

**Molekulargenetische  
Untersuchungen bei Patienten mit  
V.a. dopa-responsive Dystonie**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Martin Andree Berghäuser aus Solms  
Gießen 2003

**Molekulargenetische  
Untersuchungen bei Patienten mit  
V.a. dopa-responsive Dystonie**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Martin Andree Berghäuser aus Solms  
Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum  
für Klinische Chemie, Klinische Immunologie und  
Humangenetik  
Institut für Humangenetik  
Leiter: Prof. Dr. U. Müller  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Müller

Gutachter: PD Dr. Oschmann

Tag der Disputation: 25.06.2003

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
  - 1.1. Dystonien
  - 1.2. Tetrahydrobiopterin
    - 1.2.1. Erkrankungen mit Tetrahydrobiopterinmangel
    - 1.2.2. Der Tetrahydrobiopterinstoffwechsel
  - 1.3. Dopa-responsive Dystonie (DRD)
  - 1.4. Genetik der dopa-responsiven Dystonie (DRD)
  - 1.5. GTP Cyclohydrolase I
2. Material
  - 2.1. Chemikalien
  - 2.2. Enzyme
  - 2.3. Nukleotide und Oligonukleotide
  - 2.4. Kits
  - 2.5. DNA-Größenstandards
  - 2.6. Materialien zur Photographie und Autoradiographie
  - 2.7. Lösungen und Puffer Geräte
3. Methoden
  - 3.1. DNA-Extraktion
  - 3.2. PCR (Polymerasekettenreaktion)
  - 3.3. Gelelektrophorese
  - 3.4. SSCP
  - 3.5. DNA-Sequenzierung
  - 3.6. Autoradiographie
  - 3.7. Radioaktive Markierung von Primern und DNA-Fragmenten
  - 3.8. Größenstandard
4. Ergebnisse
  - 4.1. Patienten mit V.a. Dopa-responsive Dystonie
  - 4.2. Patienten mit V.a. fokale Dystonien
  - 4.3. Patienten mit generalisierten Dystonien, Torsionsdystonien und M. Parkinson
  - 4.4. L-Dopa-Dosierungen bei Patienten mit dopa-responsiver Dystonie mit ohne Mutationsnachweis in GCH I

5. Diskussion
  - 5.1. Mutationen in GCH I
  - 5.2. Fokale Dystonien durch GCH I-Mutationen
  - 5.3. Generalisierte Dystonien und GCH I
  - 5.4. Wodurch wird eine DRD verursacht, wenn sich keine Mutationen in GCH I nachweisen lassen?
  - 5.5. Molekulare Mechanismen: Dominant negativer Effekt vs. Beeinflussung der Transkription
  - 5.6. Diagnostik der dopa-responsiven Dystonie
  - 5.7. Behandlung der DRD
  - 5.8. Levodopadosierungen bei DRD-Patienten mit bzw. ohne Mutationsnachweis in GCH I
6. Zusammenfassung
7. Anhang
8. Literaturverzeichnis

## 1.1 Dystonie

Der Begriff der Dystonie wurde 1911 von Oppenheim eingeführt. Er hatte bei sechs Patienten im Alter von 8-14 Jahren einen zwischen Hypo- und Hypertonus fluktuierenden Muskeltonus beobachtet und verwendete den Begriff zur Beschreibung dieses Symptoms (Oppenheim H, 1911). Heute verstehen wir unter dieser Bezeichnung eine Bewegungsstörung, die durch unwillkürliche, anhaltende Muskelkontraktionen gekennzeichnet ist und zu drehenden und repetitiven Bewegungen oder Haltungsanomalien führen kann (Ad hoc committee, 1984)(Fahn S, 1987).

Die Lokalisation einer Dystonie unterliegt einer großen Variabilität. So gibt es fokale Formen, deren Auftreten streng auf eine umschriebene Körperregion beschränkt ist. Als Beispiele kann man hierfür den Schreibkrampf, die Dysphonie, den Torticollis oder auch den Blepharospasmus anführen. Segmentale Formen betreffen zwei oder mehr benachbarte, multifokale Formen hingegen zwei oder mehr nicht benachbarte Körperregionen. Auch der ipsilaterale Befall der Extremitäten wird beschrieben, was man dann als Hemidystonie bezeichnet. Des weiteren kann ein generalisiertes Befallsmuster auftreten, welches dann zu völliger Bewegungsunfähigkeit führen kann.

Schon die Aufzählung der unterschiedlichen Lokalisationen zeigt die Heterogenität der Erkrankungen, die unter diesem Begriff subsumiert werden. Dies führt – wie man sich sicherlich leicht vorstellen kann – wiederholt zu Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung der hiervon betroffenen Patienten.

Name	Affected musculature	Symptoms
Blepharospasm	Orbicularis oculi and neighboring facial muscles	Initially, these may be photophobia and ocular discomfort and excessive blinking. Forced closure of the eyelids caused by increasingly lengthy spasms rendering the patient functionally blind. Involvement of jaw and neck muscles with blepharospasm is known as Meige's syndrome.
Oromandibular dystonia	Muscles innervated by cranial nerves V, VII, X and XII	Spasms of jaw opening or closing, jaw deviation, tongue protrusion, lip smacking, sometimes minor twitching of oral region.
Spasmodic dystonia	Laryngeal muscles	When adductor muscles are affected (most common type) the voice is strained, harsh and strangled, may be tremulous and jerky. When abductor muscles are affected voice is weak and breathy (often mistaken for psychiatric condition). There may be mixed types.
Dystonic dysphagia	Pharyngeal muscles	Difficulty with swallowing.
Torticollis	Sternocleidomastoideus, trapezius, splenius capitis, scalenes, semispinalis and other nuchal muscles	Rotation, tilting, flexion, extension, lateral or sagittal shift of neck and head, elevation of shoulder. May be tonic or associated with head tremor or irregular jerking movements.
Writer's cramp	Muscles of hand, forearm and arm	One of „task-specific“ or „occupational“ dystonias; symptoms occur predominantly when one specific movement is initiated; symptoms can spread to include related movements. Other examples are keyboard operators, musicians and sport-related cramps.
Leg dystonia	Muscles of foot, leg and thigh (e.g. gastrocnemius, tibialis posterior, flexor digitorum brevis)	Spasmodic flexion or inversion of feet, bizarre gait with flexion of knees and thighs.
Scoliosis, lordosis, kyphosis, tortipelvis	Muscles of back	Twisting and arching movements of trunk and pelvis.

Tab. 1.1 Symptome und Zeichen der Dystonie (Müller U, 1998)

Das Auftreten einzelner fokaler Dystonien steht häufig im Zusammenhang mit spezifischen Tätigkeiten. Besonders häufig ist die Verbindung mit beruflichen Beanspruchungen, die insbesondere spezialisierte, repetitive motorische Fertigkeiten erfordern. Ein nahezu klassisches Beispiel hierfür ist der Schreibkrampf.

Die Unterdrückung von dystonen Symptomen ist häufig zumindest partiell mit Hilfe sensorischer Reize möglich. Dies nennt man sensorische Tricks. Insbesondere propriozeptive Reizformen wie Haltungsänderungen oder taktile Reizungen einer Körperregion (Fahn S, 1984) sind dazu geeignet. Diese Reize müssen hierbei nicht zwingend die betroffenen Körperregionen einbeziehen.

Aufgrund der unterschiedlichen Erscheinungsformen und der teils bizarren Symptomatik wurden Dystonien lange Zeit als primär psychogene Erkrankung angesehen. Jedoch gelang durch eine Untersuchung an Patienten mit Schreibkrampf der Nachweis, dass psychiatrische Veränderungen bei diesem Personenkreis nicht häufiger als in der Normalbevölkerung vorkommen oder sekundärer Natur sind. Erst dieses Erkenntnis ermöglichte die Betrachtung der Dystonien als somatische Erkrankung und die Loslösung der Behandlung aus rein psychoanalytischen Konzepten.

Man unterscheidet primäre und sekundäre Dystonieformen. Bei den primären Formen ist die Dystonie das einzige oder zumindest das vorherrschende Symptom der Erkrankung. Sowohl familiär gebundene als auch sporadische Formen werden beschrieben. Die Klassifikation der primären Dystonie basierte lange auf klinischen Kriterien. So wurde zur Einteilung das Erkrankungsalter, das Verteilungsmuster und auch die Symptombeeinflussbarkeit durch pharmakologische Substanzen herangezogen. Da sich Dystonien jedoch als ein phänotypisch sehr heterogenes Krankheitsbild darstellen ist diese Form der Einteilung problematisch. Die Ergebnisse der Molekulargenetik der letzten Jahre erlauben eine genauere Einteilung und Differenzierung (Müller U, 1998).

<b>Bezeichnung (Synonyme)</b>	<b>Modus der Vererbung</b>	<b>Gen lokus</b>	<b>Chromosomale Lokalisation</b>	<b>Mutation in Gen kodierend für</b>
<b>Dystonia 1;</b> <i>autosomal dominant, early onset dystonia; idiopathic torsion dystonia (ITD)</i>	AD	<i>DYT1</i>	9q34	<b>ATP-binding protein</b>
<b>Dystonia 7;</b> <i>focal, adult-onset idiopathic torsion dystonia; idiopathic focal dystonia (IFD)</i>	AD	<i>DYT7</i>	18p	-
<b>Dystonia 6;</b> <i>adult-onset idiopathic torsion dystonia of mixed type</i>	AD	<i>DYT6</i>	8p21-8p22	
<b>Dystonia 5;</b> <i>dopa-responsive dystonia (DRD); hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (HPD); Segawa syndrome</i>	AD AR	<i>DYT5</i> -	14q22.1-q22.2 11p15.5	GTP Cyclohydrolase 1 (Tyrosin hydroxylase)
<b>Dystonia 8, 9;</b> <i>paroxysmal dystonic choreoathetosis (PDC); familial dyskinesia (FDP); Mount-Reback syndrome;</i>	AD	<i>PNKC</i>  <i>CSE</i>	2q33-q25 1p21-p13.3	- -
<b>Dystonia 10;</b> <i>paroxysmal dystonia; kinesigenic choreoathetosis (PKC)</i>	AD	-	-	-
<b>Dystonia 11;</b> <i>myoclonic dystonia; alcohol-responsive dystonia</i>	AD	-	-	-
<b>Dystonia 12;</b> <i>rapid-onset dystonia parkinsonism (RDP)</i>	AD	-	-	-
<b>Dystonia 4;</b> <i>torsion dystonia 4</i>	AD	<i>DYT4</i>	-	-
<b>Dystonia 2;</b> <i>autosomal recessive dystonia, DYT2 dystonia</i>	AR	<i>DYT2</i>	-	-
<b>Dystonia 3;</b> <i>X-linked dystonia parkinsonism syndrome (XDP)</i>	XR	<i>DYT3</i>	Xq13.1	-
<i>X-linked sensorineural deafness, dystonia, mental retardation; Mohr-Tranebjaerg syndrome; DFN-1/MTS</i>	XR		Xq22	DDP

Tab. 1.2 Klassifikation primärer Dystonien modifiziert nach Müller U, 1998

Sekundäre Formen beinhalten die Dystonie als ein Symptom im Zusammenhang mit anderen neurologischen Auffälligkeiten. Als Ursache kommen diverse Umweltbedingungen, Medikamente, angeborene und erworbene Erkrankungen in Frage.

Tab. 1.3 Ursachen sekundärer Dystonien

a) mit genetischer Ursache

<i>primäre neurologische Erkrankungen:</i> M. Hallervorden-Spatz progressive Degeneration d. Palladiums Juvenile neuronale cereoid Lipofuscinose SCA
<i>Lysosomale Speicherkrankheiten:</i> Metachromatische Leukodystrophie GM <sub>1</sub> und GM <sub>2</sub> Gangliosidose Hexoaminidase A und B -Defizienz Dystonische Lipidose
<i>Aminazidurien und organische Azidurien</i> Glutarazidurie Homozystinurie Hartnup Erkrankung
<i>Andere:</i> Aicardi-Goutieres Syndrom Bent Syndrom Lesch Syndrom Leigh Syndrom Sandifer Syndrom Triosephosphat Isomerase Defizienz M. Wilson Ataxia teleangiectasia Adrenoleukodystrophie

b) primär nicht genetisch oder durch Umweltfaktoren verursacht

<i>perinatale Asphyxie</i>
<i>ZNS Prozesse:</i> Apoplex Entzündung/Infektion Tumor Trauma
<i>Medikamente:</i> L-Dopa Neuroleptika Ergotamine Antikonvulsiva
<i>Neurotoxine:</i> Mn CO CS <sub>2</sub> Methanol
<i>neurodegenerative Erkrankungen:</i> multiple Sklerose M. Parkinson
Hypoparathyreodismus
psychogen

Modifiziert nach Müller U, 1990, Fahn S, 1987 und Oxford Medical Database

Die Gesamtprävalenz aller Dystonieformen wird mit etwa  $391 \times 10^{-6}$  angegeben. Man darf jedoch annehmen, daß die tatsächliche Anzahl betroffener Patienten deutlich oberhalb dieses Wertes liegt, da die

Diagnosestellung aufgrund des variablen Phänotyps häufig erschwert ist oder sogar nicht gelingt.

Innerhalb der Dystonien sind die Dystonien aufgrund eines Mangels an Tetrahydrobiopterin (BH4) ohne Hyperphenylalaninämie (HPA) eine Untergruppe.

### **1.2.1 Erkrankungen mit Tetrahydrobiopterinmangel**

Die Gruppe der Erkrankungen durch Mangel an Tetrahydrobiopterin (BH4) kann sich phänotypisch entsprechend des Enzym-Defekts mit oder auch ohne Hyperphenylalaninämie (HPA) darstellen. Dadurch ist leicht verständlich, daß die wesentlichen Leitsymptome und Diagnosestrategien sich deutlich unterscheiden. Während Patienten mit Tetrahydrobiopterinmangel mit Hyperphenylalaninämie (HPA) im allgemeinen im Rahmen des Neugeborenen Screenings auffallen, steht bei Patienten ohne Hyperphenylalaninämie (HPA) die klinische Symptomatik verbunden mit der laborchemischen Analyse der Neurotransmitter und ihrer Metabolite im Liquor im Mittelpunkt. Da dabei im wesentlichen die monoaminergen Neurotransmitter betroffen sind, stehen hier Störungen der neurologischen Entwicklung und der Bewegungskontrolle im Blickpunkt des Interesses.

Im wesentlichen handelt es sich bei den Erkrankungen aufgrund von Tetrahydrobiopterin (BH4)-Mangel ohne Hyperphenylalaninämie (HPA) um Patienten mit dopa-responsiver Dystonie (DRD) oder einem Sialpterin-Reduktase (SR)-Mangel. Zusätzlich zu diesen beiden Erkrankungen gibt es noch die Beschreibung einzelner Patienten mit einem 6-Pyruvoyl-Tetrahydrobiopterin-Synthase (6-PTS)-Mangel.

## 1.2.2 Der Tetrahydrobiopterinstoffwechsel

Tetrahydrobiopterin ist ein essentieller Co-Faktor der Phenylalanin-, der Tyrosin- und der Tryptophanhydroxylase. Die Tyrosin- und Tryptophanhydroxylase wiederum sind die wesentlichen Enzyme bei der Bildung der Katecholamine und des Serotonins.

Tetrahydrobiopterin wird aus GTP mit Hilfe der GTP Cyclohydrolase (GTPCH), der 6-Pyruvoyl-Tetrahydrobiopterin-Synthase (6-PTS) und der Sapterinreduktase (SR) gebildet.

Zuerst wird GTP durch die GTP Cyclohydrolase (GTPCH) in Dihydroneopterintriphosphate verwandelt. In dieser Reaktion wird auch Zink als Co-Faktor benötigt. Die GTP Cyclohydrolase (GTPCH) wird durch das Gen GCH I auf Chromosom 14q22.1-q22.2 kodiert. Das Gen besteht aus 6 Exonen, die über 30 kb verteilt sind. Durch Mutationen in diesem Gen entsteht das Krankheitsbild der dopa-responsiven Dystonie (DRD), welches im Rahmen dieser Doktorarbeit weiter untersucht wurde.

Im nächsten Schritt wird durch das Enzym 6-Pyruvoyl-Tetrahydrobiopterin-Synthase (6-PTS) aus Dihydroneopterintriphosphat 6-Pyruvoyl-Tetrahydrobiopterin. Diese Reaktion benötigt als weitere Co-Faktoren Magnesium und Zink.

Zum Abschluß wird mittels der Sapterinreduktase (SR) in einer NADPH-abhängigen Reaktion aus dem oben entstandenen 6-Pyruvoyl-Tetrahydrobiopterin Tetrahydrobiopterin gebildet.

### **1.3 Dopa-responsive Dystonie (DRD)**

Mit der erfolgreichen Einführung der Levodopa-Therapie bei Morbus Parkinson 1967 wurde diese Medikation auch bei anderen neurologischen Krankheitsbildern versucht. Bei Patienten mit Dystonien zeigte der Großteil kein Ansprechen auf die Medikation (Coleman MP, 1969)(Barrett RE, 1970), wohingegen bei einer kleinen Gruppe eine deutliche Verbesserung der Symptomatik beobachtet werden konnte (Barrett RE, 1970 #29)(Mandell S, 1970 #28).

Die erste Veröffentlichung eines dystonen Krankheitsbildes mit deutlicher tageszeitenabhängiger Fluktuation der Symptome und deutlichem Ansprechen auf Levodopa stammt aus dem Jahre 1971 von Segawa. 1988 führte Nygaard den Begriff der dopa-responsiven Dystonie ein. Er stellte das Krankheitsbild und die zugrundeliegenden diagnostischen Kriterien dar (Nygaard TG, 1988).

Die dopa-responsive Dystonie (DRD) ist ein phänotypisch sehr variables Krankheitsbild. Die Symptome können in unspezifischen Beschwerden, in fokalen Dystonien minimalster Ausprägung, aber auch in progredienten Verläufen generalisierter Dystonien mit schwersten Formen der Behinderung bestehen (Nygaard TG, 1988).

Die typische Symptomatik beginnt im Kindes- und Jugendalter – bevorzugt in der ersten Lebensdekade mit Dystonien der unteren Extremität, die sich meist als Fußfehlstellungen oder Gangstörung manifestieren (Nygaard TG, 1995). Die Erkrankung kann progredient verlaufen, sich auf die gesamte untere Extremität ausbreiten und in schweren Fällen sogar generalisieren und

zu völliger Bewegungsunfähigkeit führen. In über 70% der Fälle wird eine Verschlechterung der Symptomatik im Verlaufe des Tages beobachtet (Segawa M, 1975)(Nygaard TG, 1995). Eine Besserung ist besonders in den Morgenstunden und direkt nach einer Schlafphase zu beobachten. Sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern können Zeichen des Parkinsonismus wie Bradykinesie, Rigidity, Verlust von Haltungsreflexen und Ruhetremor beobachtet werden (Segawa M, 1976)(Nygaard TG, 1988)(Nygaard TG, 1995)(Harwood G, 1994).

Auffällig ist das – im Gegensatz zu anderen Dystonieformen - sehr gute Ansprechen auf bereits niedrige Dosen Levodopa mit folgender deutlicher Besserung oder sogar dem Sistieren der Beschwerden. Die Nebenwirkungen der Levodopa-Therapie wie z.B. das „On-Off-Phänomen“ oder das Sistieren der therapeutischen Wirkung, die bei der Behandlung des Morbus Parkinson auftreten, sind bei der Behandlung der dopa-responsiven Dystonie (DRD) nicht zu beobachten (Nygaard TG, 1991).

Objektive Symptome	Subjektive Symptome
Blepharospasmus	prätibiale Schmerzen
Oromandibuläre Dystonie	Zittern von Extremitäten
Torticollis	Muskelverspannungen und –spasmen
Außenrotation der Arme	schnelle Ermüdbarkeit
Dystonie einzelner Finger	
Schreibkrampf	
Tremor, besonders im Handbereich	
Abnormale Haltung der Schultern	
Dystonien des Stamms	
Skoliose/Hyperlordose	
Beinverkürzung	
Laufen auf der Fußaußenkante	
Suppinationshaltung des Fußes, Spitzfußhaltung	
Spontane Dorsalextension oder Plantarflexion von Zehen	
Dauerhafte Hyperflexion von Zehen	
Gangbildveränderungen oder Gangunfähigkeit	
Unfähigkeit, Bewegungen zu Ende zu führen	
Parkinsonismus	
Tageszeitliche Schwankung der Symptomausprägung	

Tab. 1.4 Symptome der DRD, modifiziert nach Steinberger D, 1996 und Müller U, 1998

Eine Aufspaltung der oben genannten Symptome in Bezug auf das Lebensalter ergibt folgendes Bild:

Signs and Symptoms in Patients with DRD (n = 323)							
	Symptoms/markers	%	Neonatal <30 days	Infancy <18 months	Childhood <10 years	Adolescence >11 years	Adulthood
Characteristic features	Dystonia (lower limbs, trunk, arms, neck)	98		+	++	++	++
	Diurnal fluctuations of symptoms	70		±	+	+	±
	Parkinsonism (association of tremor, rigidity, bradykinesia)	14			±	±	+
Other extrapyramidal signs	Tremor	23				+	+
	Rigidity	16	±	+	+	+	+
	Neck tilting/poor head control	7		±	±	±	±
	Bradykinesia	5		±	±	±	±
	Hypo/akinesia	4		±	±	±	±
	Oromandibular-oro-facial dyskinesia	4				±	±
	Dysphagia	2			±	±	±
Other neurological signs	Hyperreflexia	5	±	±	±	±	±
	Hypotonia (at onset)	5		±	±	±	±
	Hypertonia	5	±	±	±	±	±
	Spasticity	2	±	±	±	±	±
Postural and orthopedic complications	Scoliosis	5			±	±	±
	Wry neck	5				±	±
	Pes equinovarus	2				±	±

Note: Percentage numbers describe the relative frequency of clinical signs and symptoms starting with the most common at the top of each system section.

Tab 1.5 Symptome bei Patienten mit DRD (Blau N, 2001)

Differentialdiagnostisch ist die Abgrenzung zum Morbus Parkinson (Harwood G, 1994), der atypischen Cerebralparese (Nygaard TG, 1994)(Bandmann O, 1996), der idiopathischen Torsionsdystonie (Nygaard TG, 1988), der spastischen Paraplegie und auch zu fokalen Dystonien (Steinberger D, 1999) häufig schwierig. Gerade aufgrund des breiten Spektrums an Symptomen sind Fehldiagnosen nicht selten. Insbesondere Fehlstellungen und Fehlhaltungen im Fußbereich werden häufig als ein orthopädisches Problem fehldiagnostiziert, Schwankung der Symptomausprägung können zu einer psychiatrischen Vorstellung der Patienten führen. Da besonders im Erwachsenenalter die Manifestation der DRD sehr häufig mit parkinsonähnlichen Symptomen wie Tremor und Rigidität der Muskulatur einhergeht, bereitet diese Unterscheidung häufig Schwierigkeiten. Typische Fehldiagnosen und die dadurch bedingte inadäquate Therapie können Tab. 1.6 entnommen werden.

Fehldiagnose	in %
Psychogene Ursache, „vegetative Dystonie“, larvierte Depression	28,9
Peroneusschwäche/Pes equinovarus, Spitzfuß	25,2
Essentieller Tremor	8,4
Skoliose/Kyphose	5,8
„atypischer Parkinson“	2,8
Andere orthopädische Diagnose	39,2
Spinale Muskelatrophie	2,8
„atypische Poliomyelitis	2,8
Inadäquate Therapiemaßnahmen	in %
Psychotherapie oder Unterbringung in psychiatrischer Einrichtung	22,4
Invasive orthopädische Therapie (Achillotomie, Sehnenumstellung)	16,8
Peroneusschiene, Thomasschiene, Stützkorsett	14,0
Andere konservative orthopädische Therapie	30,8
Betablocker, Tranquilizer	5,8

Tab. 1.6 Fehldiagnosen und inadäquate Therapie bei DRD (Steinberger D, 1996)

Aufgrund des häufig dramatischen Ansprechens auf Levodopa lag es nahe, die Ursache der Erkrankung im Bereich des Dopaminstoffwechsels zu suchen. Liquoruntersuchungen zeigten erniedrigte Werte für Neopterin, Tetrahydrobiopterin, Homovanillinmandelsäure (HVA) und häufig, wenn auch nicht beständig, auch für 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA)(Fink JK, 1988)(Furukawa Y, 1993)(Rajput AH, 1994)(Takahashi H, 1994).

Eine Untersuchung der Levodopaaufnahme in dopaminergen Neuronen mittels PET ergab eine normale Aufnahme des Dopamins im Striatum (Takahashi H, 1994), was ein weiterer Hinweis auf eine Störung des Dopamin-Metabolismus als Ursache der Erkrankung war. Degenerative Erkrankungen konnten somit ausgeschlossen werden.

