



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Ευθύμιος Δαρδιώτης, Επίκ. Καθηγητής Νευρολογίας

Διδακτορική Διατριβή

«Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών σε ασθενείς με εστιακή δυστονία»

υπό

Βασιλείου Π. Σιώκα

Ιατρού

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2019

© 2019 ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΣΙΩΚΑΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** **Ευθύμιος Δαρδιώτης**
Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
- 2^{ος} Εξεταστής** **Γεωργία Ξηρομερήσιου**
Επίκουρος Καθηγήτρια Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
- 3^{ος} Εξεταστής** **Ευαγγελή Τσιρώνη-Μαλίζου**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Οφθαλμολογίας-Νευροοφθαλμολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
- 4^{ος} Εξεταστής** **Κωνσταντίνος Φουντάς**
Καθηγητής Νευροχειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
- 5^{ος} Εξεταστής** **Ιωάννης Χατζηιωάννου**
Αναπληρωτής Καθηγητής ΩΡΛ, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
- 6^{ος} Εξεταστής** **Ευτυχία Καψαλάκη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ακτινοδιαγνωστικής, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
- 7^{ος} Εξεταστής** **Σοφία Ανδρούδη**
Επίκουρος Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου καθώς και να ευχαριστήσω όσο πιο θερμά είναι δυνατόν, όποιον και όποια, που με οποιοδήποτε τρόπο συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της διδακτορικής αυτής διατριβής. Κατά πρώτο λόγο, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Δρ.Δαρδιώτη Ευθύμιο, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας, για την καθοδήγηση του, την επίβλεψη του καθώς και για την βοήθεια του κατά την εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής. Ακόμη, τον Δρ.Χατζηγεωργίου Γεώργιο, Καθηγητή Νευρολογίας για την προσωπική του στήριξη και την ουσιαστική μέριμνα για την ολοκλήρωση της εν λόγω διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Δρ.Τσιρώνη Ευαγγελία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας-Νευροοφθαλμολογίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε καθώς και για την συμπαράσταση και βοήθεια της σε όλη τη διάρκεια της διατριβής. Ακόμη θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ.Ξηρομερήσιου Γεωργία, Επίκουρο Καθηγήτρια Νευρολογίας, για την βοήθειά της κατά τη διενέργεια της διατριβής. Θα ήθελα ακόμη, να ευχαριστήσω την βιοχημικό Δρ.Δαρδιώτη Μαρία, που με βοήθησε ιδιαίτερος σε πολλούς τομείς καθώς και για τη στήριξη της και την υπομονή της στο εργαστήριο Νευρογενετικής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη των Πανεπιστημιακών Κλινικών Νευρολογίας και Οφθαλμολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την αμέριστη βοήθεια τους.

Στην οικογένεια μου.

Βασίλειος Σιώκας

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο: Σιώκας

Όνομα: Βασίλειος

Όνομα Πατέρα: Παναγιώτης

Ημερομηνία γέννησης: 25/11/1983

Τόπος γέννησης: Κατερίνη

Εργασία: Ειδικευόμενος Νευρολογίας (2017-) ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ

ΣΠΟΥΔΕΣ

α) Απόφοιτος Ιατρικής Α.Π.Θ. (2009)

β) Κάτοχος Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε.) Τίτλος Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Msc): «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής». Ιατρική Θεσσαλίας (2014)

γ) Υποψήφιος διδάκτορας Ιατρική Θεσσαλίας (2015-2019)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

α) Αγγλικά (Επίπεδο Γ2)

β) Γερμανικά (Επίπεδο Β2)

β) Ισπανικά (Επίπεδο Β2)

«Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών σε ασθενείς με εστιακή δυστονία»

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΣΙΩΚΑΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ευθύμιος Δαρδιώτης** Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
(Επιβλέπων)
2. **Γεωργία Ξηρομερήσιου** Επίκουρος Καθηγήτρια Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
3. **Ευαγγελή Τσιρώνη-Μαλίζου** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας-
Νευροοφθαλμολογίας, Γνωστικό αντικείμενο, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΥΠΟΒΑΘΡΟ: Γενετικές παραλλαγές εμπλέκονται στην ανάπτυξη του βλεφαρόσπασμου. Ο ακριβής ρόλος του πολυμορφισμού rs6265 στο γονίδιο του brain-derived neurotrophic factor (BDNF) στον βλεφαρόσπασμο παραμένει αμφιλεγόμενος. Επίσης η γενετική παραλλαγή rs75392628 στο Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 (TREM2), έχει συσχετισθεί με ιδιοπαθή τρόμο και νόσο του Πάρκινσον.

ΣΚΟΠΟΣ: Η αξιολόγηση της επίδρασης του rs6265 και του rs75392628 στον βλεφαρόσπασμο.

ΜΕΘΟΔΟΙ: 206 ασθενείς με βλεφαρόσπασμο και 206 υγιείς μάρτυρες συγκεντρώθηκαν και γονοτυπήθηκαν για τον rs6265 και τον rs75392628. Επίσης, πραγματοποιήσαμε μια μετά-ανάλυση για τον rs6265, αναλύοντας τα αποτελέσματά της συγκεκριμένης μελέτης με αυτά από προηγούμενες μελέτες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Στο dominant μοντέλο κληρονομικότητας βρέθηκε σημαντική επίδραση του rs6265 στον κίνδυνο εμφάνισης βλεφαρόσπασμου [Odds Ratio, OR (95% confidence interval, C.I.): 1,52 (1,01-2,29), $p=0,044$]. Η ανάλυση χρησιμοποιώντας το OR_G , έδειξε ότι υψηλότερο φορτίο του αλληλόμορφου "A" του rs6265 υποδηλώνει μεγαλύτερη πιθανότητα ενός ατόμου να αναπτύξει βλεφαρόσπασμο (OR_G 1,48 95%CI 1,00-2,19). Τέλος, τα αποτελέσματα από τη μετά-ανάλυση αποκάλυψαν ότι ο rs6265 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο βλεφαρόσπασμου στο dominant μοντέλο [OR: 1,26; 95% CI: 1,02-1,55, $p_z = 0,03$]. Επίσης, υψηλότερο φορτίο του αλληλόμορφου "A" του rs6265 υποδηλώνει μεγαλύτερη πιθανότητα ενός υποκειμένου να αναπτύξει βλεφαρόσπασμο (OR_G 1,26 95% CI 1,04-1,53). Δεν ανιχνεύθηκε κανένα αλληλόμορφο T του rs75392628 στο δείγμα μας, επομένως δεν ήταν δυνατή περαιτέρω ανάλυση για τη συγκεκριμένη γενετική παραλλαγή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η παρούσα μελέτη παρέχει πρόσθετες αποδείξεις στις υπάρχουσες γνώσεις σχετικά με τη συμβολή του rs6265 BDNF στον κίνδυνο ανάπτυξης του βλεφαρόσπασμου. Ενώ η παθοφυσιολογία και η γενετική του βλεφαρόσπασμου και της εστιακής δυστονίας είναι εν μέρει μόνο γνωστές, φαίνεται ότι το BDNF γονίδιο και ο rs6265 μπορεί να αποτελούν έναν βασικό παράγοντα κινδύνου που εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό. Με βάση τα αποτελέσματα μας για τον rs75392628 του TREM2, δεν έχουμε ενδείξεις ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου στο βλεφαρόσπασμο.

Λέξεις-κλειδιά: BDNF, βλεφαρόσπασμος, εστιακή δυστονία, πολυμορφισμός, TREM2, SNP.

ABSTRACT

BACKGROUND: A few genetic variants are implicated in the development of blepharospasm (BSP). The precise role of the rs6265 on the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene on BSP remains controversial. Also, the genetic variant rs75392628 in the Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 (TREM2) has been previously associated with essential tremor and Parkinson's disease.

OBJECTIVE: Evaluation of the effect of rs6265 and of rs75392628 on BSP.

METHODS: 206 patients with BSP and 206 healthy controls were recruited and genotyped for the rs6265 and for the rs75392628. We also performed a meta-analysis for the rs6265, by pooling our results with those from previous studies.

RESULTS: A significant effect of rs6265 on the risk of BSP was found in the dominant model of inheritance [Odds Ratio, OR (95% confidence interval, C.I.): 1.52 (1.01-2.29), $p=0.044$]. Mutational load analysis of rs6265 in the risk of BSP using the OR_G , revealed that higher load of the “A” allele of rs6265 denotes higher probability of a subject to develop BSP (OR_G 1.48 95%CI 1.00-2.19). Finally, pooled results from the meta-analysis revealed that the rs6265 is associated with an increased risk of BSP in the dominant model [OR: 1.26; 95%CI: 1.02-1.55, $pz=0.03$]. Also, higher load of the “A” allele of rs6265 denotes higher probability of a subject to develop BSP (OR_G 1.26 95%CI 1.04-1.53). There were no T alleles of rs75392628 in our sample, therefore no further analysis was possible for the particular genetic variant.

CONCLUSIONS: The present study provides additional evidence to the existing knowledge concerning the contribution of the rs6265 BDNF on the risk of developing BSP. While the

pathophysiology and genetic susceptibility in BSP and focal dystonia are only partially understood, it seems that BDNF and rs6265 may constitute one essential risk factor that is heavily involved. Based on our results for the rs75392628 of TREM2, there are no indications that it is a possible risk factor in the BSP.

Keywords: BDNF; blepharospasm; focal dystonia; polymorphism; TREM2, SNP.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	10
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΔΥΣΤΟΝΙΑΣ	15
Ορισμός και ταξινόμηση της δυστονίας	15
Επιδημιολογικά στοιχεία	18
Παθοφυσιολογικά στοιχεία.....	18
Αντιμετώπιση 19	
SNPs	21
Γενικά για τους SNPs	21
ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΩΝ ΔΥΣΤΟΝΙΩΝ	22
Μονογονιδιακές μορφές της δυστονίας	22
Γενετικοί παράγοντες κινδύνου στη δυστονία.....	23
ΒΛΕΦΑΡΟΣΠΑΣΜΟΣ	34
Κλινική εικόνα 34	
Επιδημιολογικά στοιχεία	35
Περιβαλλοντικοί παράγοντες	35
Γενετικοί παράγοντες κινδύνου στον βλεφαρόσπασμο	35
BDNF και rs6265 (Val66Met)	37
Γενικά για τον BDNF	37
Ο πολυμορφισμός rs6265 (Val66Met)	37
BDNF rs6265 (Val66Met) και δυστονία	41
BDNF rs6265 (Val66Met) και άλλες παθήσεις	42
Άλλοι πολυμορφισμοί του BDNF	42
TREM2 και rs75392628 (R47H)	43
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	46
ΣΚΟΠΟΣ	47
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες	49
Εργαστηριακές τεχνικές	49
Στατιστική ανάλυση	59
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	62
Μέτα-ανάλυση για τον rs6265 στο BDNF γονίδιο	62
Βιβλιογραφική αναζήτηση	62
Εξαγωγή δεδομένων	64
Στατιστική ανάλυση	66
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
Μελέτη ασθενών-μαρτύρων	68

Αποτελέσματα για τον rs6265 στο BDNF γονίδιο	68
Αποτελέσματα για τον rs75392628 στο TREM2 γονίδιο	70
ΣΥΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
Μέτα-ανάλυση για τον rs6265 στο BDNF γονίδιο	71
Διαδικασία επιλογής μελετών και χαρακτηριστικά των συμπεριλαμβανόμενων μελετών.....	71
Έλεγχος ετερογένειας	73
Publication Bias 73	
Αποτελέσματα 76	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	98
PRISMA-guidelines.....	98

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΔΥΣΤΟΝΙΑΣ

Ορισμός και ταξινόμηση της δυστονίας

Η δυστονία αποτελεί μια κινητική διαταραχή [1]. Ο όρος δυστονία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει είτε το σύμπτωμα της δυστονίας, είτε τη νόσο στην οποία η δυστονία αποτελεί το μοναδικό ή κύριο χαρακτηριστικό [2]. Πρόσφατα, ένας νέος ορισμός και μία νέα ταξινόμηση της δυστονίας, θεσπίστηκαν από ένα διεθνές πάνελ επιστημόνων. Σύμφωνα με αυτό, ο ορισμός της δυστονίας είναι ο εξής: *«Η δυστονία ορίζεται ως κινητική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από παρατεταμένες ή διαλείπουσες συσπάσεις των μυών που προκαλούν μη φυσιολογικές, συχνά επαναλαμβανόμενες, κινήσεις, στάσεις ή και τα δύο. Οι δυστονικές κινήσεις τυπικά έχουν μοτίβο και είναι στροφικές, και μπορεί να είναι τρομώδεις. Η δυστονία συχνά προκαλείται ή επιδεινώνεται από την εθελοντική δράση και σχετίζεται με την υπερβολική ενεργοποίηση των μυών»* [1]. Επίσης, και πάλι βάση αυτού η δυστονία ταξινομείται με βάση 2 κύριους άξονες: 1. τα κλινικά χαρακτηριστικά της (στα οποία συμπεριλαμβάνονται η ηλικία έναρξης αυτής, η σωματική της κατανομή, το χρονικό μοτίβο της και τα νευρολογικά χαρακτηριστικά της), και 2. την αιτιολογία της (που περιλαμβάνει την παθολογία του νευρικού συστήματος και την κληρονομικότητα) [1]. Η ταξινόμηση της δυστονίας με βάση το άρθρο των Albanesse et al. (2013), φαίνεται στον **Πίνακα 1** [1].

Με βάση τον άξονα 1 και ως προς τα κλινικά χαρακτηριστικά της, η δυστονία μπορεί να διακριθεί όπως περιγράφεται παρακάτω. Με βάση την ηλικία έναρξης μπορεί να ταξινομηθεί ως δυστονία στη(ν) : 1. βρεφική ηλικία (γέννηση έως 2 ετών), 2. παιδική ηλικία (3-12 ετών), 3. εφηβική ηλικία (13-20 ετών), 4. πρόωμη ενήλικος ζωή (21-40 ετών) και 5. όψιμη ενήλικος ζωή (> 40 ετών). Με βάση την κατανομή της στο σώμα ως: 1.εστιακή, 2.τμηματική, 3.πολυεστιακή, 4. γενικευμένη (με ή χωρίς εμπλοκή των ποδιών), και

5.ημιδυστονία. Σε σχέση με το χρονικό της μοτίβο κατά την πορεία της σε: 1.στατική και 2.προοδευτική και ως προς το μοτίβο μεταβλητότητας σε: 1.επίμονη, 2.ειδική κατά συγκεκριμένη δράση, 3. ημερήσιας διακύμανσης και 4.παροξυσμική [1].

