR, Rodenburg RJT, Yntema HG, Spruijt L, Vermeer S, Rinne T, van Gassen KL, Bodmer D, Lugtenberg D, de Reuver R, Buijsman W, Derks RC, Wieskamp N, van den Heuvel B, Ligtenberg MJL, Kremer H, Koolen DA, van de Warrenburg BPC, Cremers FPM, Marcelis CLM, Smeitink JAM, Wortmann SB, van Zelst-Stams WAG, Veltman JA, Brunner HG, Scheffer H, Nelen MR (2013): A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat* 34: 1721–1726
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (Hrsg.) (2016): Patterns of Single-Gene Inheritance. In: *Genetics in medicine*. 8. Aufl., Elsevier, Philadelphia, 107–132
- Paciorkowski AR, McDaniel SS, Jansen LA, Tully H, Tuttle E, Ghoneim DH, Tupal S,

- Gunter SA, Vasta V, Zhang Q, Tran T, Liu YB, Ozelius LJ, Brashear A, Sweadner KJ, Dobyns WB, Hahn S (2015): Novel mutations in ATP1A3 associated with catastrophic early life epilepsy, episodic prolonged apnea, and postnatal microcephaly. *Epilepsia* 56: 422–430
- Paulson HL (2009): The spinocerebellar ataxias. *J Neuroophthalmol* 29: 227–237
- Petrovski S, Wang Q, Heinzen EL, Allen AS, Goldstein DB (2013): Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS Genet* 9: e1003709
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987): A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336–341
- Pyle A, Smertenko T, Bargiela D, Griffin H, Duff J, Appleton M, Douroudis K, Pfeffer G, Santibanez-Koref M, Eglon G, Yu-Wai-Man P, Ramesh V, Horvath R, Chinnery PF (2015): Exome sequencing in undiagnosed inherited and sporadic ataxias. *Brain* 138: 276–283
- Renaud M, Anheim M, Kamsteeg E-J, Mallaret M, Mochel F, Vermeer S, Drouot N, Pouget J, Redin C, Salort-Campana E, Kremer HPH, Verschuuren-Bemelmans CC, Muller J, Scheffer H, Durr A, Tranchant C, Koenig M (2014): Autosomal recessive cerebellar ataxia type 3 due to ANO10 mutations: delineation and genotype-phenotype correlation study. *JAMA Neurol* 71: 1305–1310
- Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M (2019): CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 47: D886–D894
- Sailer A, Houlden H (2012): Recent advances in the genetics of cerebellar ataxias. *Curr Neurol Neurosci Rep* 12: 227–236
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463–5467
- Schirinzi T, Graziola F, Nicita F, Travaglini L, Stregapede F, Valeriani M, Curatolo P, Bertini E, Vigeveno F, Capuano A (2018): Childhood Rapid-Onset Ataxia: Expanding the Phenotypic Spectrum of ATP1A3 Mutations. *Cerebellum* 17: 489–493
- Schneider SA, Bird T (2016): Huntington’s disease, huntington’s disease look-alikes, and benign hereditary chorea: what’s new? *Mov Disord Clin Pract* 3: 342–354
- Schulze TG, McMahon FJ (2004): Defining the phenotype in human genetic studies:

- forward genetics and reverse phenotyping. *Hum Hered* 58: 131–138
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014): MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11: 361–362
- Shaw C, Hisama F, Friedman J, Bird TD (2015): ADCY5-Related Dyskinesia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, Amemiya A (Hrsg.): *GeneReviews* [Internet]. University of Washington, Seattle, Seattle (WA)
- Sherry ST, Ward M-H, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K (2001): dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29: 308–311
- Sweney MT, Newcomb TM, Swoboda KJ (2015): The expanding spectrum of neurological phenotypes in children with ATP1A3 mutations, alternating hemiplegia of childhood, rapid-onset dystonia-parkinsonism, CAPOS and beyond. *Pediatr Neurol* 52: 56–64
- Sweney MT, Silver K, Gerard-Blanluet M, Pedespan J-M, Renault F, Arzimanoglou A, Schlesinger-Massart M, Lewelt AJ, Reyna SP, Swoboda KJ (2009): Alternating hemiplegia of childhood: Early characteristics and evolution of a neurodevelopmental syndrome. *Pediatrics* 123: e534-541
- Tübing J, Bohnenpoll J, Spiegler J, Gillessen-Kaesbach G, Bäumer T, Max C, Sperner J, Klein C, Münchau A (2018): Methylphenidate Can Improve Chorea in NKX2.1 and ADCY5 Mutation-positive Patients—A Report of Two Children. *Mov Disord Clin Pract* 5: 343–345
- Tunc S, Brüggemann N, Baaske MK, Hartmann C, Grütz K, Westenberger A, Klein C, Münchau A, Bäumer T (2017): Facial twitches in ADCY5-associated disease - Myokymia or myoclonus? An electromyography study. *Parkinsonism Relat Disord* 40: 73–75
- University of Washington (2014): Exome Variant Server. URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> [Aufruf am: 13. Oktober 2014]
- University of Wisconsin-Madison (2019): Marshfield Comprehensive Human Genetic Maps. URL: <https://www.biostat.wisc.edu/~kbroman/publications/mfdmaps/> [Aufruf am: 21. Januar 2019]
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM (2007): Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35: W71-74
- Vermeer S, Hoischen A, Meijer RPP, Gilissen C, Neveling K, Wieskamp N, Brouwer A de, Koenig M, Anheim M, Assoum M, Drouot N, Todorovic S, Milic-Rasic V, Lochmüller H, Stevanin G, Goizet C, David A, Durr A, Brice A, Kremer B,

- Warrenburg BPC van de, Schijvenaars MMVAP, Heister A, Kwint M, Arts P, Wijst J van der, Veltman J, Kamsteeg E-J, Scheffer H, Knoers N (2010): Targeted next-generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals ANO10 mutations in patients with autosomal-recessive cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 87: 813–819
- Waalkens AJE, Vansenne F, van der Hout AH, Zutt R, Mourmans J, Tolosa E, de Koning TJ, Tijssen MAJ (2018): Expanding the ADCY5 phenotype toward spastic paraparesis: A mutation in the M2 domain. *Neurol Genet* 4: e214
- Wang K, Li M, Hakonarson H (2010): ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38: e164
- Weissbach A, Djarmati A, Klein C, Dragašević N, Zühlke C, Raković A, Gužvić M, Butz E, Tönnies H, Siebert R, Petrović I, Svetel M, Kostić VS, Lohmann K (2010): Possible genetic heterogeneity of spinocerebellar ataxia linked to chromosome 15. *Mov Disord* 25: 1577–1582
- Westenberger A (2015): Genetic Factors Causing Dystonia. *Med. Habil. Schr., Lübeck*
- Westenberger A, Max C, Brüggemann N, Domingo A, Grütz K, Pawlack H, Weissbach A, Kühn AA, Spiegler J, Lang AE, Sperner J, Fung VSC, Schallner J, Gillessen-Kaesbach G, Münchau A, Klein C (2017): Alternating Hemiplegia of Childhood as a New Presentation of Adenylate Cyclase 5-Mutation-Associated Disease: A Report of Two Cases. *J Pediatr* 181: 306-308.e1
- Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R, Bekheirnia MR, Leduc MS, Kirby A, Pham P, Scull J, Wang M, Ding Y, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Eng CM (2013): Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 369: 1502–1511
- Yoshida K, Miyatake S, Kinoshita T, Doi H, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Matsumoto N (2014): „Cortical cerebellar atrophy“ dwindles away in the era of next-generation sequencing. *J Hum Genet* 59: 589–590
- Zech M, Boesch S, Jochim A, Weber S, Meindl T, Schormair B, Wieland T, Lunetta C, Sansone V, Messner M, Mueller J, Ceballos-Baumann A, Strom TM, Colombo R, Poewe W, Haslinger B, Winkelmann J (2016): Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up. *Mov Disord* 32: 549–559
- Zech M, Jech R, Wagner M, Mantel T, Boesch S, Nocker M, Jochim A, Berutti R, Havránková P, Fečíková A, Kemlink D, Roth J, Strom TM, Poewe W, Růžička E,