Neuropathologische Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse der Bildgebung, denn auch hier konnten im Bereich der Basalganglien keinerlei degenerative Veränderungen beobachtet werden. Auffällig war eine reduzierte Menge an Dopamin und eine Hypopigmentation der Substantia nigra. Die Aktivität des Enzyms Tyrosinhydroxylase war vermindert, die Menge befand sich jedoch im Normbereich (Rajput AH, 1994).

In mit Phythämagglutinin stimulierten mononukleären Blutzellen konnte bei Patienten mit einer nachgewiesenen Mutation im Gen für die GTP Cyclohydrolase eine deutlich erniedrigte Enzymaktivität gemessen werden. Aufgrund des Vorliegens eines nicht mutierten Allels des Gens (heterozygote Ausprägung) hätte man eine Erniedrigung der GCH I-Aktivität auf ungefähr 50% der Norm erwartet. Bei den Messungen fanden sich bei Patienten jedoch Werte zwischen 2 und 20%, wohingegen bei den symptomfreien Verwandten, die die Mutation ebenfalls trugen, deutlich höhere Aktivitäten

meßbar waren. Aufgrund dessen ist anzunehmen, daß die Restaktivität des Enzyms eine entscheidende Rolle bei der Manifestation der dopa-responsiven Dystonie spielt. Weswegen die symptomfreien Mutationsträger eine höhere Restaktivität des Enzyms haben als Patienten und der Mechanismus warum dies so ist, sind weiterhin ungeklärt. Eine Hypothese vermutet, daß das abnorme Polypeptid mit der unveränderten Form interagiert und diese somit inaktiviert. Dies erklärt nur den Abfall der Restenzymaktivität unter 50%, aber nicht, warum dieselbe Mutation teils zur Erkrankung, teils aber nur zum Symptomträgereum führt. An dieser Stelle werden Mutationen in noch nicht untersuchten Genen und Mechanismen auf Transkriptionsebene vermutet.

#### **1.4 Genetik der dopa-responsiven Dystonie (DRD)**

Die Prävalenz der DRD wird mit  $0,5-1 \times 10^{-6}$  angegeben (Nygaard TG, 1995). Aufgrund des sehr variablen Phänotyps und den sich daraus ergebenden diagnostischen Schwierigkeiten dürfte die Zahl der Erkrankungen jedoch deutlich höher liegen. Frauen erkranken 2-4mal häufiger als Männer (Nygaard TG, 1988)(Nygaard TG, 1994)(Ichinose H, 1994).

Der Vererbungsmodus blieb lange Zeit Diskussionsthema. Aufgrund von Beobachtungen in einigen Familien von Betroffenen, in denen auch andere Familienmitglieder dystone Symptome präsentierten, wurde ein autosomal dominanter Erbgang mit verminderter Penetranz und unterschiedlicher Expressivität angenommen (Segawa M, 1976)(Nygaard TG, 1988). Die Tatsache, daß sich häufig keine weiteren erkrankten Familienmitglieder finden ließen wurde damit erklärt, daß ein großer Teil auf eine Neumutationen zurückzuführen ist oder daß aufgrund der reduzierten Penetranz nur wenige Genträger dann auch manifest erkranken. Des weiteren

wurden aber auch Vermutungen über die Existenz einer autosomal rezessiven Form der Erkrankung geäußert.

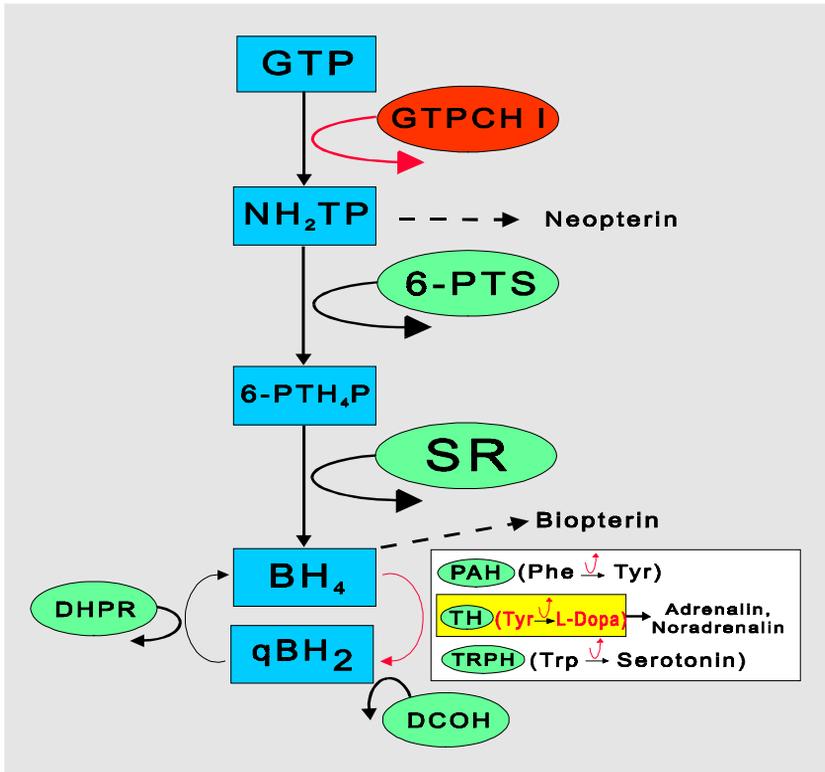
Die Penetranz der Erkrankung wurde auf Grundlage der Untersuchung einer einzigen großen Familie auf etwa 30% geschätzt (Nygaard TG, 1991). Je nach Untersucher schwanken die Angaben der Penetranz dieser Erkrankung jedoch ganz erheblich.

Durch Kopplungsuntersuchungen konnte man einen DRD-Genlocus auf Chromosom 14 kartieren (Nygaard TG, 1993). Gene, die aufgrund ihrer Funktion und Lokalisation im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen konnten, wurden molekulargenetisch analysiert. Bei diesen Untersuchungen fand sich ein Gen, das für das Enzym GTP Cyclohydrolase (GTPCH) codiert. GTP Cyclohydrolase (GTPCH) katalysiert die Bildung von Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), dem essentiellen Co-Faktor der Tyrosinhydroxylase (TH), die das wesentliche Enzym für die Synthese von Dopamin aus Tyrosin ist. In diesem Gen wurden 1994 Mutationen bei DRD-Patienten nachgewiesen. Diese Mutationen im GCH I-Gen führten zu einer verminderten Enzymaktivität der GTP Cyclohydrolase (GTPCH) und somit auch zu einer verringerten Dopaminsynthese (Ichinose H, 1995).

## **1.5 GTP-Cyclohydrolase I**

Der für die Erkrankung der dopa-responsiven Dystonie (DRD) wesentliche Neurotransmitter Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylalanin) wird in der Nebenniere und in sympathischen Nervenendigungen synthetisiert. Dies geschieht mit Hilfe der Tyrosinhydroxylase (TH) durch Hydroxylierung von L-Tyrosin (Ichinose H, 1995).

Wesentlich für diese Synthese durch die Tyrosinhydroxylase ist die ausreichende Verfügbarkeit des essentiellen Cofaktors Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) (Ichinose H, 1994). Auch für die Funktion der anderen Aminosäurenmonooxygenasen Phenylalanin- und Tryptophanhydroxylase und die Stickstoffmonoxid-Synthetasen ist dieser Cofaktor erforderlich.



**Abbildung 1.1:** Pteridine Stoffwechsel. Funktion der GTPCH I (GTP Cyclohydrolase 1) bei der Synthese von L-DOPA. GTP: Guanosintriphosphat; NH<sub>2</sub>TP: Dihydroneopterin-triphosphat; 6-PTH<sub>4</sub>P: 6-Pyruvoyltetrahydropterin; BH<sub>4</sub>: Tetrahydrobiopterin; qBH<sub>2</sub>: Quinoiddihydrobiopterin; 6-PTS: 6-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase; SR: Sepiapterinreductase; PAH: Phenylalanin-hydroxylase; TH: Tyrosinhydroxylase; TRPH: Tryptophanhydroxylase; Phe: Phenylalanin; Tyr: Tyrosin; Trp: Tryptophan; DHPR: Dihydropterinreduktase.

Die Synthese des essentiellen Cofaktors Tetrahydrobiopterin erfolgt über mehrere Schritte aus Guanosintriphosphat (GTP). Wie in der Grafik dargestellt ist der erste Schritt hierbei die enzymatische Umwandlung in Dihydroneopterin (NH<sub>2</sub>TTP). Das notwendige Enzym ist die GTP-Cyclohydrolase (GTPCH). Man konnte zeigen, daß diese erste Umwandlung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der BH<sub>4</sub>-Synthese ist (Ichinose H, 1995). Dies unterstreicht die Bedeutung des Enzyms in der Synthese von Dopamin und erklärt den Zusammenhang der GTPCH-Defizienz zur dopa-responsiven Dystonie mit den Symptomen eines Dopaminmangels.

Das Gen, welches für GTPCH codiert, wurde von Ichinose (Ichinose H, 1994) und Thony (Thony B, 1995) auf der Genomposition 14q22.1-q22.2 lokalisiert. Der Nachweis von Mutationen in diesem Gen im Zusammenhang mit an dopa-responsiver Dystonie (DRD) erkrankten Patienten in 4 Familien gelang bald darauf (Ichinose H, 1994). In allen 6 Exonen des Gens konnten inzwischen bei Patienten mit dem klinischen Krankheitsbild einer dopa-responsiven Dystonie (DRD) Mutationen nachgewiesen werden.

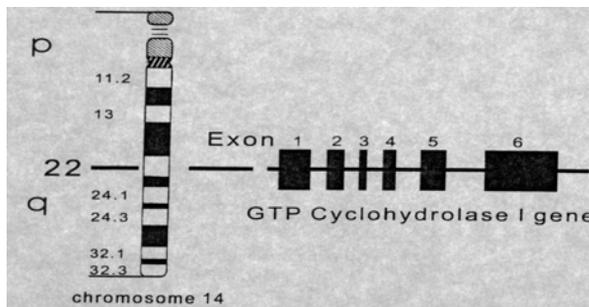


Abb. 1.2 Lokalisation und genomische Struktur von GTPCH I aus Müller U, 1998)

## 1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir Patienten mit den klassischen klinischen Kriterien der dopa-responsiven Dystonie (DRD). Sowohl Patienten als auch deren Angehörige wurden – soweit Material zur Analyse verfügbar war – molekulargenetisch im Bereich des Gens GCH I auf Veränderungen der genomischen Sequenz untersucht.

Bei einer zweiten Gruppe von Patienten mit atypischer klinischer Symptomatik (z.B. mit Schreibkrämpfen, Bandscheibenvorfällen in atypischer Lokalisation) wurde ebenfalls das Gen GCH I untersucht. Dies geschah unter der Fragestellung, ob es sich hierbei um fokale Dystonien handeln könne, die durch denselben Mechanismus wie bei der klassischen typischen Form entstehen.

Des weiteren bildete sich durch die Probeneinsendungen eine weitere Gruppe an Patienten, die unter generalisierten Beschwerden litten, heraus. Auch diese untersuchten wir, wie von den niedergelassenen Kollegen angeregt, auf Veränderungen der genomischen Sequenz von GCH I und auf eine daraus folgende verringerte Aktivität des Enzyms GTP Cyclohydrolase I.

Nicht zuletzt betrachteten wir bei allen Patienten, von denen uns innerhalb der letzten Jahre Probenmaterial und klinische Informationen zugeschickt worden war, ob es bei der Dosierung von Levodopa zu signifikanten Unterschieden zwischen Patienten mit Mutationsnachweis in GCH I und Patienten ohne einen solchen Nachweis kommt, in der Erwartung daraus möglicherweise Rückschlüsse auf den Erkrankungsmechanismus ziehen zu können.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid Stammlösung Rotiophorese 40	Roth (Karlsruhe)
Acrylease	Stratagene (Heidelberg)
Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf)
	GibcoBRL (USA)
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma (USA)
Ammoniumpersulfat	Roth (Karlsruhe)
Aqua bidest	selbst aufgereinigt über Milli-Q UF
Aqua dest.	selbst aufgereinigt über Berpur
	Wasserentsalzungsablage
ATP	Boehringer (Mannheim)
Borsäure	Merk (Darmstadt)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Chloroform	Sigma (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (USA)
Eisessig	Roth (Karlsruhe)
Ethanol absolut	Riedel-de Haen (Seelze)
Ethidiumbromid	Sigma (USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma (USA)
Formamid	Fluka (Schweiz)
Gelatine	Amersham (Braunschweig)
Hämosol	Baxter-Dade (USA)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
HBSS	GibcoBRL (USA)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Lamda-DNA	New England Biolabs (Schwalbach)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Mineralöl	Sigma (USA)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Phenol	ICN Biomedicals (USA)
Polyethylenglykol	Merck (Darmstadt)
Saccharose	Merck (Darmstadt)
Sigmacote	Sigma (USA)
Silikon-Fett	Merck (Darmstadt)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Tris-Base	Sigma (USA)
Tris-HCl	USB (Braunschweig)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Whatman Papier	Schleicher & Schuell (Dassel)

## 2.2 Enzyme

Restriktionsendonuklease:

EcoR I AGS (Heidelberg)

Schnittstelle 5'...G/ATTC...3'  
3'...CTAA/G...5'

Puffer: 90 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl

Hind III Boehringer (Mannheim)

Schnittstelle 5'...A/AGCTT...3'  
3'...TTCGA/A...5'

Puffer: 50 mM NaCl, 10mM Tris HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT

DNA-Polymerasen:

Taq-Polymerase Gibco-BRL (Berlin)

Taq-Polymerase Qiagen (Hilden)

Taq-Polymerase selbstpräpariert (Giessen)

T4-Polynukleotidkinase Amersham (Braunschweig)

## 2.3 Nukleotide und Oligonukleotide

Desoxyribonukleotide Promega (Heidelberg)

$\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol) Amersham (Braunschweig)

$\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (3000 Ci/mmol) Amersham (Braunschweig)

Oligonukleotide MWG-Biotech (Ebersberg)

Oligonukleotide (mit Fluoreszenzfarbstoff) MWG-Biotech (Ebersberg)

## 2.4 Kits

DNA Gel Extraction Kit Qiagen (Hilden)

Thermosequenase Cycle Sequencing Kit Amersham (Braunschweig)

Thermosequenase Fluorescent Labeled Amersham (Braunschweig)

Primer Cycle Sequencing Kit

Random Primer DNA Labeling System Gibco /BRL (Berlin)

## 2.5 DNA-Größenstandards

Lambda-DNA/EcoRI/HindIII selbst präpariert (Giessen)

Bioladder 100 (100-1000 bp) AGS (Heidelberg)

## 2.6 Materialien zur Photographie und Autoradiographie

Entwickler Dupont (USA)

Cromex MD-Developer A 625ml

Cromex MD-Developer B 125 ml

Cromex MD-Developer C 62,5ml ad 2,5L

Fixierer Dupont (USA)

Cromex MF-E-Fixer A 625 ml

Cromex MF-E-Fixer B 125 ml ad 2,5 L

Klarsichtfolie  
Röntgenfilm: Agfa Curix HAT 1000L  
Röntgenfilm (35,6x32,1cm)  
Röntgenfilm (18x24cm)  
Thermal Paper  
Whatman Papier

Agfa (Japan)  
Sterling (Deutschland)  
Dupont  
Mitsubishi (Japan)  
Schleicher & Schuell (Dassel)

## 2.7 Lösungen und Puffer

Auftragspuffer Agarosegele

100 ml  
2 M Harnstoff  
50% Saccharose  
0,1 M EDTA  
0,1 % Bromphenolblau  
0,1 % Xylencyanol  
ad 100 ml mit 10x TBE

Denaturierungslösung

1,5 M NaCl  
0,5 M NaOH  
ad 1 l mit A. bidest

DNA-Extraktionspuffer

0,04 M Tris Base (pH 8,0)  
0,02 M EDTA (pH 8,0)  
0,1 M NaCl

40 ml 1 M Trise-Base (pH 8,0)  
40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
20 ml 5 M NaCl  
ad 1 l mit A. bidest, steril filtern,  
Lagern bei 4°C

„Heiß-Mix“

1,25 mM dATP  
0,1 mM dCTP  
1,25 mM dGTP  
1,25 mM dTTP

50 µl 10 mM dATP  
4 µl 10 mM dCTP  
50 µl 10 mM dGTP  
50 µl 10 mM dTTP  
246 µl A. bidest, Lagern bei -20°C

„Kalt-Mix“

1,25 mM dATP  
1,25 mM dCTP  
1,25 mM dGTP  
1,25 mM dTTP

50 µl 10 mM dATP  
50 µl 10 mM dCTP  
50 µl 10 mM dGTP  
50 µl 10 mM dTTP  
200 µl A. bidest, Lagern bei -20°C

Lyse-Enzym/TE

Lyse Enzym in Lösung 4 mg/ml  
1 x TE

2 mg Lyse-Enzym  
500 µl 1 x TE

### MDE-Gel-Lösung für SSCP Gele

MDE Gel-Solution

0,1 % APS

0,005 % TEMED

15 ml MDE Gel-Solution

35 ml A. bidest

600  $\mu$ l APS 10%

30  $\mu$ l TEMED

unmittelbar vor dem Giessen des Gels angesetzt

### Nuklei-Extraktionspuffer

0,3 M Saccharose

0,005 M MgCl<sub>2</sub>

1% Triton X-100

0,01 M Tris-Base (pH 8,0)

109,5 g Saccharose

5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>

10 ml Triton X-100

10 ml 1 M Tris-Base (pH 8,0)

### Phenol/Chloroform

Chloroform : trisgesättigtes Phenol  
im Verhältnis 1:1

### Polyacrylamid-Gel-Lösung

Polyacrylamid Lösung

0,1 % APS

0,005 % TEMED

60 ml Polyacrylamid-Lösung

600  $\mu$ l APS 10%

30  $\mu$ l TEMED

unmittelbar vor dem Giessen des Gels angesetzt

### Polyacrylamid-Lösung 8% für Sequenzgele

8 % Acrylamid

1x TBE

2 M Harnstoff

200 ml 40 % Acrylamid-  
Stammlösung

100 ml 10x TBE

200 ml 10 M Harnstoff mit A. bidest  
auf 1 l auffüllen, bei RT  
aufbewahren

### 50x TAE-Elektrophoresepuffer

2 mM Tris-Acetat

50 mM EDTA

242 g Tris-Base

100 ml 0,5 M EDTA (pH8,0)

57,1 ml Eisessig

mit A. bidest auf 1 l auffüllen,  
Aufbewahren bei RT

40% Acrylamid-Stammlösung  
 käuflich als Rotiphorese Gel 40 (Roth) oder selbst angesetzt  
 38 % Acrylamid 380 g Acrylamid  
 2 % N,N'-methylenbisacrylamid 20 g N,N'-metyhlenbisacrylamid  
 mit A. bidest 600 ml erhitzen auf  
 37 °C, Auffüllen mit A. bidest auf  
 1 l, steril filtrieren, Flasche in  
 AluFolie einschlagen, Aufbewahren  
 bei RT

10x DNA-Auftragspuffer für SSCP-Gele  
 10 mM NaOH 0,1 ml 10 M NaOH  
 1 mM EDTA 2 ml 0,5 M EDTA 8pH 8,0)  
 80 % Formamid 82 ml Formamid 98 %  
 0,025 % Bromphenolblau 25 mg Bromphenolblau  
 0,025 % Xylencyanol 25 mg Xylencyanol

10x Taq-Puffer 100 mM Tris-HCl pH 8,3  
 500 mM KCl  
 15 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,1% Gelatine

10x TBE 0,9 M Tris  
 0,9 M Borsäure  
 0,025 M EDTA Dinatriumsalz  
 pH 8,2-8,5

1x TE 10 mM Tris/HCl, pH 7,6  
 1 mM EDTA Dinatriumsalz

1x TE + RNase A 100 ml 1x TE + 125 µl RNase A

## 2.8 Geräte

Autoklav	Vakulab 300	MMM
Bunsenbrenner		Roth
Eismaschine	Icematic	Castel MAC
Feinwaage	bis 400 g	PM 400
	Mettler	
Gefrierschrank	bis -30 °C	637
Gefrierschrank	bis -70 °C	U 85360
Geiger-Müller-Zähler	Mini Monitor Series	Hereaus
Geiger-Müller-Zähler	LB 1200	Berthold
Geltrockner mit elektrischer Unterdruckpumpe	GT 3	von Keutz
Geltrockner mit Wasser- strahlpumpe	Drygel	Hoefler

Heizblock	DB - 3	Techne
Heizrührplatte mit Magnetrührer	MEA II	IDL
Horizontalelektrophoresekammer Volumen 25 ml	Horizon 58	BRL
Horizontalelektrophoresekammer Volumen 100 ml	H 5	BRL
Horizontalelektrophoresekammer Volumen 100 ml		Keutz
Kühlschrank	KGS 3701	Bosch
Laminar-Air-Flow-Bank steriler Arbeitsplatz	8511	Köttermann
Mischwippe	M 261 25	Thermolyne
PCR-Thermocycler Eppendorfröhrchen	Cetus 1	Perkin-Elmer
PCR_Thermocycler, Mikrotiterplatte	Uno-Block	Biometra
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Reagenzglasschüttler	RS 1	IDL
Spannungsquelle bis 240 V	Mini Power Pack	Biometra
Spannungsquelle bis 500 V	2002 Power Supply	LKG
Spannungsquelle bis 2000 V	Macrodrive 5	LKG
Spannungsquelle bis 4000 V	4000	BRL
Spektrometer	Gen Quant II	Pharmacia
UV-Kamera mit Thermodrucker zum Digitalisieren und zur Dokumentation von Thermoprintbildern	Bioprint System Kamera 4722 Monitor E1491A Drucker P68E	Fröbel COHU Mitsubishi Mitsubishi
Transluminator 2011	LKB	
Vertikalelektrophoresekammer mit Gelkamm Abstandhalter Glasplatten	Model S 2 1054 SE 1031 NC 1034 ND	BRL
Waage bis 4 kg	PM 4800	Mettler
Wasserbad 10 l	W12	Medingen
Wasserbad 20 l	W22	Medingen
Zentrifuge Tischzentrifuge	Biofuge A	Heraeus
Zentrifuge Kühlzentrifuge	Biofuge 13R 13000 min-1	Heraeus
Zentrifuge Kühlzentrifuge	RC 2-B 20000 min-1	Sorvall

## **3 Methoden**

### **3.1 DNA-Extraktion**

#### **3.1.1 Lyse der Leukozyten**

Zur Gewinnung der DNA ist es wesentlich, die kernlosen Blutbestandteile (Erythrozyten, Proteine) von den kernhaltigen zu trennen. Nach dieser Trennung erfolgt das Aufbrechen der Zellmembran unter Verwendung der nichtionischen Detergenz Triton X-100. Dieses Produkt bricht die Zellwand unter größtmöglicher Schonung der DNA. Zur weiteren Schonung der DNA wird noch Saccharose hinzugegeben, die ein sofortiges Aufplatzen der Zellen verhindern soll. Diese beiden Stoffe bilden die Grundlage des Kernextraktionspuffers.

Die DNA-Extraktion aus dem Kern erfolgt mit Hilfe des DNA-Kernextraktionspuffers, der als wirksame Bestandteile EDTA und SDS enthält. EDTA entzieht der Membran Magnesiumionen, die wesentlich für deren Stabilität sind, SDS ist eine Detergenz zur Entfernung der Lipidhülle.

#### **Durchführung**

Man füllt 7,5ml EDTA-Blut auf 40ml mit HBSS auf und zentrifugiert 10 min bei 1500 rpm. Danach saugt man das Blutplasma mit einer Wasserstrahlpumpe bis ca. 1 cm über der Interphase ab. In der Interphase befinden sich die Leukozyten. Nach der Zugabe von 15 ml Kernextraktionspuffer wird dreimal für ca. 10 sec gewirldmixt und die Probe danach für 30 sec auf Eis verbracht. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2500 rpm, dann wird der Überstand entfernt. In dem nun vorliegenden Zustand kann die Probe bei -80°C über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

Zur weiteren Verarbeitung werden 250 µl Kernextraktionspuffer hinzugegeben und kurz gemischt, dann wiederum 250 µl Kernextraktionspuffer/1% SDS beigemischt. Jetzt sollte für 3 h bei 50°C im Wasserbad inkubiert werden.

### **3.1.2 Aufreinigung durch Phenol/Chloroform**

Phenol oder alternativ ein Phenol/Chloroformgemisch (1:1) dient der Entfernung von Proteinen, denn diese verkleben zwischen Phenol und der sich bildenden wäßrigen Phase, während die DNA aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaft die obere wäßrige Phase bevorzugt. Zur Erlangung möglichst reiner DNA sollte dieser Reinigungsschritt mehrfach wiederholt werden.

#### **Durchführung**

Ein Probenvolumen Phenol wird hinzugegeben und für 30 min auf einer Schüttelwippe gut durchmischt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 2500 rpm wird der Überstand umpipettiert und dazu 500 µl Phenol gegeben. Dies wird erneut für ca. 30 min auf der Schüttelwippe gemischt und danach für 10 min max. zentrifugiert. Auch diesmal wird der Überstand umpipettiert und diesmal 500 µl Phenol/Chloroform dazugegeben, was dann für 20 min gemischt wird. Zum Abschluß dieses Aufreinigungsschrittes wird für 10 min max. zentrifugiert.