Ως προς τα συνοδά χαρακτηριστικά μπορεί να ταξινομηθεί σε 1.μεμονωμένη δυστονία ή δυστονία συνδυασμένη με άλλη κινητική διαταραχή και σε 2. δυστονία με παρουσία άλλων νευρολογικών ή συστηματικών εκδηλώσεων [1]. Η πρώτη μπορεί περαιτέρω να διακριθεί σε 1.μεμονωμένη δυστονία (όπου η δυστονία αποτελεί το μόνο κινητικό χαρακτηριστικό, εξαιρουμένου του τρόμου) και 2.συνδυασμένη δυστονία (όπου η δυστονία συνδυάζεται με άλλες κινητικές διαταραχές, όπως ο παρκινσονισμός, ο μυόκλονος, κ.α.) [1].

Με βάση τον άξονα 2, δηλαδή την αιτιολογία της διακρίνεται ως προς την παθολογία του νευρικού συστήματος σε δυστονία: 1. με αποδεικτικά στοιχεία εκφυλισμού, 2. με αποδεικτικά στοιχεία δομικών (συχνά στατικών) βλαβών και 3. χωρίς στοιχεία για εκφυλισμού ή δομικής βλάβης. Ως προς την κληρονομικότητα σε δυστονία: 1. κληρονομική (με αυτοσωμικό κυρίαρχο τρόπο κληρονομικότητας, αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας, υπολειπόμενο που συνδέεται με το χρωμόσωμα X, και μιτοχονδριακή) ή 2. επίκτητη (οφειλόμενη σε περιγεννητικό τραυματισμό εγκεφάλου, λοίμωξη, φάρμακα, τοξικούς παράγοντες, αγγειακούς παράγοντες, νεοπλασίες, τραυματισμό εγκεφάλου ή ψυχογενής). Τέλος μπορεί να διακριθεί σε ιδιοπαθή ή οικογενής [1].

Πίνακας 1. Ταξινόμηση δυστονίας [1].

Άξονας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά

Ηλικία έναρξης

1. βρεφική ηλικία (γέννηση έως 2 ετών)
2. παιδική ηλικία (3-12 ετών)
3. εφηβική ηλικία (13-20 ετών)
4. πρώιμη ενήλικος ζωή (21-40 ετών)
5. όψιμη ενήλικος ζωή (> 40 ετών)

Κατανομή της στο σώμα

- 1.εστιακή
- 2.τμηματική

- 3. πολυεστιακή
 - 4. γενικευμένη (με ή χωρίς εμπλοκή των ποδιών)
 - 5. ημιδυστονία
 - Χρονικό μοτίβο
 - Πορεία νόσου
 - 1. στατική
 - 2. προοδευτική
 - Μεταβλητότητα
 - 1. επίμονη
 - 2. ειδική κατά συγκεκριμένη δράση
 - 3. ημερήσιας διακύμανσης
 - 4. παροξυσμική
 - Συνοδά χαρακτηριστικά
 - 1. μεμονωμένη δυστονία ή δυστονία συνδυασμένη με άλλη κινητική διαταραχή
 - 1. μεμονωμένη δυστονία
 - 2. συνδυασμένη δυστονία
 - 2. δυστονία με παρουσία άλλων νευρολογικών ή συστηματικών εκδηλώσεων
 - 1. Κατάλογος με συνυπάρχουσες νευρολογικές εκδηλώσεις
 - Άξονας 2. Αιτιολογία
 - Παθολογία του νευρικού συστήματος
 - 1. με αποδεικτικά στοιχεία εκφυλισμού
 - 2. με αποδεικτικά στοιχεία δομικών (συχνά στατικών) βλαβών
 - 3. χωρίς στοιχεία για εκφυλισμού ή δομικής βλάβης
 - Κληρονομική ή επίκτητη
 - Κληρονομική
 - αυτοσωμικό κυρίαρχο τρόπο
 - αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο
 - υπολειπόμενο που συνδέεται με το χρωμόσωμα X
 - μιτοχονδριακή
 - Επίκτητη
 - περιγεννητικός τραυματισμός εγκεφάλου
 - λοιμώξη
 - φάρμακα
 - τοξικοί παράγοντες
 - αγγειακοί παράγοντες
 - νεοπλασίες
 - τραυματισμός εγκεφάλου
 - ψυχογενής
 - Ιδιοπαθής
 - Σποραδική
 - Οικογενής
-

Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο επιπολασμός της δυστονίας δεν είναι γνωστός, ωστόσο φαίνεται πως οι ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από δυστονία, να είναι σε ποσοστό, περίπου το ~ 20% εκ των πασχόντων από κινητικές διαταραχές ασθενών [3]. Γενικά ο επιπολασμός της δυστονίας εκτιμάται πως είναι περίπου στο 430 ανά εκατομμύριο [4]. Η ιδιοπαθής μεμονωμένη δυστονία και οι γενετικές μορφές δυστονίας φαίνεται πως είναι σχετικά πιο συχνές [5]. Όσον αφορά τη συχνότητα σε σχέση με την ηλικία εμφάνισης, τα ποσοστά της δυστονίας φαίνεται να αυξάνονται με την ηλικία, ενώ η ηλικία έναρξης μπορεί να διαφέρει μεταξύ των εθνοτήτων [5]. Σχετικά με την επιδημιολογία της δυστονίας ως προς την κατανομή της, ο βλεφαρόσπασμος και η αυχενική δυστονία θεωρούνται οι πιο συνηθισμένες μορφές εστιακής δυστονίας. Ο επιπολασμός του βλεφαρόσπασμου κυμαίνεται από 16 έως 133 ανά εκατομμύριο [4], ενώ η αυχενική δυστονία φαίνεται να έχει επιπολασμό 0,28% στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής [6]. Ο βλεφαρόσπασμος πιστεύεται ότι είναι λιγότερο κοινός από την αυχενική δυστονία, ωστόσο, στην Ιαπωνία και στην Ιταλία, το ο βλεφαρόσπασμος είναι πιο διαδεδομένος σε σύγκριση με την αυχενική δυστονία [7].

Παθοφυσιολογικά στοιχεία

Οι ακριβείς παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί οι οποίοι οδηγούν στην δυστονία δεν είναι γνωστοί [2]. Αρκετοί παθοφυσιολογικοί και μοριακοί μηχανισμοί, έχουν αναφερθεί να προδιαθέτουν στην εμφάνιση της δυστονίας, στους οποίους περιλαμβάνονται, ανωμαλίες στο αισθητικό σύστημα [8], αλλαγές στην νευρωνική πλαστικότητα [9], διαταραχές στο επίπεδο των βασικών γαγγλίων [2] καθώς και συμμετοχή της παρεγκεφαλίδας [10] και του ντοπαμινεργικού συστήματος [11]. Σε γενικές γραμμές, δεδομένα από νευροπαθολογικές μελέτες, δεν έχουν καταφέρει έως τώρα να αναδείξουν σταθερά και επαναλαμβανόμενα

αποτελέσματα, που να αφορούν ανωμαλίες σε μακροσκοπικό ή μικροσκοπικό επίπεδο στον εγκέφαλο [2, 12]. Κάποια αποτελέσματα (όπως π.χ. απώλεια των κυττάρων του Purkinje και το αξονικό οίδημα στην παρεγκεφαλίδα ασθενών με αυχενική δυστονία [10], ή τα κυτταροπλασματικά έγκλειστα στους πυρήνες του εγκεφάλου στελέχους σε άτομα με TOR1A δυστονία [13]) χρειάζονται επανάληψη και περαιτέρω επιβεβαίωση [2, 12].

Μελέτες θεωρούν τη δυστονία ως μία “network disorder”, στην οποία συμμετέχουν, τα βασικά γάγγλια, η παρεγκεφαλίδα, ο θάλαμος και ο φλοιός [12]. Δηλαδή στη δυστονία εμπλέκεται ένα «βασικά γάγγλια-παρεγκεφαλίδα-θάλαμος-φλοιός κύκλωμα» [12]. Γενικά, η θεωρία του δικτύου, όπως προαναφέρθηκε, ίσως να μπορεί να εξηγήσει, σε κάποιο βαθμό, την αιτία για την οποία, είναι τόσο δύσκολο να εντοπιστεί μία παθολογική περιοχή στη δυστονία [2].

Αντιμετώπιση

Με δεδομένο ότι ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός της δυστονίας δεν είναι γνωστός, η αντιμετώπιση της παραμένει συμπτωματική και εξαρτάται κυρίως από την σοβαρότητα της και την κατανομή της στο σώμα [2]. Η έγχυση αλλαντικής τοξίνης προτιμάται σε περιπτώσεις κυρίως εστιακής δυστονίας (αλλά και τμηματικής) [14, 15], ενώ σε περιπτώσεις γενικευμένης δυστονίας φάρμακα όπως η μπακλοφένη, η λεβοντόπα, βενζοδιαζεπίνες, αντιχολινεργικοί και αντιντοπαμινεργικοί παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν [2]. Στις περιπτώσεις που αναγνωρίζεται κάποιο αίτιο που προκαλεί τη δυστονία ή κάποιο σύνδρομο, στην θεραπευτική στρατηγική εντάσσεται και η αντιμετώπιση αυτού [16]. Συμπληρωματική φυσικοθεραπεία [17, 18] και μη επεμβατικές μέθοδοι διέγερσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Ο εν τω βάθει εγκεφαλικός ερεθισμός [deep brain stimulation (DBS)] φαίνεται να αποτελεί την αποτελεσματικότερη θεραπεία για ασθενείς με μεγάλη

αναπηρία, τόσο στην γενικευμένη όσο και στην εστιακή και τμηματική δυστονία [19, 20].

Τέλος αρκετές φαρμακευτικές και μη μελέτες, σχεδιάζονται ή βρίσκονται σε εξέλιξη [2, 14].

SNPs

Γενικά για τους SNPs

Ένας πολυμορφισμός είναι μια παραλλαγή στην αλληλουχία DNA που εμφανίζεται σε έναν πληθυσμό με συχνότητα 1% ή μεγαλύτερη [21]. Όταν μια παραλλαγή εμφανίζεται σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο, σε μια συγκεκριμένη θέση του γονιδιώματος, ονομάζεται single nucleotide polymorphism (SNP) [22]. Οι SNPs μπορούν να εμφανιστούν εντός κωδικοποιών περιοχών, σε μη κωδικοποιούσες περιοχές, στα ιντρόνια ή σε περιοχές μεταξύ των γονιδίων [23]. Ένας SNP μπορεί να χαρακτηριστεί ως συνώνυμος (όταν η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης δεν μεταβάλλεται) και μη-συνώνυμος (όταν η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης μεταβάλλεται) [24]. Οι μη-συνώνυμοι SNPs χωρίζονται σε missence (όταν οδηγούν σε διαφορετικό αμινοξύ) και non-sense (όταν οδηγούν κωδικόνιο λήξης) [24].

ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΩΝ ΔΥΣΤΟΝΙΩΝ

Μονογονιδιακές μορφές της δυστονίας

Αρκετές μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια έχουν εντοπιστεί στις κληρονομικές μονογονιδιακές μορφές της δυστονίας [25-27]. Γενετικοί τόποι, οι οποίοι έχουν ενοχοποιηθεί κατά καιρούς για τις μονογονιδιακές της δυστονίας είναι προσβάσιμες στο “Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders” (<https://www.omim.org/>). Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται συνοπτικά στο **Πίνακα 2** αυτοί οι γενετικοί τόποι. Προηγούμενα reviews σχετικά με τη γενετική της δυστονίας [2, 25, 28-32] χρησιμοποιήθηκαν συμβουλευτικά.

Πίνακας 2: Γονίδια και γενετικοί τόποι οι οποίοι έχουν συνδεθεί με μονογονιδιακές μορφές δυστονίας. “Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders”

Σύμβολο	Γονίδιο/Περιοχή	Τοποθεσία	Κύριος τρόπος κληρονομικότητας	Φαινότυπος (MIM νούμερο)	Γονίδιο/Περιοχή (MIM νούμερο)
DYT1	TOR1A	9q34.11	ΑΕ	128100	605204
DYT2	HPCA	1p35.1	ΑΥ	224500	142622
DYT3	TAF1	Xq13.1	ΦΥ	314250	313650
DYT4	TUBB4A	19p13.3	ΑΕ	128101	602662
DYT5b	TH	11p15.5	ΑΥ	605407	191290
DYT5 ¹	GCH1	14q22.2	ΑΕ,ΑΥ	128230	600225
DYT6	THAP1	8p11.21	ΑΕ	602629	609520
DYT7	?	18p	ΑΕ	602124	?
DYT8	MR1	2q35	ΑΕ	118800	609023
DYT10	PRRT2	16p11.2	ΑΕ	128200	614386
DYT11	SGCE	7q21.3	ΑΕ	159900	604149
DYT12	ATP1A3	19q13.2	ΑΕ	128235	182350
DYT13	?	1p36.32-p36.13	ΑΕ	607671	?
DYT14	GCH1	14q22.2	ΑΕ, ΑΥ	128230	600225
DYT15	?	18p11	ΑΕ	607488	?
DYT16	PRKRA	2q31.2	ΑΡ	612067	603424
DYT17	?	20p11.2-q13.12	ΑΡ	612406	?
DYT18 ²	SLC2A1	1p34.2	ΑΕ	601042	138140
DYT19	?	16q13-q22.1	ΑΕ	611031	?
DYT20	?	2q31	ΑΕ	611147	?
DYT21	?	2q14.3-q21.3	ΑΕ	614588	?
DYT22	Not listed in OMIM				

DYT23	CACNA1B	9q34.3	AE	614860	601012
DYT24	ANO3	11p14.3-p14.2	AE	615034	610110
DYT25	GNAL	18p11.21	AE	615073	139312
DYT26	KCTD17	22q12.3	AE	616398	616386
DYT27	COL6A3	2q37.3	AY	616411	120250
DYT28	KMT2B	19q13.12	AE	617284	606834
DYT29	MECR	1p35.3	AY	617282	608205

¹Παλαιότερα διακρινόταν ως DYT5a (GCH1) και DYT5b (TH, 11p15.5, AR, 605407, 191290)

²Παλαιότερα ταξινομούμενο ως DYT 9

³AE, Αυτοσωμικός επικρατής. AY υπολειπόμενος. ΦΥ, φυλοσύνδετος υπολειπόμενος.

Γενετικοί παράγοντες κινδύνου στη δυστονία

Επιπλέον, σύμφωνα με αποτελέσματα από μελέτες ασθενών-μαρτύρων, συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι έχουν συσχετισθεί με τη δυστονία [25, 29]. Πιο συγκεκριμένα, στην σποραδική δυστονία, πολλά γονίδια έχουν συνδεθεί με διάφορους φαινοτύπους δυστονίας συμπεριλαμβανομένου (αλλά χωρίς να περιορίζονται σε αυτά) των *torsinA* (TOR1A), *b-cystathionine synthase* (CBS), *GTP cyclohydrolase1* (GCH1), *dopamine D5 receptor* (DRD5) και *brain-derive neurotrophic factor* (BDNF) [33-43]. Επιπλέον, το γονίδιο *apolipoprotein E* (APOE) έχει βρεθεί να επηρεάζει την ηλικία κατά την έναρξη της δυστονίας [44]. Ωστόσο, τα γονίδια *TOR1A* και *BNDF* παραμένουν τα πιο εκτενώς μελετημένα στη δυστονία [45].