- Haslinger B, Winkelmann J (2017): Molecular diversity of combined and complex dystonia: insights from diagnostic exome sequencing. *Neurogenetics* 18: 195–205
- Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Girón CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, Lavidas I, Liu Z, Loveland JE, Maurel T, McLaren W, Moore B, Mudge J, Murphy DN, Newman V, Nuhn M, Ogeh D, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Zadissa A, Frankish A, Hunt SE, Kostadima M, Langridge N, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Aken BL, Cunningham F, Yates A, Flicek P (2018): Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res* 46: D754–D761
- Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, Scheidtmann K, Kern P, Winkelmann J, Müller-Myhsok B, Riedel L, Bauer M, Müller T, Castro M, Meitinger T, Strom TM, Gasser T (2001): Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet* 29: 66–69

7 Anhang

7.1 Tabellen

Tabelle 7.1 Details zu verwendeten Primern. F - Vorwärts (engl. *forward*); R - Rückwärts (engl. *reverse*); bp - Basenpaare; ex - Exon.

Primer- bezeichnung (Gen und Exon)	Sequenz (5'→3') (F; R)	Länge des Produkts [bp]	Annealing- Temperatur [°C]	Sequenz- PCR-Primer; Besonderheit
ANO10_ex6	GGAAGTGAGGGTTGAATGATCC; GGCATGGAGATCATCAGTGTC	856	63,5	R
KCNJ12_ex3	TGGCGGCCTTCCTCTTCTCC; GGGCCTCCACAATGTGGCTC	288	63	F
KCNJ12_ex3b	TCTTCATGGTGGTGGCCCAG; GGGCCTCCACAATGTGGCTC	204	65	F
CLASP2_ex26	AATTTTCCCCCTGGAAACCAGACG; TCAGCGGGGTGTGGTGGC	483	65	F
TRANK1_ex7	GCCTGCATCTCCCCACAC; AGCTTACCCACCCACCCAC	494	65	F
C11orf21_ex1	GCCCCGGAAGAAGGGCAG; GCTGTCACAGGACATTCAAAGGG	380	63	F
ADCY5_ex1a	TGGAGGTGGGTCTGGAGG; GAGTGGGGTAAGAAGCTCCC	827	60	F+R; GC-rich
ADCY5_ex1b	GACGGGGGTGCCAAGATG; CGACGGGAACCTTCTTGGAGC	829	60	R; GC-rich
ADCY5_ex1a_n	GACGGGGGTGCCAAGATG; TCCAGACCCACCTCCACC	642	60	R
ADCY5_ex1b_n	CGGCTCCACCAAGAAACCC; CAGGTAGGGCAGCTGGAG	661	60	R; GC-rich
ADCY5_ex1c	AGGTGGGTCTGGAGGAGC; TGTAATGAAGCCGCTGGGG	848	60	R
ADCY5_ex2	TGCTCGGCTGCTCACAGTG; ACTCTCTCCAGGGGAAACATTC	468	63	F
ADCY5_ex3	CGAGAAATGTGGCGAGGGAG; ACTCATTTAACACACCTGGAGGG	548	65	R
ADCY5_ex4	AAGAAGTCGAGGCTGCAGTG; AGCAGGATATACCCAGGCAC	400	60	F; GC-rich

ADCY5_ex5	TGCGCTCACTGCCCTAAAAG; CTCAGCTTGGCTGGGCAC	395	63	F
ADCY5_ex6	GAAGCAGCAGGGCTCTAGG; ACTTCCACTGTGCTCACCCC	575	63	F
ADCY5_ex7	AGACAGTGTGGTTGCAGTGG; ACTGCCGGGGTCCTTTTTAAG	500	65	R
ADCY5_ex8	AGGGCTGTGCAGAGAGGAAAG; GCACTTGTATTTGCTTGTGTGGC	400	63	R
ADCY5_ex9	CGTCTAGCACAGCACCTGTC; ACCACCTGACGGCTAGGG	388	65	F
ADCY5_ex10	TGCCCTGATTGGGCTGATGG; AAACTGAGGCCACCCCTTCC	395	63	F
ADCY5_ex11	CTTCCCTGTTGTGGGAGTGG; TCAGACCCCTGGCTTCTAC	400	65	F
ADCY5_ex12	CTGAAGCTGTGAGGATGGGC; CATTGGAGAGGTGTGGCTGG	357	65	F
ADCY5_ex13	ATGCTGGGGAGAGACACAGG; AAGCTGATCCCAGACCCAGG	373	60	R; <i>GC-rich</i>
ADCY5_ex14	GGACAGCTGGGCAGACTTTG; GAGATACTGGGGTAAGCAGGC	482	63	F
ADCY5_ex15	CAGAAACATGCCAGCCCAG; TGACCTGAGGCCACTCCAAC	491	63	R
ADCY5_ex16	ATATGGAGGGTGAATGGGGC; AGACTACAGATCACCTTGGCAG	393	65	F
ADCY5_ex17	GCAAGCAGGGTCTGAGATGG; CAGGGCACCAAGTGGCTTC	493	65	F
ADCY5_ex18	CTCCAGGCTTGTTCTGCTC; AGTGACCTCAGGCCAGACAC	826	63	F
ADCY5_ex19	GTCCAGTGGGTGAGTGAGTG; CGCCTGGCCTTCTACCTTG	532	63	F
ADCY5_ex20	GGAGGCTGCAGGGTTTAGC; ATCACCCCTGAATCTGGCTGC	401	63	F
ADCY5_ex21	AGCTGCCCCTCTCCTTCTG; CAAGTGAAAATCTCAGCAGCG	383	63	F

Tabelle 7.2 Verwendete Mikrosatelliten. Die Informationen zu den einzelnen Mikrosatelliten wurden der *Marshfield* Datenbank entnommen (<https://www.biostat.wisc.edu/~kbroman/publications/mfdmaps/>). Dem Vorwärts-Primer der Mikrosatelliten wurde am 5'-Ende jeweils die FAM-M13F Sequenz (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') angehängt. F - Vorwärts (engl. *forward*); R - Rückwärts (engl. *reverse*).