### **3.1.3 Anreicherung und Fällung der Nukleinsäuren**

Um die DNA aus der Chloroformlösung zu fällen, müssen die ihr anheftenden Hydrathüllen entfernt werden. In Gegenwart von Natriumionen (enthalten im „Zeitsparalkohol“) ist 96%iger Ethylalkohol in der Lage DNA zu fällen, denn die Natriumionen entziehen den Nukleinsäuren eben diese Hydrathülle. Durch diesen Schritt erreicht man, daß die Nukleinsäuren nicht mehr wasserlöslich sind. Des weiteren werden Reste von Phenol und Chloroform aus dem vorhergehenden Schritt entfernt. Salze und kleine organische Moleküle können durch Ethanol 70% entfernt werden.

#### **Durchführung**

Der Überstand, der am Ende der Aufreinigung gewonnen wurde, wird mit 2 Volumen „Zeitsparalkohol“ vermischt und danach für 20 min max. zentrifugiert. Der entstehende Überstand wird verworfen. Nach dem Zugabe von 200 µl Ethanol 70% wird für 10 min max. zentrifugiert und der Überstand dann erneut verworfen. Das gewonnene Pellet sollte nun gut antrocknen, was ca. 30-60 min dauert. Nach dem Antrocknen werden 200 µl 1xTE/RNase dazugegeben. Die Proben werden dann in ein Wasserbad verbracht und lösen bei 50°C über Nacht. Die Aufgabe der RNase besteht in der Zerstörung von möglicherweise mitextrahierter störender Ribonukleinsäure (RNA).

### **3.1.4 Photometrische Messung der DNA-Konzentration**

Über die Absorption läßt sich der DNA-Gehalt der Proben spektrometrisch bei 260 nm bestimmen. Die Konzentrationsbestimmung geschah in einem Gen Quant II-Spektrometer der Firma Pharmacia. Die Verdünnung zum Einsatz in der PCR erfolgte dann entsprechend der jeweiligen Meßdaten.

## **3.2 PCR (Polymerasekettenreaktion)**

### **3.2.1 Einführung und Allgemeines**

Die PCR bietet die Möglichkeit mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase kleinste Mengen genomischer DNA von definierter Länge und Sequenz spezifisch zu vermehren (Saiki, 1988). Die DNA-Polymerase, die die Fähigkeit hat, zu einem DNA-Einzelstrang einen komplementären Strang aufzubauen, ist ein Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) (Chien A, 1976). Dieses Enzym besitzt eine 5'→3'-Endonukleaseaktivität und eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität, eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität fehlt. Kurze Oligonukleotide, die antiparallel liegen und den zu amplifizierenden Bereich einschließen, dienen diesem Enzym als Erkennungspunkt und Startsequenz (Primer). Die bei der Reaktion entstehenden doppelsträngigen Fragmente dienen im nächsten Zyklus wieder als Ausgangsmaterial für die weitere Amplifikation. Die durchschnittliche Fehlerrate der Taq bei 30 Zyklen liegt bei ca. 0,25% (Saiki RK, 1988). Diese ist bedingt durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität, die an das Vorhandensein doppelsträngiger DNA-Bereiche gebunden ist und nicht nur einzelne Nukleosid-5'-Phosphatreste, sondern auch Di- und Oligonukleotide mit einer Kettenlänge von bis zu 10 Basen spaltet. Voraussetzung für die gezielte Vermehrung eines Abschnittes aus einem DNA-Molekül ist, daß eine Sequenz aus dem Randbereich bekannt sein muß. Diese Oligonukleotide – Primer genannt - sollten mindestens 16 bp, besser jedoch 20-24 bp groß sein und folgenden Bedingungen entsprechen:

- G-C-Gehalt von 40-60%
- keine ungewöhnlichen DNA-Strukturen (z.B. poly-A, poly-T)
- keine Bildung von Sekundärstrukturen und damit sterischer Hemmung des „Annealings“
- keine Basenhomologie, besonders am 3'-Ende
- weitestgehende Übereinstimmung der Dissoziationstemperatur der gewählten Primer

Die PCR besteht aus folgenden sich wiederholenden Schritten:

#### Denaturierung

Um den Primern die Hybridisierung an die genomische DNA zu ermöglichen, muß der DNA-Doppelstrang in die komplementären Einzelstränge aufgetrennt und somit die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelhelix aufgebrochen werden. Dies geschieht durch Erhitzen des DNA-Templates auf 94°C für 30-60 Sekunden. Die Einzelstränge können dann als Matrize für das Amplifikat eingesetzt werden.

#### Annealing

In diesem zweiten Schritt erfolgt die Hybridisierung der Primer mit der genomischen DNA. Die zu wählende Temperatur sollte unterhalb der Primerschmelztemperatur liegen und zugleich die spezifische Primeranbindung an die Zielsequenz ermöglichen. Die Temperatur liegt erfahrungsgemäß zwischen 50 und 70°C und ist abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide ( $T_m$ ).

## Extension

Die Extension dient der eigentlichen Amplifikation. Die gewählte Temperatur sollte folglich dem Temperaturoptimum der DNA-Polymeras entsprechen und liegt im Falle des Enzyms aus *Thermophilus aquaticus* bei 72°C. Die Extensionszeit muß der Größe der Zielsequenz angepaßt werden (orientierend 1min/kb).

Nach Durchführung dieser drei Schritte beginnt der Zyklus von Neuem. Im allgemeinen werden zwischen 25 und 35 Zyklen gewählt, wodurch man ungefähr  $10^5$  Kopien (Strachan, 1996) der gewählten Sequenz erhält. Die Vermehrung verläuft zu Beginn der Reaktion nahezu exponentiell, im weiteren Verlauf verringert sich die Vermehrungsgeschwindigkeit aufgrund der Aktivitätsabnahme der DNA-Polymerase.

Das beschriebene Schema wird häufig durch einen einmaligen Denaturierungsschritt zu Beginn von 3-5 Minuten und einen finalen Verlängerungsschritt von 5-10 Minuten ergänzt.

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	3 min	94°C	1
Denaturierung	30 sec	94°C	}
Annealing	30 sec-1 min	50-70°C	}25-35
Extension	30 sec	72°C	}
Extension	5-10 min	72°C	1

Tab 3.1 Thermocyclerprogramm, verallgemeinert

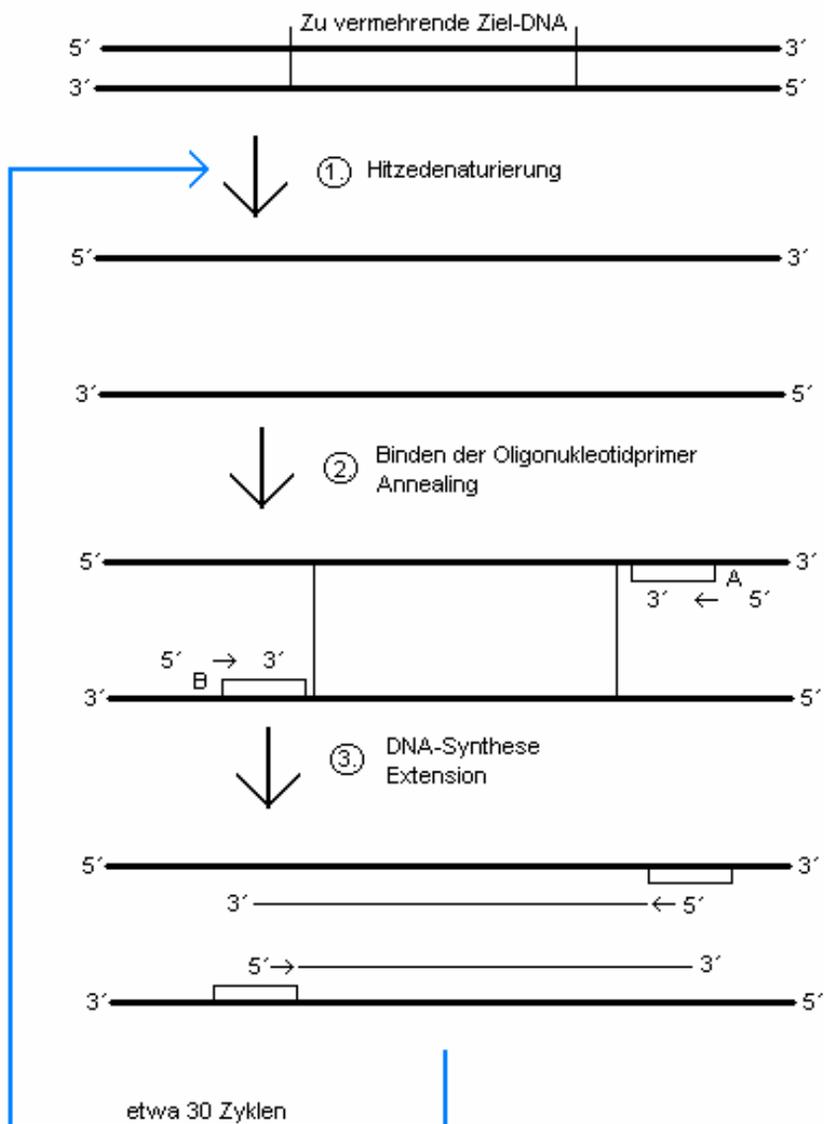


Abb. 3.1 Schema einer PCR. Modifiziert nach (Strachan T, 1996)

## Durchführung

Zur Amplifikation wird 1µl DNA (Konzentration mindestens 40ng/µl) in Mikrotiterplatten bzw. Eppendorf-Hütchen vorgelegt und mit 19µl eines Gesamtansatzes vermischt, der je nach Reaktion variiert, so daß ein Gesamtvolumen von 20µl resultiert. Die genauen Bedingungen für die Amplifikation der einzelnen Exon von GCH 1 sind den Tabellen im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen. Verallgemeinert besteht ein solcher Gesamtansatz aus:

Kaltmix	4µl		
PCR-Puffer	2µl		
Primer A	1µl		
Primer B	1µl		
MgCl <sub>2</sub>	0µl	0,8µl	1,6µl (entsprechend 0,1,2 mM MgCl <sub>2</sub> )
Taq	1µl	Haustaq bzw. 0,1µl QIA-Taq entsprechend Tab. ()	
Bidest	zum Auffüllen auf 19µl		

pro Probe.

Für jedes Primerpaar wurde ausgehend von Vorerfahrungen, Literaturangaben bzw. Information durch das Computerprogramm „Oligo“ die günstigste Annealing-Temperatur bestimmt. Zur Erhöhung der Spezifität der Amplifizierung und zum Erreichen einer höheren Ausbeute wurde abhängig von der Reaktion DMSO, Perfect Match, Betain und Q-Solution hinzugefügt. Die genauen Angaben können wiederum den Tabellen im Anhang entnommen werden.

Bei Thermocyclern ohne beheizbaren Deckel sollte der Reaktionsansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet werden, um eine Verdampfung zu verhindern.

Die Reaktion erfolgt dann in einem Thermocycler. Mittels gelelektrophoretischer Auftrennung über Agarosegele nach Zugabe von 2µl 10x Auftragspuffer und guter Durchmischung läßt sich die Länge des Amplifikats bewerten und die Konzentration kann orientierend abgeschätzt werden. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch. Dabei auftretende, unspezifische Banden können Folgen einer fehlerhaften Primergestaltung oder –synthese, oder aber Hinweis auf eine zu niedrige Annealing-Temperatur sein. Bei fehlendem Nachweis eines PCR-Produkts kann dieses durch eine zu hohe Annealing-Temperatur bedingt sein. Entsprechend der Ergebnisse erfolgte die Austestung der jeweiligen PCR.

### **3.2.2 Nested-PCR**

Diese Form der PCR dient dem Ausschluß unspezifischer Produkte. Das Amplifikat aus einer ersten PCR dient als Template für eine zweite Reaktion mit Primern, die innerhalb des Amplifikats der ersten Reaktion liegen.

In dieser Arbeit wurde eine Nested-PCR zur Untersuchung des Exon 4 von GCH 1 nötig, da ansonsten nur eine unzureichende spezifische Vermehrung des zu untersuchenden Genabschnittes gelang.

### **3.2.3 PCR mit radioaktiv markierten Nukleotiden**

Der oben beschriebene Ablauf einer PCR bleibt bestehen, auch die Programme des Thermocyclers werden nicht verändert. Der Unterschied besteht darin, daß anstelle des Kaltmixes ein Heißmix verwendet wird, der deutlich weniger dCTP enthält. Des weiteren fügt man 0,1 µl dCTP-P32 (10

$\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) hinzu und reduziert die Zugabe von Bidest um  $0,1\mu\text{l}$ . Das radioaktiv endmarkierte dCTP wird nun in das PCR-Produkt eingebaut. Nach Beendigung der PCR werden  $7\mu\text{l}$  Ladungspuffer hinzugegeben und die Reaktion durch Denaturierung über 3 min bei  $94^\circ\text{C}$  gestoppt. Die Lagerung der entstandenen Einzelstränge kann im Tiefgefrierfach bei  $-20^\circ\text{C}$  über einen längeren Zeitraum erfolgen.

Mit Hilfe der elektrophoretischen Auftrennung önnen die Amplifikate dann autoradiographisch dargestellt werden.

### **3.2.4 RT-PCR**

Hierbei wird ein an mRNA erstellter cDNA-Strang mit Hilfe einer DNA-Polymerase im Rahmen einer Standard-PCR vervielfältigt.

## **3.3 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese wird zur Auftrennung und Aufreinigung von DNA eingesetzt. Dies ist möglich, weil DNA ein negativ geladenes Phosphodiestergerüst besitzt, das im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols wandert. Die Geschwindigkeit wird dabei von dem Molekulargewicht der DNA, der Größe der Matrixporen (Gelkonzentration, Vernetzung), der angelegten Spannung (im Bereich unterhalb von  $5\text{V}/\text{cm}$  direkt proportional), ausgebildeten DNA-Sekundärstrukturen (supercoiled, linear, ringförmig) und dem Laufpuffer mitbestimmt.

### **3.3.1 Agarosegele**

#### **Einführung**

Es werden 0,5-2% Agarosegele zur Testung von PCR-Bedingungen und Aufreinigung von PCR-Produkten verwendet. Nach erfolgreicher PCR und elektrophoretischer Auftrennung wird die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt (Sharp PA, 1973). Ethidiumbromid interkaliert zwischen benachbarte Basen mit seiner aromatischen Ringstruktur bevorzugt parallel (Singer M, 1992) und fluoresziert unter UV-Beleuchtung (254 und 300nm) im sichtbaren Bereich. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur DNA-Konzentration. Bei Verwendung eines Größenmarkers kann somit also die Fragmentgröße und die Konzentration abgeschätzt werden. Nachteilig bei Agarosegelen ist die begrenzte Auflösungskapazität.

#### **Durchführung**

Nach Abwiegen der benötigten Menge Agarose wird diese mit 1xTBE aufgefüllt und dann zum Aufkochen gebracht. Diese Lösung wird dann mit Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 0,5-0,6mg/ml vermischt. Danach wird die Lösung in eine Flachbrettgelappertur gegossen. Ein PVC-Kamm wird zur Bildung von Geltaschen (Slots) für den späteren Probenauftrag eingesteckt. Zum Auftrag wird zu den DNA-Proben 1/10tel Volumen 10x-Auftragspuffer mit Bromphenolblau und Xylencyanol gegeben, der eine optische Überwachung ermöglicht. Dabei wandert Bromphenolblau mit doppelsträngiger DNA von etwa 100bp Länge, Xylencyanol mit doppelsträngiger DNA von ca. 5kb Länge (Ibelgaufts H, 1993). Durch seinen Glycerinanteil verhindert der Puffer das Herausdiffundieren der Proben aus den Taschen. Die Elektrophorese muß in einem Medium mit konstantem pH-Wert durchgeführt werden. Als Puffer

eignen sich Lösungen wie TBE und TAE, die Tris enthalten und einen pH-Wert von ungefähr 8 aufweisen. Mit den Proben wird ein käuflicher Längenstandard aufgetragen. Die angelegte Feldstärke beträgt zwischen 2,5 und 4,5 V/cm. Das Gel wurde nach der Elektrophorese auf einem UV-Transluminator bei einer Wellenlänge von 590nm betrachtet und mittels eines Bioprint-Systems fotografiert.

Die notwendige Konzentration zur effektiven Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente läßt sich etwa wie folgt auführen (Maniatis T., 1989):

Agarosegelkonzentration in %	Effektive Auftrennung linearer DNA in bp
0,6	1000-20000
1,2	400-6000
1,5	200-3000
2,0	100-2000

Tab. 3.2 Agarosegelkonzentrationen zur effektiven linearen DNA Auftrennung

### 3.3.2 Polyacrylamidgele

#### Einführung

Polyacrylamidgele haben wesentlich kleinere Poren und bieten somit den Vorteil, daß schon der Unterschied einer Base sich in den Laufeigenschaften einer Probe auswirkt. Daraus bedingt sich ein hohes Auflösungsvermögen.

Polyacrylamid kristallisiert in Gegenwart freier Radikale aus und bildet dann ein Netzwerk aus Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid. Die Porengrößen wird von der Konzentration und der Vernetzung (Maniatis T., 1989) bestimmt. Die freien Radikale zur Polymerisierung werden von APS beigesteuert, TEMED katalysiert die Bildung dieser freien Radikale. Der enthaltene Harnstoffanteil in Sequenziergelen denaturiert im Gegensatz zu

Agarosegelen und SSCP-Gelen die DNA, so daß diese als entfalteter Einzelstrang durch das Gel wandert. Damit ist die Auftrennung nicht mehr von der unterschiedlichen DNA-Konfiguration beeinflusst, sondern wird im wesentlichen durch die DNA-Größe bestimmt.

### **3.3.2.2 Herstellung und Verwendung von PAA-Gelen für Sequenzierung mit radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten Primern und von MDE-Gelen für SSCP**

Die Reinigung der Glasplatten erfolgt mit Hämosol als Waschdetergens, Bidest und Ethanol, eine Platte wird mit Acrylase, die andere mit Sigmacote beschichtet. Wichtig ist eine Vermischung von Acrylase und Sigmacote zu verhindern, was ein markieren der verwendeten Platten erfordert. Die Polyacrylamidgele werden zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch 3 Abstandshalter (Spacer, 2 vertikal, 1 horizontal) voneinander getrennt sind. Somit ergibt sich eine Geldicke, bestimmt durch den Abstand der beiden Glasplatten von etwa 0,4mm. An den Schnittstellen der Spacer wird mit Vaseline zusätzlich abgedichtet. Nach Zugabe von 500 µl APS 35 µl TEMED zu 60-70ml Stammlösung wird das Gel über eine Pipette zügig zwischen den beiden Glasplatten gegossen. Vor der vollständigen Polymerisation werden durch Käme Taschen für den späteren Probenauftrag geschaffen. Die Polymerisation des Geles ist nach etwa einer Stunde bei Raumtemperatur abgeschlossen.

Sequenziergel:	
8% PAA-Gel:	350ml Harnstoff 10M 100ml Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 40% 50ml 10xTBE
SSCP-Gel:	
MDE-Gel:	20ml MDE-Solution 35ml A.bidest 10ml 5xTBE
Sequenziergel für Licor:	
	37,5ml Harnstoff 7M 7,5ml Amrescolösung 40% 5,0ml Long run 10x TBE Puffer

Tab. 3.3 Stammlösungen

Nach Entfernung des horizontalen Spacers und Auffüllen des entstandenen Zwischenraums durch den verwendeten Puffer wird das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und der vorgesehene Laufpuffer (0,6x bzw. 1xTBE) in das obere und untere Pufferbehältnis gefüllt. Ein Vorlauf von 30 min unter den späteren Bedingungen dient dem gleichmäßigen Erhitzen der Matrix. Zu den Auftragsproben wird ein Puffer gegeben, dessen Formamidanteil an einer Denaturierung ein Renaturieren verhindert. Nach Auftrag der Proben erfolgt die Wanderung von Kathode zur Anode, also von oben nach unten. Die Wanderung kann wieder anhand von Farbstoffbanden (Bromphenolblau, Xylencyanolblau), die im zugesetzten Auftragspuffer enthalten sind, verfolgt werden. Die Elektrophorese wird unter den Bedingungen für die SSCP und Sequenz wie im Anhang ersichtlich durchgeführt.

Nach der vorgesehenen Elektrophoresezeit, wird das Gel aus der Kammer genommen, die beiden seitlichen Spacer entfernt und die beiden Glasplatten

werden mit einem Spatel voneinander getrennt, wobei das Gel auf der mit Sigmacote beschichteten Platte verbleibt. Die Fixierung erfolgt bei Sequenziergelen für radioaktiv markierte Primer durch 10minütiges Verbringen in eine Wanne mit 10%iger Essigsäure, SSCP-Gele benötigen keine Fixierung. Danach wird das Gel auf Blottingpapier (Whatman®-Papier) übertragen, mit Alufolie überzogen und für ca. 45 min auf einem Gelrockner getrocknet. Als letztes folgt die Darstellung mittels Autoradiographie. Die letzten beiden Schritte Trocknung und Darstellung mittels Autoradiographie sind bei Gelen für den Sequencer von Licor natürlich nicht notwendig.

Das Vorgehen bei SSCP und DNA-Sequenzierung kann unter 3.4 bzw. 3.5 nachgeschlagen werden.

### **3.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen**

In dieser Arbeit wurde zur Isolation der DNA aus der Gelmatrix nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese die chromatographische Aufreinigung durch Qiagen's DNA-Gel-Extraction-Kit verwendet.

Nachdem die DNA in der Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidinterkalation gefärbt wird, erfolgt das Ausschneiden aus dem Agarosegel unter UV-Licht mit dem Skalpell. Danach wird das Gewicht bestimmt, und das dreifache Volumen des Puffers Q1 in ein Eppendorfgefäß hinzu gegeben. Das ganze wird in ein Wasserbad bei 15°C verbracht, wo sich die Agarose innerhalb von ca. 15 min auflöst. Danach wird das einfache Volumen Isopropanol hinzugefügt und nach Mischen der Gesamtansatzes in eine Qiagen-Spin-column umpipettiert. Das folgende Zentrifugieren für 1 min bei 13000 rpm bindet die DNA an die polykationische Matrix der Säule.

Zur Entfernung verbliebener Agarosereste werden 500 µl Q1 Puffer hinzugegeben und bei 13000 rpm eine Minute erneut zentrifugiert. Als nächster Schritt werden 500 µl des ethanolhaltigen Waschpuffers PE hinzugefügt, der unspezifisch an die Membran angelagerte Salze entfernen soll. Es folgt ein erneuter Zentrifugenschritt. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Danach werden Reste des Waschpuffers vom Säulenrand abpipettiert, da Ethanol die Eluation der DNA beeinträchtigen würde. Die Qiagen-Spin-Säulen werden nun in ein Eppendorfgefäß gesteckt und 30 µl Eluationspuffer EB hinzugefügt. Nach 5 Minuten Wartezeit wird für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Die Eluation wird mittels Gelelektrophorese auf Agarosegelen mit kleinen Geltaschen (Slots) überprüft.

### **3.4 SSCP (single strand conformation polymorphism)**

#### **Einführung**

Diese Art der Gelelektrophorese dient dem Nachweis, nicht aber der Lokalisation und Beschreibung von Mutationen und Polymorphismen. Sie beruht auf dem Prinzip, daß einzelsträngige DNA unter nicht denaturierenden Bedingungen durch Auffaltung und Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen eine durch die jeweilige Basensequenz vorgegebene Struktur ausbildet, die das Laufverhalten bestimmt. Weitere Faktoren, die das Laufverhalten beeinflussen sind die Molekülgröße und die Ladung. Somit genügt eine einzige unterschiedliche Basensequenz, um unterschiedliche Strukturen und damit auch ein unterschiedliches

Laufverhalten in der gelelektrophoretischen Auftrennung hervorzurufen (Glavac D., 1993). Diese Abweichung bezeichnet man als Shift.

Die SSCP dient als Screeningverfahren. Proben mit auffälligem Laufverhalten werden sequenziert, um die jeweilige Mutation darzustellen bzw. eine Veränderung der Basensequenz auszuschließen. Während der Vervielfältigung des zu untersuchenden DNA-Abschnittes mittels PCR wird zur späteren Detektion  $^{32}\text{P}$ -dCTP mit in das Produkt eingebaut. Dies ermöglicht die spätere Detektion mittels Autoradiographie. Nach Beendigung der PCR wird durch einen kurzen Denaturierungsschritt erreicht, daß Einzelstränge von DNA vorliegen, die dann auf ein nicht denaturierendes Gel aufgetragen werden und dort Sekundärstrukturen bilden, die dann das unterschiedliche Laufverhalten von Proben mit Abweichungen von der Wildtyp-Sequenz ergeben.