Οι γενετικές μελέτες ολόκληρου του γονιδιώματος [genome wide association studies (GWASs)] σε ασθενείς με δυστονία έχουν δείξει ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της *arylsulfatase G* (ARSG) ίσως να προσδώσουν ευαισθησία στη δυστονία του μουσικού και μεταλλάξεις στο *sodium leak channel* (NALCN) σε ασθενείς με αυχενική δυστονία [46, 47].

Παρακάτω παρουσιάζονται οι κυριότεροι γενετικοί παράγοντες κινδύνου στη δυστονία:

TOR1A

Το γονίδιο TOR1A, αποτελείται από πέντε εξόνια και καλύπτει μια περιοχή μεγέθους 11 Kb, και εδράζεται στο χρωμόσωμα 9. Η πρωτεΐνη TOR1A, που ονομάζεται TorsinA, ανήκει στην οικογένεια των AAA + ATPases. Βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο πυρηνικό περίβλημα των περισσότερων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων του κεντρικού νευρικού συστήματος [29]. Η λειτουργία της TorsinA και ο τρόπος με τον οποίο οι παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου TOR1A οδηγούν σε δυστονία παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη [48]. Σε μοριακό επίπεδο δρα κυρίως ως τσαπερόνη [49]. Οι μοριακές και κυτταρικές διαδικασίες, στις οποίες εμπλέκεται η TorsinA, περιλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης, σημαντικές λειτουργίες του ενδοπλασματικού δικτύου και του πυρηνικού περιβλήματος και τη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού των λιπιδίων [29, 50-52]. Είναι γνωστό ότι χρειάζεται η TorsinA να συνδεθεί με την TOR1AIP2 (Torsin 1A Interacting Protein 2) ή με την Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 8 (HSPA8) προκειμένου να ενεργοποιηθεί [53], μια διαδικασία η οποία είναι διαταραγμένη όταν υπάρχει η GAG deletion, όπως έχει επιβεβαιωθεί με κρυσταλλογραφία [54, 55].

Το TOR1A γονίδιο παραμένει το πιο εκτεταμένα μελετημένο γονίδιο τόσο στις μονογονιδιακές όσο και στις σποραδικές μορφές δυστονίας [29]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από τις μελέτες ασθενών-μαρτύρων έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα, ενώ επίσης οι συσχετίσεις επηρεάζονται από την κατανομή της δυστονίας στο σώμα, την εθνικότητα και άλλες συνοδές φαινοτυπικές εκδηλώσεις. Έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα αρκετές μελέτες ασθενών μαρτύρων [37, 41, 43, 56-70] και έχουν διερευνηθεί αρκετές γενετικές παραλλαγές του TOR1A γονιδίου (rs1801968, rs2296793, rs1182, rs3842225, rs13283584, rs11787741, rs13297609, rs2287367, rs1043186 και rs35153737). Εκτός από τις μελέτες ασθενών-

μαρτύρων, έχουν εντοπιστεί διάφορες παραλλαγές μέσω ελέγχου (screening) για διάφορες μεταλλάξεις στο TOR1A γονίδιο (rs766483672, rs80358233, rs75881350, rs1183, rs563498119, rs573629050, rs1045441, rs144572721) [71]. Επιπλέον, οι μέχρι τώρα μετα-αναλύσεις, έχουν δείξει, μια σημαντική συσχέτιση του rs1182 και του rs1801968 του TOR1A με την ανάπτυξη εστιακής δυστονίας και με τη δυστονία του συγγραφέα αντίστοιχα [72]. Επιπλέον, οι γενετικές παραλλαγές, εντός του 3'UTR, που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 5, φαίνεται πως αντιπροσωπεύουν έναν επιπλέον λειτουργικό γενετικό τόπο του TOR1A, αν και αυτό μπορεί να συμβαίνει με συνεργική δράση με άλλες γενετικές παραλλαγές TOR1A [72]. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με μια πρόσφατη μελέτη ασθενών μαρτύρων, στην οποία βρέθηκε μια σύνδεση του rs35153737 στο 3'UTR τμήμα του TOR1A γονιδίου με τη δυστονία, ένα αποτέλεσμα όμως, το οποίο αποδόθηκε σε λειτουργικές παραλλαγές οι οποίες βρίσκονται σε υψηλή ανισορροπίας γενετικής σύνδεσης [linkage disequilibrium (LD)] [70].

Από λειτουργικής άποψης, οι γενετικοί τόποι που περιέχουν τις προαναφερθείσες γενετικές παραλλαγές, φαίνεται να έχουν συνέπειες στη λειτουργία του γονιδίου [72]. Όπως για παράδειγμα οι παραλλαγές μεταξύ του εξονίου 4 και της 3'UTR περιοχής του TOR1A γονιδίου που κωδικοποιείται από το εξόνιο 5, φαίνεται να επηρεάζουν συνολικά τη λειτουργία του γονιδίου TOR1A [72]. Ειδικότερα, ο rs1801968 σχετίζεται με μειωμένη διείσδυση της παθογόνου παραλλαγής ΔGAG στους ανθρώπους [73, 74]. Όσον αφορά την 3'UTR περιοχή του εξονίου 5, υπάρχουν μόνο κάποιες ενδείξεις ότι συγκεκριμένες παραλλαγές σε αυτή την περιοχή μπορεί να έχουν κάποιες λειτουργικές συνέπειες υπό συνεργική δράση [70, 72]. Είναι ενδιαφέρον ότι, ο rs563498119 στο 3'UTR τμήμα του TOR1A αναφέρθηκε ότι μεταβάλλει την έκφραση του γονιδίου TOR1A [71]. Η ρύθμιση της έκφρασης του TOR1A γονιδίου, μεταλλάσσοντας την περιοχή της θέσης πρόσδεσης του

ανθρώπινου microRNA (hsa-miR-494), όπου βρίσκεται ο rs563498119, θα μπορούσε να υποδηλώνει πως το hsa-miR-494 είναι ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος στη δυστονία [71].

BDNF

Μεταξύ των σημαντικότερων μηχανισμών που εμπλέκονται στη δυστονία περιλαμβάνονται η μειωμένη αναστολή του κινητικού συστήματος και η διαταραχή της νευρωνικής πλαστικότητα [75]. Πιο συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί αυξημένη πλαστικότητα στην περιοχή αντιπροσώπευσης του χεριού στον κινητικό φλοιό σε ασθενείς με εστιακή δυστονία χεριού, βλεφαρόσπασμο και αυχενική δυστονία [76]. Συνεπώς, η μη φυσιολογική πλαστικότητα σε ορισμένα κυκλώματα του κινητικού φλοιού μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα χαρακτηριστικό ορισμένων μορφών δυστονίας στους ενήλικες [76, 77].

Η συναπτική πλαστικότητα επηρεάζεται από τον BDNF. Ένας κοινός SNP του γονιδίου BDNF στην prodomain περιοχή, είναι ο rs6265, που οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη (Val) στη θέση 66 με το αμινοξύ μεθειονίνη (Met) (Val → Met), μια αντικατάσταση που πιθανώς επηρεάζει τη συναπτική πλαστικότητα [78-80], και πιθανώς εμπλέκεται στην ανάπτυξη δυστονίας. Οι υγιείς φορείς του val66met φαίνεται ότι έχουν διαφορές στη δομή του εγκεφάλου και μη κανονική πλαστικότητα του κινητικού φλοιού [81, 82]. Αναλυτικά στοιχεία για το γονίδιο BDNF και τον rs6265 περιγράφονται και παρακάτω στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής σχετικά με το ρόλο του rs6265 στη δυστονία έχουν δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, ο rs6265 έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με αυχενική δυστονία και βλεφαρόσπασμο σε πολυεθνικές και κινεζικές κοόρτες ασθενών αντίστοιχα [38, 39]. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε υψηλότερη συχνότητα αμφοτερόπλευρου τρόμου χεριός σε ασθενείς με αυχενική δυστονία σε ασθενείς

που έφεραν την παραλλαγή BDNF Met66Met, σε σύγκριση με τους φορείς Val66Met και Val66Val [83]. Εντούτοις, αυτά τα αποτελέσματα δεν έχουν αναπαραχθεί σε ασθενείς με δυστονία από τη Σερβία, την Κίνα, την Ιταλίας και Καυκάσιους πληθυσμούς [77, 84-86]. Οι μέτα-αναλύσεις που αξιολόγησαν, μέχρι στιγμής, την επίδραση του rs6265 στη δυστονία έχουν επίσης παράξει αντικρουόμενα αποτελέσματα [40, 86]. Η πιο πρόσφατη αναφέρει μία στατιστικά σημαντική επίδραση του γονότυπου AA του rs6265 στην ανάπτυξη της ιδιοπαθούς δυστονίας [40]. Εντούτοις, η έλλειψη αναπαραγωγιμότητας των θετικών αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί, μεταξύ άλλων, στις στατιστικές μεθόδους οι οποίες χρησιμοποιούνται [87], στην πιθανή επίδραση των επιγενετικών μηχανισμών στη γονιδιακή λειτουργία του BDNF (όπως για παράδειγμα η μεθυλίωση του DNA) [88], καθώς και στο γεγονός ότι επιπρόσθετες γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο BDNF μπορούν να επηρεάζουν τα επίπεδα του BDNF στον ορό και τη λειτουργία του γονιδίου [89]. Το BDNF μπορεί να θεωρηθεί ως δυνητικός θεραπευτικός στόχος στη δυστονία, όπως και σε άλλες νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές [90-92].

APOE

Η απολιποπρωτεΐνη E είναι το προϊόν του γονιδίου APOE, το οποίο συνδέεται με λιπίδια για να σχηματίσει λιποπρωτεΐνες. Υπάρχουν τουλάχιστον τρία αλληλόμορφα (e2, e3, και e4) του γονιδίου APOE, με το πιο κοινό να είναι το e3. Η κύρια λειτουργία των λιποπρωτεϊνών είναι η μεταφορά της χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων σε όλους τους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος [93]. Το αλληλόμορφο e4 συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο Αλτσχάιμερ, σε σύγκριση με το αλληλίλο e3, ενώ το αλληλίλο e2, με μειωμένο κίνδυνο αυτής [94]. Όπως το BDNF, έτσι και η APOE μπορεί επίσης να επηρεάσει τη νευρωνική πλαστικότητα και αναδιαμόρφωση [38, 44]. Σε μια

μελέτη σε Ιαπωνικό πληθυσμό, βρέθηκε ότι οι φορείς του e4 αλληλίου ανέπτυξαν δυστονία κατά μέσο όρο περίπου 10 χρόνια νωρίτερα από τους μη-φορείς του e4 [38, 44]. Η TorsinA εμπλέκεται επίσης στο μεταβολισμό των κυτταρικών λιπιδίων [50]. Επομένως, οι παραλλαγές που επηρεάζουν τη βιολογία των λιπιδίων μπορούν να συμβάλουν στη δυστονία. Οι Matsumoto και συν., στη μελέτη τους θεώρησαν ότι το e4 αλληλόμορφο μπορεί ίσως να επηρεάσει σοβαρά τη νευρωνική αναδιοργάνωση και τη νευρωνική αποκατάσταση, πράγμα το οποίο μπορεί να οδηγεί σε μια μικρότερη ηλικία εμφάνισης δυστονίας [44]. Συνεπώς, είναι πιθανό ότι οι γενετικές παραλλαγές των γονιδίων TOR1A, BDNF και APOE ή ακόμα και σε άλλων γονιδίων κάτω από συνεργική δράση, να επηρεάζουν τη φαινοτυπική εκδήλωση της δυστονίας.

THAP 1

Περίπου εκατό, missense, nonsense και frameshift γενετικές παραλλαγές, στο μεγαλύτερο τμήμα της κωδικοποιού περιοχής του «thanatos associated protein domain containing, apoptosis associated protein 1» (THAP1) γονιδίου, έχουν συσχετιστεί με δυστονία [25, 42, 95] σε γενετικά διαφορετικούς πληθυσμούς [29]. Η THAP1 θεωρείται ότι ρυθμίζει τη μεταγραφή αρκετών βασικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου TOR1A [29, 96].

Οι μελέτες ασθενών μαρτύρων σε σχέση με τον ρόλο γενετικών παραλλαγών του THAP1 γονιδίου σε ασθενείς με δυστονία είναι σχετικά περιορισμένες [43, 56], λόγω κυρίως της σπανιότητας των γενετικών παραλλαγών του THAP1 γονιδίου. Ως εκ τούτου, τα περισσότερα ευρήματα σχετικά με το ρόλο του THAP1 γονιδίου προέρχονται από τον screening για μεταλλάξεις κατά μήκος αυτού [42, 95, 97-103]. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι η συχνότητα του αλληλόμορφου C της παθογόνου παραλλαγής c.71+126T>C είναι αυξημένη σε Βρετανούς ασθενείς με δυστονία [97]. Μια άλλη γενετική παραλλαγή επίσης,

γνωστή ως -237_236GA>TT, βρέθηκε να είναι αυξημένη σε Ευρωπαίους ασθενείς με δυστονία [101], αλλά τα αποτελέσματα αυτά δεν μπόρεσαν να αναπαραχθούν σε άλλες μελέτες [97, 98, 104]. Επιπλέον, η γενετική παραλλαγή IVS2-87 A> G (rs11989331) βρέθηκε να είναι σχετικά συχνή στη δυστονία σε μια μελέτη από την Ινδία [102]. Ακόμη η συχνότητα του ελάσσονος αλληλίου του rs200209986 βρέθηκε επίσης να είναι σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με δυστονία σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες στη μελέτη των Vemula και συν., και σε σύγκριση με δεδομένα από τη βάση «1000 Genomes project», αλλά όχι σε σύγκριση με τη βάση τα δεδομένα από την «EVS database» [103].

Η μεγάλη ποσότητα παθογόνων γενετικών παραλλαγών του THAP1 που συνδέονται με τη δυστονία μπορεί να υποδηλώνει μια αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων [105], τον τύπο της εργασίας των ασθενών ή την έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τα φυτοφάρμακα, που ενδέχεται να προδιαθέτουν στην ανάπτυξη της δυστονίας [31, 42, 95].