Gen	Mikrosatellit	Sequenz (5'→3') (F_M13; R)	Hetero- zygotie	Repeat- Anzahl- Bereich (min.- max.)	Repeat-Anzahl (Allel 1, Allel 2)	
					CEPH 1331- 01	CEPH 1331- 02
ANO10	D3S3647	GGCTCAGAGCAGGCATAC; CCTAACTAATAAAATGTGTTCCCAG	0,73	218-228	224, 220	222, 220
	D3S3678	ACCTGTAGAGTCCAGGGATGC; GGGCTCATCTCATGCAAAG	0,76	247-265	265, 265	263, 261
	D3S3559	GCTCTACATCAGGCAACC; AAAAATAATTGGACCTGTAAAAAC	0,85	173-196	186, 181	182, 175
	D3S3685	AACAACCCAGCTCTTTGTG; AATACAGGTAACCTGCCC	0,89	195-221	211, 195	219, 207
	D3S3624	GGGATATGACTGCCAAC; GCCTCAAAATGCGAATG	0,72	134-154	152, 150	150, 146
ADCY5	D3S1269	CCTTGAGACAGACAGATCACA; ATTAGCACCTAGACCAAGGG	0,85	198-216	212, 208	202, 200
	D3S3636	GATCTACAGCTCCTNCCCAG; GGTGAATGAATGGACTCTTGGT	0,87	160-196	192, 184	196, 192
	D3S3573	TACATCTTGAAAGATCATTCTCCA; AGCTCTGAAGTAAGTGNTTTG	0,77	164-176	176, 172	172, 170
	D3S3674	TTGCCTGCAACAATGATTAC; GCCTTGGAACCTTGAA	0,82	181-205	197, 185	187, 187
	D3S1267	ACTAAGTGGCCACACAGAAA; AGTCACCCATACCAAGGAAG	0,88	129-167	151, 147	133, 133

Tabelle 7.3 Genombezeichnungen und zugehörige Gene der Proteinsequenzen für miteinander verglichene Spezies. Die in der Tabelle aufgeführten Informationen zu den Spezies und den zugehörigen Proteinsequenzen (siehe Abbildung 3.5, S. 41 und Abbildung 3.8, S. 44) sind der *Ensembl*-Datenbank entnommen (siehe 2.3.7.4).

Spezies	Systemischer Name	Genom-Assembly	Gen
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	GRCh37	<i>ADCY5</i>
Rhesusaffe	<i>Macaca mulatta</i>	Mmul_8.0.1	<i>ADCY5</i>
Hauskatze	<i>Felis catus</i>	Felis_catus_9.0	<i>ADCY5</i>
Maus	<i>Mus musculus</i>	GRCm38	<i>Adcy5</i>
Bankivahuhn	<i>Gallus gallus</i>	GRCg6a	<i>ADCY5</i>
Kugelfisch	<i>Takifugu rubripes</i>	FUGU5	<i>adcy5</i>
Zebrabärbling	<i>Danio rerio</i>	GRCz11	<i>adcy5</i>
Tropischer Krallenfrosch	<i>Xenopus tropicalis</i>	JGI_4.2	<i>adcy5l</i>
Taufliege	<i>Drosophila melanogaster</i>	BDGP6	<i>CG43373</i>
Fadenwurm	<i>Caenorhabditis elegans</i>	WBcel235	<i>acy-4</i>

7.2 Abbildungen

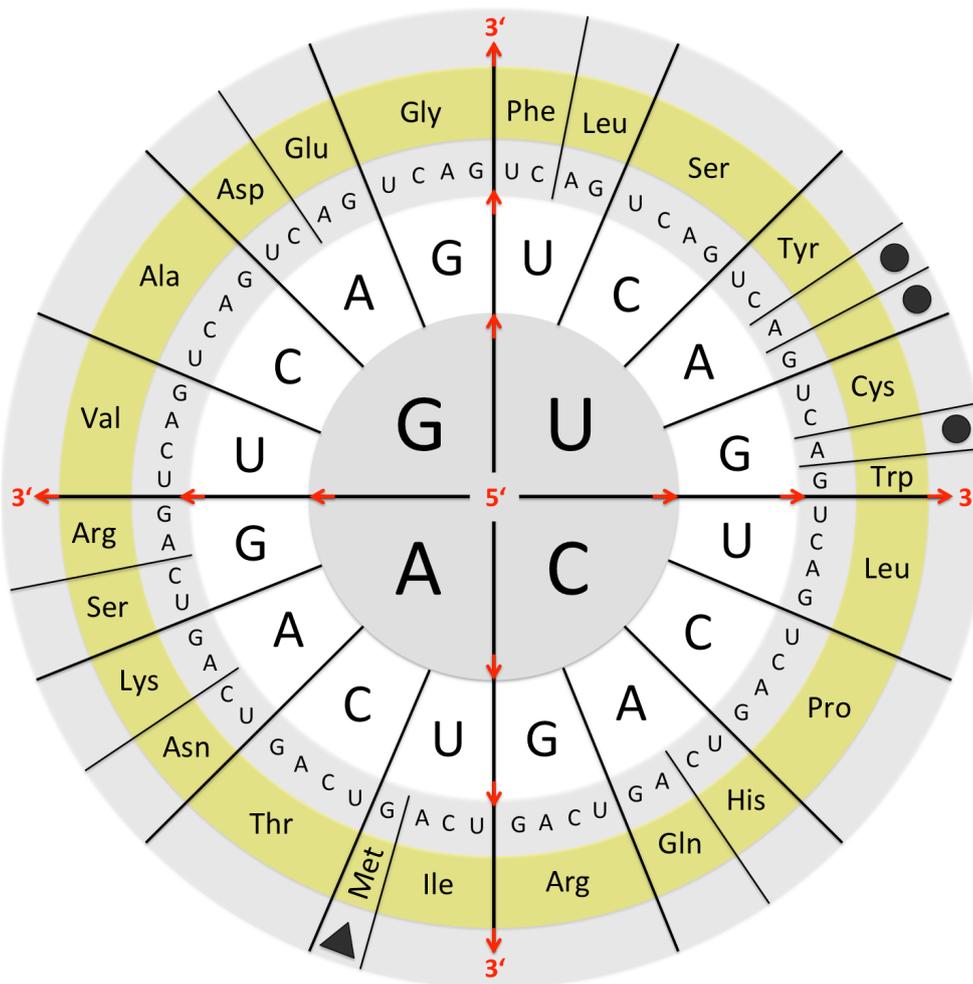


Abbildung 7.1 Der genetische Code. In Form einer sogenannten Code-Sonne ist hier der genetische Code gezeigt, welcher die Anleitung dafür darstellt, nach welchem Schema die in der DNA verschlüsselten, genetischen Informationen in Form einer Nukleinsäureabfolge während der Translation in eine Aminosäurekette (Protein) übersetzt werden. Beim Zwischenschritt der Transkription wird die Information des kodierenden DNA-Stranges in eine *messenger* RNA (mRNA) umgeschrieben. Diese enthält Uracil (U) anstelle von Thymin (T). Drei aufeinanderfolgende Basen werden als Codon bezeichnet und ergeben in dieser Darstellung von innen nach außen gelesen (entspricht 5'→3'-Richtung) entweder eine Aminosäure (gelb hinterlegt) oder beenden die Translation (Stopcodons: UAA, UAG und UGA, schwarze Punkte). Die Translation der mRNA beginnt bei der ersten Basenabfolge AUG (Startcodon, schwarzes Dreieck) ab dem 5'-Ende stets mit einem Methionin. (adaptiert von Bresch und Hausmann, 1972)

7.3 Klinische Informationen der Mutationsträger

Die folgenden Fallbeschreibungen entstammen den jeweiligen Befunden der untersuchenden Spezialisten für Bewegungsstörungen. Das Untersuchen von Patienten war nicht Teil der vorliegenden Arbeit.