Bei der Auswertung sieht man bei menschlicher DNA mit Ausnahme der Geschlechtschromosomen die Darstellung der zwei Allele, jeweils eins von jedem Chromosom. Sollte eine Sequenzveränderung im heterozygoten Stadium vorliegen, so entsteht das klassische SSCP-Bild mit 4 Banden (Strang- und Gegenstrang des unveränderten Allels sowie strang und Gegenstrang des veränderten Allels). Durch Reannealing beim Auftrag auf das SSCP-Gel können sich wieder doppelsträngige DNA-Anteile ausbilden, die dann zu weiteren Banden führen können. Selbst wenn dies durch einen Denaturierungsschritt weitestgehend verhindert wird, so entstehen doch immer wieder unspezifische Banden. Eine Möglichkeit die Entstehung dieser Doppelstränge zu reduzieren besteht in der Verdünnung der Probe, da dadurch die Wahrscheinlichkeit des „Re-Annealing“ verringert wird.

Wenn man bedenkt, daß RNA-Basenpaarungen stabiler sind als DNA-RNA-Paarungen, so ist zu erwarten, daß die SSCP mit RNA-Einzelsträngen sensitiver und stabiler sein müsste. Die Literatur scheint dies zu bestätigen (Sarkar G, 1992). Jedoch wird zumeist aufgrund des deutlich erhöhten Aufwands und der mit dieser Methodik verbundenen erhöhten Kosten auf diese Form des Mutationsscreenings verzichtet.

Wesentlich für ein erfolgreiches Screening mittels SSCP sind im wesentlichen vier Variablen. Diese beinhalten die Länge des PCR-Fragments, die Temperatur, die Denaturierung der PCR vor dem Auftrag und die Charakteristika des verwendeten Gels.

Die optimale Länge des Einzelstranges in dieser Methodik scheint zwischen 150 und 200 Nukleotiden zu liegen (Sheffield VC, 1993). Wenn Produkte dieser Größenordnung verwendet werden, sind 70-90% der Variationen der Sequenz zu detektieren, unter den optimalen Bedingungen liegt sie jedoch bei bis zu 98% (Ravnik-Glavac M, 1994). Bei der Verwendung längerer Produkte wird die Sekundärstruktur in Relation zur Produktgröße weniger verändert und die Veränderung der Laufeigenschaft kann somit geringer ausfallen. Ein kürzeres Produkt kann weniger Sekundärstrukturen ausbilden und eine Detektion ist somit weniger sensitiv. Auch der GC-Gehalt der Sequenz dürfte von Bedeutung sein, da GC-Verbindungen bekanntlich hitzestabiler sind als AT-Verbindungen.

Weiterhin wird die Sensitivität der SSCP als Screeningverfahren durch die Temperatur beeinflusst. Da die Schmelzpunkte der oben beschriebenen kurzen Basenpaarungen, die die Konformation des Einzelstranges bilden, zumindest zu Teilen unterhalb der Raumtemperatur liegen, führten wir zusätzlich zu

einem Lauf unter Raumtemperatur (20-25°C) einen Lauf unter standardisierten Bedingungen bei 4°C in einem Kühlraum durch. Daß ein solches Vorgehen sinnvoll ist, beweisen diverse Berichte über zusätzliche Band-Shifts, die erst unter verschiedensten Bedingungen aufgetreten sind (Leren TP, 1993)(Sekiya T, 1993). In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, daß ein Erhitzen des Gels vermieden werden muß, da dadurch zum Teil große Temperaturen entstehen können, die die oben beschriebenen Effekte bedingen können. Dies kann durch Wasserkühlungssysteme, aber auch durch die entsprechende Wahl der Stromanlage vermieden werden.

Der nächste wesentliche Einflußfaktor ist die Denaturierung des Produkts, um die Bildung von Doppelsträngen und das Entstehen weiterer Banden zu verhindern, da ansonsten die Auswertbarkeit deutlich erschwert werden kann. Auch das Vorhandensein von in großen Mengen zugegebenen Primern kann die Anlagerung an die Einzelstränge und damit eine erschwerte Auswertung zur Folge haben. Um diese Re-annealing-Effekte zu minimieren kann man versuchen, die Auftragsproben zu verdünnen, oder aber auch die Zahl der Cycles der PCR zu reduzieren. Des weiteren sollten vor jedem Auftrag die Proben nochmals denaturiert und danach sofort auf Eis verbracht werden, von wo aus der zügige Auftrag erfolgen sollte.

Nicht zuletzt ist die Beschaffenheit des Gels von zentraler Bedeutung. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang die Acrylamid-Konzentration, die Acrylamid/Bisacrylamid-Ratio, die verwendeten Puffer und ihre Konzentration und Zugaben wie z.B. Glycerol. Wir verwendeten eine im Handel erhältliche standardisierte Lösung (MDE-Gel Solution), die besondere Eignung zur Untersuchung von Fragmenten mit einer Länge von 150-250 bp besitzt.

## **Durchführung**

Zuerst wird eine PCR mit radioaktiv markierten Nukleotiden und einem Gesamtvolumen von 20 µl ausgeführt, es folgt die Zugabe von 7 µl Auftragspuffer. Hiernach werden die Proben für 3min bei 94°C denaturiert. 3 µl jeder DNA-Probe werden dann auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Wir verwenden MDE-Gellösung und testen bei Raumtemperatur und 650V, sowie bei 4°C und 450V. Als Puffer findet 0,6x TBE Verwendung. Die unterschiedlichen Laufbedingungen dienen der Erhöhung der Sensitivität der Methode. Die exakten Laufbedingungen für die einzelnen Exone können im Anhang nachgeschlagen werden.

Nach Durchführung der Gelelektrophorese erfolgt die Trennung der Glasplatten, die Fixierung des Gels auf Whatman®-Papier, die Trocknung unter Alufolie auf einem Trockner und die Darstellung des Ergebnisses durch Autoradiographie.

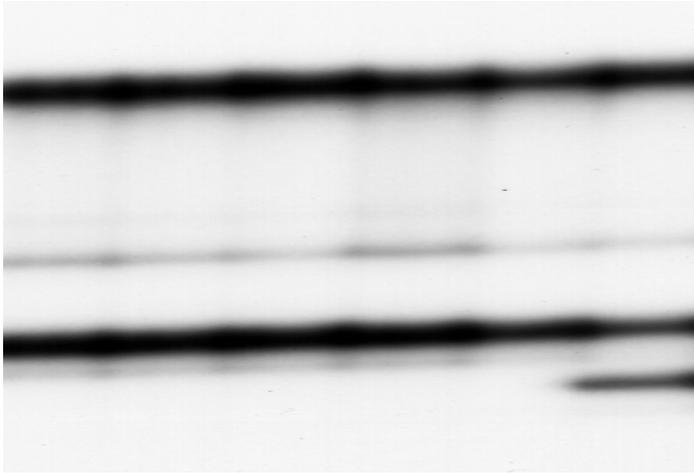


Abb. 3.2 Beispiel einer SSCP mit Shift in der letzten Probenspur

### 3.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung dient zur Basenabfolgebestimmung in einem definierten DNA-Bereich. Die verwendete Methode basiert auf einer Modifizierung der Didesoxykettenabbruchsmethode nach Sanger (Sanger F., 1977).

Wir analysierten die Sequenz von Proben, deren Laufverhalten in der SSCP sich von Kontrollen unterschied.

Bei der modifizierten Form nach Kretz (Kretz, 1994) wird das zyklische Aufeinanderfolgen von Abkühlen und Erhitzen einer PCR genutzt (Cycle Sequencing). Wie bei der PCR wird durch einen Denaturierungsschritt die DNA in die einsträngige Form überführt, damit im darauffolgenden Schritt bei niedrigerer Temperatur ein markierter Primer (radioaktiv oder fluoreszierend) binden kann. Dieser Primer ermöglicht später die Detektion und somit die Auswertung. Im dritten Schritt baut eine hitzestabile Sequenase

Nukleotide in die in der Synthese befindliche DNA ein. Neben den herkömmlichen Nukleotiden (dNTPs) werden auch 2',3'-Dideoxynucleosidtriphosphate (ddNTPs) eingesetzt, die bei ihrem Einbau die enzymatische Reaktion unterbrechen, weil ihnen das 3'-Hydroxylende fehlt, um die folgende Phosphodiesterbindung zu bilden. Es entstehen somit Abbruchprodukte unterschiedlicher Länge. Die Vermehrung erfolgt nur linear, da nur ein Primer verwendet wird.

Die vier Ansätze, die jeweils die unterschiedlichen Dideoxynucleosidtriphosphate enthalten werden gelelektrophoretisch auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt. Durch die Denaturierung im Gel wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Produkte im wesentlichen von der Produktlänge und nicht mehr von der Konformation bestimmt. Danach erfolgt, je nach Markierung des Primers, die Auswertung über Autoradiographie oder per Computer über die Fluoreszenz.

### **3.5.1.1 Cycle Sequencing mit radioaktiv markierten Primern**

Zuerst wird die zu untersuchende DNA mittels PCR amplifiziert, gelelektrophoretisch über Agarosegel aufgetrennt und dann aus der Gelmatrix isoliert. Des Weiteren müssen Primer zur Sequenzierung mittels ATP-P<sup>32</sup> radioaktiv endmarkiert werden.

Verwendet wurde der Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit von Amersham.



Abb. 3.3 Beispiel einer radioaktiven Sequenzierung; Sinnstrang einer Probe und einer Kontrolle

### **Durchführung**

Je 4  $\mu\text{l}$  des Didesoxynukleotidmixes werden auf Eppendorf-Gefäße verteilt. Der Reaktionsansatz besteht aus 5  $\mu\text{l}$  DNA (durch PCR, Gelelektrophorese und Eluation erhalten), 2  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer, 2  $\mu\text{l}$  markiertem Primer, 2  $\mu\text{l}$  Thermo Sequenase aufgefüllt auf 17,5  $\mu\text{l}$  mit A. bidest. Von dem Gesamtansatz werden je 4  $\mu\text{l}$  auf die vier Eppendorf-Gefäße verteilt. Nach Überschichtung mit Mineralöl, das ein Verdampfen der Proben verhindern soll, wird die Reaktion in einem Thermocycler gestartet. Das jeweilige Reaktionsprogramm kann den Tabellen im Anhang entnommen werden. Nach beendeter Reaktion werden 4  $\mu\text{l}$  Stoppuffer, der Formamid zur Denaturierung enthält, hinzugegeben und erneut für etwa 3 min bei 95 °C denaturiert. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung werden je 3  $\mu\text{l}$  aus den Eppendorf-Gefäßen nebeneinander auf ein 8 prozentiges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Laufzeiten und -bedingungen sind wiederum in den Tabellen im Anhang fixiert. Nach Fixierung und Trocknung des Gels erfolgt der Nachweis durch Autoradiographie.

### **3.5.2.1 Cycle Sequencing mit Primern mit Fluoreszenzmarkierung**

Im Unterschied zum Cycle Sequencing mit radioaktivmarkierten Primern werden hierbei Primer als Synthesestartpunkt verwendet, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. Die Elektrophorese und Analyse der Daten erfolgt durch ein Sequenziergerät der Firma Licor.

Bei der zyklischen Sequenzierreaktion entstehen unterschiedlich große Fragmente, die während der Elektrophorese an einem Photodetektor vorbei wandern. Das Gerät sendet hierzu einen Laserstrahl aus, der die fluoreszierenden Anteile anregt. Der Photodetektor mißt und speichert die Signale und macht sie über ein Computerprogramm sichtbar. Dies ermöglicht die maschinelle Auswertung.

Hierfür wurde der Thermosequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit der Firma Amersham eingesetzt. Die fluoreszenzmarkierten Primer sind sehr lichtempfindlich und sollten darum lichtgeschützt gelagert und keiner längeren Lichtexposition ausgesetzt werden.

#### **Durchführung**

Je ein  $\mu\text{l}$  des ddNTP-Mixes A,C,G und T(besteht aus dNTPs, ddNTPs und Reaktionspuffer) wird in ein Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Der Reaktionsansatz besteht aus 1  $\mu\text{l}$  DMSO, 1,5  $\mu\text{l}$  fluoreszenzmarkiertem Primer und bis zu 10,5  $\mu\text{l}$  Template (je nach Konzentration des Eluates) ad 13  $\mu\text{l}$  aufgefüllt mit A. bidest. Je 3  $\mu\text{l}$  dieses Reaktionsansatzes werden auf die Aliquots des ddNTP-Mixes gegeben. Auch hier erfolgt die Übersichtung mit Mineralöl. Die Reaktion erfolgt in einem Thermocycler. Nach der

Reaktion werden 3  $\mu\text{l}$  Stopplösung dazupipettiert und 2 min bei 70 °C denaturiert. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung werden jeweils 1,5  $\mu\text{l}$  aufgetragen und die Analyse durch den Computer gestartet.

### **3.6 Autoradiographie**

Durch die Autoradiographie kann eine radioaktiv markierte Probe in einer Gelmatrix lokalisiert und nachgewiesen werden.

Das markierte Produkt wird elektrophoretisch aufgetrennt und nach einer orientierenden Untersuchung mit dem Geiger-Zähler zur Abschätzung der Expositionsdauer auf Whatman®-Papier übertragen und auf einem Gelrockner getrocknet. Danach legt man einen Film in einer Dunkelkammer direkt auf das Gel auf. Die radioaktive Strahlung wandelt während der Exposition durch  $\beta$ -Teilchen oder  $\gamma$ -Strahlen Silberionen in atomares Silber um (Reduktion). Eine Expositionszeit von einem  $\frac{1}{2}$  bis zu 2 Tagen bei der Verwendung von  $^{32}\text{P}$  sollte ausreichen.

Aufgrund der sehr energiereichen Strahlung von  $^{32}\text{P}$  ergeben sich Probleme im Bereich des Arbeitsschutzes. Daraus ergibt sich die besondere Behandlung und Verwendung von Plexiglasschirmen. Des weiteren ist eine besondere Laborspezifikation notwendig, die verwendeten  $\beta$ -Strahler erzeugen beim Auftreten auf Materie Bremsstrahlung, die mit zunehmender Kernladungszahl Z des Wechselwirkungsmaterials steigt. Aus diesem Grunde sollte zur Abschirmung leichtes Material wie z.B. Plexiglas verwendet werden. Orientierend kann man sagen, die Dicke des benötigten Abschirmmaterials sich aus der maximalen  $\beta$ -Energie in MeV multipliziert mit zwei. wir verwendeten Plexiglasschirme mit einer Stärke von 1,5 cm.

Nach der Exposition des Films werden beim folgenden Entwickeln dann ganze Silberhalogenidkristalle zu metallischem Silber reduziert, beim Fixieren werden die nichtbestrahlten Anteile entfernt (Strachan T., 1996). Somit erhält man eine zweidimensionale Darstellung auf Röntgenfilm, die eine optische Auswertung ermöglicht. Die Entwicklung und Fixierung erfolgt maschinell.

Wir verwenden Filmkassetten mit Verstärkerfolien. Diese Bögen aus anorganischem Szintillator sind besonders bei hochenergetischer Strahlung (wie das verwendete <sup>32</sup>P) sinnvoll, da diese Strahlung zum großen Teil durch den Film hindurchgeht. Die Verstärkerfolie absorbiert diese Strahlung und wandelt sie in Licht um, was zu einer indirekten Autoradiographie führt. Die Überlagerung der direkten autoradiographischen und indirekten photographischen Strahlung intensiviert dann das Bild.

Wir verwendeten Filme mit hohem Silbergehalt und grober Körnung (Agfa Curix HAT 1000L). Die Arbeit mit diesen Filmen geschah bei Rotlicht in der Dunkelkammer, um eine versehentliche Belichtung zu vermeiden.

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte in dieser Arbeit durch

1. Einbau von dCTP-P<sup>32</sup> im Rahmen einer PCR
2. Primerendmarkierung mit dATP-P<sup>32</sup>

## **3.7 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten**

### **3.7.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten**

Anstelle eines Kaltmixes wird zur PCR ein Heißmix verwendet. Dieser enthält deutlich weniger dCTP, somit kann man durch Hinzufügen von radioaktiv-markiertem dCTP (0,1 µl dCTP-P32 (10 µCi/µl)) den Einbau ermöglichen. Mit Hilfe dieser Markierung ist dann nach gelektrophoretischer Auftrennung die Detektion mittels Autoradiographie möglich.

### **3.7.2 5'-Endmarkierung von Primern**

Zur 5'-Endmarkierung von Primern wurde die T4-Polynukleotidkinase (PNK) verwendet. Mit Hilfe dieses Enzyms kann der  $\gamma$ -Phosphatrest des radioaktiv markierten  $\gamma$ -ATP auf das 5'-OH-Ende der Primer übertragen werden.

Es werden 2 µl des Primers (entsprechen ca 20 pmol) mit 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 µl  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und 2,5 µl T4-PNK (verdünnt 1:10 mit Dilution Buffer) zusammenpipettiert und danach auf 25µl mit A. bidest aufgefüllt. Nach Inkubation dieses Ansatz über 1 Stunde bei 37°C ist die Markierung abgeschlossen.

## **3.8 DNA-Größenstandard**

Als Längenstandard auf Agarosegelen verwendeten wir Bioladder 100 (100-1000 bp) von AGS Heidelberg. Dieser käufliche Längenstandard wird bereits auftragsfertig geliefert.

Alternativ nutzten wir durch HIND III verdaute  $\chi$ -DNA. Der Bakteriophage  $\chi$  ist ein doppelsträngiges DNA-Virus mit einer Genomgröße von ca. 30 kb. Mittels des Enzyms HIND III gelingt es den Phagen so zu schneiden, daß Produkte mit einer Größe von 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 und 23130 bp entstehen. aufgrund dieser Auftrennung ist dann eine Verwendung als Größenstandard möglich.

### **Durchführung**

Man inkubiert einen Ansatz aus 200  $\mu$ l  $\chi$ -DNA (Konzentration 500  $\mu$ g/ml), 60  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 30  $\mu$ l 10x Puffer (Boehringer und 10  $\mu$ l HIND III für 3 Stunden bei 37°C. Durch die dann folgende Zugabe von 700  $\mu$ l Ethanol/Natriumacetat wird die DNA gefällt und anschließend für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes gibt man 200  $\mu$ l Ethanol 70% hinzu und zentrifugiert erneut für 10 Minuten mit 13000rpm. Auch der dabei entstandene Überstand wird entfernt. Das entstandene Pellet wird in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgelöst und um eventuell noch vorhandene Enzymreste zu entfernen für 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patienten mit V.a. Dopa-responsive Dystonie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde uns DNA von 43 Patienten aus 40 Familien mit der Verdachtsdiagnose einer dopa-responsiven Dystonie zur molekulargenetischen Untersuchung des GCH I Gens vorgestellt. Sicherlich gibt es – wie oben beschrieben – kaum ein einheitliches Krankheitsbild, so daß eine scharfe Abgrenzung von typischen und untypischen Verläufen nahezu unmöglich ist. Jedoch gibt es Kriterien, die das Vorhandensein einer DRD wahrscheinlicher machen, und bei deren Fehlen nur selten ein Mutationsnachweis gelingt. Hierzu gehören neben der klinischen feststellbaren Dystonie, die tageszeitliche Beschwerdeabhängigkeit mit einer deutlichen klinischen Besserung nach einer längeren Ruhephase und nicht zuletzt das gute klinische Ansprechen auf niedrige Gaben Levodopa.

Legt man diese drei Kriterien als Basis zu Grunde, so waren von den erwähnten 43 Patienten aus 40 Familien mit der Verdachtsdiagnose einer dopa-responsiven Dystonie 17 Patienten aus 15 Familien als klassische Verläufe zu beurteilen.

Bei 26 Patienten aus 28 Familien waren nicht alle Kriterien erfüllt. Bei 14 Patienten aus 15 Familien waren die oben genannten grundlegenden Kriterien nicht komplett erfüllt, bei 12 Patienten aus 13 Familien fehlten die hierzu notwendigen klinischen Informationen, so daß eine klare Zuordnung als klassischer oder atypischer Verlauf nicht möglich war.

Im Rahmen unserer molekulargenetischen Untersuchungen untersuchten wir unter den zuvor beschriebenen Bedingungen die Exone und ihre flankierenden Introne auf Mutationen. Dies geschah primär mittels Screening durch SSCP. Waren Befunde im Screening auffällig, so erfolgte die direkte Sequenzierung zum Mutationsnachweis. Patienten mit der typischen Klinik, tageszeitlicher Abhängigkeit der Beschwerden und Sensitivität auf die Verabreichung von Levodopa wurden unabhängig vom Ergebnis der SSCP komplett sequenziert.

Bei den Mutationsanalysen fanden sich 9 Mutationen in den 15 Familien. Dabei fanden wir 1 Deletion die zum einem Frameshift führte, 2 Insertionen im Intronbereich in unmittelbarer Nähe zum Exon, 2 Punktmutationen im Intron in unmittelbarer Nähe zum Exon und 4 Punktmutationen, die zu einem Basenaustausch im Sinne einer Missense-Mutation führen. Alle Patienten bei denen eine Mutation gefunden wurde stammten aus der Gruppe der als klassisch eingestuften Patienten. Bei diesen Patienten mit positivem Mutationsnachweis erfolgte - soweit Untersuchungsmaterial zugänglich war und dies gewünscht wurde - die Untersuchung der Angehörigen auf eben diese Veränderung der genomischen Sequenz mittels direkter Sequenzierung. Dabei fanden sich 8 weitere Personen aus 5 Familien, die als Träger der Mutation identifiziert werden konnten. Zwei der Mutationsträger wurden als symptomfrei beschrieben und bezeichneten sich selbst als gesund, bei vier Patienten bestand klinisch ebenfalls der V.a. eine dopa-responsive Dystonie, 1 Patientin war bislang als Morbus Parkinson diagnostiziert und behandelt worden, 1 Patient hatte rezidivierende krampfartige gastrointestinale Beschwerden unklarer Ursache. In wie weit dies im Zusammenhang mit einer dopa-responsiven Dystonie gesehen werden kann, ist bei noch ausstehendem Versuch einer Levodopa-Medikation nicht zu beurteilen.

ID	Fam		Indikation	Symptomatik
349	4	GCH I Exon 3 Del C477, Frameshift	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
195	4	GCH I Exon 3 Del C477, Frameshift	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
196	4	GCH I Exon 3 Del C477, Frameshift	V.a. DRD	unauffällige Genträgerin
188	6	GCH I Exon 3 T488G, LEU163ARG	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
294	6	GCH I Exon 3 T488G, LEU163ARG	Ausschluß DRD	schwache Parkinsonsymptomatik
320	6	GCH I Exon 3 T488G, LEU163ARG	Ausschluß DRD	gastrointestinale Beschwerden
200	6	GCH I Exon 3 T488G, LEU163ARG	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
307	8	GCH I Exon 1 C68T, PRO23LEU	V.a. DRD	unauffällige Genträgerin
202	8	GCH I Exon 1 C68T, PRO23LEU	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
212	14	GCH I Intron 5 G(+5)A	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
217	16	GCH I Exon 3 T488G, LEU163ARG	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
271	69	GCH I Intron 5 InsT+2	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
357	77	GCH I Intron 3 G(+1)T	V.a. DRD	unauffälliger Genträger
280	77	GCH I Intron 3 G(+1)T	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
330	113	GCH I Exon 6 A631G, MET211VAL	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik
340	113	GCH I Exon 6 A631G, MET211VAL	V.a. DRD	unauffällige Genträgerin
343	121	GCH I Intron 5 Ins T+2	V.a. DRD	klassische DRD-Symptomatik

Tab. 4.1 Mutationen bei Patienten mit klassischer DRD

Eine weitere Diskussion der Krankheitsverläufe, der oben beschriebenen Patienten mit nachweisbarer Mutation im GCH I Gen erfolgt weiter unten.

In der Gruppe wo zumindest ein Kriterium nicht erfüllt oder mangels vorliegender Information unbekannt war fand sich keine Veränderung der genomischen Sequenz.

### **GCH I Exon 3 Del C477**

Wir fanden diese Mutationen bei einer klinisch unauffälligen Mutter asiatischen Ursprungs und bei Ihren beiden Kindern. Sowohl der Sohn als

auch die Tochter zeigten dystone Symptome mit tageszeitlicher Fluktuation und deutlicher Besserung auf Levodopa-Gaben unmittelbar nach der Geburt. Unter der fortgeführten Medikation mit 100 mg Levodopa täglich entwickeln sich beide Kinder bis heute gut, weitere Auffälligkeiten sind unseren Informationen zu Folge bisher nicht aufgetreten. Nach Angaben des behandelnden Arztes ist die Mutter symptomfrei und wird darum auch nicht behandelt. Informationen über weitere Familienangehörige waren nicht zu eruieren.

Die Deletion eines C an Stelle 477 von Exon 3 führt zu einem Frameshift. Daraus erfolgt eine erniedrigte Enzymaktivität, die die vorliegenden klinischen Beschwerden erklärt. Wir veröffentlichten diese genetische Veränderung 2000 in *Neurology* (Steinberger D, 2000), weitere Besreibungen liegen unserem Kenntnisstand zur Folge nicht vor.