GNAL, TAF1, GCH1, MR-1 (PNKD), SGCE, ATP1A3, PRKRA, HLA DRB, CBS, MTHFR και MS

Το GNAL (guanine nucleotide-binding protein subunit alpha L) έχει αναφερθεί ως υπεύθυνο για δυστονία με εκδήλωση στην ενήλικη ζωή, η οποία είναι φαινοτυπικά πρωτίστως αυχενική ή κρανιακή [106]. Ορισμένες γενετικές παραλλαγές του GNAL (rs9303742, rs8095592, rs72865259, rs1647556, rs200508915, rs138151459, rs2071140, rs138151459, rs2071140, rs2071141, rs199571902) εξετάστηκαν για συσχέτιση με γενικευμένη, πολυεστιακή, τμηματική και εστιακή δυστονία [107]. Παρά το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία για τη συσχέτιση αυτών με τη δυστονία, συνεχώς βρίσκονται νέες γενετικές παραλλαγές σε ασθενείς με δυστονία με διάφορους φαινότυπους

[107], έχοντας οδηγήσει σε περίπου 30 διαφορετικές παραλλαγές του GNAL σε ασθενείς με δυστονία [25]. Το GNAL κωδικοποιεί την guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha [Gα(olf)]. Το Gα (olf) εμπλέκεται τόσο στην άμεση όσο και στην έμμεση οδό προς την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, με τη σύζευξη των υποδοχέων ντοπαμίνης τύπου 1 και των υποδοχέων A2A αδενοσίνης στους medium spiny νευρώνες, αντίστοιχα [106]. Στην πραγματικότητα, η εμπλοκή στην έμμεση οδό της ενεργοποίησης οδηγεί στην ενεργοποίηση της adenylyl cyclase type 5 (AC5). Η AC5 κωδικοποιείται από το γονίδιο adenylyl cyclase 5 (ADCY5), το οποίο αναφέρθηκε ότι ίσως εμπλέκεται στη δυστονία [108]. Είναι πιθανό ότι το το φαινόμενο της επίστασης επηρεάζει την αιτιολογική επίδραση των γενετικών παραλλαγών του GNAL και του ADCY5.

Ο Newman και συν., το 2012, εκτός από τα γονίδια TOR1A, THAP1, τα οποία περιγράφονται σε προηγούμενα κεφάλαια, γονοτύπησαν αρκετές παραλλαγές και άλλων γονιδίων [TAF1, GCH1, MR-1 (PNKD), SGCE, ATP1A3 και PRKRA] σε ασθενείς με δυστονία [43]. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά όσον αφορά αρκετές γενετικές παραλλαγές στα γονίδια TAF1, MR-1 (PNKD), SGCE, ATP1A3 και PRKRA, αλλά παρατηρήθηκαν ασθενείς συσχετίσεις για τους rs12147422, rs3759664 και rs10483639 GCH1 (GTP cyclohydrolase 1) γονιδίου, όταν συγκρίθηκε η συνολική, μη ομογενής φαινοτυπικά ομάδα ασθενών με δυστονία, με τους υγιείς μάρτυρες [43]. Η έλλειψη αναπαραγωγιμότητας αυτών των συσχετίσεων μπορεί να υποδηλώνει την ανάγκη συλλογικών μελετών με μεγαλύτερα δείγματα ασθενών [109]. Παρόλα αυτά, η GCH1 ανήκει στα αιτιολογικά γονίδια της ντοπα-ανταποκρινόμενης δυστονίας (dopa-responsive dystonia). Επιπλέον, η διείσδυση των παθογόνων παραλλαγών της GCH1 φαίνεται να είναι σημαντικά υψηλότερη στις γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες [110]. Οι γενετικές παραλλαγές της GCH1, οδηγούν σε ανεπάρκεια ντοπαμίνης και σεροτονίνης [111].

Τέλος, δεν υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για τη συσχέτιση μεταξύ γεντικών παραλλαγών των γονιδίων HLA-DRB HLA-DRB, cystathionine β-synthase (CBS), methionine tetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MS), με δυστονία [37].

Dopamine pathway γονίδια (DAT1, DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, DRD5, COMT, DAT, TH, MAO-A και -B, DDC και DBH)

Για τις δυστονικές κινήσεις έχει ενοχοποιηθεί μεταξύ άλλων και η διαταραγμένη λειτουργία και διαταραχές της ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης και σηματοδότησης στα βασικά γάγγλια [112]. Η υπόθεση της εμπλοκής του ντοπαμινεργικού συστήματος στην παθοφυσιολογία της δυστονίας έχει επίσης ενισχυθεί, μέσω των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί σε γονίδια της οδού ντοπαμίνης σε μονογενείς μορφές δυστονίας [113]. Το αλληλόμορφο 2 του DRD5 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αυχενικής δυστονίας και βλεφαρόσπασμου σε βρετανικούς ασθενείς [34, 36]. Ακόμη τα αλληλόμορφα 6 και 4 του DRD5 έχουν συσχετιστεί με την αυχενική δυστονία σε βρετανικές και ιταλικές ομάδες ασθενών [33, 36], υποστηρίζοντας έτσι έντονα τη συμμετοχή του γονιδίου DRD5 στη δυστονία [35]. Ωστόσο, το DRD5 δεν έχει συσχετιστεί με δυστονία σε μελέτες από την Ιταλία, την Γερμανία και την Αμερική [37, 68]. Αν και υπάρχουν αρνητικά αποτελέσματα σχετικά με τα γονίδια που εμπλέκονται στην οδό της ντοπαμίνης [68, 114, 115], οι Groen και συν., υποθέτουν ότι οι αλλαγές στα επίπεδα ντοπαμίνης μπορεί να είναι δευτερογενείς κατά στη δυστονία και ότι σπάνιες νουκλεοτιδικές παραλλαγές των γονιδίων της ντοπαμίνης συνδέονται πιθανώς με αυτή [116].

ARSG, NALC, OR4X2, COL4A1

Οι γενετικές μελέτες ολόκληρου του γονιδιώματος [genome wide association studies (GWASs)] σε ασθενείς με δυστονία έχουν δείξει ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της arylsulfatase G (ARSG) ίσως να προσδίδουν ευαισθησία στη δυστονία του μουσικού και μεταλλάξεις στο sodium leak channel (NALCN) σε ασθενείς με αυχενική δυστονία [46, 47].

Πιο αναλυτικά σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τις GWASs, υπάρχει μια προκαταρκτική ένδειξη ότι οι παραλλαγές στα γονίδια ARSG και NALCN παίζουν κάποιον ρόλο στη δυστονία [46, 47].

Στην GWAS από τους Lohmann και συν., ο ιντρονικός πολυμορφισμός rs11655081 του γονιδίου ARSG συσχετίστηκε με τη δυστονία του μουσικού και την κράμπες του συγγραφέα [46]. Ο missense rs61999318 ήταν σημαντικά υψηλότερος στην ομάδα των ασθενών κράμπα του συγγραφέα σε σύγκριση με τους Ευρωπαίους Αμερικανούς στη βάση δεδομένων «EVS» [117]. Η λειτουργική ανάλυση υποδεικνύει ότι το rs61999318 μπορεί να αντιπροσωπεύει μια λειτουργική παραλλαγή, καθώς η υποκείμενη υποκατάσταση αμινοξέος της ισολευκίνης στη θέση 493 με θρεονίνη (p.I493T), φαίνεται να προκαλεί την ασθένεια [117]. Η ARSG είναι η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ARSG γονίδιο και υδρολύει τους θειικούς εστέρες και συνεπώς εμπλέκεται μεταξύ άλλων στην κυτταρική σηματοδότηση, στη σύνθεση των ορμονών και στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών [118, 119].

Σύμφωνα με τη GWAS των Mok και συν. αρκετές παραλλαγές κοντά στο εξόνιο 1 του NALCN γονιδίων βρέθηκαν να προσεγγίζουν το όριο στατιστική σημαντικότητας σε ένα βρετανικό πληθυσμό ασθενών με αυχενική δυστονία [47]. Οι στατιστικά πιο σημαντικές παραλλαγές ήταν στο γονίδιο NALCN (rs61973742, rs1338051, rs9518385, rs9518384, rs1338041 rs3916908), στο γονίδιο COL4A1 (rs619152), στο γονίδιο RGL1 (rs12132318),

στο γονίδιο OR4X2 3 (rs67863238), καθώς και διαγονιδιακά (rs1249277, rs1249281, rs9416795), KIAA1715 (rs10930717) OR4B1 (rs35875350) [47]. Ωστόσο, σε μία μελέτη ασθενών μαρτύρων, με σκοπό να αναπαράξουν τα αποτελέσματα της GWAS, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση των γενετικών παραλλαγών που βρέθηκαν στην GWAS, στα γονίδια NALCN, OR4X2, COL4A1 καθώς και των διαγονιδιακών παραλλαγών [120]. Επίσης τα αποτελέσματα για το NALCN (rs1338041, rs61973742) επίσης δεν αναπαράχθηκαν σε κινεζικό πληθυσμό [121]. Η κύρια λειτουργία του NALCN είναι η μεταφορά νατρίου στις νευρωνικές μεμβράνες, καθώς και η ρύθμιση της νευρωνικής διεγέρσεως [122]. Γενικά, οι παραλλαγές στα γονίδια, των οποίων η πρωτεΐνη δρα επίσης ως κανάλι ιόντων, αποτελούν κρίσιμα στοιχεία και μπορεί να είναι πρόσθετοι παράγοντες για την ανάπτυξη της δυστονίας [46], όπως το γονίδιο ANO3 που συγκαταλέγεται μεταξύ των γονιδίων που προκαλούν μια μονογονιδιακή μορφή καθυστερημένης κρανιο-αυχενικής δυστονίας [25, 123].

ΒΛΕΦΑΡΟΣΠΑΣΜΟΣ

Κλινική εικόνα

Ο βλεφαρόσπασμος είναι ένας υπο-φαινότυπος εστιακής δυστονίας και προέρχεται από ακούσιους σπασμούς του σφιγκτήρα μυ του βλεφάρου [124]. Είναι συνήθως αμφοτερόπλευρος, συμμετρικός και σύγχρονος [125]. Εκτός από τους ακούσιους σπασμούς του σφιγκτήρα μυ του βλεφάρου, και επιπλέον κινητικές εκδηλώσεις μπορούν να παρατηρηθούν στον βλεφαρόσπασμο, όπως η απραξία ανοίγματος του βλεφάρου (“apraxia of eyelid opening”) [126, 127]. Αυτή αποτελεί μία αποτυχία στο εκουσίο άνοιγμα των ματιών, χωρίς να υπάρχει εμφανής σπασμός του σφιγκτήρα μυ των βλεφάρου και παρά τη συνεχή σύσπαση του μετωπιαίων μυών, και φαίνεται να προκαλείται από μια ακούσια σύσπαση της κογχικής μοίρας του σφιγκτήρα μυ των βλεφάρου που ανταγωνίζεται το επαν-άνοιγμα του βλεφάρου [126, 127]. Ακόμη, ο ρυθμός βλεφαρίσματος (“blink rate”) φαίνεται να είναι μεγαλύτερος σε ασθενείς με βλεφαρόσπασμο [128, 129]. Ο βλεφαρόσπασμος έχει μεγάλη τάση να εξαπλώνεται σε παρακείμενα τμήματα του σώματος, σε σύγκριση με άλλους φαινότυπους εστιακής δυστονίας [1, 130, 131].

Εκτός από τα κινητικά συμπτώματα, υπάρχουν και μη κινητικές εκδηλώσεις οι οποίες εμφανίζονται σε ασθενείς με βλεφαρόσπασμο. Μεταξύ αυτών είναι το αίσθημα καψίματος, η αίσθηση ξηρότητας στον οφθαλμό και η φωτοφοβία [124, 132]. Από τη ψυχιατρική σφαίρα, η κατάθλιψη καθώς επίσης και συμπτωματολογία εμμονής και καταναγκασμού φαίνεται να είναι συχνές σε ασθενείς με βλεφαρόσπασμο [133-135], ενώ ως προς το άγχος περισσότερες μελέτες χρειάζονται για να εξαχθούν με περισσότερη βεβαιότητα συμπεράσματα [124]. Οι διαταραχές ύπνου, δεν είναι ξεκάθαρο αν οφείλονται στο βλεφαρόσπασμο αυτό καθεαυτό ή στην κατάθλιψη που συνυπάρχει [124], ενώ επιπλέον μελέτες χρειάζονται για να εξακριβωθεί

κατά πόσο, και αν, επηρεάζεται η γνωστική λειτουργία των ασθενών με βλεφαρόσπασμο [124, 136, 137].

Επιδημιολογικά στοιχεία

Αν και ο βλεφαρόσπασμος είναι κυρίως μια σποραδική διαταραχή, 1 στους 4 ασθενείς με βλεφαρόσπασμο έχουν 1 ή περισσότερα μέλη στη οικογένειά τους που έπασχαν από δυστονία [124, 138, 139]. Ο βλεφαρόσπασμος είναι δύο φορές πιο συχνός στις γυναίκες συγκριτικά με τα άνδρες, η ηλικία εμφάνισής του είναι μεταξύ της πέμπτης και της έβδομης δεκαετίας της ζωής [1, 130, 131]. Όπως προείπαμε, μαζί με την αυχενική δυστονία θεωρούνται οι πιο συνηθισμένες μορφές εστιακής δυστονίας με επιπολασμό που κυμαίνεται από 16 έως 133 ανά εκατομμύριο [4], ωστόσο, στην Ιαπωνία και στην Ιταλία, το ο βλεφαρόσπασμος είναι πιο διαδεδομένος σε σύγκριση με την αυχενική δυστονία [7]. Η εμμηνόπαυση μπορεί να είναι ένας παράγοντας που προδιαθέτει σε βλεφαρόσπασμο σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας [140].

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς, φαίνεται να υπάρχουν τόσο προστατευτικοί όσο και επιβλαβείς παράγοντες [124]. Η ξηρότητα του οφθαλμού φαίνεται να συσχετίζεται με βλεφαρόσπασμο [141]. Η προηγούμενη κατανάλωση καφέ φαίνεται να έχει προστατευτική επίδραση έναντι του βλεφαρόσπασμου [138, 142], ενώ το η επίδραση του καπνίσματος χρήζει περαιτέρω διερεύνησης [124].

Γενετικοί παράγοντες κινδύνου στον βλεφαρόσπασμο

Σχετικά με τη γενετική του βλεφαρόσπασμου, το αλληλόμορφο 2 του DRD5 γονιδίου και το D1.1 του γονιδίου του D1 receptor έχουν συσχετιστεί με βλεφαρόσπασμο [34].

Επιπλέον, ο πολυμορφισμός rs1182 του TOR1A του έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την εξάπλωση του βλεφαρόσπασμου σε γειτονικές περιοχές του σώματος [130]. Επίσης ο rs6265 του BDNF γονιδίου έχει συσχετισθεί με βλεφαρόσπασμο [39]. Πρόσφατα, επιβλαβείς αλληλουχίες στα CACNA1A, DNAH17, TRPV4, CAPN11, VPS13C, UNC13B, SPTBN4, MYOD1 και MRPL15 γονίδια με whole-exome sequencing (WES), βρέθηκαν σε ασθενείς με βλεφαρόσπασμο [143].