7.3.1 Detaillierte Fallbeschreibungen aller Patienten mit *ADCY5*-Mutation

Patient L-3482 (p.Asp1015Glu, geb. 2000):

Dieser Patient wurde im Alter von zwei Jahren aus Südosteuropa adoptiert. Erst mit vier Jahren begann er zu laufen und zu sprechen. Während seines gesamten Lebens war er unruhig und konnte nicht still sitzen. In der frühen Kindheit entwickelte er Lähmungsattacken, die ohne eindeutige Trigger in unregelmäßigen Abständen zwischen einigen Malen pro Woche und mehrmals täglich auftraten. Die einzelnen Anfälle dauerten typischerweise 20 bis 30 Minuten und begannen mit einer Schwäche, die zunächst nur die Gesichtsmuskulatur betraf, sich jedoch anschließend auf die Extremitäten ausbreitete. Das exakte Verteilungsmuster variierte jeweils, jedoch bestand üblicherweise eine Halbseitenlähmung. Auch die Sprache und das Schlucken waren während dieser Anfälle beeinträchtigt, was eine ausgeprägte Sialorrhö und die Unfähigkeit zu Sprechen zur Folge hatte. Das Bewusstsein war während der Attacken jedoch stets erhalten. Typischerweise endeten die Attacken abrupt und der Patient war plötzlich wieder in der Lage, beide Körperhälften zu bewegen. Neuropsychologische Tests ergaben eine leichtgradige Entwicklungsstörung. Ein Defizit konnte er jedoch in der Grundschulzeit aufholen und die weiterführende Schule regulär beenden.

Bei der körperlichen Untersuchung zeigten sich ein leichtes Stottern und eine Dysarthrie. Er war etwas hypoton und es bestand eine geringfügige Verlangsamung der Hand- und Fingerbewegungen sowie eine generalisierte Chorea der orofazialen Muskulatur. Es zeigten sich vereinzelte, kurze Zuckungen in Körperteilen, die nicht an den jeweiligen Willkürbewegungen beteiligt waren. Hiervon waren vor allem der Nacken und die Beine betroffen. Ferner bestand ein intermittierender Retrocollis, der durch willkürliche Bewegungen ausgelöst wurde. Außerdem ergab die Untersuchung eine leichtgradige Dysmetrie und Dysdiadochokinese. Die Symptomatik war nicht progredient, sondern verbesserte sich im Krankheitsverlauf eher: Häufigkeit und Schwere der Attacken nahmen ab und es zeigte sich ein Rückgang der interiktalen Symptome (Westenberger et al., 2017).

Patient L-9494 (p.Glu1025Val, geb. 2005):

Bei diesem Patienten deutsch-algerischer Herkunft ist erstmals im Alter von drei Monaten eine verzögerte psychomotorische Entwicklung aufgefallen. Mit zwei Jahren begann er zu laufen und im selben Jahr zeigten sich zum ersten Mal schnelle, choreiforme Bewegungen. Im Alter von drei Jahren entwickelte er kurze Episoden plötzlicher Lähmungszustände ohne Bewusstseinsverlust, die maximal eine Minute andauerten. Die Anfälle waren durch eine akute Schwäche der Gesichts-, Nacken- und Rumpfmuskulatur, eine leichte Schwäche der Extremitäten, eine leichtgradige Chorea und eine generalisierte Dystonie gekennzeichnet. Letztere manifestierte sich perioral, an beiden Armen und in Form eines Retrocollis, der aufgrund einer Schwäche im Bereich der ventralen Halsmuskulatur besonders ausgeprägt war. Während der Anfälle konnte der Patient nicht sprechen und nur schwer schlucken. Kurz vor Ende der Attacken ließen zunächst die dystonen Anteile nach. Der schlaffe Muskeltonus überwog in dieser Zeit, sodass der Patient für ca. 30 Sekunden nur mit Mühe den Kopf halten konnte. Schließlich klang auch diese Schwäche sukzessive ab. Die Attacken ereigneten sich nach längeren Ruhephasen, beim Essen oder in Zuständen von Müdigkeit. Als der Patient älter wurde, verlängerte sich die Dauer der Attacken auf bis zu fünf Minuten.

Bei der körperlichen Untersuchung war der Patient durchgehend dysarthrisch und hypoton. Er hatte eine starke generalisierte Chorea, welche geringfügig die Haltungsstabilität verschlechterte jedoch insbesondere willkürliche Bewegungsabläufe (z. B. das Schreiben) beeinträchtigte. Außerdem zeigte sich eine ausgeprägte Kieferöffnungsdystonie. Diese war zwar auch in Ruhe vorhanden, wurde jedoch durch Willkürbewegungen von distalen Muskeln verstärkt. Ein Therapieversuch mit L-Dopa und Trihexyphenidyl hatte keinen Effekt auf die Symptome der Bewegungsstörung.

Zusätzlich bestand bei den Patienten L-3482 und L-9494 eine Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung. In beiden Fällen war die Familienanamnese nicht bekannt. Alle zusätzlichen Untersuchungen wie cMRTs, Elektroenzephalographien (EEG) und metabolische Analysen waren unauffällig. Bei Patient L-3482 wurde mit vier Jahren eine cMRT-Untersuchung durchgeführt, bei Patient L-9494 im Alter von drei Jahren (Westenberger et al., 2017).

Patient K1-1 (p.Arg418Trp, Sohn von K1-2, geb. 1994):

Dieser Patient kam nach einer unauffälligen Schwangerschaft durch einen komplikationslosen, elektiven Kaiserschnitt zur Welt. Im Alter von sieben Monaten fiel eine Verzögerung der motorischen Entwicklung auf und mit Beginn des zweiten Lebensjahres kam eine generalisierte, kinesiogene Choreoathetose hinzu. Die Meilensteine der motorischen und sprachlichen Entwicklung wurden verspätet erreicht: Mit fünf Jahren konnte er sich auf die Seite drehen und mit sieben Jahren frei sitzen. Er lernte nie zu krabbeln oder eigenständig zu laufen, aber konnte mit einem Jahr ein Laufgestell benutzen. Im Alter von sieben Jahren verwendete er einzelne Wörter, mit acht Jahren ganze Sätze. Die geistige Entwicklung war normal. Die generalisierte paroxysmale Choreoathetose variierte in ihrer Häufigkeit. Die einzelnen Anfälle dauerten jeweils einige Minuten und traten in *Clustern* auf (maximale Häufigkeit: Vier Anfälle pro Stunde). Er konnte nachts die ersten vier Stunden ohne Exazerbationen der unwillkürlichen Bewegungen schlafen. Letztere beeinträchtigten seinen Nachtschlaf jedoch in der Zeit nach Mitternacht. Die paroxysmalen Bewegungen schienen mit einer Epilepsie vereinbar zu sein und er erhielt eine EEG-Telemetrie. Eine Therapie mit Clonazepam (1,5 mg pro Tag) schien die ungewollten Bewegungen zu reduzieren. Es fanden erfolglose Therapieversuche mit L-Dopa (100 mg pro Tag für drei Monate), Valproat, Clobazam und Carbamazepin statt. Die unwillkürlichen Bewegungen waren ausgeprägter während des Schlafens nach Mitternacht, Bewegungsversuchen, psychischem Stress und bei zusätzlicher Krankheit. Eine rückläufige Entwicklung der erlernten motorischen Fähigkeiten zeigte sich nicht.

Bei der körperlichen Untersuchung im Alter von zehn Jahren zeigte sich eine Dysarthrie und eine generalisierte, kinesiogene Choreoathetose, von der die Extremitäten und der Rumpf betroffen waren. In Ruhe waren keine unwillkürlichen Bewegungen oder dystone Fehlhaltungen festzustellen. Bei ausgestreckten Armen zeigte sich beidseits eine dystone Haltung der oberen Extremität. Bei Untersuchung der Augenbewegungen zeigten sich normale Fingerfolgebewegungen, jedoch fehlende Sakkaden beim Blick nach oben. Weitere Symptome waren eine Kopfhaltenschwäche und eine axiale Hypotonie, welche eine Krümmung des Rumpfs zu Folge hatten. Der Tonus der unteren Extremität war beidseits spastisch. Die Reflexe waren insgesamt lebhaft und das Babinski-Zeichen beidseits positiv. Ansonsten war die Untersuchung von Kraft und Sensibilität unauffällig. Aufgrund der Häufigkeit der unwillkürlichen Bewegungen konnte die Koordination nicht untersucht werden. Er bewegte sich auf eine sehr spezielle, „froschartige“ Art und Weise: Da er

aufgrund der axialen Hypotonie nicht in der Lage war, seinen Rumpf in einer aufrechten Position zu halten, setzte er sich mit übereinander gekreuzten Beinen hin und streckte anschließend die Beine, um seinen Körper vorwärts zu bewegen. Um zu robben, nutzte er seine Arme (Chang et al., 2016).