ACGTACGT



Wildtyp

Patient

### **GCH I Exon 3 T488G**

Die Mutation T488G ist eine Punktmutation, die zu einem Basenaustausch von Leucin zu Arginin an Position 163 führt. Diese Veränderung ist unserer Kenntnis nach in der Literatur noch nicht beschrieben worden, so daß wir diese Veränderung erstmalig 2000 veröffentlichten (Steinberger D, 2000).

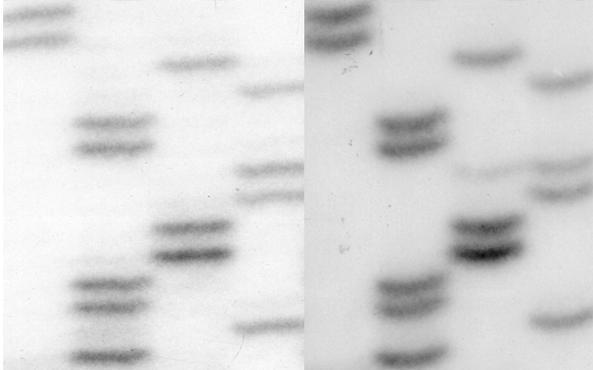
Diese Veränderung der genomischen Sequenz konnten wir in zwei Familien nachweisen, eine Verwandtschaft bestand unseren Informationen nach nicht. In Familie 16 war nur DNA des Indexpatienten verfügbar, auch lagen weitere Informationen über die Familie nicht vor. Der Patient selbst wird von den behandelnden Kollegen als klassische Symptomatik einer dopa-responsiven Dystonie beschrieben. Im Adoleszentenalter hätten dystone Bewegungen im Bereich beider Beine zuerst zu mehreren orthopädischen Vorstellungen geführt. Unter Einlagenbehandlungen seien die Beschwerden jedoch nicht gebessert, sondern eher progredient gewesen. Die Symptomatik habe nun auch zur Einstellung des Schulsportes geführt. Im Rahmen einer Vorstellung beim niedergelassenen Neurologen war aufgrund der klinischen Symptomatik und der deutlichen Besserung nach Schlafphasen und in den frühen Morgenstunden eine Verabreichung von Levodopa versucht worden, die zuerst zu einer klinischen Besserung geführt hatte. Nach etwa zwei Monaten der konsequenten medikamentösen Behandlung mit 75 mg Levodopa seien die Beschwerden nicht mehr existent gewesen. Medikamentöse Nebenwirkungen haben nicht bestanden.

Die oben beschriebene Mutation fanden wir ebenfalls in Familie 6. Nach dem positiven Mutationsnachweis bei der Indexpatientin erreichte uns auch Probenmaterial von zwei Brüdern und der Mutter der Patientin. Auch hierin gelang der Nachweis dieser Veränderung der genomischen Sequenz. Die

Indexpatientin und einer Ihrer Brüder litten seit dem frühen Adoleszentenalter unter zunehmenden Dystonien der distalen Extremitäten. Diese Beschwerden aggravierten im Laufe der kommenden Jahre, so daß orthopädische Korrektur-Operationen (Sehnenverlängerungen, Umstellungsosteotomien vorgenommen wurden, um eine symptomatische Besserung der Beschwerden zu erreichen. Das Krankheitsbild jedoch blieb progredient, so daß beide Patienten mit Anfang 30 sich nur noch im Rollstuhl vorwärts bewegen konnten. Die obere Extremität war glücklicherweise kaum betroffen. Die insbesondere anfangs ausgeprägte Schwankung der Symptomatik abhängig von der Tageszeit und vorhandenen Ruhephasen hatte auch zu wiederholten Vorstellungen in psychologischen und psychiatrischen Einrichtungen geführt. Erst als beide Patienten fast 50 Jahre alt waren, wurde ein Therapieversuch mit Levodopa 300 mg täglich bei V.a. dopa-responsive Dystonie unternommen. Die klinische Besserung ging und geht nur sehr langsam voran, was sicherlich mit der langen Krankheitsprävalenz in Verbindung steht. Jedoch ist seit Beginn dieser Therapie eine Progredienz nicht mehr zu verzeichnen.

Im Rahmen der durchgeführten Familienuntersuchung fand sich eben diese Mutation auch bei einem weiteren Bruder der Patientin, der keinerlei dystone Symptome zeigte. Dieser Patient litt jedoch unter rezidivierenden krampfartigen abdominellen Beschwerden, deren Ursache bis heute ungeklärt ist. Auch zwei Laparotomien und die Operation einer Hiatushernie hatten keine Linderung der Beschwerden erbracht. Sicherlich läßt sich an dieser Stelle über eine fokale Dystonie im Abdominalbereich spekulieren. Fakt ist jedoch, daß der Patient bis zum heutigen Tage keinen Therapieversuch mit Levodopa wünscht und somit eine Besserung dieser Beschwerden somit nicht beobachtet werden kann.

# ACGTACGT



Wildtyp

Patient

Die Mutter dieser drei Patienten war bis zu Ihrem 70. Lebensjahr klinisch unauffällig. Keinerlei ernsthafte Erkrankungen oder gar Krankenhausaufenthalte werden berichtet. Erst dann sei ein M. Parkinson in einer milden kaum progredienten Form diagnostiziert worden, der unter Therapie mit Levodopa gut zu beherrschen sei. Auch Jahre nach Beginn der Therapie seien unerwünschte Effekte wie der „on-off“-Effekt nicht zu verzeichnen. Die täglich verabreichte Dosis beträgt unverändert 300 mg Levodopa täglich. Aus unserer Sicht handelt es sich hierbei weniger um eine milde Verlaufsform eines M. Parkinson, sondern um eine spät manifeste Form der dopa-responsiven Dystonie.

Des weiteren wurde berichtet, daß auch die Urgroßmutter unter einer ungeklärten Tremorerkrankung gelitten habe. Weitere DNA-Proben der

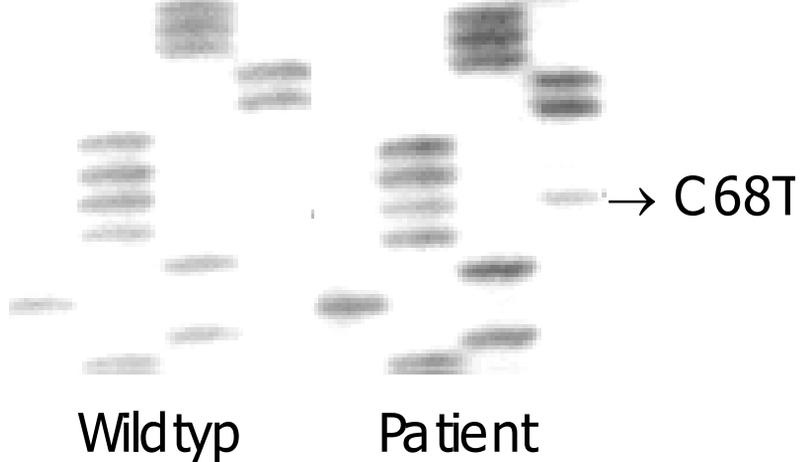
Familie waren uns leider nicht zugänglich, so daß eine weitere umfangreiche Familiendiagnostik nicht durchgeführt werden konnte.

Insgesamt beeindruckt bei dieser Familie das außerordentlich variable Spektrum an klinischen Beschwerden bei Nachweis ein und derselben Mutation als Krankheitsursache.

### **GCH I Exon 1 C68T**

Diese Punktmutation, die zu einem Austausch eines C gegen ein T an Position 68 führt, hat einen Basenaustausch von Prolin zu Leucin an Position 23 zu Folge. Daraus resultiert eine verminderte Enzymaktivität, wodurch die Krankheitssymptome einer dopa-responsiven Dystonie zu erklären sind. Diese Mutation wurde 1997 von Jarman et al bereits bei Patienten mit DRD beschrieben (Jarman PR, 1997).

# ACGTACGT



Unsere Patientin litt unter klinisch zunehmenden Beschwerden mit Einwärtsdrehungen der unteren Extremitäten und verminderter Belastbarkeit besonders in den Abendstunden. Eine Verbesserung war nach Schlafphasen immer zu verzeichnen, die Medikation mit Levodopa 100 mg täglich hatte zu einer kompletten Remission der Beschwerden geführt. Den engen Zusammenhang zwischen physischer und psychischer Entwicklung kann man deutlich an dieser Patienten darstellen. Während der zunehmenden Beschwerden verschlechterte sie sich in der Schule dermaßen, daß die Versetzung gefährdet war. Nach Beginn der Medikation und der daraus folgenden Genesung hat sich die kleine Patientin erfreulicherweise um zwei Notenpunkte in Ihren schulischen Leistungen verbessert.

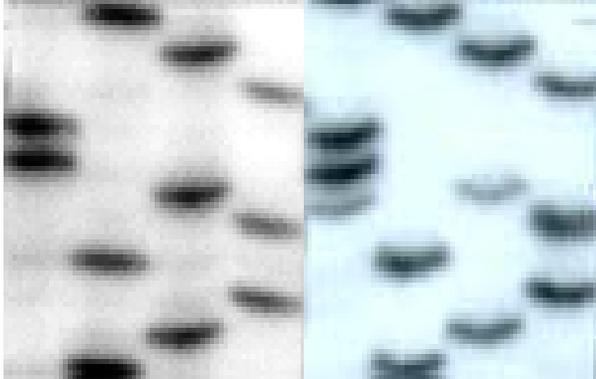
Im Rahmen der Familienuntersuchung konnte wir auch DNA beider Eltern auf eben diese Veränderung untersuchen. Dabei zeigte sich die auch bei der

kleinen Patientin beschriebene Mutation ebenfalls bei der Mutter. Diese war jedoch klinisch nach Angaben des betreuenden Arztes beschwerdefrei. Somit ist auch hier wieder die enorme Varianz der klinischen Beschwerden darzustellen und besonders zu erwähnen.

### **GCH I Intron 5 G+5A**

Zu dieser Patientin liegen uns leider kaum klinische Daten vor. Auch Familienangehörige waren aufgrund nicht erreichbaren Materials nicht zu untersuchen. Die klinische Symptomatik wird lediglich als klassische Verlaufsform einer dopa-responsiven Dystonie beschrieben. Die täglich verabreichte Dosis an Levodopa beträgt 300 mg. Darunter seien die Beschwerden zuerst rückläufig gewesen, inzwischen sei die Patientin unter fortgeführter Therapie beschwerdefrei.

ACGTACGT



→ Intron 5 G + 5A

Wildtyp

Patient

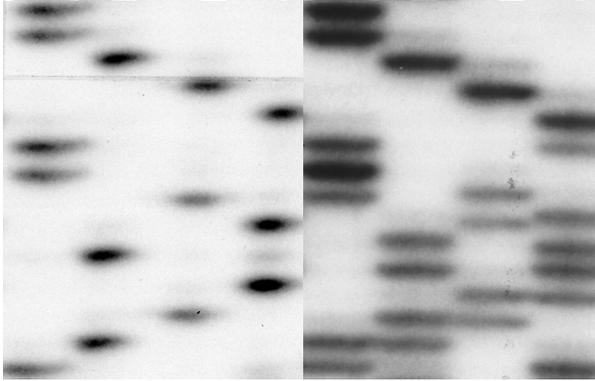
Die Mutation führt zu einer Veränderung der „Splice-site“ und somit zu einem veränderten Splicing des Genproduktes. Die erstmalige Veröffentlichung dieser Mutation erfolgte durch unsere Gruppe (Steinberger D, 2000). Weitere funktionelle Untersuchungen dieser Mutation liegen unserem Wissen zu Folge nicht vor.

### **GCH I Intron 5 InsT+2**

Auch diese Mutation beeinflusst das Splicing und sorgt damit für eine verminderte Enzymaktivität. Die Insertion ist noch nicht vorbeschrieben gewesen und wurde in diesem Patienten erstmalig gefunden (Steinberger D, 2000). Wir fanden diese Veränderung bei zwei unserer Patienten.

Die klinischen Beschwerden werden bei beiden Patienten als tageszeitlich schwankende Beschwerden im Sinne von Dystonien der unteren Extremität beschrieben. Unter der täglichen Verabreichung von Levodopa 75 mg bzw. 150 mg hat sich die klinische Symptomatik komplett zurückgebildet. Weitere Beschwerden bestehen seitdem nicht mehr. Weitere klinische Informationen lagen uns leider nicht vor.

ACGTACGT



→ Intron 5 Ins T + 2

Wildtyp

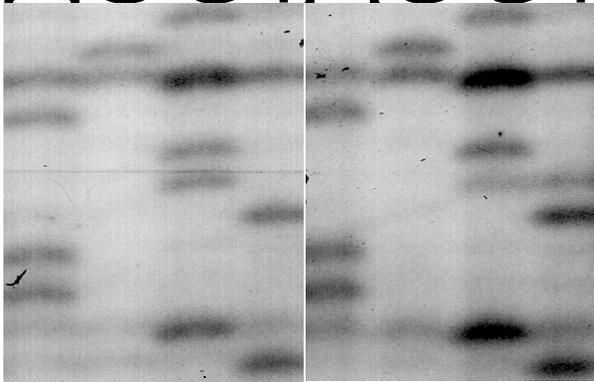
Patient

### **GCH I Intron 3 G+1T**

Genau wie die beiden zuvor beschriebenen Veränderungen der genomischen Sequenz beeinflusst diese Veränderung das Splicing und sorgt somit für die klinischen Beschwerden einer dopa-responsiven Dystonie. Auch diese Veränderung war zuvor nicht beschrieben worden, so daß eine erste Veröffentlichung 2000 durch uns erfolgte (Steinberger D, 2000).

Die zentralen klinischen Beschwerden bei dem 1984 geborenen Patienten bestanden im wesentlichen aus Gang- und Standbeschwerden, die von unterschiedlicher Ausprägung sind. So war der Patient am frühen Morgen nach dem Aufstehen fast beschwerdefrei, während die Symptomatik im Laufe des Tages aggravierte und Ihm ein teilnehmen an sportlichen Aktivitäten am Nachmittag unmöglich machte. Unter medikamentöser Einstellung mit 200 mg Levodopa sind die Beschwerden nicht mehr aufgetreten. Im Rahmen der Genotypisierung des GCH I Gens der Eltern fand sich diese Mutation auch beim Vater des Patienten, der sich bis zum heutigen Zeitpunkt nicht in ärztlicher Behandlung befindet. Nach Angaben des behandelnden Arztes ergab auch eine intensive neurologische Symptomatik keinen auffälligen Befund.

ACGTACGT



→ Intron 3 G + 1T

Wildtyp

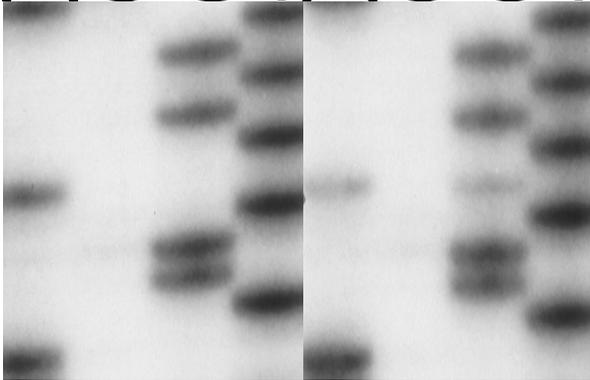
Patient

## **GCH I Exon 6 A631G**

Diese Punktmutation im Exon 6 des GCH I Gens an Position 631 führt zum Austausch von Methionin durch Valin an Position 211. Diese Veränderung wurde im Jahre 1998 durch Bandmann (Bandmann O, 1998) schon beschrieben. Interessant ist jedoch, daß der damals beschriebene Patient nicht unter einer klassischen dopa-responsiven Dystonie litt, sondern die klinische Symptomatik als milde Hyperphenylalaninämie beschrieben wird.

Bei unserer Patientin hingegen zeigte sich das klinische Bild einer klassischen dopa-responsiven Dystonie. Unter täglicher Einnahme von 300 mg Levodopa haben sich die klinischen Beschwerden komplett zurückgebildet. Bei der Untersuchung der Familienangehörigen fanden sich diese Punktmutation, die einen Basenaustausch zur Folge hat auch bei der Mutter der Patientin, die jedoch bis dato klinisch unauffällig war.

ACGTACGT



Wildtyp

Patient

→ A631G

#### 4.2 Patienten mit V.a. fokale Dystonien

1999 war von Steinberger et al (Steinberger D, 1999) eine Mutation im GCH I Gen beschrieben worden, die klinisch lediglich zu einer orofacialen Dystonie geführt hatte und unter niedrig dosierter L-Dopa-Medikation dann auch sistierte. Somit war anzunehmen, daß Veränderungen der Enzymaktivität nicht nur zu generalisierten, sondern auch zu fokalen Symptomen führen können. Unter dieser Annahme untersuchten wir im Rahmen dieser Arbeit Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen, deren Beschwerden im Zusammenhang mit einer fokalen Dystonie gesehen werden können auf Mutationen in der kodierenden Region und der flankierenden intronischen Gebiete im Gen für GCH I.

Somit wurden insgesamt 19 Patienten mit cervikalen Bandscheibenvorfällen molekulargenetisch untersucht. Die cervikale Lokalisation der Beschwerden wurde gewählt, um eine Vermischung mit belastungsinduzierten Bandscheibenvorfällen, die in Ihrer Mehrheit ja doch lumbal lokalisiert sind, zumindest zu minimieren. Bei zwei dieser Patienten war eine familiäre Häufung dieser Beschwerden zu lokalisieren, zwei Erkrankte hatten eine Besserung ihrer Beschwerden unter L-Dopa-Medikation angegeben, die anderen konnte hierzu keine Angaben machen. Eine Abhängigkeit der Beschwerden von der Tageszeit und von Ruhepausen wurde von 2 Patienten bestätigt, 2 verneinten dies. Die übrigen 14 Patienten konnten dazu keine Angaben machen, da Ihre Beschwerden nicht in einer Form auftraten, die eine Beobachtung bezüglich einer Fluktuation zuließ.

Pat- id	Fam.	Status	Symptome	Tageszeitlich	Dopa-sensitiv
256	54	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
245	43	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
250	48	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
246	44	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
241	39	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
257	55	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
230	29	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
228	27	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
219	18	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
321	106	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	ja
236	35	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
329	112	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
263	61	a	Bandscheibe cervikal, familiäre Häufung	keine Angabe	keine Angabe
319	105	a	Bandscheibe cervikal	keine Angabe	keine Angabe
266	64	a	Bandscheibe cervikal, rezidivierend	Nein	keine Angabe
255	53	a	Bandscheibe cervikal, Schreibkrampf, familiäre Häufung	Nein	keine Angabe
306	96	a	Bandscheibe cervikal, rez Rückenschmerzen	Ja	keine Angabe
235	34	a	Bandscheibe cervikal, Torticollis, steifer Gang	Nein	Ja
233	32	a	Bandscheibe cervikal, rez. Rückenschmerzen	Ja	Keine Angabe

Tab. 4.2 Patienten mit V.a. cervikale Dystonie

Bei diesen Mutationsanalysen fand sich bei allen dieser 19 Patienten keine Veränderung in der kodierenden Region und den flankierenden intronischen Bereichen.

Eine weitere Gruppe von Patienten gab als zentrales Beschwerdesymptom Schreibkrämpfe an. Weitere Symptome waren nicht zu eruieren. Auch bei diesen 15 Patienten führten wir molekulargenetische Analysen unter der

Vorstellung einer möglicherweise bestehenden fokalen Dystonie durch. Dies erschien uns um so vielversprechender, da dieses Symptom durchaus auch zur Diagnostik einer Dopa-responsiven Dystonie im Rahmen eines Schreibtest verwendet wird. Bezüglich der Symptomfluktuation und der Sensitivität der Beschwerden auf Levodopa lagen leider nur bei einem Patienten Informationen vor. Bei diesem waren beide Kriterien gegeben, bei den anderen 14 Patienten waren keine Angaben in Erfahrung zu bringen. 3 Patienten hatte eine positive Familienanamnese bzgl dystoner Erkrankungen, bei sieben von ihnen war der Schreibkrampf nicht das einzige, wenn aber auch das zentrale Symptom.

Pat-ID	Fam	Status		Tageszeitl.	Dopa-sensitiv
276	73	A	Schreibkrampf re	keine Angabe	keine Angabe
237	36	A	Schreibkrampf re	keine Angabe	keine Angabe
218	17	A	Schreibkrampf re	keine Angabe	keine Angabe
232	31	A	Schreibkrampf re	keine Angabe	keine Angabe
231	30	A	Schreibkrampf re	keine Angabe	keine Angabe
221	20	A	Schreibkrampf re	Keine Angabe	keine Angabe
227	26	A	Schreibkrampf re	Keine Angabe	keine Angabe
225	24	A	Schreibkrampf re	Keine Angabe	keine Angabe
281	78	A	Schreibkrampf re und li, Retrocollis	Keine Angabe	keine Angabe
240	38	A	Schreibkrampf re, progressive dystone segmentale Dystonie	Keine Angabe	keine Angabe
275	72	A	Schreibkrampf re, Vater M.Parkinson	Keine Angabe	keine Angabe
268	66	A	Schreibkrampf re, Vater und Onkel M. Parkinson	Keine Angabe	keine Angabe
304	94	A	Schreibkrampf, dystoner Tremor re Hand, Myoklonien li Schulter	Keine Angabe	keine Angabe
311	99	A	Schreibkrampf, schlechte Feinmotorik, Gangbildstörung, verwaschene Sprache, tageszeitlich	Ja	ja
313	101	A	Schreibkrampf, Skoliose, Gangstörung re, myoklonforme Bewegungen in allen Extremitäten	Keine Angabe	keine Angabe

Tab. 4.3 Patienten mit Schreibkrampf

Im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchungen fand sich bei keinem der Patienten aus dieser Gruppe eine Auffälligkeit in der Screening-Untersuchung, es war keine Mutation nachweisbar.

Des weiteren führten wir molekulargenetische Analysen bei Patienten mit dem Hauptsymptom Torticollis durch. Bei vier der sieben untersuchten Patienten war der Torticollis das einzige Symptom. Bei den anderen

Patienten kamen Dystone Symptome des Rumpfs, Zungenschlunddyskinesien bzw. eine statomotorische Entwicklungsverzögerung hinzu. Tests bezüglich einer Levodopa-Sensitivität waren nur bei einem Patienten durchgeführt worden. Bei diesem hat sich die Symptomatik daraufhin auch gebessert, bei den übrigen Patienten wurde eine entsprechende Testung noch nicht durchgeführt. Ein Patient bestätigte die Frage nach tageszeitlichen Fluktuationen, ansonsten waren keine zeitlichen Auffälligkeiten zu eruieren.

Pat-ID	Fam	Status	Symptomatik	Tageszeitl.	Dopa-sensitiv
242	40	A	Torticollis	Nein	Ja
267	65	A	Torticollis	Nein	keine Angabe
317	102	A	Torticollis	Nein	keine Angabe
269	67	A	Torticollis, linksseitige Rumpfdystonie	Nein	keine Angabe
274	71	A	Torticollis, Vater Tremorerkrankung	Ja	keine Angabe
350	124	A	Torticollis, Retrocollis, Zungenschlunddyskinesien, Autritt bei Schwangerschaft	Nein	keine Angabe
284	81	A	Torticollis, statomotorische Entwicklungsverzögerung, normale Intelligenz	Nein	keine Angabe

Tab. 4.4 Patienten mit Torticollis.

Jedoch auch hier fand sich in den untersuchten Proben kein Hinweis auf eine Mutation im Gen GCH I als Ursache der Symptomatik.

In die letzte Gruppe wurden 12 Patienten eingeteilt, die unter fokalen Dystonien unterschiedlichster Lokalisation litten. Die Skala reichte von Dystonien der Hand (außer Schreibkrampf) über orofaciale Symptome bis hin zu Tremorbeschwerden. Drei Patienten hatten unter Levodopa-Mediaktion profitiert, 2 gaben eine fragliche nicht zu objektivierende

Besserung an, bei einem hatte sich keine Veränderung ergeben. Bei den übrigen 6 Patienten konnte hierzu keine Angabe gemacht werden, da eine Testung noch nicht erfolgt war. Eine eindeutige tageszeitenabhängige Fluktuation der Beschwerden wurde nur bei einem Patienten erwähnt. Bei den übrigen fanden sich hierzu keine Angaben.