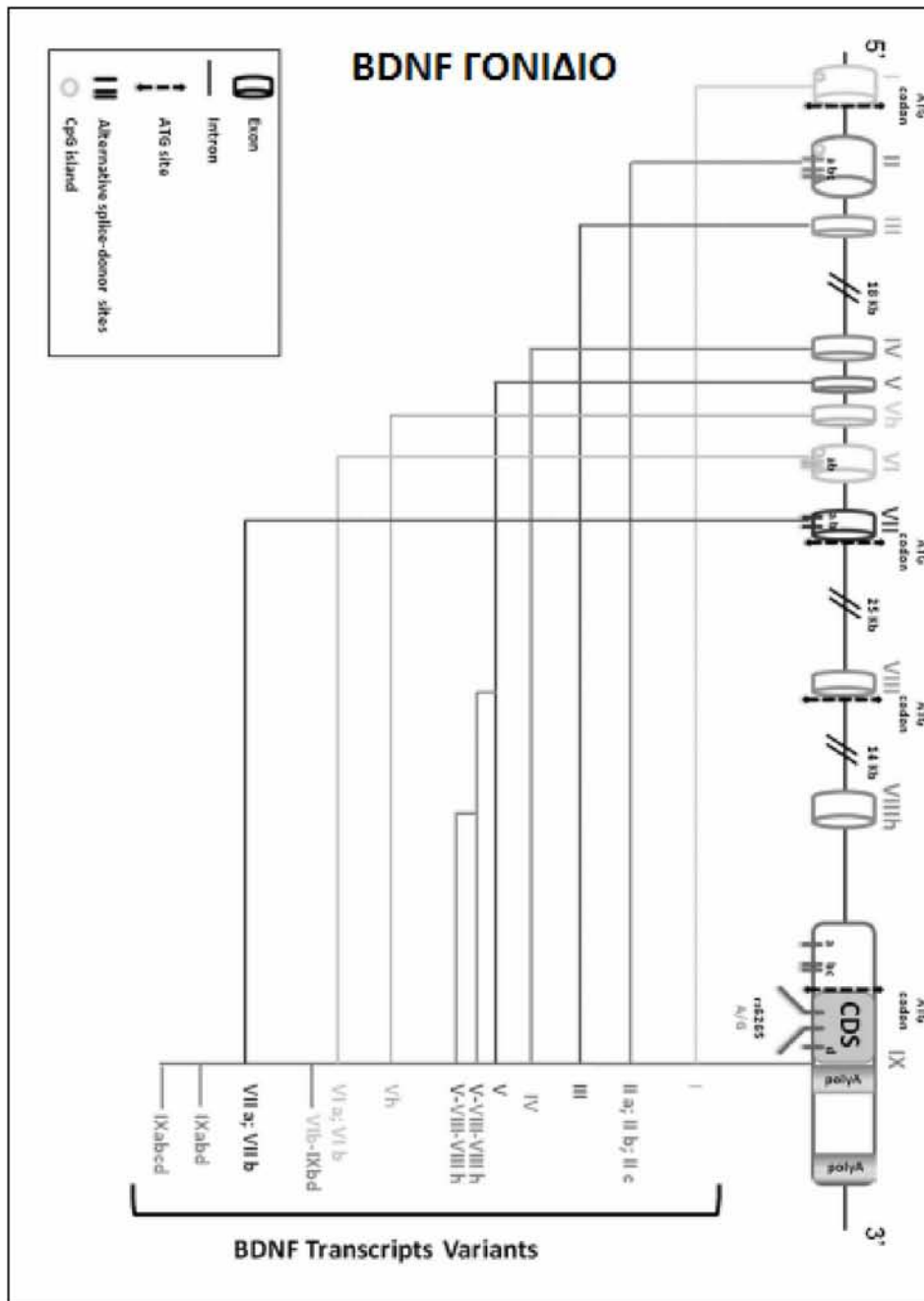
BDNF και rs6265 (Val66Met)

Γενικά για τον BDNF

Ο BDNF ανήκει σε μία οικογένεια αυξητικών παραγόντων, γνωστή ως νευροτροφίνες, που συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες, όπως η διαφοροποίηση και η επιβίωση των νευρώνων [80]. Η συναπτική πλαστικότητα επίσης επηρεάζεται από τον BDNF [144, 145]. Το ανθρώπινο γονίδιο BDNF βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11, στην περιοχή p13-14, και εκτείνεται ~ 70 kb [146]. Το γονίδιο BDNF αποτελείται από 11 εξόνια στο και από 9 λειτουργικούς υποκινητές (functional promoters) [147].

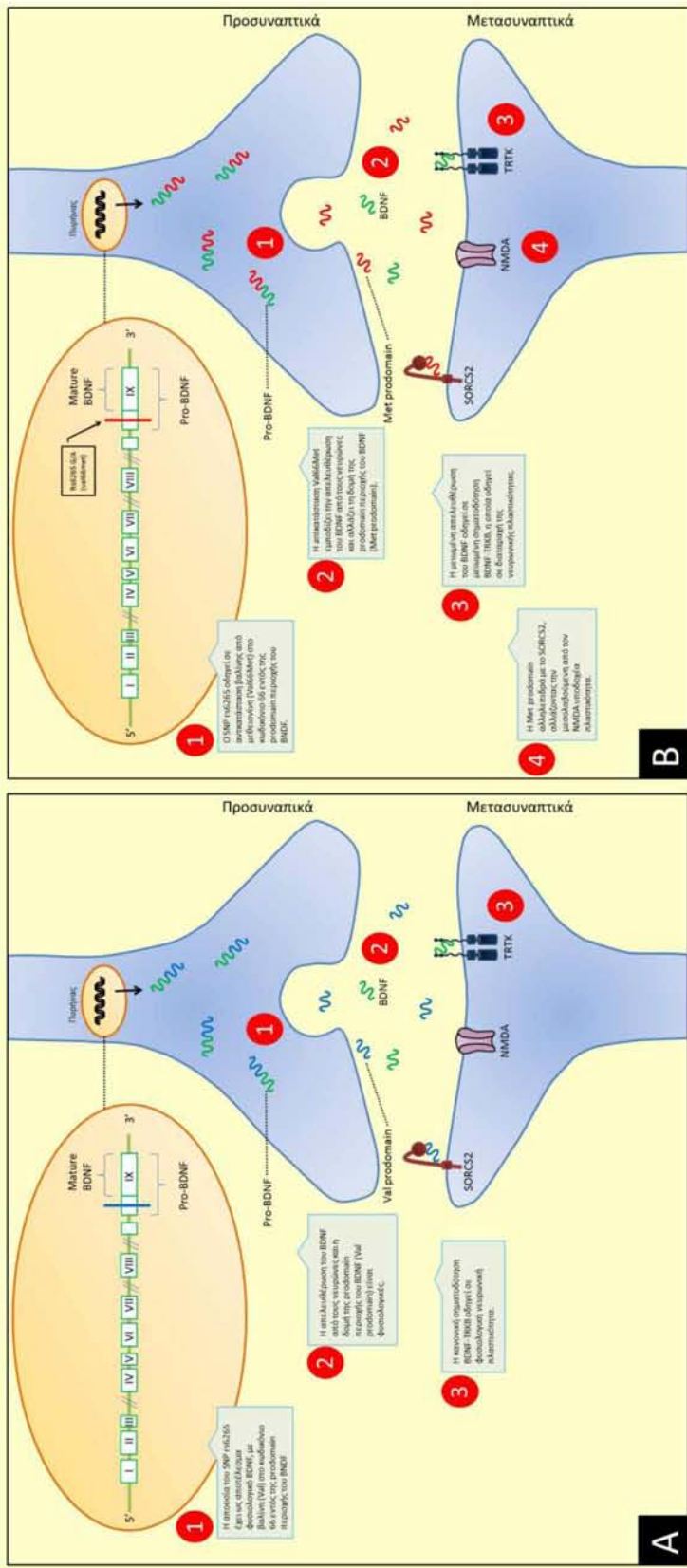
Ο πολυμορφισμός rs6265 (Val66Met)

Ο rs6265 (G/A) είναι ένας κοινός πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου [Single Nucleotide polymorphism (SNP)] στην prodomain περιοχή του γονιδίου BDNF [148]. Ο rs6265 οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη (Val) στη θέση 66 με το αμινοξύ μεθειονίνη (Met) (Val → Met), μια αντικατάσταση που πιθανώς επηρεάζει τη συναπτική πλαστικότητα [78-80]. Το γονίδιο BDNF απεικονίζεται στην **Εικόνα 1** (Τροποποιημένη εικόνα. Ανατύπωση από: Cattaneo A., Cattane N., Begni V., Pariante C.M., Riva M.A. "The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders". Translational psychiatry. 2016;6(11):e958. [146]).



Εικόνα 1. Στην εικόνα απεικονίζεται η δομή του BDNF γονιδίου. (Τροποποιημένη εικόνα. Ανατύπωση από: Cattaneo A., Cattane N., Begni V., Pariante C.M., Riva M.A. "The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders". *Translational psychiatry*. 2016;6(11):e958. [146]).

Ο rs6265 ενδεχομένως προδιαθέτει σε δυστονία και βλεφαρόσπασμο [39]. Η απουσία του rs6265 οδηγεί σε φυσιολογικό BDNF, με βαλίνη (Val) στο κωδικόνιο 66 εντός της prodomain περιοχής του BDNF, οδηγώντας σε φυσιολογική σηματοδότηση BDNF-TRKB, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε φυσιολογική νευρωνική πλαστικότητα [78-80]. Αντίθετα, η παρουσία του rs6265 επηρεάζει την απελευθέρωση του BDNF από τους νευρώνες, αλλάζοντας ταυτόχρονα τη δομή του prodomain του BDNF (Met prodomain) [78-80]. Η μειωμένη απελευθέρωση του BDNF οδηγεί σε μειωμένη σηματοδότηση BDNF-TRKB, η οποία οδηγεί σε διαταραχή της νευρωνικής πλαστικότητας [78-80]. Ο πιθανός μηχανισμός με τον οποίο εμπλέκεται η ο BDNF στην νευρωνική πλαστικότητα απεικονίζεται στην **Εικόνα 2**.



Εικόνα 2.

Εικόνα 2. ΛΕΖΑΝΤΑ

A 1. Η απουσία του SNP rs6265 έχει ως αποτέλεσμα φυσιολογικό BDNF, με βαλίνη (Val), στο κωδικόνιο 66 εντός της prodomain περιοχής του BDNF. 2. Η απελευθέρωση του BDNF από τους νευρώνες και η δομή της prodomain περιοχής του BDNF (Val prodomain) είναι φυσιολογικές. 3. Η κανονική σηματοδότηση BDNF-TRKB οδηγεί σε φυσιολογική νευρωνική πλαστικότητα [78-80].

B 1. Ο SNP rs6265 οδηγεί σε αντικατάσταση της βαλίνης από μεθειονίνη (Val66Met) στο κωδικόνιο 66 εντός της prodomain περιοχής του BDNF. 2. Η αντικατάσταση Val66Met εμποδίζει την απελευθέρωση του BDNF από τους νευρώνες και αλλάζει τη δομή της prodomain BDNF (Met prodomain). 3. Η μειωμένη απελευθέρωση του BDNF οδηγεί σε μειωμένη σηματοδότηση BDNF-TRKB, η οποία οδηγεί σε διαταραχή της νευρωνικής πλαστικότητας. 4. Η Met prodomain αλληλεπιδρά με το SORCS2, αλλάζοντας την μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα NMDA πλαστικότητα [78-80].

BDNF rs6265 (Val66Met) και δυστονία

Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί, εξετάζοντας τον ρόλο του rs6265 του BDNF στη δυστονία και στον βλεφαρόσπασμο, έχοντας δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα [38, 40, 77, 83-86]. Επιπλέον, δύο μέτα-αναλύσεις μέχρι σήμερα έχουν εξετάσει την επιδράσεις του rs6265 του BDNF στη δυστονία [40, 86]. Στην πρώτη, δεν βρέθηκε καμία σημαντική συσχέτιση ούτε με τη δυστονία ως γενικός φαινότυπος, ούτε με υπο-φαινοτύπους, όπως η αυχενική δυστονία και ο βλεφαρόσπασμος [86], ενώ στη δεύτερη βρέθηκε, μία στατιστικώς

σημαντική συσχέτιση μεταξύ του AA γονότυπου του rs6265 και της ιδιοπαθούς δυστονίας [40].

BDNF rs6265 (Val66Met) και άλλες παθήσεις

Εκτός της δυστονίας, έχουν αναφερθεί συσχετίσεις μεταξύ του rs6265 και άλλων παθήσεων, όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, η νόσος του Πάρκινσον, η νόσος Αλτσχάιμερ, ημικρανία, ωστόσο τα αποτελέσματα μεταξύ των μελετών είναι αντικρουόμενα και χρειάζονται επιπλέον μελέτες [149]. Ακόμη έχουν αναφερθεί συσχετίσεις και με νοσήματα από την ψυχική σφαίρα, όπως η σχιζοφρένεια, η διπολική διαταραχή, η κατάθλιψη διαταραχή και οι διαταραχές πανικού [150-155].

Άλλοι πολυμορφισμοί του BDNF

Εκτός του rs6265, και άλλοι πολυμορφισμοί του γονιδίου BDNF έχουν μελετηθεί. Ο rs56164415 (C270T) έχει αναφερθεί να συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για νόσο του Αλτσχάιμερ όψιμης έναρξης, καθώς και ότι συνδέεται με την έναρξη της πολλαπλής σκλήρυνσης [149, 156, 157]. Επιπλέον ο rs2030324 βρέθηκε να επηρεάζει οπτική γνωστική επεξεργασία σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση [158]. Ωστόσο υπάρχουν μελέτες που δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ αυτών και διαφόρων νευρολογικών νοσημάτων [149, 159].