Patientin K1-2 (stand für eine *ADCY5*-Genanalyse nicht zur Verfügung, Mutter von K1-1, geb. 1970):

Diese Patientin entwickelte im Alter von drei Jahren paroxysmale, generalisierte, Choreoathetose-ähnliche Bewegungen und dystone Fehlhaltungen. Sie ist die Tochter *nicht*-verwandter Eltern. Während der Schwangerschaft trat kurz vor der Geburt eine Präeklampsie bei der Mutter auf. Eine vaginale Geburt war aufgrund einer Steißlage erschwert, sodass sie durch einen komplikationslosen Kaiserschnitt zur Welt kam. Eine Neugeborenenasphyxie oder andere perinatale Komplikationen sind nicht dokumentiert. Sie krabbelte erst mit neun Monaten und im Alter von drei Jahren entwickelte sie paroxysmale, generalisierte, Choreoathetose-ähnliche Bewegungen und dystone Fehlhaltungen. Die Anfälle variierten in ihrer Dauer zwischen einigen Minuten und einer Stunde und traten in *Clustern* bis zu sieben Mal täglich auf (maximale Häufigkeit dabei: Vier Anfälle pro Stunde). Zweimal im Jahr traten *Cluster* von ähnlichen, unwillkürlichen Bewegungen auf, die 24 Stunden andauerten. Die längste Zeitspanne ohne unwillkürliche Bewegungen betrug einige Minuten. Es wurde eine dyskinetische Zerebralparese diagnostiziert. Die Bewegungen waren ausreichend, die Verdachtsdiagnose einer Epilepsie zu stellen. Therapieversuche mit L-Dopa (bis zu 10 mg/kg KG pro Tag), Trihexyphenidyl, Tetrabenazin, Antikonvulsiva und Oxazepam brachten keine Besserung. Exazerbationen der unwillkürlichen Bewegungen traten bei Einschlafversuchen in den Abendstunden auf, was einen erholsamen Schlaf verhinderte. Andere Faktoren, die zu Exazerbationen führten, waren Bewegungsversuche, psychischer Stress, zusätzliche Krankheiten und Menstruationsblutungen. Eine leichte Verbesserung der unwillkürlichen Bewegungen und des Nachtschlafs brachte eine Therapie mit Clonazepam. Zwischen den wiederkehrenden Exazerbationen zeigte die Patientin kontinuierliche orofaziale dystone Bewegungen und eine hochgradige axiale Hypotonie.

Im Alter von sieben Jahren konnte sie frei sitzen und als Jugendliche mit Unterstützung gehen. Später war die generalisierte Choreoathetose durchgehend präsent, was zusammen mit der axialen Hypotonie zu einer Rückentwicklung der motorischen Fähigkeiten führte.

Im Alter von 25 Jahren konnte sie selbst mit Unterstützung nicht mehr gehen. Sie war bei allen Alltagsaktivitäten auf die Hilfe einer Vollzeitpflege angewiesen. Es besteht eine leichtgradige geistige Behinderung. Sie hat zehn Jahre schulische Ausbildung an einer Förderschule absolviert.

Bei der körperlichen Untersuchung im Alter von 31 Jahren zeigte sich eine dystone Dysarthrie. In Ruhe waren durchgehend dystone Bewegungen der Gesichtsmuskulatur, ein Blepharospasmus und Grimassieren sichtbar. Außerdem fand sich eine axiale Hypotonie mit Kopfhaltenschwäche und eine Krümmung des Rumpfs. In Ruhe waren keine unwillkürlichen Bewegungen der Extremitäten festzustellen. Während Bewegungsversuchen zeigte sich eine dystone Fehlhaltung der Finger, ein Retrocollis und ein leichtgradiger Opisthotonus zusammen mit generalisierten, Choreoathetose-ähnlichen Bewegungen. Bei der Untersuchung der Augenbewegungen zeigten sich normale Fingerfolgebewegungen, jedoch fehlende Sakkaden beim Blick nach oben. Es bestand eine motorische Impersistenz der Zunge und der Arme. Die Reflexe der unteren Extremität waren lebhaft, das Babinski-Zeichen beidseits positiv und ein Fußklonus war auslösbar. Ansonsten war die Untersuchung von Kraft und Sensibilität unauffällig. Die Koordination konnte wegen der Häufigkeit der unwillkürlichen Bewegungen nicht untersucht werden. Sie konnte nicht ohne Unterstützung gehen (Chang et al., 2016).

Patientin K2-1 (p.Arg418Trp, Tochter von K2-2, geb. 1982):

Diese Patientin ist die Tochter *nicht*-verwandter Eltern, ihre Geburt fand termingerecht statt und verlief ohne Komplikationen. Postnatal hatte sie Schwierigkeiten mit der Atmung und wurde deshalb vier Tage lang in einem Brutkasten versorgt. Es zeichnete sich eine Gedeihstörung ab. Dazu lag eine Trinkschwäche vor und mit neun Monaten wurde ein Floppy-infant-Syndrom diagnostiziert. Zum selben Zeitpunkt wurde eine gastroösophageale Refluxkrankheit festgestellt. Im Alter von 13 Monaten entwickelte sie paroxysmale, generalisierte, choreiforme Bewegungen und dystone Fehlhaltungen, die zwischen vier und sieben Mal am Tag auftraten. Die einzelnen Anfälle dauerten zwischen fünf Minuten und einer Stunde. Die längste Zeitspanne ohne die unwillkürlichen Bewegungen betrug zwei Tage. In den Intervallen zwischen den Anfällen zeigte sie eine hochgradige axiale Hypotonie, eine durchgehende orobukkale Chorea und dystone Fehlhaltungen der Arme und Beine. Der paroxysmale Charakter der unwillkürlichen Bewegungen führte zunächst zur Diagnose einer Epilepsie. Therapieversuche mit

Phenobarbital, Valproat (20 mg/kg KG pro Tag), Carbamazepin (400 mg pro Tag) und L-Dopa (20 mg/kg KG pro Tag) brachten keine Besserung. Die paroxysmalen Bewegungen exazerbierten durch Willkürbewegungen, Schlaf und bei zusätzlicher Krankheit. In Zuständen von Müdigkeit waren die pathologischen Bewegungen besonders ausgeprägt, was einen erholsamen Schlaf verhinderte. Ein leichter Rückgang der Schlaf-getriggerten, unwillkürlichen Bewegungen wurde unter Clonazepam (3 mg pro Tag) beobachtet. Die Meilensteine der motorischen Entwicklung wurden verspätet erreicht: Mit 18 Monaten konnte sie frei sitzen und im Alter von zweieinhalb Jahren mit Unterstützung gehen. Als sie 20 Monate alt war, wurde eine dyskinetische Zerebralparese diagnostiziert. Aufgrund der ausgeprägten axialen Hypotonie war sie als Kind nicht in der Lage, ihren Oberkörper aufrecht zu halten. Ihre Art sich fortzubewegen war unverkennbar und „froschartig“: Mit übereinander gekreuzten Beinen sitzend streckte sie anschließend die Beine, um ihren Körper vorwärts zu bewegen. Um zu robben, nutzte sie zusätzlich die Arme. Die Sprachentwicklung war verlangsamt, sodass sie mit 19 Monaten die Fähigkeiten erlernte, die normalerweise mit neun Monaten erlernt werden.