Pat-ID	Fam	Status	Symptomatik	Tageszeitl.	Dopa-sensitiv
324	109	A	fokale Dystonie li Hand	keine Angabe	Keine Angabe
226	25	A	fokale Dystonie re Fuß	keine Angabe	Fraglich
204	10	A	fokale Dystonie re Hand	Ja	Keine Angabe
326	111	A	fokale Dystonie, Bewegungsstörung untere Extremität, positive Familienanamnese	keine Angabe	Keine Angabe
341	120	A	fokale Dystonie, dystoner Tremor	keine Angabe	Ja
270	68	A	fokale Dystonie, Gangataxie, Ballenhohlfuß	keine Angabe	Nein
220	19	A	fokale Dystonie, Handdystonie li	keine Angabe	Keine Angabe
290	84	A	fokale Dystonie, mehrere Segmente betreffend	keine Angabe	Keine Angabe
223	22	A	fokale Dystonie, orofaciale Dyskinesien, unwillkürliche Kopf-, Schulter-, Muskelbewegungen, Tremor Hände	keine Angaben	Ja
322	107	A	fokale Dystonie, oromandibuläre Dystonie	keine Angabe	Fraglich
303	93	A	fokale Dystonie, rechter Fuß, rhythmisch dystone Bewegungen der Fußzehen, Verkrampfung re Hand und Arm	keine Angabe	Ja
323	108	A	fokale Dystonie, Tremor	keine Angabe	keine Angabe

Tab. 4.5 Patienten mit sonstigen fokalen Dystonien

Auch hier fanden sich keinerlei Hinweise auf Veränderungen in der genomischen Sequenz des GCH I Gens.

### **4.3 Patienten mit generalisierten Dystonien, Torsionsdystonien und M. Parkinson**

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden uns auch DNA von Patienten vorgestellt, die weder unter der klassischen Symptomatik einer dopa-responsiven Dystonie, noch unter fokalen Dystonie litten. Hieraus ließ sich eine Gruppe von Patienten filtern, die generalisierte klinische Beschwerden angaben. Auch diese Patienten mit generalisierter Dystonie, Torsionsdystonie und 2 Patienten mit einem M. Parkinson untersuchten wir auf Mutationen im Gen für GCH I.

Hierbei untersuchten wir 12 Patienten aus 12 Familien, deren zentrales klinisches Symptom von den behandelnden Ärzten als generalisierte Dystonie beschrieben wurde. Zu tageszeitlichen Schwankungen der Symptomatik lagen bei diesen Patienten keine Informationen vor. Lediglich bei einem Patienten war eine fragliche Sensitivität auf Levodopa beobachtet worden, bei den übrigen Patienten lagen hierzu keine Angaben vor. Im Rahmen der Genotypisierung von aller Exone von GCH I und der flankierenden intronischen Region fand sich keine Mutation.

Pat-ID	Fam	Status	Symptomatik	tageszeitlich	dopa-sensitiv
264	62	a	generalisierte Dystonie	keine Angabe	keine Angabe
346	123	a	generalisierte Dystonie	keine Angabe	keine Angabe
335	116	a	generalisierte Dystonie	keine Angabe	keine Angabe
338	119	a	generalisierte Dystonie	keine Angabe	keine Angabe
312	100	a	generalisierte Dystonie	keine Angabe	keine Angabe
314	103	a	generalisierte Dystonie	keine Angabe	keine Angabe
325	110	a	generalisierte Dystonie	keine Angabe	keine Angabe
295	88	a	generalisierte Dystonie, cervikale Dystonie	keine Angabe	keine Angabe
310	98	a	generalisierte Dystonie, evtl. viscerale Beteiligung	keine Angabe	fraglich
309	97	a	generalisierte Dystonie, Torticollis	keine Angabe	keine Angabe
262	60	a	generalisierte Dystonie, verzögerte körperliche und geistige Entwicklung, Handtremor, Retrocollis, einschießende Bewegungen	keine Angabe	keine Angabe
265	63	a	generalisierte Dystonie	keine Angabe	keine Angabe

Tab. 4.6 Patienten mit generalisierter Dystonie

Des Weiteren untersuchten wir das Genom von 4 Patienten mit Torsionsdystonien als zentralem klinischen Symptom ihrer klinischen Symptomatik. Auch hierbei lagen uns leider keinerlei Informationen zur Sensitivität auf Levodopa oder bezüglich einer tageszeitlichen Schwankung der Beschwerden vor. Im Rahmen der Genotypisierung fanden sich keinerlei Veränderung der genomischen Sequenz.

Pat-ID	Fam	Status	Symptomatik	tageszeitlich	dopa-sensitiv
333	114	a	Torsionsdystonie	keine Angabe	keine Angabe
282	79	a	Torsionsdystonie, Basalganglienveränderungen	keine Angabe	keine Angabe
351	125	a	Torsionsdystonien mit Myoklonien	keine Angabe	keine Angabe
318	104	a	Torsionsdystonien, kurzfristige choreatiforme Bewegungen	keine Angabe	keine Angabe

Tab 4.7 Patienten mit Torsionsdystonien

Auch wurden uns zwei Patienten mit der Diagnose M. Parkinson vorgestellt. Einer dieser beiden Patienten ist bereits als Familienangehörige bei einem Patienten mit dopa-responsiver Dystonie beschrieben worden. Hier hatte sich im Rahmen der Familienuntersuchung dieselbe Mutation wie bei der Indexpatientin gefunden. Bei dem anderen Patienten war keine Veränderung der genomischen Sequenz nachzuweisen. Beide Patienten hatten von der Medikation mit Levodopa – wie bei einem M. Parkinson ja auch zu erwarten – deutlich profitiert.

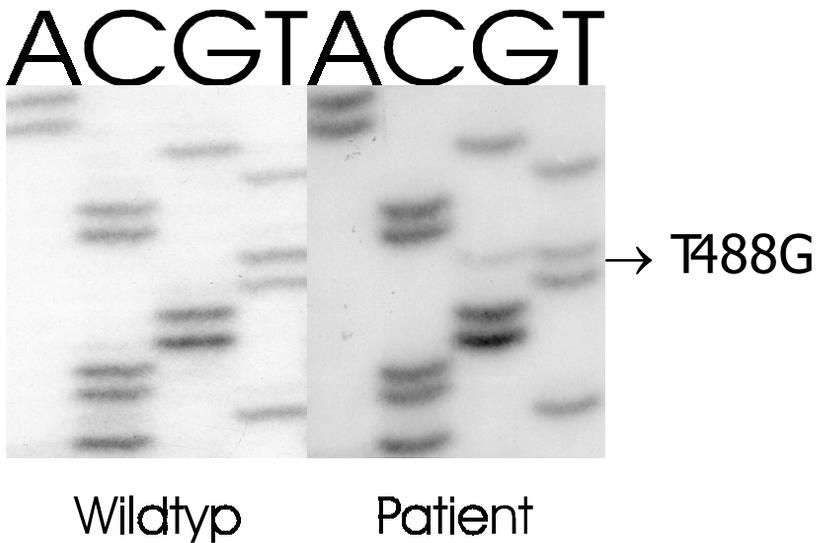
Pat-ID	Fam.	Status	Symptomatik	tageszeitlich	dopa-sensitiv
296	37	a	M. Parkinson	keine Angabe	ja
294	6	a	M. Parkinson	keine Angabe	ja

Tab 4.8 Patienten mit Morbus Parkinson

Die Patientin, bei deren Familie wir bereits eine Mutation identifiziert hatten, war bis zu Ihrem 70. Lebensjahr klinisch unauffällig. Krankenhausaufenthalte oder längere Phase von Krankheit werden nicht berichtet. Erst später sei dann ein M. Parkinson in einer milden kaum progredienten Form diagnostiziert worden, der unter Therapie mit Levodopa

gut zu beherrschen sei. Auch Jahre nach Beginn der Therapie seien unerwünschte Effekte wie der „on-off“-Effekt nicht zu verzeichnen. Die täglich verabreichte Dosis beträgt unverändert 300 mg Levodopa täglich. Aus unserer Sicht handelt es sich hierbei weniger um eine milde Verlaufsform eines M. Parkinson, sondern um eine spät manifeste Form der dopa-responsiven Dystonie.

Die gefundene Punktmutation T488G führt zu einem Basenaustausch, der eine verminderte Enzymaktivität zur Folge hat, wodurch sich die klinische Symptomatik erklärt.



#### **4.4 L-Dopa-Dosierungen bei Patienten mit dopa-responsiver Dystonie mit ohne Mutationsnachweis in GCH I**

Insgesamt wurden uns 58 Patienten mit Dystonie und einem positiven Ansprechen auf die therapeutische Gabe von Levodopa mit einem peripheren Decarboxylasehemmer mit der Bitte um Mutationsanalysen im GCH I-Gen vorgestellt. Analysiert wurden die Exone und die Exon-Intron-Grenzen in den Arbeiten von Frau Yvonne Weber, Frau Diana Fischer und schließlich in dieser Arbeit. Im Rahmen dieser Arbeiten fanden sich bei 30 Patienten aus 22 Familien Mutationen des GCH I-Gens.

In 16 Fällen war DNA von Familienmitgliedern zur weiteren Untersuchung erreichbar. Hierbei gelang der Nachweis von familiären Mutationen in 13 Fällen, wohingegen in 3 Fällen eine de novo-Mutation gezeigt werden konnte (Tab 4.9).

Bei 28 Patienten aus 23 Familien gelang kein Nachweis einer Mutation im GCH I-Gen, obwohl die Klinik eine typische Symptomatik und ein positives Ansprechen auf Levodopa zeigte (Tab. 4.10).

Die täglichen Dosierungen von Levodopa in der Gruppe der Patienten mit Mutation lag bei Kindern bis zu 10 Jahren zwischen 20 und 100 mg, bei älteren Patienten wurden 50 - >400 mg verabreicht.

In der Gruppe der Patienten ohne nachgewiesene Mutation erhielten Kinder unter 10 Jahren tägliche Dosen von 12,5 bis 300 mg, ältere Patienten bekamen täglich 50 bis >400 mg verabreicht.

Die therapeutischen Dosen in den beiden Gruppen sind somit vergleichbare, ein signifikanter Unterschied konnte mittels ANOVA nicht gezeigt werden.

Familie	Patient	Alter	Geschlecht	Mutation	Behandlung	Type
1	4	30	f	Exon 1 G181T, Glu61Ter	250 mg levodopa	F
1	12	46	f	Exon 1 G181T, Glu61Ter	375 mg levodopa	F
1	3	58	f	Exon 1 G181T, Glu61Ter	125 mg levodopa	F
3	64	23	f	Intron 4 G(+1)C	250 mg levodopa	S
4	30	45	f	Exon 1 C225A, Tyr75Ter	100 mg levodopa	F
4	35	25	f	Exon 1 C225A, Tyr75Ter	120 mg levodopa	F
5	40	26	f	Exon 1 Del G309, Frameshift	> 400mg levodopa	F
6	94	66	f	Exon 5 C544T, Gln182Ter	50 mg levodopa	F
6	55	64	f	Exon 5 C544T, Gln182Ter	100 mg levodopa	F
6	58	8	f	Exon 5 C544T, Gln182Ter	60 mg levodopa	F
7	59	32	f	Exon 5 C544T, Gln182Ter	400 mg levodopa	F
10	65	26	f	Intron 1 A(-2)G, Exonskipping 2	50 mg levodopa	F
10	66	20	f	Intron 1 A(-2)G, Exonskipping 2	50 mg levodopa	F
12	114	29	f	Intron 2 A(-2)G, Ins G, Frameshift	50 mg levodopa	F
15	126	20	f	Exon 5 G607A, Gly203Arg	100 mg levodopa	S
19	150	66	f	Intron 5 Ins T(+3)	400 mg levodopa	n.d.
23	168	6	f	Exon 5 G607A, Gly203Arg	25 mg levodopa	S
26	173	35	f	Exon 1 C68T, Pro23Leu	100 mg levodopa	F
27	174	30	f	Intron 5 Ins T(+3)	20 mg bromocriptine	n.d.
30	185	10	f	Intron 4 A(-2)C	80 mg levodopa	F
31	294	74	f	Exon 3 T488G, Leu 163Arg	300 mg levodopa	F
31	188	54	m	Exon 3 T488G, Leu 163Arg	300 mg levodopa	F
31	200	51	f	Exon 3 T488G, Leu 163Arg	300 mg levodopa	F
35	195	6	f	Exon 3 Del C477, frameshift	100 mg levodopa	F
38	202	10	f	Exon 1 C68T, Pro23Leu	100 mg levodopa	F

42	212	50	f	Intron 5 G(+5)A	300 mg levodopa	n.d.
44	217	8	f	Exon 3 T488G, Leu 163Arg	75 mg levodopa	n.d.
66	271	10	m	Intron 5 Ins T(+3)	50 mg levodopa	n.d.
74	280	12	m	Intron 3 G(+1)T	200 mg levodopa	n.d.
111	330	37	f	Exon 6 A631G, Met 211Val	300 mg levodopa	F

Tab. 4.9 Patienten mit DRD und Mutationen in GCH I, f=weiblich, m=männlich, Levodopa wurde in allen Fällen mit peripheren Decarboxylasehemmern verabreicht, F=Mutation familiär, S=Mutation sporadisch, n.d.=nicht bekannt (Steinberger D, 2000).

Familie	Patient	Alter	Geschlecht	Behandlung
2	15	18	m	150 mg levodopa
2	17	54	f	150 mg levodopa
11	68	25	m	>550 mg levodopa
17	137	20	f	200 mg levodopa
18	138	5	f	25 mg levodopa
18	139	11	f	100 mg levodopa
18	141	14	f	100 mg levodopa
22	154	32	f	360 mg levodopa
22	165	6	f	130 mg levodopa
28	181	33	m	200 mg levodopa
28	183	26	m	200 mg levodopa
34	194	48	f	400 mg levodopa
43	213	2	m	12,5 mg levodopa
48	253	40	f	600 mg levodopa
49	254	11	m	50 mg levodopa
56	261	49	f	150 mg levodopa
90	300	8	f	25 mg levodopa
91	303	30	f	300 mg levodopa
97	311	25	f	300 mg levodopa
104	321	42	f	300 mg levodopa
116	336	43	f	250 mg levodopa
124	251	10	f	200 mg levodopa
136	234	63	m	400 mg levodopa
137	244	60	f	500 mg levodopa
141	229	9	f	100 mg levodopa
147	223	57	m	150 mg levodopa
150	235	53	m	375 mg levodopa
151	242	10	f	300 mg levodopa

Tab. 4.10. Patienten mit DRD ohne nachweisbare Mutation in GCH I, f=weiblich, m=männlich, , Levodopa wurde in allen Fällen mit peripheren Decarboxylasehemmern verabreicht (Steinberger D, 2000).



## 5 Diskussion

### 5.1 Mutationen in GCH I

Bei der Genotypisierung des GCH I Gens bei Patienten mit V.a. dopa-responsive Dystonie sind, wenn man die gesamte Literatur betrachtet, Mutationen in allen sechs Exonen des Gens nachgewiesen worden. Dabei fanden sich alle Formen von Mutationen. Neben Nonsense- und Missense-Mutationen fanden sich auch Deletionen und Insertionen, die zu einem Frameshift führten. Des weiteren gelang der Nachweis intronischer Veränderungen, die das Splicing veränderten. So fanden auch wir im Zusammenhang mit dieser Doktorarbeit erneut unbeschriebene Mutationen. In der folgenden Aufzählungen sind die bislang bekannten Mutationen im Bereich der 6 Exone und ihrer flankierenden intronischen Regionen – soweit mir bekannt - aufgelistet. Veränderungen der genomischen Sequenz, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden sind extra hervorgehoben.

5'-UTR	C-22 T	n.d.	(Tassin J, 2000)
5'-UTR	C-39 T	n.d.	(Bandmann O, 1998)
5'-UTR	C-132 T	n.d.	(Bandmann O, 1998)
Exon 1	Translation start point change del A1 to A58		(Tamaru Y, 1998)
Exon 1	3 Ins GG	Frameshift	(Ichinose H, 1994)
<b>Exon 1</b>	<b>Pro 23 Leu</b>	<b>Missense</b>	<b>(Steinberger D, 2000)</b> (de la Fuente-Fernandez R, 1998) (Jarman PR, 1997)
Exon 1	149 Del C	Frameshift	(Furukawa Y, 1998)
Exon 1	Glu 48 Stop	Nonsense	(Hong KM, 2001)
Exon 1	Glu 56 Stop	Nonsense	(Bandmann O, 1998)
Exon 1	Glu 61 Stop	Nonsense	(Nitschke M 1997)
Exon 1	Glu 65 Stop	Nonsense	(Furukawa Y, 1996)
Exon 1	Leu 71 Glu	Missense	(Bandmann O, 1998)
Exon 1	212 Del T	Frameshift	(Furukawa Y, 1998)
Exon 1	Ala 74 Val	Missense	(Bandmann O, 1998)
Exon 1	Tyr 75 Stop	Nonsense	(Steinberger D, 2000)
Exon 1	229 Del 18 bp	Deletion	(Furukawa Y, 1998)
Exon 1	Leu 79 Pro	Missense	(Ichinose H, 1995)
Exon 1	Gly 83 Ala	Missense	(Bandmann O, 1998)
Exon 1	261 Del 6 bp	n.d.	(Tassin J, 2000)
Exon 1	Arg 88 Trp	Missense	(Ichinose H, 1994)
Exon 1	Arg 88 Pro	Missense	(Bandmann O, 1996)
Exon 1	Gln 89 Stop	Nonsense	(Hoenicka J, 2001)
Exon 1	Gly 90 Val	Missense	(Hirano M, 1999)
Exon 1	Thr 94 Lys	Missense	(Markova ED, 1999)
Exon 1	Trp 96 Stop	Nonsense	(Sasaki R, 1998)
Exon 1	Met 102 Lys	Missense	(Illarioshkin SN, 1998)
Exon 1	Met 102 Arg	Missense	(Nishiyama N, 2000)

Exon 1	309 Del G	Frameshift	(Steinberger D, 1998)
Exon 1	Gly 108 Asp	Missense	(Furukawa Y, 1998)
Exon 1	Gly 108 Val	Missense	(Hirano M, 1999)
Exon 1	Gln 110 Stop	Nonsense	(Thöny B, 1997)
Exon 1	329 Ins A	Frameshift	(Furukawa Y, 1998)
Exon 1	Ser 114 Stop	Nonsense	(Furukawa Y, 1996)
			(Jeon BS, 1998)
Exon 1	Ser 114 silent mutation, exon skipping?		(Bandmann O, 1998)
Exon 1	Asp 115 Asn	Missense	(Jarman PR, 1997)
Exon 2	351 Del A	Frameshift	(Furukawa Y, 1998)
			(Furukawa Y, 1998)
Exon 2	Asp 134 Val	Missense	(Ichinose H, 1994)
Exon 2	Ile 135 Lys	Missense	(Brique S, 1999)
Exon 2	Cys 141 Arg	Missense	(Nishiyama N, 2000)
Exon 2	Cys 141 Trp	Missense	(Illarioshkin SN, 1998)
Exon 2	His 144 Pro	Missense	(Hirano M, 1996)
Exon 3	His 153 Pro	Missense	(Bandmann O, 1996)
<b>Exon 3</b>	<b>477 Del C</b>	<b>Frameshift</b>	<b>(Steinberger D, 2000)</b>
<b>Exon 3</b>	<b>Leu 163 Arg</b>	<b>Missense</b>	<b>(Steinberger D, 2000)</b>
Exon 4	511 Del 13 bp	Frameshift	(Ichinose H, 1994)
Exon 4	524 Del 13 bp	Frameshift	(Ichinose H, 1995)
Exon 4	Ser 176 Thr	Missense	(Illarioshkin SN, 1998)
Exon 4	Arg 178 Ser	Missense	(Beyer K, 1997)
Exon 4	Gln 180 Stop	Nonsense	(Nishiyama N, 2000)
Exon 4	Gln 180 Arg	Missense	(Tassin J, 2000)
Exon 5	Glu 182 Stop	Nonsense	(Steinberger D, 1998)
Exon 5	Arg 184 His	Missense	(Ichinose H, 1995)
Exon 5	Leu 185 Arg	Missense	(Furukawa Y, 2000)
Exon 5	Thr 186 Lys	Missense	(Hirano M, 1997)
Exon 5	567 Del G	Frameshift	(Nishiyama N, 2000)
Exon 5	Val 191 Ile	Missense	(Bandmann O, 1998)
Exon 5	Ala 196 Ser	Missense	(Steinberger D, 1999)
Exon 5	Pro 199 Leu	Missense	(Tassin J, 2000)
Exon 5	Gly 201 Glu	Missense	(Ichinose H, 1994)
Exon 5	Gly 203 Arg	Missense	(Bandmann O, 1996)
Exon 6	631 Del 2 bp	Frameshift	(Furukawa Y, 1998)
			(Bandmann O, 1998)
Exon 6	Met 211 Ile	Missense	(Ichinose H, 1995)
<b>Exon 6</b>	<b>Met 211 Val</b>	<b>Missense</b>	<b>(Steinberger D, 2000)</b>
			(Bandmann O, 1998)
Exon 6	Met 213 Thr	Missense	(Touma EH, 2000)
Exon 6	Arg 216 Stop	Nonsense	(Bandmann O, 1996)
Exon 6	Met 221 Thr	Missense	(Bezin L, 1998)
			(Furukawa Y, 1998)
Exon 6	Arg 249 Ser	Missense	(Hwu WL, 1999)
Exon 6	Lys 224 Stop	Nonsense	(Jarman PR, 1997)
Exon 6	Lys 224 Arg	Missense	(Bandmann O, 1996)
			(Furukawa Y, 1998)
Exon 6	Phe 234 Ser	Missense	(Bandmann O, 1996)
Exon 6	Arg 241 Trp	Missense	(Bandmann O, 1998)

Tab. 5.1 Mutationen in den Exonen 1 bis 6 und der 5'-UTR von GCH I

Intron 1	A -1 T	Exon 2 skipping	(de la Fuente-Fernandez R, 1998)
Intron 1	A -2 G	n.d.	(Steinberger D, 2000)
Intron 2	G +1 C	Exon 2 skipping	(Weber Y, 1997)
Intron 2	A -2 G	n.d.	(Hirano M, 1995)
Intron 2	Ag-gg	Exon 2 skipping	(Weber Y, 1997)
Intron 3	G -1 A	Exon 2 skipping	(Bandmann O, 1998)
<b>Intron 3</b>	<b>G +1 T</b>	Defective splicing	(Furukawa Y, 1998)
Intron 4	G +1 A	<b>n.d.</b>	<b>(Steinberger D, 2000)</b>
Intron 5	G +1 A	n.d.	(Steinberger D, 2000)
<b>Intron 5</b>	<b>Ins T +2</b>	Exon 6 skipping	(Bandmann O, 1998)
<b>Intron 5</b>	<b>G +5 A</b>	<b>n.d.</b>	(Hirano M, 1998)
		<b>n.d.</b>	<b>(Steinberger D, 2000)</b>

Tab 5.2 Mutationen in den intronischen Sequenzen von GCH I

Alle Mutationen, die durch uns gesichert werden konnten, waren in heterozygoter Ausprägung nachzuweisen. Die bisher bekannten homozygoten Veränderungen der genomischen Sequenz sind Gln 180 Stop in Exon 1, Arg 184 His in Exon 5 und Met 211 Ile in Exon 6 (Ichinose H, 1995) wurden alle ebenfalls in heterozygoter Ausprägung bei Patienten mit den typischen klinischen Zeichen einer dopa-responsiven Dystonie gefunden.

Wenn man die Patienten und Ihre klinische Symptomatik betrachtet, so wird schnell klar, daß keine Genotyp-Phänotyp-Relation besteht, das heißt eine Mutation verursacht bei verschiedenen Patienten eine unterschiedliche Symptomatik. Dies ist in dieser Arbeit besonders eindrucksvoll am Beispiel der Familie 6 nachzuvollziehen. Eine Beschreibung der klinischen Beschwerden erfolgte bereits im Ergebnisteil. Während zwei Kinder unter einer ausgeprägten Form der dopa-responsiven Dystonie leiden, die sie im Verlauf rollstuhlpflichtig werden ließ, hat ein drittes Kind abgesehen von gastrointestinalen Beschwerden, deren Zusammenhang zur Mutation nicht bewiesen werden kann, keinerlei Beschwerden, die Mutter selbst war bis ins hohe Alter beschwerdefrei und erkrankte erst dann mit milden parkinsonähnlichen Symptomen. Auch in anderen Familien konnten wir wie

oben schon beschrieben ein asymptomatisches Trägertum der genomischen Sequenzveränderung nachweisen. Eine ausreichende Erklärung für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf liegt bis heute nicht vor. Möglicherweise spielen hierbei Effekte auf der Transkriptionsebene eine Rolle, doch all dies ist bislang lediglich Spekulation.