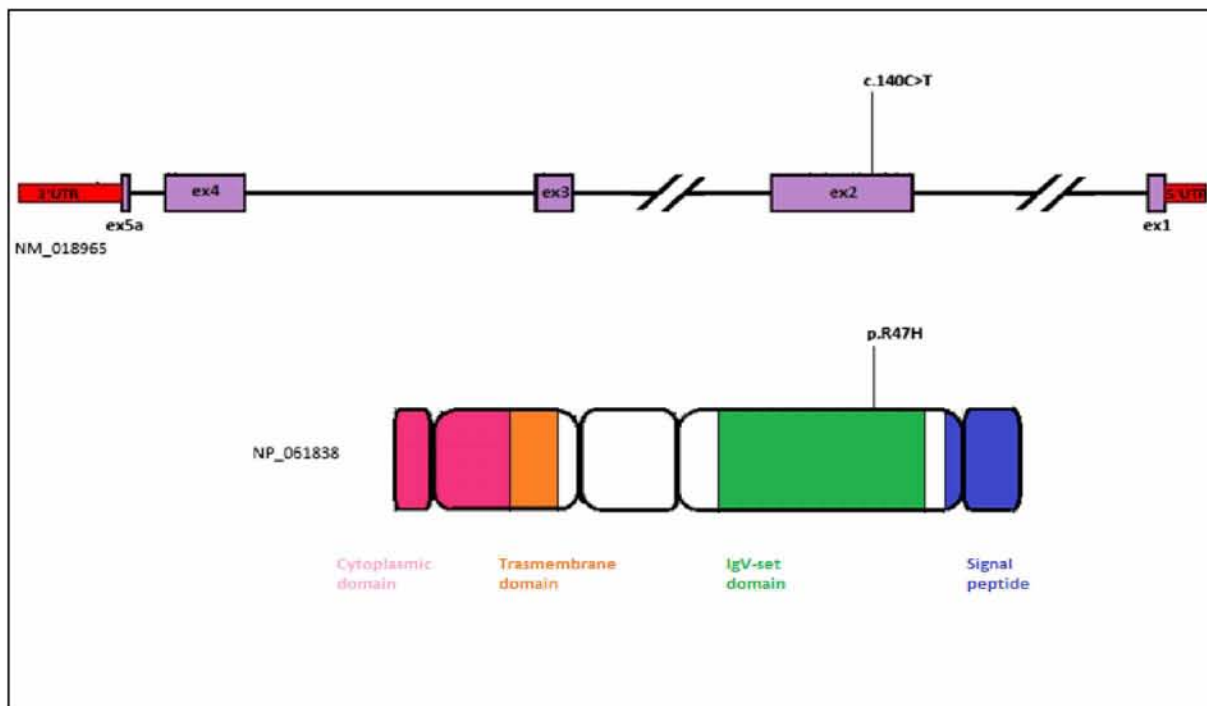
TREM2 και rs75392628 (R47H)

Η Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 (TREM2) είναι μία πρωτεΐνη και του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία εκφράζεται σε αρκετά κύτταρα, όπως στα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, στους οστεοκλάστες, στα ενεργοποιημένα μακροφάγα και στη μικρογλοία [160]. Η TREM2 αποτελεί μία πρωτεΐνη σηματοδότησης, η οποία συνδέεται με την Tyrosine Kinase-binding protein (TYROBP/DP12), και αποτελούν διαφορετικές υπομονάδες του του ίδιου συμπλέγματος σηματοδότησης-υποδοχέα [161]. Δύο φαίνεται πως είναι οι κύριοι ρόλοι της TREM2 στη μικρογλοιακή λειτουργία: α) την προώθηση της φαγοκυττάρωσης των κυτταρικών απομεινारीών και των βακτηριδίων, καθώς και την καταστολή των φλεγμονωδών διεργασιών [162]. Επομένως, οι γενετικές παραλλαγές του TREM2 γονιδίου μπορεί να οδηγήσουν σε ελαττωματική λειτουργία μικρογλοίας και έτσι στην απελευθέρωση φλεγμονωδών διεργασιών με ένα ευρύ φαινοτυπικό φάσμα [163].

Το TREM2 γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6, και έχει έκταση από τη θέση 41,158,506 έως τη θέση 41,163,186. Υπάρχει μεγάλο πλήθος γενετικών παραλλαγών στο TREM2 γονίδιο οι οποίες έχουν αναφερθεί να συσχετίζονται με νευροκεφυλιστικά νοσήματα [163, 164]. Το TREM2 αρχικά αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως γενετική αιτία του Polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS), γνωστή και ως νόσος Nasu-Hakola [165], το οποίο χαρακτηρίζεται κλινικά από οστικές κύστες, κατάγματα, νευροψυχιατρικά συμπτώματα και άνοια [163]. Τα νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που πάσχουν από PLOS είναι ο εκφυλισμός των νευραξόνων, η απώλεια λευκής ουσίας, καθώς και φλοιώδη ατροφία, συνοδευόμενη από αυξημένη ενεργοποίηση της μικρογλοίας καθώς και αστροκύττωση [166]. Αρκετές γενετικές παραλλαγές του TREM2 έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με PLOS [163].

Η γενετική παραλλαγή rs75392628, που βρίσκεται στη θέση 41161514, στο εξόνιο 2, στο χρωμόσωμα 6, στο TREM2 γονίδιο, οδηγεί σε αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη, που οδηγεί στην αντικατάσταση της αργινίνης με την ιστιδίνη (R47H) στην πρωτεΐνη TREM2. Το γονίδιο TREM2, η θέση του rs75392628 πάνω σε αυτό, η TREM2 πρωτεΐνη μαζί με το σημείο πάνω σε αυτή που γίνεται η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου όπως περιγράφηκε, απεικονίζονται στην **Εικόνα 3** (Τροποποιημένη εικόνα. Ανατύπωση από: Cuyvers E., Bettens K., Philtjens S., et al. "Investigating the role of rare heterozygous TREM2 variants in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia". *Neurobiol. Aging*. 2014;35(3):726.e711-729. [167]. Ο rs75392628 έχει συσχετισθεί με διάφορους φαινότυπους, όπως για παράδειγμα, μεταξύ άλλων, νόσο του Αλτσχάιμερ [168, 169], μετωποκροταφική άνοια [170], σποραδική μορφή της νόσου του κινητικού νευρώνα [171], ιδιοπαθή τρόμο [172], και νόσο του Πάρκινσον [170, 173, 174].

Μέχρι σήμερα, από όσα γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο του TREM2, και πιο συγκεκριμένα της γενετικής παραλλαγής rs75392628 σε ασθενείς με δυστονία. Λαμβάνοντας υπόψιν, ότι δυστονικές κινήσεις εμφανίζονται σε ασθενείς με Πάρκινσον [175], τις προηγούμενες συσχετίσεις του rs75392628 με κινητικές διαταραχές (ιδιοπαθή τρόμο και νόσο του Πάρκινσον), το γεγονός ότι μέχρι σήμερα η παθοφυσιολογία της δυστονίας παραμένει άγνωστη και επίσης ότι με βάση πρόσφατα δεδομένα που φανερώνουν ότι δυστονία είναι μία "network disorder", στην οποία συμμετέχουν, τα βασικά γάγγλια, η παρεγκεφαλίδα, ο θάλαμος και ο φλοιός [12], υποθέσαμε ότι ίσως μπορεί να αποτελεί ένα παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση δυστονίας.



Εικόνα 3. Στην εικόνα διακρίνονται το γονίδιο TREM2, η θέση του rs75392628 πάνω σε αυτό, η TREM2 πρωτεΐνη μαζί με το σημείο πάνω σε αυτή που γίνεται αντικατάσταση της γουανίνης από αδερίνη, που οδηγεί στην αντικατάσταση της αργινίνης με την ιστιδίνη (R47H) (Τροποποιημένη εικόνα. Ανατύπωση από: Cuyvers E., Bettens K., Philtjens S., et al. "Investigating the role of rare heterozygous TREM2 variants in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia". *Neurobiol. Aging.* 2014;35(3):726.e711-729. [167])

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Ο ρόλος του rs6265 του BDNF στη δυστονία και στον βλεφαρόσπασμο, μέχρι τώρα δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, καθώς οι έως τώρα μελέτες έχουν δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα [38, 40, 77, 83-86]. Τα αποτελέσματα επίσης από τις μέχρι σήμερα μετα-αναλύσεις δεν έχουν ξεκαθαρίσει εάν ο rs6265 συσχετίζεται ή όχι με τη δυστονία [40, 86]. Στη μία από αυτές δεν καταδείχθηκε συσχέτιση μεταξύ δυστονίας και του rs6265 (τόσο στην ανάλυση θεωρώντας τη δυστονία έναν ενιαίο φαινότυπο, ούτε σε ανάλυση σε σχέση με υπό-φαινότυπους, όπως η αυχενική δυστονία και ο βλεφαρόσπασμος) [86]. Στη δεύτερη μετα-ανάλυση βρέθηκε, μία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του AA γονότυπου του rs6265 και της ιδιοπαθούς δυστονίας [40].

Μέχρι σήμερα, από όσα γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο του TREM2, και πιο συγκεκριμένα της γενετικής παραλλαγής rs75392628 σε ασθενείς με δυστονία. Είναι γνωστό πως δυστονικές κινήσεις εμφανίζονται σε ασθενείς με Πάρκινσον [175]. Επίσης ο rs75392628 έχει συσχετισθεί με κινητικές διαταραχές (ιδιοπαθή τρόμο και νόσο του Πάρκινσον). Ακόμη, η δυστονία είναι μία “network disorder”, στην οποία συμμετέχουν, τα βασικά γάγγλια, η παρεγκεφαλίδα, ο θάλαμος και ο φλοιός [12]. Έτσι λοιπόν υποθέσαμε ότι ο rs75392628 ίσως μπορεί να αποτελεί ένα παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση δυστονίας.

Ο σκοπός λοιπόν της τρέχουσας μελέτης, έχοντας υπόψιν της σχετική βιβλιογραφία έως σήμερα, όπως αυτή προαναφέρθηκε, ήταν να επεκτείνουμε την γνώση μας σχετικά με το ρόλο του rs6265 του BDNF ως παράγοντα κινδύνου στο βλεφαρόσπασμο. Αρχικά λοιπόν, στόχος μας ήταν να αξιολογήσουμε τη συσχέτιση του rs6265 σε μια ελληνική ομάδα ασθενών με βλεφαρόσπασμο και υγείων μαρτύρων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε επιπλέον μια

συμπληρωματική μέτα-ανάλυση, αναλύοντας τα τα δεδομένα μας μαζί με αυτά αντίστοιχων προηγούμενων μελετών, προκειμένου να διευκρινιστεί η επίδραση του rs6265 του BDNF στον βλεφαρόσπασμο. Επιπλέον θέλαμε να διερευνήσουμε πιθανή συσχέτιση μεταξύ του rs75392628 στο TREM2 γονίδιο και του βλεφαρόσπασμου. Έτσι λοιπόν γονοτυπήσαμε τους συμμετέχοντες μας και για τον rs75392628 στο TREM2.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες

Συνολικά 206 ασθενείς με βλεφαρόσπασμο και 206 υγιή άτομα ως μάρτυρες συγκεντρώθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης. Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν Καυκάσιοι. Κανένας από τους συμμετέχοντες δεν ανέφερε θετικό οικογενειακό ιστορικό. Οι ασθενείς με βλεφαρόσπασμο είχαν εξεταστεί στα τακτικά εξωτερικά ιατρεία της Πανεπιστημιακής Νευρολογικής και Πανεπιστημιακής Οφθαλμολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Ο βλεφαρόσπασμος διαγνώστηκε από ειδικό νευρολόγο και οφθαλμίατρο. Από τη επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας εγκρίθηκε η παρούσα μελέτη. Όλοι οι συμμετέχοντες χορήγησαν έντυπο συγκατάθεσης για την συμμετοχή τους.

Εργαστηριακές τεχνικές

Απομόνωση DNA

DNA απομονώθηκε από τα δείγματα περιφερικού αίματος των ασθενών με τη χρήση της μεθόδου της εξαλάτωσης όπως την έχουμε περιγράψει προηγουμένως [176]. Το γενομικό DNA με το οποίο θα δουλέψουμε πρέπει να διέπεται από δύο πολύ σημαντικά χαρακτηριστικά:

- 1) να μην έχει προσμίξεις και επίσης,
- 2) να μην διασπαστεί σε πολύ μικρά κομμάτια, γιατί έτσι δεν θα είναι δυνατό ούτε να ενισχυθούν αλλά και ούτε να αναλυθούν.

Το γενωμικό DNA το οποίο θα χρησιμοποιηθεί περαιτέρω, λαμβάνετε από πυρήνες λευκοκυττάρων. Αυτό είναι δυνατό έπειτα από λήψη περιφερικού αίματος. Γίνεται λήψη 10ml περιφερικού αίματος. Κατόπιν το αίμα τοποθετείται σε σωληνάριο, το οποίο έχει αντιπηκτικό Na₂EDTA. Εν συνεχεία περιγράφονται τα αντιδραστήρια που, με τη χρήση των οποίων είναι δυνατόν να ολοκληρωθούν οι διαδικασίες με τις οποίες πραγματοποιείται η απομόνωση του γενωμικού DNA. Αυτά είναι:

1) διάλυμα διάσπασης των πυρήνων [Lysis I: NH₄Cl (155mM), KHCO₃ (10mM), EDTA (1mM), pH=7.4 και Lysis II : Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na EDTA (2mM), pH=8.2],

2) διάλυμα πρωτεΐνάσης K (10mg/ml),

3) το διάλυμα 10% w/v SDS (sodium dodecyl sulfate: δωδεκακυλοθειικό νάτριο),

4) κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M),

5) απόλυτη αιθανόλη,

6) CH₃COONa (3M),

7) πηκτή αραρόζης 1%

Εν συνεχεία περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθείται ώστε να καταστεί εφικτή η απομόνωση του γενωμικού DNA με την εφαρμογή της μεθόδου της εξαλάτωσης. Τα στάδια λοιπόν που ακολουθούνται περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια:

Ημέρα πρώτη

1. Το αίμα τοποθετείται σε ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου χωρητικότητας 15ml και μετά αραιώνεται μέχρι τα 12ml με χρήση ddH₂O (δισ αποσταγμένο νερό). Μετά από αυτό, πρέπει να ακολουθήσει πολύ καλή ανάδευση, με τελικό στόχο τα ερυθρά αιμοσφαίρια να λυθούν.
2. Φυγοκέντριση διάρκειας 15min στις 3500rpm, στους 40C (για να απομονωθούν τα εμπύρηννα κύτταρα).
3. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντριση, απορρίπτεται το υπερκείμενο. Με το ίζημα μπορούμε να συνεχίσουμε τη διαδικασία συνεχίζοντας περαιτέρω. Γίνεται αραιώση των κυττάρων. Η αραιώση αυτή γίνεται σε ddH₂O έως 12ml και επιπλέον της αραιώσης πραγματοποιείται ανακίνηση σε vortex.
4. Εν συνεχεία ακολουθεί φυγοκέντριση διάρκειας 15min στις 3500rpm, στους 40C.
5. Συνεχίζουμε τη διαδικασία μετά από αφαίρεση και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Προτίθεται το διάλυμα lysis I. Η προσθήκη γίνεται μέχρι τα 12ml.
6. Πραγματοποιούμε φυγοκέντριση διάρκειας 15min στις 3500rpm, και η θερμοκρασία είναι ίση με 40C.
7. Πραγματοποιείται επανάληψη των σταδίων 5 και 6, τα οποία περιγράφονται ακριβώς πιο πάνω αναλυτικά με τη χρησιμοποίηση lysis I.
8. Συνεχίζουμε την όλη διαδικασία με το ίζημα αφού αφαιρέσουμε και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Γίνεται προσθήκη διαλύματος lysis II μέχρι τα 6ml (για να διευκολυνθεί η διάσπαση των πυρηνικών μεμβρανών για να είναι δυνατή η απελευθέρωση του DNA χρησιμοποιούμε τα lysis I και lysis II, τα οποία όπως είπαμε ήδη, αποτελούν λυτικά διαλύματα. Τα απαραίτητα κατιόντα για να δράσουν οι νουκλεάσες, δηλαδή τα δισθενή κατιόντα (Ca²⁺, Mg²⁺), δεσμεύονται με το περιεχόμενο EDTA. Με αυτό τον τρόπο, γίνεται

απενεργοποίηση των ενζύμων, και αποφεύγεται έτσι η διάσπαση του γενωμικού DNA. Γίνεται ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η διάρκεια της είναι 5-30min.