Im Alter von 22 Jahren bestand weiterhin eine paroxysmale, generalisierte Chorea mit dystonen Fehlhaltungen. Weitere Auslöser für Exazerbationen der unwillkürlichen Bewegungen waren zu diesem Zeitpunkt Koffeinkonsum und Menstruationsblutungen. Nachdem sie für einige Jahre die Fähigkeit zu gehen verloren hatte, konnte sie unter einer Kombinationstherapie mit L-Dopa (1000 mg pro Tag) und Clonazepam (4,5 mg pro Tag) wieder ohne Unterstützung bis zu drei Meter gehen. Im Alter von 27 Jahren erhöhte sich die Häufigkeit der unwillkürlichen Bewegungen und als Folge zeigte sich eine Verschlechterung der sprachlichen und motorischen Fähigkeiten. Zu dem Zeitpunkt konnte sie nicht mehr eigenständig laufen. Mit 30 Jahren wurde eine bilaterale tiefe Hirnstimulation durchgeführt und bereits einige Tage nach dem Eingriff verbesserten sich die dystonen und die Choreoathetose-ähnlichen Bewegungen. Bei einer Untersuchung im Alter von 33 Jahren waren die Dystonie und die kinesio gene Choreoathetose der Extremitäten weiterhin auf verringertem Niveau. Sie konnte nun Kommunikationstafeln effektiver benutzen und ihren elektrischen Rollstuhl über einen Joystick steuern. Die axiale Hypertonie war jedoch unverändert, sodass sie beim Gehen weiterhin Hilfe benötigte. Während einer kurzzeitigen Abschaltung des Hirnschrittmachers im Rahmen einer Kontrolluntersuchung traten die Choreoathetose der Arme und die dystonen Haltungen sofort wieder auf und bei Reaktivierung des Geräts verschwanden sie erneut.

Bei der körperlichen Untersuchung im Alter von 23 Jahren zeigten sich intermittierend generalisierte Choreoathetose-ähnliche Bewegungen, die durch Willkürbewegungen ausgelöst wurden. Basal bestand eine orobukkale Chorea und dystone Fehlhaltungen der unteren Extremität sowie eine axiale Hypotonie mit Kopfhalteschwäche. Es zeigte sich ein Kopftremor sowie ein Ruhetremor beider Arme und des rechten Beins. Es bestand eine motorische Impersistenz der Zunge. Bei Untersuchung der Augenbewegungen zeigten sich normale Fingerfolgebewegungen, jedoch fehlende Sakkaden beim Blick nach oben. In der horizontalen Ebene initiierte sie die Sakkaden durch eine ruckartige Drehbewegung des Kopfes. Es zeigte sich ein spastischer Tonus der unteren Extremität beidseits, eine Hyperreflexie, das Babinski-Zeichen war beidseits positiv und es war ein Fußklonus auslösbar. Die Untersuchung der Sensibilität war unauffällig. Aufgrund der Häufigkeit der unwillkürlichen Bewegungen konnte die Koordination nicht untersucht werden (Chang et al., 2016).

Patientin K2-2 (stand für eine *ADCY5*-Genanalyse nicht zur Verfügung, Mutter von K2-1):

Von dieser Betroffenen waren nur wenige klinische Informationen vorhanden. Sie erkrankte an einer Bewegungsstörung mit Krankheitsbeginn im Säuglingsalter, welche durch eine generalisierte Choreoathetose, eine Dysarthrie und dystone Fehlhaltungen der Beine gekennzeichnet war. Außerdem bestand eine leichtgradige geistige Behinderung (Chang et al., 2016).

Patient K3-1 (p.Arg418Trp, geb. 1985):

Dieser Patient ist der Sohn *nicht*-verwandter Eltern und wurde nach einer unauffälligen Schwangerschaft termingerecht durch einen elektiven, komplikationslosen Kaiserschnitt geboren. Eine Neugeborenenasphyxie oder andere perinatale Komplikationen sind nicht dokumentiert. Im Alter von 14 Monaten konnte er noch nicht frei sitzen und zeigte eine paroxysmale, generalisierte Choreoathetose sowie einzelne Anfälle mit dystonen Spasmen. Die paroxysmale Choreoathetose trat drei bis sieben Mal pro Tag auf und die einzelnen Anfälle dauerten zwischen 30 Sekunden und einer Stunde. Die längste Zeitspanne ohne die unwillkürlichen Bewegungen betrug vier Stunden. Trigger für die dystonen und die Choreoathetose-ähnlichen Bewegungen waren sowohl Willkürbewegungen als auch Alkohol und in Zuständen von Müdigkeit waren die Symptome besonders ausgeprägt. Letzteres verhinderte einen erholsamen Schlaf. Lachen und Niesen verschlimmerte

ausschließlich die dystonen Bewegungen. Die paroxysmalen Bewegungen wurden zunächst als Epilepsie charakterisiert und wie eine solche behandelt. Therapieversuche mit L-Dopa (300 mg pro Tag für ein Jahr), Clonazepam (0,25 mg pro Tag), Trihexyphenidyl, Pregabalin (25 mg pro Tag), Gabapentin, Baclofen und Carbamazepin (200 mg pro Tag) zeigten keine Wirksamkeit. Unter Clobazam (15 mg pro Tag) verbesserte sich die nächtliche Choreoathetose, was den Nachtschlaf erholsamer machte. Zwischen den Anfällen unwillkürlicher Bewegungen bestand eine axiale Hypotonie ohne dystone Fehlhaltungen oder spastische Lähmungen. Er erlernte nie frei zu laufen aber im Alter von drei Jahren konnte er zumindest mit Unterstützung eines Laufgestells gehen. Dieser war aufgrund der axialen Hypotonie mit einem Fixierungsgurt ausgestattet. Eine rückläufige Entwicklung der erlernten motorischen Fähigkeiten zeigte sich nicht. Die Meilensteine der sprachlichen Entwicklung waren unauffällig. Eine geistige Behinderung besteht nicht. Seine dominante Hand ist funktionell unbrauchbar, aber mit seiner *nicht*-dominanten Hand kann er einen elektrischen Rollstuhl und eine Computermaus bedienen.

Bei der körperlichen Untersuchung im Alter von 23 Jahren zeigte er eine Dysarthrie, in Ruhe jedoch keine unwillkürlichen Bewegungen. Beim Versuch seine Arme oder Beine zu bewegen, zeigten sich kinesio gene, generalisierte, Choreoathetose-ähnliche Bewegungen der Extremitäten. Lachen löste beim Patienten dystone Haltungen beider Arme sowie eine Extension der Beine und des Halses aus. Die Untersuchung der Augenbewegungen ergab fehlende Sakkaden beim Blick nach oben sowie lange Sakkadenlatenzen in der horizontalen Ebene und beim Blick nach unten. Die Fingerfolgebewegungen waren bis auf geringfügige Einschränkungen beim Blick nach oben ohne pathologischen Befund. Es bestand eine motorische Impersistenz der Zunge und beim Handgriff. Ansonsten war die Untersuchung von Kraft, Reflexen und Sensibilität unauffällig. Aufgrund der Häufigkeit der unwillkürlichen Bewegungen konnte die Koordination nicht untersucht werden. Durch die axiale Hypotonie und Exazerbationen der generalisierten Choreoathetose war die Hilfe von zwei Personen nötig, damit er stehen und einige Schritte gehen konnte (Chang et al., 2016).