## **5.2 Fokale Dystonien durch GCH I-Mutationen**

In dieser Arbeit untersuchten wir Personen aus verschiedenen Erkrankungsgruppen, deren dominierendes Symptom als fokale Dystonie gedeutet werden konnte. In der Literatur sind vereinzelt solche „Minorformen“ einer dopa-responsiven Dystonie beschrieben. So wurde aus unserem Haus von Steinberger et al (Steinberger D, 1999) eine Mutation beschrieben, die sich bei diesem Patienten lediglich in einer oromandibulären Dystonie äußerte. Ermutigt durch diesen Fund untersuchten wir Patienten mit Torticollis, Schreibkrampf und cervikalen Bandscheibenvorfällen auf Veränderungen der genomischen Sequenz im GCH I Gen. Hierbei fanden wir jedoch keinerlei Auffälligkeiten, so daß fokale Dystonien als Ausdrucksvariante einer dopa-responsiven Dystonie zwar vereinzelt – entsprechend der Beschreibungen in der internationalen Literatur – vorkommen, jedoch nicht sehr häufig sind. Trotz allem bleibt auch bei unwahrscheinlichen Fällen, die Erkrankung DRD als Differentialdiagnose weiterhin bestehen, denn viele außergewöhnliche Verläufe sind beschrieben. Erinnert sei nur an die Patientin aus Familie 6, die als Morbus Parkinson diagnostiziert worden war, und bei der erst durch die Familienuntersuchung aufgrund der DRD einer Tochter und eines Sohnes die korrekte Diagnose gestellt werden konnte. Auch auf diverse Fehldiagnosen wie Zerebralparese, Peroneusschwäche oder andere Diagnosen aus dem orthopädischen Formenkreis, sowie Psychiatrische Erklärungen des Beschwerdebildes, die

Patienten zu zum Teil endlosen Leidensgeschichten verurteilt haben, sei hierbei nochmals hingewiesen.

### **5.3 Generalisierte Dystonien und GCH I**

Durch das umfangreiche Material, welches uns zur Zeit dieser Arbeit erreichte, bildete sich eine weitere Gruppe an Patienten, von denen uns Analysematerial mit der Bitte um molekulargenetische Untersuchung des GCH I Gens vorgestellt wurde. Bei diesen Patienten mit generalisierter Dystonie und Torsionsdystonie fand sich keine Mutation im Gen GCH I, so daß hier nochmals auf die wesentlichen Kriterien der Dopa-Sensitivität und der tageszeitlichen Fluktuation der Beschwerdesymptomatik hingewiesen sei.

Bei den beiden Patienten, die uns mit einer milden Parkinsonsymptomatik vorgestellt wurden, fand sich bei einer Patientin eine Veränderung der genomischen Sequenz, die schon bei Ihren Verwandten mit Verdacht auf eine dopa-responsive Dystonie nachgewiesen werden konnte. Somit liegt hier sicherlich kein Morbus Parkinson als Grunderkrankung vor, sondern es handelt sich um eine spät manifeste Form einer dopa-responsiven Dystonie. Gerade im höheren Alter sind die Erstmanifestationssymptome bei dieser Erkrankung ja häufig dem Morbus Parkinson sehr ähnlich. Somit sei an dieser Stelle noch einmal an die Bedeutung der DRD als Differentialdiagnose bei parkinsonähnlicher Symptomatik hingewiesen.

Bei dem zweiten Patienten mit der milden Verlaufsform eines Morbus Parkinson konnte keine Mutation im Gen GCH I, welches für die GTP Cyclohydrolase kodiert, nachgewiesen werden.

## **5.4 Wodurch wird eine DRD verursacht, wenn sich keine Mutationen in GCH I nachweisen lassen?**

Jedoch bei allen Untersuchungen findet sich immer wieder das Problem, das lediglich

40 – 50 % der Patienten mit passenden klinischen Merkmalen einen positiven Mutationsbefund im Gen GCH I haben. Also ist bei über der Hälfte trotz passender Merkmale keine Mutation nachweisbar und es stellt sich natürlich die Frage, warum dies so ist.

### **GCH I promotor region und 5'-UTR**

Eine Überlegung war, daß wie bei anderen Erkrankungen auch die Aktivität des Gens über einen Promotor geregelt wird, wurde von unserer Gruppe im Rahmen einer weiteren Arbeit auch die Sequenz des bis 925 bp oberhalb des Startkodons (ATG) untersucht. Hierbei fanden sich lediglich zwei scheinbar funktionell neutrale Polymorphismen. Somit erscheint diese Möglichkeit der zusätzlichen Steuerung des GCH I Gens zumindest nicht von herausragender Bedeutung zu sein.

In der 5'-untranslatierten Region haben sich in der letzten Zeit bei Patienten mit dem klinischen Bild einer dopa-responsiven Dystonie Basensubstitution von C nach T nachweisen lassen (siehe Tab. 5.1). Diese Veränderungen waren bei der jeweiligen Kontrollgruppe nicht nachweisbar, so daß sich die Frage stellt in wie weit diese Veränderungen zum klinischen Bild beitragen. Funktionelle Untersuchungen hierzu stehen jedoch noch aus.

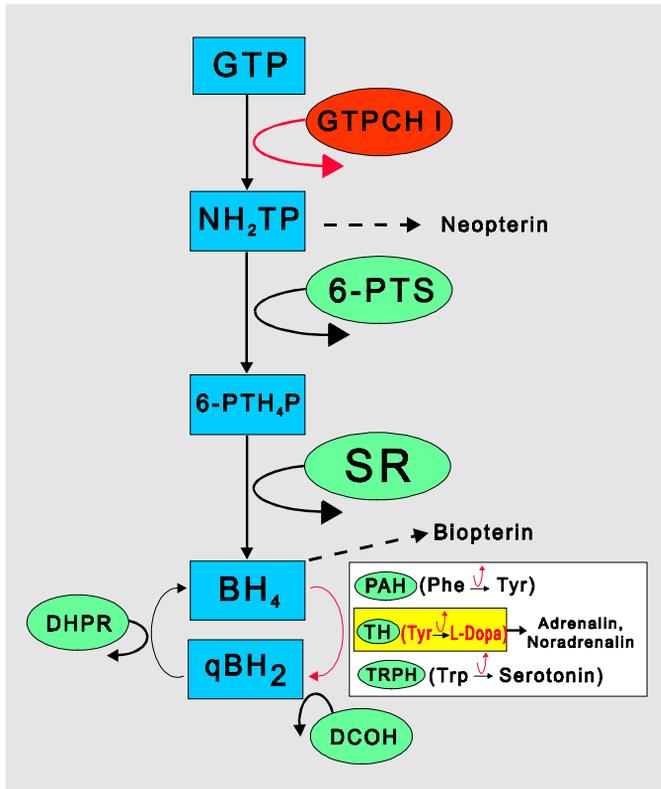
## **6-PTS und SR**

Führt man sich den Stoffwechselweg, der in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist nochmalig vor Augen, so ergeben sich diese beiden Kandidatengene von selbst. Denn im weiteren Syntheseweg von Tetrahydrobiopterin wird die Sialpterin-Reduktase (SR) und die 6-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase in weiteren Schritten benötigt und eine Untersuchung dieser beiden Gene erscheint somit sinnvoll und vielversprechend.

## **Tyrosinhydroxylase (TH)**

Das Enzym Tyrosinhydroxylase erscheint als Kandidatenenzym weniger geeignet, denn obwohl es einige Beschreibungen von Veränderungen der genomischen Sequenz bei Patienten mit v.a. einer dopa-responsiven Dystonie gibt, so ist die dort beschriebene Symptomatik doch deutlich abweichend von der typischen Klinik (Lüdecke B, 1995)(Van den Heuvel LPWJ, 1998). So sind dort Beschwerden wie Hypokinesie, Rigidity und Hypotonie beschrieben. Furukawa und Kish zufolge ist dieses Krankheitsbild als dopa-responsiver Parkinsonismus von der dopa-responsiven Dystonie abzugrenzen (Furukawa Y, 1999).

**Abbildung 5.1:** Pteridine Stoffwechsel. Funktion der GTPCH1 (GTP Cyclohydrolase 1) bei der Synthese von L-DOPA. GTP: Guanosintriphosphat; NH<sub>2</sub>TP: Dihydroneopterin-triphosphat; 6-PTH<sub>4</sub>P: 6-Pyruvoyltetrahydropterin; BH<sub>4</sub>: Tetrahydrobiopterin; qBH<sub>2</sub>: Quinoiddihydrobiopterin; 6-PTS: 6-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase; SR: Sepiapterinreductase; PAH: Phenylalanin-hydroxylase; TH: Tyrosinhydroxylase; TRPH: Tryptophanhydroxylase; Phe: Phenylalanin; Tyr: Tyrosin; Trp: Tryptophan; DHPR: Dihydropterinreduktase.



Jedoch haben Untersuchungen dieser beiden Gene bei Patienten mit den typischen klinischen Symptomen einer dopa-responsiven Dystonie keine Veränderungen der genomischen Sequenz dieser beiden Enzyme gezeigt. Somit erscheint eine Beteiligung dieser Enzyme an der Pathogenese – wenn auch nicht ausgeschlossen – unwahrscheinlich. Also läßt sich auch hier keine genetische Ursache für fast 50 % der Patienten mit dopa-responsiver Dystonie finden.

Somit ist weiterhin unklar, was bei dieser großen Gruppe an Patienten die Beschwerden verursacht und die weitere Suche nach geeigneten Kandidatengenen scheint notwendig. Auch könnte eine Untersuchung der intronischen Bereiche interessant sein, da in neuerer Zeit vermehrt „Splice-Enhancer“ dort gefunden wurden, die entsprechende – z.T. auch atypische – Krankheitsbilder verursachen. Als Beispiel sei nur der wieder ins Zentrum der Beobachtungen gerückte M. Fabry erwähnt, bei dem eine Punktmutation im Intron einen kardialen Phänotyp nach sich zieht (Nakao S, 1995). Auf die Veränderungen im Bereich der 5'-untranslatierten Region bei Patienten mit klinisch bestätigter dopa-responsiver Dystonie und die hierzu ausstehenden funktionellen Untersuchungen wurde zuvor schon hingewiesen.

Auch sollten Untersuchungen auf Transkriptionsebene in Erwägung gezogen werden, um derartige und andere Veränderungen auf dieser Ebene zu erfassen.

## **5.5 Molekulare Mechanismen: Dominant negativer Effekt vs. Beeinflussung der Transkription**

Die Messung der GCH-Aktivität in mononukleären Blutzellen nach Stimulation mit PHA zeigte bei Patienten mit dopa-responsiver Dystonie und Nachweis einer Mutation im GCH I Gen bei heterozygoter Ausprägung der Veränderung der genomischen Sequenz Aktivitätswerte, die etwa bei 20% der Meßwerte gesunder Kontrollen liegen. Diese Messungen werden durch die Neopterin-Bestimmung im Liquor bestätigt, die ähnliche Verringerungen zeigten.

Die Mutationen im Bereich des Gens für GCH I in dieser Arbeit sind wie auch in anderen Studien Nonsense- oder Missense-Mutationen, intronische Veränderungen der genomischen Sequenz, die zu abnormalem Splicing führen oder Insertionen bzw. Deletionen, die einen „Frameshift“ zur Folge haben und dadurch zu einer verringerten Aktivität des Enzyms GTP Cyclohydrolase führen. Diese Mutationen sind in allen sechs Exonen des zugrundeliegenden Gens nachweisbar.

Auch wenn sich Mutationen im Bereich aller Exone des GCH I-Gens zeigen ließen, so bleibt es doch weiterhin unklar, warum die Aktivitätsmessungen der GTP Cyclohydrolase I bei Patienten mit einer autosomal dominanten Mutation Werte ergeben, die so deutlich unterhalb von 50% liegen (Ichinose H, 1994). Immerhin liegt ja wie bei anderen Stoffwechselerkrankungen auch noch ein intaktes Allel vor, somit wäre die erwartete Aktivität etwa 50%, was sicherlich auch die Klinik deutlich beeinflussen würde.

Weiterhin wurde bereits mehrfach gezeigt, und kann auch von uns hier gezeigt werden, daß in Familien asymptotische Mutationsträger vorkommen, die dieselbe Mutation wie der zum Teil sehr schwer betroffene Patient aufweisen. Selbst wenn man annimmt, daß möglicherweise Minorsymptome übersehen wurden oder aus welchem Grund auch immer nicht erfaßt werden konnten, so bleiben markante Unterschiede bei Patienten mit ein und derselben Mutation. Auch die Neopterinwerte im Liquor sind bei klinisch nicht betroffenen Familienangehörigen, die ebenfalls diese genetische Veränderung besitzen, höher als bei Patienten (Takahashi H, 1994). Dieses asymptotische Trägertum scheint häufiger bei Männern als bei Frauen vorzukommen.

All diese Untersuchungen unterstützen die Vorstellung, daß im wesentlichen die GCH-Aktivität im Bereich des ZNS für die Entwicklung des Krankheitsbildes verantwortlich ist. Es scheint dabei notwendig zu sein, daß die Aktivität auf Werte von ungefähr 20% des Normalwertes fällt, um Symptome zu produzieren.

Hiermit stellt sich natürlich die Frage, warum die Aktivität auf ca. 20% reduziert sein kann, obwohl ja noch ein intaktes Allel vorliegt. Die meist gefundene Erklärung favorisiert einen dominant negativen Effekt. Dies würde bedeuten, daß das veränderte Enzym mit dem unveränderten Enzym interferiert oder sogar die Aktivität des intakten Allels inhibiert (Hirano M, 1996)(Furukawa Y, 1999). Hirano et al. zeigten, daß die Co-expression des Wildtyps mit einer mutierten Form in COS-7-Zellen mit einer verringerten Enzymaktivität einhergeht (Hirano M, 1998). Dies würde dann eine Erniedrigung der Enzymaktivität unter das erwartete Niveau zu Folge haben.

Trotzdem erscheint diese Erklärung wenig zufriedenstellend, denn man würde auch unter dieser Annahme erwarten, daß auch bei asymptomatischen Familienmitgliedern die Enzymaktivität wie bei den Indexfällen reduziert ist. Des weiteren sollte man bedenken, daß bei etwa 40% der Patienten mit dopa-responsiver Dystonie keine Mutation im Bereich der kodierenden Sequenz und der intronischen Umgebung für GCH I nachgewiesen werden kann. Gerade bei diesen Patienten ist die Vorstellung einer Interaktion einer mutierten mit einer nichtmutierten GCH-Variante ja als Erklärung nicht tauglich.

Inagaki et al. konnten in PHA-stimulierten mononukleären Blutzellen zeigen, daß die mRNA bei Patienten und Familienmitgliedern auf etwa 40% reduziert ist. Bei der weiteren Untersuchung wurden die mRNA der beiden Allele differenziert, wobei nur das Transkript eines Allels bei betroffenen Familienmitgliedern gefunden werden konnte (Inagaki H, 1999). Somit erscheint die verringerte RNA-Menge durch eine mißlungene Expression eines Allels erklärbar.

Alles in allem betrachtet haben sowohl Ereignisse während der Transkription als auch möglicherweise Mutationen in einer bislang noch nicht untersuchten Region Einfluß auf die Krankheitsausprägung. Insgesamt muß diese Frage als weiterhin nicht geklärt betrachtet werden. So wurden beispielsweise Punktmutationen im Bereich der nichttranslatierten 5'-Region von GCH I – wie weiter oben bereits erwähnt - beschrieben, die beide einen Austausch von Cytosin durch Thymin bedeuteten und in 100 Kontrollen nicht dargestellt werden konnten (Bandmann O, 1998). Es bleibt weiterhin zu zeigen, ob diese Mutationen zu einer Beeinflussung der Transkription führen.

Somit ist es sicherlich wünschenswert, die Patienten bei denen sich keine Mutation in der genomischen Sequenz im Bereich des Gens GCH I nachzuweisen ist, auch auf Transkriptionsebene zu untersuchen, um oben beschriebene Veränderungen auszuschließen.

## **5.6 Diagnostik der dopa-responsiven Dystonie**

Aufgrund des breiten Spektrums an Symptomen und Beschwerden und des nicht immer typischen Verlaufs gestaltet sich die Diagnostik dieser Erkrankung häufig schwierig, was für die Patienten häufig einen langen Leidensweg bedeutet. Die typische klinische Symptomatik besteht – wie oben bereits beschrieben - aus einer Dystonie eines Beines bis zum 9 Lebensjahr, die sich dann ausbreitet. Wesentliches Kriterium sind eine deutliche Befundbesserung nach Ruhephasen (z.B. nach dem Schlafen) und eine Verschlechterung unter längeren Phasen der Belastung. Weiterhin besteht bei all diesen Formen ein ausgesprochen gutes Ansprechen der Beschwerden auf bereits niedrige Dosen Levodopa ohne Beschreibung von Nebenwirkungen.

Damit sind die wesentlichen Kriterien aber auch genannt. Neben diesen typischen Verläufen gibt es eine Vielzahl an Symptomen und atypischen Krankheitsverläufen, welche die korrekte Diagnose deutlich erschweren. Eine Aufzählung der häufigsten Symptome, der Fehldiagnosen und der daraus folgenden inadäquaten Behandlung ist bereits erfolgt.

Somit erscheint es bedeutsam objektive Parameter einzuführen, um die Diagnostik zu erleichtern. Den größten Informationswert durch laborchemische Untersuchungen ergibt sicherlich die Bestimmung der Pterine (Neopterin, Biopterin) und der Neurotransmittermetabolite HVA

(Homovanillinmandelsäure) und 5-HIAA (5-Hydroxy-Indol-Essigsäure) im Liquor. Bei den Liquoruntersuchungen findet man die Pterine signifikant reduziert, HVA ist meist reduziert, 5-HIAA ist häufig – wenn auch nicht immer – ebenfalls reduziert (Blau N, 2001). Dieses diagnostische Kriterium ist recht spezifisch und erlaubt eine sichere Diagnostik.

In einigen Kliniken wird des Weiteren ein Phenylalaninbelastungstest (100 mg/kg KG) verwendet. Hierbei versucht man auszunutzen, daß aufgrund der erniedrigten Tetrahydrobiopterinkonzentration das Enzym Phenylalaninhydroxylase nicht in der Lage sein sollte, aus dem angebotenen Phenylalanin, Tyrosin im normalen Mengenverhältnis zu produzieren. Problematisch ist jedoch einzuschätzen, daß bei dieser Form der Testung einige Patienten mit genetisch gesicherter DRD Normalwerte aufwiesen (Saunders- Pullmann R, 2001) und auch falsch positive Ergebnisse erzielt werden. Ebenfalls zeigen heterozygote Mutationsträger einer Phenylketonurie dieselben Abweichungen bei den Laborparametern (Saraiva JM, 1993). Somit ist diese Form der Testung im Vergleich zur Liquoruntersuchung weniger aussagekräftig. Sollte jedoch eine Liquoruntersuchung nicht möglich oder nicht gewünscht sein, so besteht durchaus die Möglichkeit über eine Phenylalaninbelastung wertvolle Informationen zu erhalten.

Die enzymatische Diagnose einer DRD durch Messung der Aktivität der GTP Cyclohydrolase I wird dadurch erschwert, daß eben dieses Enzym in verschiedensten Zelltypen, darunter in Blut und Fibroblasten, unter normalen Umständen nicht exprimiert wird. Jedoch gibt es Beschreibungen über eine Messung der Enzymaktivität in phythämagglutininstimulierten Monozyten (Ichinose H, 1994). Auch eine Messung bei zytokinstimulierten Fibroblasten

ist inzwischen etabliert (Bonafé L, 2001). Beide Methoden liefern aussagekräftige Ergebnisse, sind jedoch recht aufwendig und kostenintensiv.

Zuletzt besteht die Möglichkeit der molekulargenetischen Analyse des Gens GCH I, welches für die GTP Cyclohydrolase I kodiert. Da dieses Gen nur aus sechs Exonen besteht ist ein zügiges Screening durchaus möglich, jedoch ergibt sich das Problem, daß ein fehlender Nachweis von Mutation in eben diesem Gen auch bei knapp der Hälfte der Patienten mit dopa-responsiver Dystonie vorliegt. Somit ist ein sicherer Ausschluß dieser Erkrankung mit dieser Technik nicht möglich. Interessant erscheint jedoch die weitere Untersuchung der DNA von Patienten mit V.a. eine DRD zum Auffinden möglicherweise weiterer involvierter Gene. Auch Veränderungen der Transkription sollten in Erwägung gezogen werden. Zur Zeit ist diese Methodik leider nur von untergeordnetem klinischen Nutzen, jedoch könnten die Erfahrungen und weitere Ergebnisse in der Zukunft dies grundlegend verändern.

## **5.7 Behandlung der DRD**

Wenn man sich den Entstehungsmechanismus der Erkrankung betrachtet erscheint die Behandlungsstrategie simpel, denn wenn das Fehlen von Tetrahydrobiopterin als kausale Ursache betrachtet wird, dann sollte die Verabreichung dieser Substanz die Beschwerden auch wieder beheben können. Jedoch waren die therapeutischen Versuche mit dieser Substanz mit wenig Erfolg gesegnet (LeWitt PA, 1986)(Fink JK, 1988)(Furukawa Y, 1996). Eine Begründung dafür ist am ehesten in der schlechten Penetranz dieses Stoffes durch die Blut-Hirn-Schranke zu finden. Die Effektivität der Blut-Hirn-Schranke für Tetrahydrobiopterin wurde mittels radioaktiver Markierung der Substanz im Mausversuch bereits gezeigt. Dabei waren

deutlich höhere Werte in der Leber und im Nierengewebe meßbar als im ZNS (Hoshiga M, 1993).

Des weiteren ist aus meiner Sicht besonders interessant, daß die Symptome der dopa-responsiven Dystonie auf Beschwerden aus dem Bereich des Dopamin-Mangels beschränkt sind, obwohl Tetrahydrobiopterin ja auch als wesentlicher Co-Faktor für die Tryptophanhydroxylase und die Phenylalaninhydroxylase benötigt wird. Symptome eines Noradrenalin- oder gar Serotonindefizits findet sich erst bei Patienten mit autosomal recessiven Veränderungen im GCH I Gen (Niederwieser A, 1984). Diese Patienten haben aber auch eine noch deutlicher verminderte Aktivität der GTP Cyclohydrolase als die Patienten mit der klassischen autosomal dominanten Form der Erkrankung. Diese Beobachtungen legen nahe, daß die nigrostriatalen dopaminergen Neurone am empfindlichsten auf einen Mangel an Tetrahydrobiopterin reagieren und erst ein weiterer Abfall der Konzentration auch Symptome des Noradrenalin- oder Serotoninmangels verursacht.

Als diese Erwägungen in Betracht ziehend, ist es also notwendig die Beschwerden eines Dopamin-Mangels an dopaminergen Neuronen des nigrostriatalen Systems zu beheben. Durch die Behandlung des M. Parkinson war ja bereits ein Medikament bekannt, wodurch Dopamin über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS gebracht werden konnte. Dies erklärt die guten Erfolge der Levodopa-Therapie bei Patienten mit dopa-responsiver Dystonie.

## **5.8 Levodopadosierungen bei DRD-Patienten mit bzw. ohne Mutationsnachweis in GCH I**

Wie im Ergebnisteil bereits erläutert zeigten die täglich verabreichten Levodopa-Dosierungen sowohl bei der Patientengruppe unter 10 Jahren, als auch bei der Patientengruppe über 10 Jahre beim Vergleich von Patienten mit bzw. ohne Mutationsnachweis in GCH I keine signifikanten Auffälligkeiten. Beide Patientengruppen benötigten zur Remission der Symptome lediglich niedrige Levodopamengen. Die Beeinflussung des dopaminergen Systems scheint also in beiden Gruppen gleich ausgeprägt zu sein.

Über mögliche Kandidatengene und Mechanismen, die diesem zu Grunde liegen könnten wurde bereits oben geschrieben.

## **6 Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten wir zeigen, wie bedeutsam diese autosomal dominant vererbte Erkrankung der dopa-responsiven Dystonie als Differentialdiagnose der Dystonien ist. Gerade da eine suffiziente und gut wirksame medikamentöse Therapie verfügbar ist, ist es umso bedeutender, die Diagnose frühzeitig zu stellen, um den Betroffenen unnötige Leiden – wie sie häufig beschrieben sind – zu ersparen.

Wie auch in der internationalen Literatur beschrieben konnten wir ebenfalls Mutationen im Gen GCH I, das für die GTP Cyclohydrolase kodiert, bei etwa der Hälfte der Patienten im Bereich der sechs Exone bzw. ihrer flankierenden intronischen Bezirke nachweisen. Wesentliche klinische Kriterien bei diesen Patienten sind die klinische Symptomatik, die tageszeitliche Fluktuation der Symptome mit einer deutlichen Verbesserung nach Ruhephasen und die dramatische Verbesserung der Beschwerden bereits bei der Verabreichung niedriger Dosen von Levodopa. Doch selbst wenn diese Kriterien streng angelegt werden bleibt diese große Anzahl an Patienten ohne Mutationsnachweis.

Wie gezeigt sind die notwendigen Levodopa-Dosierungen, die zur Remission der Beschwerden verabreicht werden müssen, bei Patienten mit Mutationsnachweis nicht signifikant unterschiedlich zu denen, die bei Patienten ohne Veränderung der genomischen Sequenz in GCH I benötigt werden. Dies unterstützt die Vermutung, daß auch bei diesen Patienten eine zumindest sehr ähnliche Störung des dopaminergen Systems zur manifesten Erkrankung führt.

All dies zeigt die Notwendigkeit der Suche nach den Mechanismen, die diese Krankheit auslösen. So ist es sicherlich sinnvoll weitere Kandidatengene zu untersuchen. Auch eine Betrachtung auf Transkriptionsebene erscheint notwendig, um Regulationsmechanismen dieses und vielleicht auch anderer Gene erklären zu können. Gerade die Veränderungen der Transkription und der vermutete dominant negative Effekt versprechen interessante Erkenntnisse. Auch die bislang unbekannte Funktion der Punktmutationen in der 5'-UTR des Gens muß an dieser Stelle erwähnt werden.