9.Εν συνεχεία προστίθενται α) 750μl SDS (10% w/v) και επιπλέον β) 100μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml). Το SDS αποτελεί ένα ανιονικό αποδιατακτικό. Η δράση του έγκειται στη δέσμευση των λιπιδίων και στην καταστροφή τη δομή της πυρηνικής μεμβράνης. Ακόμη συνεισφέρει στο να αποδιαταχθούν τόσο οι πρωτεΐνες όσο και η χρωματίνη. Τέλος, για να διασπαστούν και να γίνει πέψη των πρωτεϊνών, με τις οποίες το DNA είναι συνδεδεμένο, είναι σημαντική η πρωτεΐνάση K.

10.Ακολουθεί επώαση στους 370C ενώ η διάρκεια της επώασης είναι 16-18hrs (overnight-O/N).

Ημέρα δεύτερη

Προστίθενται 2ml 6M από το κεκορεσμένο διάλυμα NaCl. Γίνεται ισχυρή ανάδευση για 15sec. Με αυτή τη μέθοδο κατακρημνίζονται οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες.

1.Γίνεται φυγοκέντριση διάρκειας 15min στις 3500rpm, ενώ είναι θερμοκρασία είναι στους 40C.

2.Το DNA υπάρχει το προκύπτων υπερκείμενο. Το υπερκείμενο λοιπόν, στη συνέχεια, το μεταγγίζουμε σε ένα νέο καθαρό σωληνάριο. Το ίζημα το οποίο υπάρχει απορρίπτεται. Γίνεται ισχυρή ανάδευση.

3.Ακολουθεί φυγοκέντριση διάρκειας 15min στις 3500rpm, και σε θερμοκρασία 40C.

4. Το παραγόμενο υπερκείμενο μεταγγίζεται σε ένα καινούργιο καθαρό σωληνάριο χωρητικότητας 50ml. Το ίζημα το οποίο έχει προκύψει το απορρίπτουμε.

5. Μετά γίνεται καταβύθιση του νουκλεϊκού οξέος, το οποίο βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα, με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης (διπλάσιο όγκο σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και CH₃COONa σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του αρχικού διαλύματος. Η προσθήκη του CH₃COONa δεν είναι απαραίτητη σε περίπτωση κατά την οποία είναι αρκετή η αρχική ποσότητα του δείγματος του αίματος.

6. Εν συνεχεία πραγματοποιείται επώαση. Η επώαση αυτή γίνεται σε 200C O/N.

Ημέρα τρίτη

1. Γίνεται φυγοκέντριση. Η διάρκεια αυτής είναι 50min και πραγματοποιείται στις 3500rpm. Επίσης αυτή η φυγοκέντριση γίνεται στους 40C.

2. Το υπερκείμενο απορρίπτεται. Συλλέγουμε το DNA. Το DNA το οποίο συλλέγεται «ξεπλένεται». Αυτό πραγματοποιείται με διάλυμα αιθανόλης 70%. Στη συνέχεια το τοποθετούμε σε σωληνάριο (το σωληνάριο είναι τύπου eppendorf). Αυτό το βήμα, δηλαδή το βήμα του καθαρισμού που μόλις περιγράφηκε, έχει ως σκοπό να απομακρυνθεί του άλατος. Αυτό το άλας, είναι αυτό οποίο έχει παραμείνει στο εν λόγω διάλυμα.

3. Ακολουθεί φυγοκέντριση διάρκειας 30min στις 12000rpm. Η θερμοκρασία δε αυτής είναι οι 40C.

4. Το στάδιο όπως περιγράφηκε προηγουμένως επαναλαμβάνεται για δύο φορές επιπλέον, με την εξής όμως διαφορά: ότι δηλαδή η φυγοκέντριση είναι διάρκειας 20min.

5. Το υπερκείμενο (αιθανόλη) αφαιρείται με πολύ μεγάλη προσοχή. Αφήνουμε έτσι με αυτή την τεχνική μόνο το ίζημα-DNA. Στη συνέχεια το σωληνάριο καλύπτεται με παραφίλμ. Είναι πολύ σημαντικό να το τρυπήσουμε, και αυτό γίνεται με τη χρήση μίας μικρής καρφίτσας. Αυτό έχει ως σκοπό να διευκολυνθεί την εξάτμιση της αιθανόλης πιο συγκεκριμένα την αιθανόλη οποία έχει παραμείνει στο σωληνάριο.

6. Εν συνεχεία ακολουθεί επώαση. Αυτή η επώαση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ψυγείου.

7. Η φύλαξη του DNA και οι συνθήκες φύλαξης εξαρτώνται από τη συχνότητα χρήσης αυτού. Εάν γίνεται συχνή χρήση, αυτό φυλάσσεται στους 40C. Σε περίπτωση που χρειάζεται να γίνει φύλαξη για χρονικό διάστημα μεγάλης διάρκειας, τότε καλό είναι η φύλαξη να γίνει σε θερμοκρασία -200C.

Προσδιορισμός ποιότητας του DNA και προσδιορισμός συγκέντρωσης του DNA

A. Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης

Με χρήση μικρής ποσότητας γενωμικού DNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%). Αυτή γίνεται με παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το DNA γίνεται ορατό με τη εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας, με χρήση συσκευής UV. Με αυτή τη διαδικασία που μόλις περιγράψαμε μπορεί να πραγματοποιηθεί ουσιαστικά ο ποιοτικός έλεγχος του DNA.

B. Μέτρηση συγκέντρωσης του DNA

Προηγουμένως περιγράψαμε τη διαδικασία απομόνωση του γενωμικού DNA. Αφού λοιπόν πραγματοποιηθεί αυτή η διαδικασία, δηλαδή της απομόνωσης του γενωμικού DNA, εν συνεχεία ακολουθεί η νέα διαδικασία με την οποία καθίσταται δυνατός προσδιορισμός της συγκέντρωσής αυτού (δηλαδή η συγκέντρωση του DNA). Η ανίχνευση, καθώς επίσης και ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA είναι δυνατή με πολλούς τρόπους. Η φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο αποτελεί την απλούστερη μέθοδο για τον υπολογισμό της συγκέντρωσής DNA. Το DNA μπορεί και απορροφά εκλεκτικά ακτινοβολία με μήκος κύματος ίσο με 260nm. Η ιδιότητα αυτή του DNA αποτελεί και την βάση της εν λόγω τεχνικής, δηλαδή της συγκέντρωσής DNA με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο.

Πιο συγκεκριμένα, μετράμε την οπτική πυκνότητα (OD) υδατικού διαλύματος DNA (αραιωμένο διάλυμα DNA 1:100). Αυτό γίνεται σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm σε κυψελίδα χαλαζία και με διαδρομή φωτός ίση με 1cm. Με βάση αυτά:

1.η απορρόφηση στα 260nm αντιστοιχεί στο νουκλεϊκό οξύ το οποίο υπάρχει στο διάλυμα, και

2.αντίθετα, η απορρόφηση στα 280 nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες καθώς και σε άλλες επιπρόσθετες προσμίξεις, οι οποίες έχουν παραμείνει στο εν λόγω διάλυμα.

Η εκτίμηση της καθαρότητας του DNA γίνεται με βάση το λόγο OD_{260}/OD_{280} . Πιο συγκεκριμένα:

1.τιμές του λόγου μεταξύ 1,7 και 1,9 είναι ενδεικτικές παρουσίας επαρκώς καθαρού DNA,

2.τιμές μικρότερες του 1,7 υποδηλώνουν ότι το διάλυμα του DNA περιέχει και πρωτεΐνες, και

3.τιμές μεγαλύτερες του 1,9 φανερώνουν πως υπάρχουν προσμίξεις με RNA.

Σε μήκος κύματος ίσο με 260nm, η τιμή OD ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση δίκλωνου DNA ίση με 50μg/ml. Με βάση αυτού το τελευταίο δεδομένο οι συγκεντρώσεις του DNA μπορούν να υπολογιστούν, μετά την διαδικασία της φωτομέτρησης ως:

$$\underline{\text{Συγκέντρωση DNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{αραίωση} \times 50 \times \text{τιμή OD}_{260}}$$

Η ευαισθησία της εν λόγω μεθόδου είναι αρκετά υψηλή. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατόν να ανιχνευθούν ποσότητες DNA μέχρι και 0,2μg DNA/ml διαλύματος.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Με την τεχνική της PCR, πραγματοποιείται *in vitro*, ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου). Αυτό γίνεται από ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος. Η PCR επί της ουσίας εκμεταλλεύεται τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA, και πιο συγκεκριμένα δύο εξ' αυτών:

1. για να γίνει η σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου, το μονόκλωνο DNA αποτελεί το εκμαγείο της Taq DNA πολυμεράσης. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητο να γίνει αποδιάταξη του DNA και

2. ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA είναι απαραίτητο για την δράση της Taq DNA πολυμεράσης. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι αν μετά το διαχωρισμό των δύο αλυσίδων ενός μορίου DNA χρησιμοποιηθεί ένας εκκινητής που μπορεί να υβριδιστεί σε ένα σημείο της μιας αλυσίδας, τότε θα ξεκινήσει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Η έναρξη θα γίνει από το σημείο που υβριδίστηκε ο εκκινητής (primer).

Με την επιλογή λοιπόν δύο εκκινητών, οι οποίοι υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου (όπου ο κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός προς κάθε μια από τις δύο αλυσίδες DNA και οι δύο μαζί καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος) είναι δυνατόν να ενισχυθεί οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA. Η PCR αποτελείται από κύκλους οι οποίοι επαναλαμβάνονται. Ο καθένας εξ' αυτών των κύκλων περιλαμβάνει τρία στάδια. Η PCR αποτελεί μία διαδικασία η οποία πραγματοποιείται εξολοκλήρου in vitro. Γίνεται με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή και λαμβάνει χώρα ένα σωληνάριο τύπου erpendorf.

Στάδια των κύκλων της PCR

Στάδιο πρώτο: θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου, και μετατροπή του DNA από σε μονόκλωνο (**denaturation**).

Στάδιο δεύτερο: οι εκκινητές συνδέονται. Ακολουθεί υβριδισμός των δύο εκκινητών με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου (**primer annealing**).

Στάδιο τρίτο: γίνεται σύνθεση DNA. Με την παρουσία της Taq DNA πολυμεράσης και των dNTPs, οι συμπληρωματικές βάσεις μπορούν και προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών με βάση την αλυσίδα DNA-εκμαγείο. Με αυτή τη διαδικασία επεκτείνονται οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες (**extension**). Η κατεύθυνση 5'→3' αποτελεί την κατεύθυνση σύνθεσης του DNA.

Κατά την εφαρμογή της τεχνικής της PCR, γίνεται μία επαναλαμβανόμενη εναλλαγή θερμοκρασιών. Τρεις θερμοκρασίες εναλλάσσονται υψηλή, σχετικά χαμηλή και ενδιάμεση.

Πιο συγκεκριμένα:

- 1.η υψηλή θερμοκρασία εξυπηρετεί στον διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA,
- 2.η σχετικά χαμηλή θερμοκρασία εξυπηρετεί στον υβριδισμό των εκκινητών με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου, και τέλος,

3.η ενδιάμεση θερμοκρασία εξυπηρετεί στην επέκταση των εκκινητών.

PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)

Η real-time PCR, αποτελεί μία παραλλαγή της PCR, η οποία περιγράφηκε προηγουμένως. Με την PCR σε πραγματικό χρόνο, μπορεί να γίνει ενίσχυση, ανίχνευση και εν συνεχεία ποσοτικοποίηση μιας αλληλουχίας-στόχου και μάλιστα με μεγαλύτερη ταχύτητα καθώς και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Το κυριότερο πλεονέκτημα της PCR σε πραγματικό χρόνο, είναι η δυνατότητα που παρέχει στο να μπορείς να παρακολουθείς την εξέλιξη της αντίδρασης, σε ανεξάρτητα από το στάδιο της. Με αυτό τον τρόπο επιτρέπεται ουσιαστικά η μέτρηση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος, το οποίο παράγεται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Αυτό γίνεται μέσω της παρακολούθησης του φθορισμού (μιας φθορίζουσας ουσίας) ο οποίος αυξάνεται.

Γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman

Η μέθοδο κατά Taqman, δύναται να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τον προσδιορισμό πολυμορφισμών σε συγκεκριμένο τμήμα του DNA. Η εν λόγω μέθοδος, δηλαδή η μέθοδος κατά Taqman αποτελεί επί της ουσίας μία PCR σε πραγματικό χρόνο. Γίνεται εφαρμογή ενός Taqman ιχνηθέτη, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με τον προς έλεγχο πολυμορφισμό. Ο ιχνηθέτης περιέχει δύο χρωστικές. Μία χρωστική η οποία είναι φθορίζουσα, ενώ η δεύτερη εκ των χρωστικών δύναται τόσο να απορροφά όσο και να εξουδετερώνει το σήμα, το οποίο προέρχεται από την πρώτη χρωστική, όταν βρίσκεται σε εγγύτητα. Σε περίπτωση που, ο υπό εξέταση πολυμορφισμός υπάρχει, τότε ιχνηθέτης θα υβριδισθεί στο αντίστοιχο τμήμα του

DNA. Όμως κατά τη διάρκεια της επέκτασης (extention) του προϊόντος της PCR, η Taq πολυμεράση θα υδρολύσει αυτόν τον ιχνηθέτη. Αυτό το γεγονός έχει ως συνέπεια να αποκόπτεται το άκρου του. Κατ' επέκταση διακόπτεται η αλληλεξουδετέρωσης του σήματος. Το τελικό αποτέλεσμα όλων αυτών των γεγονότων αποτελεί η παραγωγή φθορισμού. Στην αντίθετη περίπτωση, εάν δηλαδή ο υπό εξέταση πολυμορφισμός δεν υπάρχει, τότε ο ιχνηθέτης παραμένει ανέπαφος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην παρατηρείται κάποιος φθορισμός. Με αυτή τη μέθοδο, την οποία μόλις περιγράψαμε, και αναλόγως βεβαίως και με την ένταση παραγόμενου φθορισμού προσδιορίζεται ο γονότυπος ο οποίος υπάρχει και αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο υπό εξέταση σημείο.