Patient K5-1 (p.Arg418Gly, Sohn von K5-2, geb. 1985):

Dieser Patient ist der Sohn *nicht*-verwandter Eltern und kam nach einer unauffälligen Schwangerschaft als Frühgeburt (sechs Wochen vor Termin) durch eine komplikationslose, vaginale Geburt zur Welt. Im Alter von neun Monaten hatte er starken

gastroösophagealen Reflux und im Alter von vier Jahren wurde eine Fundoplikatio nach Nissen durchgeführt. Die Meilensteine der motorischen und sprachlichen Entwicklung wurden verspätet erreicht. Frei laufen konnte er mit drei Jahren. Eine geistige Behinderung besteht nicht. Im Alter von sechs Monaten entwickelte er paroxysmale, generalisierte, unwillkürliche Bewegungen in Form von Myoklonien und dystonen Spasmen. In den darauffolgenden Jahren zeigte sich eine Progredienz dieser Bewegungen, welche Sprache und Gang beeinträchtigten. Die Anfälle traten täglich auf, dauerten zwischen zehn Sekunden und zwei Minuten und waren von schmerzhaften Hyperextensionen des Rumpfs, des Halses und der Beine begleitet, wodurch er stürzte oder von seinem Sitz rutschte. Die längste Zeitspanne ohne die unwillkürlichen Bewegungen betrug einige Stunden. Während des Schlafens war die Symptomatik besonders ausgeprägt, was zu Schlafstörungen und Schmerzen führte. Ein Therapieversuch mit L-Dopa (600 mg pro Tag) brachte keine Besserung, unter Clonazepam (4 mg pro Tag) wurde jedoch ein Rückgang der paroxysmalen, unwillkürlichen Bewegungen und der damit verbundenen Stürze festgestellt. Nach Einnahme von Clonazepam konnte er besser schlafen, sich eigenständig anziehen, eine Tasse mit einer Hand halten, Besteck benutzen und eine Computertastatur bedienen. Auch Koffeinkonsum führte zu einer Verbesserung der Symptomatik. Im Alter von neun Jahren wurde eine Zerebralparese diagnostiziert und er zeigte Verhaltensauffälligkeiten mit Aggressionen. Mit 14 Jahren wurde eine Dauermedikation mit Risperidon (1 mg pro Tag) begonnen und im selben Jahr hatte er eine Hüftluxation.

Bei der körperlichen Untersuchung im Alter von 16 Jahren, bei der das Clonazepam pausiert war, zeigten sich durchgehend zuckende Bewegungen der orobukkalen Muskulatur, die zunächst als Myoklonien charakterisiert wurden. Begleitend bestand eine Dysarthrie. Die Fingerfolgebewegungen und Sakkaden waren unauffällig. Es bestand ein Torticollis nach rechts, ein Retrocollis und eine Dystonie des Oberkörpers mit Seitneigung nach rechts. Darüber hinaus lag eine axiale Hypotonie und eine motorische Impersistenz der Zunge vor. Es zeigten sich myoklonische Zuckungen des Nackens, der Schultern und der Hüftbeuger, welche retrospektiv jedoch auch choreiforme Anteile besaßen. Die Untersuchung von Kraft, Reflexen und Sensibilität war unauffällig und das Babinski-Zeichen beidseits negativ. Auch die Koordination war weitestgehend unauffällig. Das Fingertippen führte er langsam aber akkurat aus. Bei einer Untersuchung im Alter von 27 Jahren unter Clonazepam (4 mg pro Tag) zeigte sich ein Rückgang der generalisierten, myoklonischen Bewegungen (Chang et al., 2016).

Patientin K5-2 (p.Arg418Gly, Mutter von K5-1, Tochter von K5-3, geb. 1961):

Von dieser Betroffenen waren nur wenige klinische Informationen vorhanden. Bei ihr bestanden leichtgradige, unwillkürliche Bewegungen sowie Sprach- und Gleichgewichtsschwierigkeiten. Die Symptomatik war ähnlich wie bei ihrem Sohn. Die Meilensteine der motorischen und sprachlichen Entwicklung wurden verspätet erreicht, die unwillkürlichen Bewegungen begannen im Kindesalter und es zeigte sich keine Progredienz der Symptome (Chang et al., 2016).

Patient K5-3 (p.Arg418Gly Mosaikform, Vater von K5-2, geb. 1928, im Alter von 84 Jahren verstorben):

Auch über diesen Betroffenen waren nur wenige klinische Informationen verfügbar. Bei ihm bestanden ebenfalls leichtgradige, unwillkürliche Bewegungen und auch er zeigte Sprach- und Gleichgewichtsschwierigkeiten. Bei ihm waren die unwillkürlichen Bewegungen morgens stärker ausgeprägt und es zeigte sich eine Besserung nach Kaffeekonsum. Er war in ein Programm für postmortale Gehirnspenden eingeschlossen. Nach seinem Tod fand man bei der Untersuchung des Hirngewebes signifikante Pathologien im olfaktorischen Cortex sowie leichtere Veränderung der Basalganglien und des zerebellären Systems, welche als Ursache für die Bewegungsstörung vermutet wurden (McCann et al., 2015; Chang et al., 2016).

7.3.2 Klinische Informationen der Betroffenen aus den Familien DI und DII

Tabelle 7.4 Klinische Merkmale aller lebenden Familienmitglieder mit homozygoter c.1150_1151delTT ANO10-Mutation. “+” - leichtgradig, “++” - mittelgradig, “+++” - hochgradig; LMN - Unteres Motoneuron (engl. *lower motor neuron*); n. v. - nicht verfügbar; EMNG - Elektromyo- und Elektroneurographie; cMRT - kranielle Magnetresonanztomographie. (adaptiert von Dragašević-Mišković et al., 2016)

Merkmal	Familie DI							Familie DII			
	Sr258	Sr114	Sr266	Sr265	Sr116	Sr271	Sr270	Sr339	Sr341	Sr344	Sr345
Alter bei Krankheitsbeginn	≈18 Jahre	≈18 Jahre	≈18 Jahre	≈18 Jahre	≈6 Jahre	≈18 Jahre	≈20 Jahre	≈26 Jahre	≈30 Jahre	≈20 Jahre	≈16 Jahre
Erkrankungsdauer	≈30 Jahre	≈36 Jahre	≈40 Jahre	≈35 Jahre	≈30 Jahre	≈22 Jahre	28 Jahre	16 Jahre	≈35 Jahre	≈20 Jahre	≈20 Jahre
Geschlecht	Weiblich	Weiblich	Männlich	Männlich	Weiblich	Weiblich	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich	Männlich
Erstsymptom	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit	Gangunsicherheit
Ataxie der Extremitäten	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	+
Gangataxie	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++
Dysarthrie	++	++	+++	++	++	++	++	++	+++	++	+
Sehnenreflexe	Lebhaft	Lebhaft	Lebhaft	Lebhaft	Lebhaft	Lebhaft	Lebhaft	Lebhaft	Lebhaft	Lebhaft	Lebhaft
Babinski-Zeichen	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ
Nystagmus	Vertikal	Vertikal	Horizontal	Vertikal	Horizontal	Horizontal	Horizontal	Horizontal	Vertikal	Vertikal	Horizontal
LMN Beeinträchtigung	Nein	Nein	Nein	Muskelhypotrophie, Faszikulationen	Nein	Faszikulationen	Nein	Nein	Muskelhypotrophie, Faszikulationen	Nein	Muskelhypotrophie, Faszikulationen
Kognitiver Status	n. v.	Abbau kognitiver Fähigkeiten	n. v.	Abbau kognitiver Fähigkeiten	Abbau kognitiver Fähigkeiten	Abbau kognitiver Fähigkeiten	Abbau kognitiver Fähigkeiten	Abbau kognitiver Fähigkeiten	n. v.	n. v.	n. v.
EMNG	LMN Beteiligung	n. v.	n. v.	LMN Beteiligung	LMN Beteiligung	LMN Beteiligung	LMN Beteiligung	LMN Beteiligung		n. v.	n. v.
Augenärztliche Untersuchung	n. v.	n. v.	n. v.	Makuladegeneration	Normal	Normal	Normal	Normal	n. v.	Normal	Normal
cMRT	n. v.	n. v.	n. v.	Hochgradige Kleinhirn- und leichtgradige Ponsatrophie	Hochgradige Kleinhirnatrophie	Hochgradige Kleinhirnatrophie	Hochgradige Kleinhirnatrophie	Hochgradige Kleinhirnatrophie	Großhirnrinden- und Kleinhirnatrophie	Kleinhirnatrophie	Hochgradige Kleinhirnatrophie