In der Literatur finden sich vereinzelt Berichte über fokale Dystonien, die durch Mutationen in GCH I verursacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist es uns nicht gelungen weitere rein lokalisierte Dystonien mit positivem Mutationsnachweis zu finden. Jedoch erscheint es aus meiner Sicht weiterhin notwendig, im Zusammenhang der differentialdiagnostischen Erwägungen bei dystonen Symptomen an das Krankheitsbild der DRD zu denken. Gerade wenn Verwandte mit den Symptomen einer DRD ebenfalls erkrankt sind, sollte auch bei einer eher untypischen klinischen Symptomatik an diese Erkrankung gedacht werden. Mit der weiteren Suche werden sich sicherlich weitere lokalisierte Formen finden. Die Prävalenz der dopa-responsiven Dystonie wird sich dadurch deutlich nach oben korrigieren.

## 7 Anhang

Exon	Primer	Ansatz	Programm	SSCP, Sequenzierung
Exon1 GCH 1.4 Länge: 178bp	A: gtccttcccgaacggcag B: ctgcgcgctcttggcct	1,0 µl DNA 1,0 µl Primer A 1,0 µl Primer B 1,6 µl MgCl 1,0 µl Puffer 10X 4,0 µl Nukleotidmix 4,0 µl Q-Solution 0,1 µl QIA-Taq 5,3 µl Bidest	3min 94°C 30sec 94°C 30sec 68°C 38x 30sec 72°C 5min 72°C	SSCP: MDE-Gel bei Raumtemperatur: 6,5h bei 650V bei 4°C: 20h 450V 0,6x TBE als Puffer  Sequenzierung: 8%-PAA-Gel Auftrag über 1,5h bei 60W Auftrag über 4h bei 60W 1x TBE als Puffer
Exon 1 GCH 1.5 Länge: 194bp	A: aggtgcagcaatgggttc B: gagctcaggatggacgagt	1,0 µl DNA 1,0 µl Primer A 1,0 µl Primer B 0,8 µl MgCl 2,0 µl Puffer 10X 4,0 µl Nukleotidmix 4,0 µl Q-Solution 0,1 µl QIA-Taq 6,1 µl Bidest	3min 94°C 30sec 94°C 30sec 64°C 40x 30sec 72°C 5min 72°C	SSCP: MDE-Gel bei Raumtemperatur: 7h 650V bei 4°C: 21h 450V 0,6x TBE als Puffer  Sequenzierung: 8%-PAA-Gel Auftrag über 1,5h bei 60W Auftrag über 4h bei 60W 1x TBE als Puffer
Exon 1 GCH 1.6 Länge: 188bp	A: aacgagctgaacctccctaac B: cccgcacgctctagcag	1,0 µl DNA 1,0 µl Primer A 1,0 µl Primer B 1,6 µl MgCl 2,0 µl Puffer 10X 4,0 µl Nukleotidmix 4,0 µl Q-Solution 0,1 µl QIA-Taq 5,3 µl Bidest	3min 94°C 30sec 94°C 30sec 65°C 35x 30sec 72°C 5min 72°C	SSCP: MDE-Gel bei Raumtemperatur: 8h bei 650V bei 4°C: 22h bei 450V 0,6x TBE als Puffer  Sequenzierung: 8%-PAA-Gel Auftrag über 1,5h bei 60W Auftrag über 4h bei 60W 1x TBE als Puffer

Exon	Primer	Ansatz	Programm	SSCP, Sequenzierung
Exon 2 GCH 2.2 Länge: 176bp	A: gacatgttactaaagcaagcc B: ttaaattgctgggaacaac	1,0 µl DNA 1,0 µl Primer A 1,0 µl Primer B 1,6 µl MgCl 2,0 µl Puffer 10X 4,0 µl Nukleotidmix 1,0 µl Haus-Taq 8,4 µl Bidest	3min 94°C  30sec 94°C 30sec 61°C 30x 30sec 72°C 5min 72°C	SSCP: MDE-Gel bei Raumtemperatur: 10h bei 650 V bei 4°C: 24h bei 450V 0,6x TBE als Puffer  Sequenzierung: 8%-PAA-Gel Auftrag über 1,5h bei 60W Auftrag über 4h bei 60W 1x TBE als Puffer
Exon 3 GCH 3.2 Länge: 181np	A: ttctttctatattctctattttg B: gtcctataaacgtattcttctg	1,0 µl DNA 1,0 µl Primer A 1,0 µl Primer B 1,6 µl MgCl 2,0 µl Puffer 10X 4,0 µl Nukleotidmix 1,0 µl Haus-Taq 8,4 µl Bidest	3min 94°C 30sec 94°C 1min 54°C 35x 15sec 72°C 5min 72°C	SSCP: MDE-Gel bei Raumtemperatur: 9h bei 650V bei 4°C: 23h bei 450V 0,6x TBE als Puffer  Sequenzierung: 8%-PAA-Gel Auftrag über 1,5h bei 60W Auftrag über 4h bei 60W 1x TBE als Puffer
Exon 4 GCH 4.1 Länge: 288bp	A: gtcctttttgtttatgaggaagc B: ggatgatgcactctataatctcag c	1,0 µl DNA 1,0 µl Primer A 1,0 µl Primer B 0,8 µl MgCl 2,0 µl Puffer 10X 4,0 µl Nukleotidmix 1,0 µl Haus-Taq 9,2 µl Bidest	3min 94°C  30sec 94°C 30sec 59°C 30x 30sec 72°C 5min 72°C	

Exon	Primer	Ansatz	Programm	SSCP, Sequenzierung
Exon 4 GCH 4.2 (nested) Länge: 195bp	A: atgaggaaggttatcaatt B: tgggtgacagagcaagac	1,0 µl DNA 1,0 µl Primer A 1,0 µl Primer B 0,8 µl MgCl 2,0 µl Puffer 10X 4,0 µl Nukleotidmix 1,0 µl Haus-Taq 9,2 µl Bidest	3min 94°C 30sec 94°C 10x 30sec 67°C 30sec 94°C 30sec 62°C 20x 30sec 72°C 5min 72°C	SSCP: MDE-Gel bei Raumtemperatur: 10h bei 650V bei 4°C: 24h bei 450V 0,6x TBE als Puffer  Sequenzierung: 8%-PAA-Gel Auftrag über 1,75h bei 60W Auftrag über 4h bei 60W 1x TBE als Puffer
Exon 5 GCH 5.2 Länge: 152bp	A: agctccttatcacatcca B: ttctagtgaccattatgac	1,0 µl DNA 1,0 µl Primer A 1,0 µl Primer B 2,0 µl Puffer 10X 4,0 µl Nukleotidmix 4,0 µl Betain 1,0 µl Haus-Taq 6,0 µl Bidest Haustaqa	3min 94°C 30sec 94°C 30sec 56°C 35x 30sec 72°C 5min 72°C	SSCP: MDE-Gel bei Raumtemperatur: 10h bei 650V bei 4°C: 23h bei 450V 0,6x TBE als Puffer  Sequenzierung: 8%-PAA-Gel Auftrag über 1,5h bei 60W Auftrag über 4h bei 60W 1x TBE als Puffer
Exon 6 GCH 6.1 Länge: 000bp	A: accaaaaccagcagctgtctact c B: aatgctactggcagctacgatcg g	1,0 µl DNA 1,0 µl Primer A 1,0 µl Primer B 2,0 µl Puffer 10X 4,0 µl Nukleotidmix 4,0 µl Betain 1,0 µl Haus-Taq 6,0 µl Bidest Haustaqa	3min 94°C 30sec 94°C 1min 60°C 33x 5min 72°C	SSCP: MDE-Gel bei Raumtemperatur: 11h bei 650V bei 4°C: 24h bei 450V 0,6x TBE als Puffer  Sequenzierung: 8%-PAA-Gel Auftrag über 1,5h bei 60W Auftrag über 4h bei 60W 1xTBE alsPuffer

## 8 Literaturverzeichnis

1. Ad hoc committee of the Dystonia Medical Research Foundation. 1984.
2. Bandmann O, Nygaard T, Surtees R, Marsden C, Wood N, Harding A. Dopa-responsive dystonia in British patients: new mutations of the GTP-cyclohydrolase I gene and evidence for genetic heterogeneity. *Human Molecular Genetics* 1996;403-406.
3. Bandmann O, Valente E, Holmans P et al. Dopa-responsive dystonia: a clinical and molecular genetic study. *Ann Neurol* 1998;44:649-656.
4. Barrett R, Yahr M, Duvoisin R. Torsion dystonia and spasmodic torticollis--results of treatment with L-dopa. *Neurology* 1970;20:107-113.
5. Beyer K, Lao-Villadoniga J, Vecino-Bilbao B, Cacabelos R, de la Fuente-Fernandez R. A novel point mutation in the GTP cyclohydrolase gene in Spanish family with hereditary progressive and dopa responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:420-1.
6. Bezin L, Nygaard T, Neville J, Shen H, Levine R. Reduced lymphoblast neopterin detects GTP cyclohydrolase dysfunction in dopa-responsive dystonia. *Neurology* 1998;50:1021-7.
7. Blau N, Bonafé L, Thöny B. Tetrahydrobiopterin deficiencies without hyperphenylalaninemia: diagnosis and genetics of Dopa-responsive dystonia and sepiapterin reductase deficiency. *Mol Genet Metab* 2001;74:172-185.
8. Blau N, Scherer-Oppliger T, Baumer A et al. Isolated central form of tetrahydrobiopterin deficiency associated with hemizygoty on chromosome 11q and a mutant allele of PTPS. *Hum Mutat* 2000;16:54-60.
9. Bonafé L, Thony B, Leimbacher W, Kierat L, Blau N. Diagnosis of dopa-responsive dystonia and other tetrahydrobiopterin disorders by the study of biopterin metabolism in fibroblasts. *Clin Chem* 2001;47:477-85.
10. Brique S, Destee A, Lambert J, Mouroux V, Delacourte A, Amouyel P. A new GTP-cyclohydrolase I mutation in an unusual dopa responsive dystonia, familial form. *Neuro Report* 1999;10:487-491.

11. Chien A, Edgar D, Trela J. Deoxyribonucleid acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976;127:1550-1557.
12. Coleman M, Barnet A. L-dopa reversal of muscular spasm, vomiting and insomnia in a patient with an atypical form of familial dystonia. *Trans Am Neurol Assoc* 1969;94:91-95.
13. de la Fuente-Fernandez R. Tardive dystonia in dopa-responsive dystonia: a reappraisal of the dopamin hypothesis of tardive dyskinesia. *Neurology* 1998;50:1134-5.
14. Fahn S. The varied clinical expressions of dystonia. *Neurol Clin* 1984;2:541-545.
15. Fahn S, Marsden C, Clane D. Classification and investigation of dystonia. London: Butterworths; 1987.
16. Fink J, Barton N, Cohen W, Lovenberg W, Burns R, Hallett M. Dystonia with marked diurnal variation associated with bipterin deficiency. *Neurology* 1988;38:707-711.
17. Furukawa Y, Guttman M, Sparagana S et al. Dopa-responsive dystonia due to a large deletion in the GTP cyclohydrolase I gene. *Ann Neurol* 2000;47:517-20.
18. Furukawa Y, Imai H. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Nippon Rinsho* 1993;51:2983-2988.
19. Furukawa Y, Kish S. Dopa-responsive Dystonia: recent advances and remaining issues to be addressed. *Movement Disorders* 1999;14:709-715.
20. Furukawa Y, Kish S, Bebin M, Jacobson R, Fryburg J, Wilson W. Dystonia with motor delay in compound heterozygotes for GTP-cyclohydrolase I gene mutations. *Ann Neurol* 1998;44:10-16.
21. Furukawa Y, Lang A, Trugman J, Bird T, Hunter A, Sadeh M. Gender-related penetrance and de novo GTP-cyclohydrolase I gene mutations in dopa-responsive dystonia. *Neurology* 1998;50:1015-20.

22. Furukawa Y, Shimadzu M, Rajput A, Shimizu Y, Tagawa T, Mori H. GTP-cyclohydrolase I gene mutations in hereditary progressive and dopa-responsive dystonia. *Ann Neurol* 1996;39:609-17.
23. Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat.* 1993;2 (5):404-414.
24. Harwood G, Hierons R, Fletcher N, Marsden C. Lessons from a remarkable family with dopa-responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:460-463.
25. Hirano M, Imaiso Y, Ueno S. Differential splicing of the GTP cyclohydrolase I RNA in dopa-responsive dystonia. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:316-9.
26. Hirano M, Komure O, Ueno S. A novel missense mutant inactivates GTP cyclohydrolase I in dopa-responsive dystonia. *Neurosci Lett* 1999;260:180-4.
27. Hirano M, Tamaru Y, Ito H, Matsumo S, Imai T, Ueno S. Mutant GTP cyclohydrolase I mRNA levels contribute to dopa-responsive dystonia onset. *Ann Neurol* 1996;40:796-798.
28. Hirano M, Tamaru Y, Ito H, Matsumoto S, Imai T, Ueno S. Exon skipping caused by a base substitution at a splice site in the GTP cyclohydrolase I gene in a Japanese family with hereditary progressive dystonia/dopa responsive dystonia. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;213:645-51.
29. Hirano M, Yanagihara T, Ueno S. Dominant negative effect of GTP cyclohydrolase I mutations in dopa-responsive hereditary progressive dystonia. *Ann Neurol* 1998;44:365-371.
30. Hoenicka J, Vidal L, Godoy M, Ochoa J, Garcia De Yébenes J. New nonsense mutation in the GTP-cyclohydrolase I gene in L-DOPA responsive dystonia-parkinsonism. *Mov Disord* 2001;16:364-6.
31. Hong K, Kim Y, Paik M. A novel nonsense mutation of the GTP cyclohydrolase I gene in a family with Dopa-responsive dystonia. *Hum Hered* 2001;52:59-60.

32. Hoshiga M, Hatakeyama K, Watanabe M, Shimada M, Kagamiyama H. Autoradiographic distribution of <sup>14</sup>C-tetrahydrobiopterin and its developmental change in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267:971-8.
33. Humphries S, Gudnason V, Whittall R, Day I. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 1997;43:427-435.
34. Hwu W, Wang P, Hsiao K, Wang T, Chiou Y, Lee Y. Dopa responsive dystonia induced by a recessive GTP cyclohydrolase mutation. *Human Genet* 1999.
35. Ibelgaufts H. *Gentechnologie von A bis Z*. Weinheim: VCH; 1993.
36. Ichinose H, Ohye T, Matsuda Y et al. Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes: mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. *J Biol Chem* 1995;270:10062-10071.
37. Ichinose H, Ohye T, Segawa M, Nomura Y, Endo K, Tanaka H. GTP cyclohydrolase I gene in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuations. *Neurosci Lett* 1995;196:5-8.
38. Ichinose H, Ohye T, Takagashi E et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nature Genet* 1994;8:236-242.
39. Illarioshkin S, Markova E, Slominsky P, Miklina N, Popova S, Limborska S. The GTP cyclohydrolase gene in Russian families with dopa responsive dystonia. *Arch Neurol* 1998;55:789-92.
40. Inagaki H, Ohye T, Suzuki T, Segawa M, Nomura Y, Nagatsu T. Decrease in GTP cyclohydrolase I gene expression caused by inactivation of one allele in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (HPD). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:747-751.
41. Jarman P, Bandmann O, Marsden C, Wood N. GTP cyclohydrolase I mutations in patients with dystonia responsive to anticholinergic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;63(3):304-8.

42. Jeon B, Jeon J, Park S, Lee M. Dopa-responsive dystonia: a syndrom of selective nigrostriatal dopamine deficiency. *Adv Neurol* 1998;78:309-317.
43. Kretz K, Callen W, Hedden V. Cycle Sequencing. *PCR-Meth. Appl.* 1994;3 (5):107-112.
44. Leren T, Solberg K, Rodningen O, Tonstad S, Ose L. Screening for point mutations in exon 10 of the low density lipoprotein receptor gene by analysis of single strand conformation polymorphism: detection of a nonsense mutation. *Hum Genet* 1993;92:6-10.
45. LeWitt P, Miller L, Levine R, Brady R, Hallet M. Tetrahydrobiopterin in dystonia: identification of abnormal metabolism and therapeutic trials. *Neurology* 1986;36:760-4.
46. Lüdecke B, Dworniczak B, Bartholomé K. A point mutation in the tyrosin hydroxylase gen associated with segawa's syndrome. *Hum Genet* 1995;95:123-125.
47. Mandell S. The treatment of dystonia with L-dopa and haloperidol. *Neurology* 1970;20:103-106.
48. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch E. *Molecular Cloning. A laboratory manual*: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
49. Markova E, Slominsky P, Illarioshkin S et al. A novel mutation in the GTP cyclohydrolase I gene associated with broad range of clinical presentations in a family with autosomal dominant dopa-responsive dystonia. *Eur J Neurol* 1999;6:605-8.
50. Martynoff Gd, Pays E, Vassart G. Synthesis of a full length DNA complementary to thyroglobulin 33 S messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1980:p645-53.
51. McPherson M, Hames B, Taylor G. *PCR 2 - A practical Approach*. Oxford: IRL Press; 1995.
52. Müller U, Kupke K. The genetics of primary torsion dystonia. *Hum Genet* 1990;84:107-115.

53. Müller U, Steinberger D, Németh A. Clinical and molecular genetics of primary dystonia. *Neurogenetics* 1998;1:165-177.
54. Müller U, Steinberger D, Topka H. Mutations of GCH1 in Dopa-responsive dystonia. *J Neural Transm* 2002;109:321-8.
55. Nakao S, Takenaka T, Maeda M. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophie. *N Engl J Med* 1995;333:288-93.
56. Newton C. PCR - essential data. Cichester: Wiley; 1995.
57. Niederwieser A, Blau N, Wang M, Joller P, Atares M, Cardesa-Garcia J. GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenylalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine and serotonin deficiencies and muscular hypotonia. *Eur J Pediatr* 1984;141:208-14.
58. Nishiyama N, Yukishita S, Hagiwara H, Kakimoto S, Nomura Y, Segawa M. Gene mutation in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (HPD), strictly defined dopa-responsive dystonia. *Brain & Development* 2000;22:102-6.
59. Nitschke M, Steinberger D, Heberlein I, Otto V, Muller U, Vieregge P. Dopa responsive dystonia with turner syndrom: clinical, genetic and neuropsychological studies in a family with a new mutation in the GTP-cyclohydrolase gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:806-8.
60. Nygaard T. Dopa-responsive Dystonia. *Curr Opin Neurol* 1995;8:310-313.
61. Nygaard T, Marsden C, Duvoisin R. Dopa-responsive dystonia. *Adv Neurol* 1988;50:377-384.
62. Nygaard T, Marsden C, Fahn S. Dopa-responsive dystonia: long-term treatment response and prognosis. *Neurology* 1991;41:174-181.
63. Nygaard T, Waran S, Levine R, Naini A, Chutorian A. Dopa-responsive dystonia simulating cerebral palsy. *Pediatr Neurol* 1994;11:236-240.
64. Oppenheim H. Über eine eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica progressiva, dystonia musculorum deformans). *Neurol Centralbl* 1911;30:1090-1107.

65. Rajput A, Gibb W, Zhong X et al. Dopa-responsive dystonia: pathological and biochemical observations in a case. *Ann Neurol* 1994;35:396-402.
66. Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet.* 1994;May;3(5):801-7.
67. Roth M, Tanese N, Goff S. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *E. coli*. *J. Biol. Chem* 1985;260:9326-9335.
68. Rychlik W, Rhoads R. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 1989;17:8543-8551.
69. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science (United States)* 1988;239:487-491.
70. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad Sci* 1977; 74: 5463-5467.
71. Saraiva J, Seakins J, Smith I. Plasma phenylalanine and tyrosine levels revisited in heterozygotes for hyperphenylalaninemia. *J Inherit Metab Dis* 1993;16:105.
72. Sarkar G, Yoon H, Sommer S. Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (SSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res* 1992;20:871-878.
73. Sasaki R, Naito H, Kuzuhara S. A novel de novo point mutation in the GTP cyclohydrolase I gene in a Japanese patient with hereditary progressive and dopa responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:947.
74. Saunders- Pullmann R, Hyland K, Nygaard T et al. Phenylalanin loading in the diagnosis of dopa responsive dystonia: the necessity to measure phenylalanine, tyrosine and biopterin. *J Inherit Metab Dis* 2001;submitted for publication.

75. Segawa M. Hereditary progressive Dystonia with marked diurnal fluctuation. Extrapyramidal tract disease. Sano Y, Uono M. Tokyo: Shoin I.; 1975:127-139.
76. Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, Nomura Y, Imai H. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Adv Neurol* 1976;14:215-233.
77. Sekiya T. Detection of mutant sequences by single strand conformation polymorphism analysis. *Mutat Res* 1993;288:79-83.
78. Sharp P, Sugden B, Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 1973;12:3055-3063.
79. Sheffield V, Beck J, Kwitek A, Sandstrom D, Stone E. The Sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics* 1993;16:325-332.
80. Singer M, Berg P. *Gene und Genome*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1992.
81. Steinberger D, Korinthenberg R, Topka H et al. Dopa-responsive dystonia: mutation analysis of GCH1 and analysis of therapeutic doses of L-dopa. *Neurology* 2000;12; 55(11):1735-7.
82. Steinberger D, Müller U. Molekulargenetik und Klinik der Dopa-responsiven Dystonie. *Deutsches Ärzteblatt* 1996;93. Jahrgang, Heft 24:1627-1629.
83. Steinberger D, Topka H, Fischer D, Müller U. GCH1 mutation in a patient with adult-onset oromandibular dystonia. *Neurology* 1999;52:877.
84. Steinberger D, Weber Y, Korinthenberg R, Deuschl G, Benecke R, Martinius J. High penetrance and pronounced variation in expressivity of GCH I mutations in five families with dopa-responsive dystonia. *Ann Neurol* 1998;43:634-9.
85. Strachan T, Read R. *Human Molecular Genetics*: Bios Scientific Publishers; 1996.

86. Takahashi H, Levine R, Galloway M, Snow B, Calne D, Nygaard T. Biochemical and fluorodopa positron emission tomographic findings in an asymptomatic carrier of the gene for dopa-responsive dystonia. *Ann Neurol* 1994;35:354-356.
87. Tamaru Y, Hirano M, Ito H, Kawamura J, Matsumoto S, Imai T. Clinical Similarities of hereditary progressive/dopa responsive dystonia caused by different mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:469-73.
88. Tassin J, Durr A, Bonnet A et al. Levodopa-responsive dystonia. GTP cyclohydrolase I or parkin mutations? *Brain* 2000;123:1112-21.
89. Thöny B, Blau N. Mutations in the GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase genes. *Hum Mutat* 1997;10:11-20.
90. Thony B, Heizmann C, Mattei M. Human GTP-cyclohydrolase I gene and siapterin reductase gene map to region 14q21-q22 and 2p14-p12, respectively, by in situ hybridization. *Genomics* 1995;26:168-170.
91. Touma E, Romstad A, Sakr A, Khneisser I, Loiselet J, Dhondt J. GTP cyclohydrolase deficiency: new honozygous mutation in an infant with favourable response to deprenyl. *J Inherit Metab Dis* 2000;23:41.
92. Van den Heuvel L, Luiten B, Smeitink J et al. A common point mutation in the tyrosine hydroxylase gene in autosomal recessive L-dopa-responsive dystonia in the Dutch population. *Hum Genet* 1998;102:644-646.
93. Verma I. Reverse transcriptase. *The Enzymes* 1977;14A:87-104.
94. Weber Y, Steinberger D, Deuschl G, Benecke R, Müller U. Two previously unrecognized splicing mutations of GCH1 in Dopa-responsive dystonie: exon skipping and one base insertion. *Neurogenetics* 1997;1:125-7.

## Lebenslauf

Martin Andree Berghäuser

geb. Am 03.12.1973 in Giessen

Havixbecker Strasse 2

48161 Münster-Roxel

Telefon 02534-972882

Handy 0170-7803884

e-mail: [bergham@mednet.uni-muenster.de](mailto:bergham@mednet.uni-muenster.de)

Ausbildung	1980-1984	Grundschule Solms-Burgsolms
	1984-1993	Gymnasium Philippinum Weilburg
	1993-1994	Zivildienst bei der JUH Giessen Abschluß als Rettungsanitäter
	1994-1998	Nebentätigkeit als Rettungssanitäter
	1994-2001	Studium der Medizin an der JLU Giessen Physikum 9/96 1. Staatsexamen 1997 2. Staatsexamen 2000 3. Staatsexamen 2001
	1998-2002	Doktorarbeit in der Humangenetik der JLU Giessen
	2000-2001	Praktisches Jahr
	2001-2002	AIP in der Kinderklinik der WWU Münster (Prof. Harms)
	2002-	Assistenzarzt in der Kinderklinik der WWU Münster (Prof. Harms)