7.4 Kenndaten zum Ethikvotum

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden durch folgende Schreiben der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt:

1)

Identifizierung neuer Gene bei Bewegungsstörungen mittels „next generation sequencing“
(vom 20.05.2011, Aktenzeichen: 11-021)

2)

Molekulargenetische Ursachen der Dystonien
(vom 10.06.2008, Aktenzeichen: 08-068)

7.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation weder zum aktuellen noch zu einem früheren Zeitpunkt andernorts vorgelegt oder einen zugehörigen Zulassungsantrag gestellt habe. Auch einem anderen Promotionsverfahren habe ich mich bisher nicht unterzogen.

Christoph Max

Göttingen, 18.12.2019

7.6 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Christine Klein für die Überlassung des Themas bedanken. Als Leiterin des Instituts für Neurogenetik gab sie mir die Chance, das Thema zu bearbeiten, die experimentellen Untersuchungen in den Räumlichkeiten des Instituts durchzuführen und diese Dissertation anzufertigen. Außerdem bin ich dankbar, dass man mir ermöglicht hat, an Kongressen teilzunehmen und dort die Ergebnisse zu präsentieren.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei PD Dr. Ana Westenberger bedanken, für ihre exzellente Betreuung, ihre Ratschläge, ihre Geduld und für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts. Sie ist für mich über die letzten Jahre zu einer wahren Vorbildperson geworden und ich wünsche ihr für die Zukunft nur das Beste.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Neurogenetik bedanken, insbesondere bei Dr. med. Aloysius Domingo und Heike Pawlack, aber auch allen anderen, die bei technischen und wissenschaftlichen Fragen im Laboralltag stets sehr freundlich und hilfsbereit waren.

Schließlich gebührt mein herzlichster Dank meiner gesamten Familie, meiner lieben Freundin und schließlich all meinen guten Freunden. Ohne diese liebenswerten Menschen würde ich heute nicht dort sein, wo ich bin.

7.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Christoph Max

Geboren 1989 in Salzgitter



Hochschulstudium

10/2010 - 05/2018	Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
03.09.2012	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2015 - 02/2016	Auslandssemester an der Medizinischen Universität Innsbruck, Österreich
06.04.2017	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2017 - 04/2018	Praktisches Jahr
15.05.2018	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

03/2013	Kardiologie, Klinikum Salzgitter
08 - 09/2013	Allgemeinmedizin, Praxis M. T. Darwisch, Salzgitter-Salder
03/2014	Unfallchirurgie und Sportorthopädie, Klinikum Garmisch-Partenkirchen
08 - 09/2015	Radiologie, Tirol Kliniken, Innsbruck, Österreich
03/2016	Anästhesie, operative Intensivmedizin, Notfallmedizin und Schmerztherapie, Helios Klinikum Salzgitter

Praktisches Jahr

05 - 09/2017	Innere Medizin, Westküstenklinikum Heide
09 - 12/2017	Anästhesiologie, Westküstenklinikum Heide
12/2017 - 04/2018	Chirurgie, Schön Klinik Neustadt

Beruflicher Werdegang

07 - 09/2019	Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie, Evangelisches Krankenhaus Göttingen-Weende
--------------	---

Promotion

Seit 04/2014	Promotionsarbeit mit dem Thema „Molekulargenetische Untersuchungen des <i>ANO10</i> - und des <i>ADCY5</i> -Gens zur Erforschung komplexer, seltener Bewegungsstörungen genetischer Ursache“, Betreuerin: PD Dr. Ana Westenberger, Institut für Neurogenetik, Universität zu Lübeck
--------------	---

04/2014 - 08/2015	Experimentelle Untersuchungen in den Laboren des Instituts für Neurogenetik, Universität zu Lübeck
12/2016 - 05/2018	Unterbrechung beim Verfassen der Dissertation aufgrund von Staatsexamina und Praktischem Jahr

7.8 Publikationsliste

Originalarbeiten

Tübing J, Bohnenpoll J, Spiegler J, Gillessen-Kaesbach G, Bäumer T, **Max C**, Sperner J, Klein C, Münchau A (2018): Methylphenidate Can Improve Chorea in NKX2.1 and ADCY5 Mutation-positive Patients—A Report of Two Children. *Mov Disord Clin Pract* 5: 343–345

Westenberger A, **Max C** (*geteilte Erstautorenschaft*), Brüggemann N, Domingo A, Grütz K, Pawlack H, Weissbach A, Kühn AA, Spiegler J, Lang AE, Sperner J, Fung VSC, Schallner J, Gillessen-Kaesbach G, Münchau A, Klein C (2017): Alternating Hemiplegia of Childhood as a New Presentation of Adenylate Cyclase 5-Mutation-Associated Disease: A Report of Two Cases. *J Pediatr* 181: 306–308.e1

Chang FCF, Westenberger A, Dale RC, Smith M, Pall HS, Perez-Dueñas B, Grattan-Smith P, Ouvrier RA, Mahant N, Hanna BC, Hunter M, Lawson JA, **Max C**, Sachdev R, Meyer E, Crimmins D, Pryor D, Morris JGL, Münchau A, Grozeva D, Carss KJ, Raymond L, Kurian MA, Klein C, Fung VSC (2016): Phenotypic insights into ADCY5-associated disease. *Mov Disord* 7: 1033–1040

Dragašević-Mišković N, Domingo A, Dobričić V, **Max C**, Braenne I, Petrović I, Grütz K, Pawlack H, Tournev I, Kalaydjieva L, Svetel M, Lohmann K, Kostić VS, Westenberger A (2016): Seemingly dominant inheritance of a recessive ANO10 mutation in romani families with cerebellar ataxia. *Mov Disord* 31: 1929–1931

Poster

Max C, Westenberger A, Brüggemann N, Domingo A, Grütz K, Pawlack H, Weissbach A, Kühn AA, Spiegler J, Lang AE, Sperner J, Fung VSC, Schallner J, Gillessen-Kaesbach G, Münchau A, Klein C (2016): Alternating hemiplegia of childhood as a new presentation of ADCY5-mutation-associated disease. 20th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Berlin

Max C, Westenberger A, Brüggemann N, Domingo A, Grütz K, Pawlack H, Weissbach A, Kühn AA, Spiegler J, Lang AE, Sperner J, Fung VSC, Schallner J, Gillessen-Kaesbach G, Münchau A, Klein C (2016): Alternierende Hemiplegie des

Kindesalters als neue Manifestation im Zusammenhang mit Mutationen des Adenylatcyclase-5-Gens. Uni im Dialog, Lübeck