Ο προσδιορισμός του πολυμορφισμού με γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman, πραγματοποιήθηκε σε ABI PRISM 7900 Sequence Detection System and analyzed with the SDS software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) [177]. Ένα ποσοστό της τάξης του 10% τυχαία επιλεγμένων δειγμάτων DNA των συμμετεχόντων, προσδιορίστηκαν γονοτυπικά για δεύτερη φορά, χωρίς να ανιχνευθεί οποιαδήποτε αναντιστοιχία.

Στατιστική ανάλυση

Η ισχύς του δείγματος υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος CaTS Power Calculator (http://csg.sph.umich.edu//abecasis/cats/gas_power_calculator/index.html) [178].

Με τη χρήση την exact test, υπολογίστηκε η ισορροπία κατά Hardy-Weinberg [Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)]. Οι διαφορές στις συχνότητες, τόσο των αλληλίων όσο και των γονοτύπων, μεταξύ των ασθενών με βλεφαρόσπασμο και των υγείων μαρτύρων υπολογίστηκαν με τα Fisher's exact test και Pearson's chi-square test.

Με το SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats/>) [179] υπολογίστηκαν τα odds ratios (ORs) μαζί με τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης [(95% confidence intervals (CIs)] και υποθέτοντας πέντε γενετικούς τρόπους κληρονομικότητας:

- 1.co-dominant,
- 2.dominant,
- 3.recessive,
4. over-dominant και
- 5.additive.

Στο co-dominant μοντέλο κυριαρχίας, εκτιμήθηκε ένα συνολικό p-value με 2 βαθμούς ελευθερίας και δύο ORs για τον SNP [ένα για την ετεροζυγωτία για το ελάσσον (mutant) αλληλόμορφο, σε σύγκριση με την ομοζυγωτία για το μείζον (wild) αλληλόμορφο (mt/wt έναντι wt/wt) και ένα για την ομόζυγοτία του ελάσσονος (mutant) αλληλομόρφου σε σύγκριση με την ομοζυγωτία για το μείζον (wild) αλληλόμορφο (mt/mt έναντι wt/wt)].

Στο dominant μοντέλο, το άθροισμα της ομοζυγωτίας για το ελάσσον (mutant) αλληλόμορφο και της ετεροζυγωτίας συγκρίθηκε με την ομοζυγωτία για το μείζον (wild) αλληλόμορφο (mt/mt + mt/wt έναντι wt/wt).

Στο recessive, η ομοζυγωτία για το ελάσσον (mutant) αλληλόμορφο συγκρίθηκε με το άθροισμα της ομοζυγωτίας για το μείζον (wild) αλληλόμορφο και της ετεροζυγωτίας (mt/mt έναντι mt/wt + wt/wt).

Στον over-dominant μοντέλο, η ετεροζυγωτία συγκρίνεται με το άθροισμα των ομοζυγωτιών (mt/wt έναντι mt/mt + wt/wt).

Τέλος, στο additive μοντέλο, κάθε αντίγραφο του ελάσσονος (mutant) αλληλόμορφου θεωρείται ότι τροποποιεί τον κίνδυνο με ένα πρόσθετο τρόπο, έτσι ώστε το ομοζυγωτία για ελάσσον (mutant) αλληλίο (mt/mt) να έχει διπλάσιο κίνδυνο σε σύγκριση με ετεροζυγωτία (mt/wt).

Για να εκτιμηθεί ο κίνδυνος εκδήλωσης βλεφαρόσπασμου, χρησιμοποιήσαμε επίσης και το generalized odds ratio (OR_G) [180, 181], χρησιμοποιώντας το λογισμικό ORGGASMA (www.biomath.uth.gr). Αυτό εκφράζει την πιθανότητα εμφάνισης ασθένειας σε σύγκριση με την πιθανότητα μη εμφάνισης νόσου, δεδομένου ότι το φορτίο μετάλλαξης είναι υψηλότερο σε ασθενείς σε σχέση με τους μη πάσχοντες [180, 181].

Τιμές χαμηλότερες του 0,05 θεωρήθηκαν ως σημαντικές στατιστικά. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων υλοποιήθηκε με SPSS έκδοση 17.0.

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μέτα-ανάλυση για τον rs6265 στο BDNF γονίδιο

Βιβλιογραφική αναζήτηση

Η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε στη βάση δεδομένων PubMed για να βρεθούν οι διαθέσιμες μελέτες οι οποίες θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στην μέτα-ανάλυση. Η αναζήτηση περιλάμβανε άρθρα από την ίδρυση του PubMed έως την 4η Ιουνίου του 2018. Οι όροι αναζήτησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) «dystonia» ή β) «blepharospasm» σε συνδυασμό με τους όρους «BDNF» και «polymorphism», ως ελεύθερες λέξεις. Ο λεπτομερής αλγόριθμος αναζήτησης παρουσιάζεται στο **Συμπληρωματικό Αρχείο 1**. Οι τίτλοι και οι περιλήψεις των άρθρων που εντοπίστηκαν, αξιολογήθηκαν με σκοπό να προσδιοριστεί η συμπερίληψη τους στην μέτα-ανάλυση. Συμπεριλήφθηκαν μόνο άρθρα γραμμένα στην αγγλική γλώσσα. Η τελευταία αναζήτηση της βιβλιογραφίας πραγματοποιήθηκε στις 4 Ιουνίου 2018. Επιπλέον, ελέγχθηκαν οι βιβλιογραφικές αναφορές των πλήρων άρθρων που εντοπίστηκαν με τη αναζήτηση στο PubMed, με σκοπό να βρεθούν μελέτες οι οποίες δεν ανευρέθηκαν με την αρχική αναζήτηση.

Τα κριτήρια ώστε να συμπεριληφθεί μία μελέτη στην ανάλυση ήταν: α) να είναι μελέτη ασθενών-μαρτύρων, που να περιλαμβάνει ασθενείς με βλεφαρόσπασμο και νευρολογικά υγιείς μάρτυρες, β) να έχει γίνει γονοτύπηση για τον rs6265 του γονιδίου BDNF, γ) οι συχνότητες των γονοτύπων του rs6265 να είναι διαθέσιμες είτε στις μελέτες ή στις προηγούμενες μέτα-αναλύσεις. Οι συμμετέχοντες σε κάθε μελέτη ταξινομήθηκαν με βάση τις αρχικές φαινοτυπικές ταξινομήσεις.

Συμπληρωματικό Αρχείο 1. Ο λεπτομερής αλγόριθμος αναζήτησης.

Terms “dystonia”, “BDNF” and “polymorphism”:

("dystonic disorders"[MeSH Terms] OR ("dystonic"[All Fields] AND "disorders"[All Fields]) OR "dystonic disorders"[All Fields] OR "dystonia"[All Fields] OR "dystonia"[MeSH Terms]) AND ("brain-derived neurotrophic factor"[MeSH Terms] OR ("brain-derived"[All Fields] AND "neurotrophic"[All Fields] AND "factor"[All Fields]) OR "brain-derived neurotrophic factor"[All Fields] OR "bdnf"[All Fields]) AND ("polymorphism, genetic"[MeSH Terms] OR ("polymorphism"[All Fields] AND "genetic"[All Fields]) OR "genetic polymorphism"[All Fields] OR "polymorphism"[All Fields])

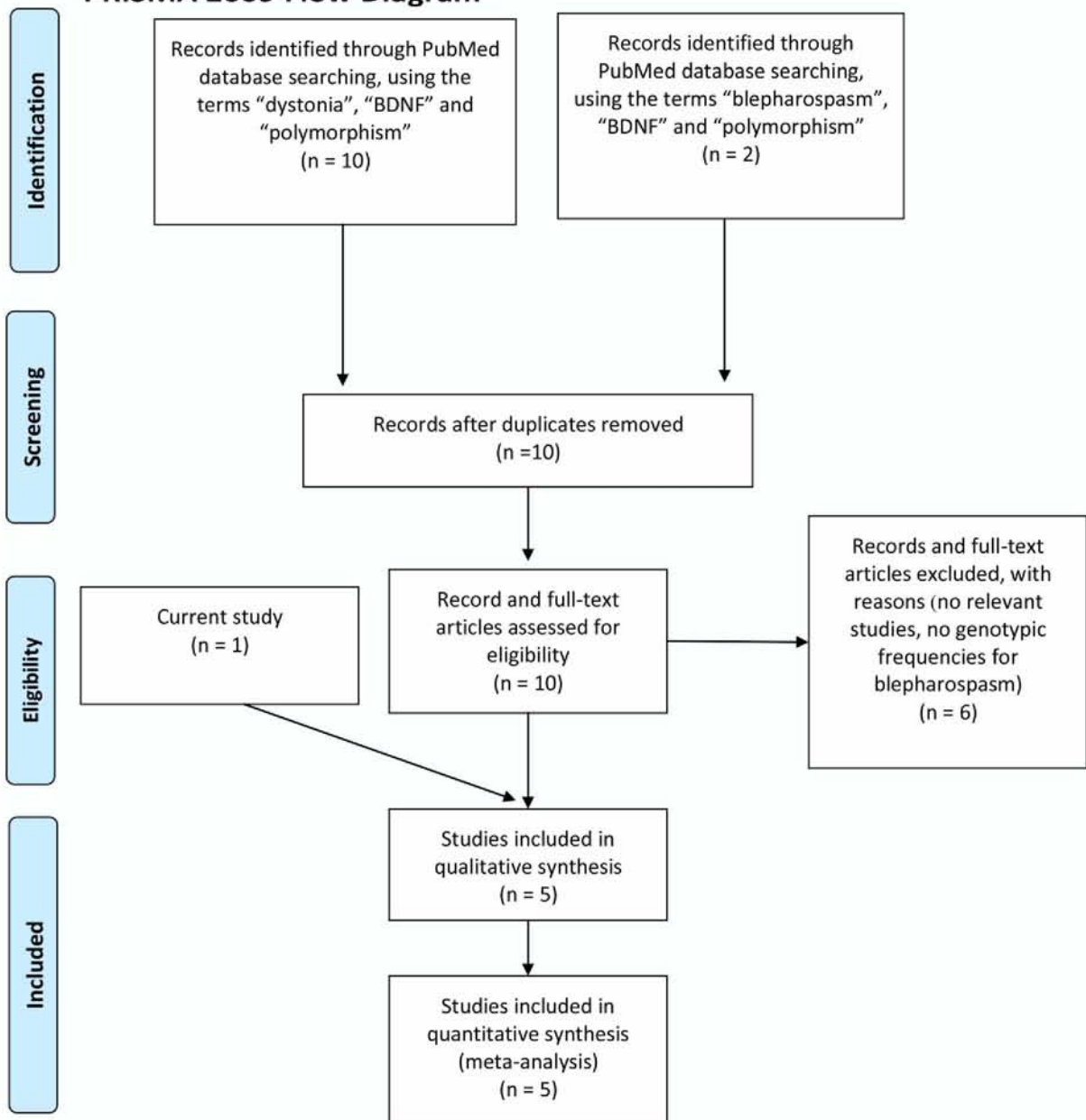
Terms “blepharospasm”, “BDNF” and “polymorphism”:

("blepharospasm"[MeSH Terms] OR "blepharospasm"[All Fields]) AND ("brain-derived neurotrophic factor"[MeSH Terms] OR ("brain-derived"[All Fields] AND "neurotrophic"[All Fields] AND "factor"[All Fields]) OR "brain-derived neurotrophic factor"[All Fields] OR "bdnf"[All Fields]) AND ("polymorphism, genetic"[MeSH Terms] OR ("polymorphism"[All Fields] AND "genetic"[All Fields]) OR "genetic polymorphism"[All Fields] OR "polymorphism"[All Fields])

Εξαγωγή δεδομένων

Ο συγγραφέας, το έτος δημοσίευσης, η εθνικότητα, ο αριθμός των ασθενών με βλεφαρόσπασμο και των υγείων μαρτύρων, η μέση ηλικία, το φύλο, το οικογενειακό ιστορικό, η ηλικία έναρξης της νόσου, ο έλεγχος ή μη για την μετάλλαξη TOR1A ΔGAG, ο έλεγχος για την ισορροπία κατά Hardy-Weinberg [Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)], καθώς και οι φαινότυποι της δυστονίας εξήχθησαν από κάθε μελέτη, όταν ήταν διαθέσιμα. Η πλήρης διαδικασία επιλογής των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στην μέτα-ανάλυση είναι διαθέσιμη, στο **Συμπληρωματικό Αρχείο 2**.

PRISMA 2009 Flow Diagram



From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.

Συμπληρωματικό Αρχείο 2

Στατιστική ανάλυση

Η συσχέτιση μεταξύ του rs6265 και του βλεφαρόσπασμο εκτιμήθηκε με υπολογισμό των pooled ORs και των αντίστοιχων 95% CIs για:

- α) τον mt/mt γονότυπο,
- β) τον mt/wt γονότυπο και
- γ) dominant μοντέλο (mt/mt+wt/mt vs wt/wt).

Με το Z-test, προσδιορίστηκε η στατιστική σημαντικότητα των OR (το κατώφλι σημαντικότητας ήταν το 0,05 , και επομένως όλες οι τιμές $p < 0,05$ χαρακτηρίστηκαν ως σημαντικά στατιστικά). Επιπλέον, η συσχέτιση μεταξύ της κατανομής του γονότυπου και των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών εκτιμήθηκε και με το OR_G και τα αντίστοιχα 95% CIs. Επιπλέον, το OR_G και τα αντίστοιχα 95% CIs υπολογίστηκαν επίσης και για κάθε μελέτη που συμπεριλήφθηκε στην μέτα-ανάλυση. Πραγματοποιήθηκαν, μια συνολική ανάλυση (που συμπεριλήφθηκαν μελέτες ανεξάρτητα από την εθνικότητα των συμμετεχόντων), και επιπλέον ανάλυση σε μελέτες με Ευρωπαϊκούς και Καυκάσιους πληθυσμούς.

Το Cochran's Q και ο δείκτης I^2 , χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της στατιστικής ετερογένειας των μελετών. Όταν υπήρχε ουσιαστική ετερογένεια ($P_Q < 0,10$ ή/και $I^2 > 75\%$), random-effects model (the DerSimonian and Laird method) χρησιμοποιήθηκαν [182, 183]. Σε αντίθετη περίπτωση, εφαρμόστηκε το fixed-effects model (the Mantel-Haenszel method) [184]. Το publication bias αξιολογήθηκε γραφικά με τα funnel plots. Επίσης εκτιμήθηκε και με το Egger's test [185] (με $p < 0,10$ ως το κατώφλι σημαντικότητας).

Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του λογισμικού Review Manager (RevMan) Version 5.3 (<http://tech.cochrane.org/revman>). Το OR_G εκτιμήθηκαν με το λογισμικό ORGGASMA (www.biomath.uth.gr). Στο **Συμπληρωματικό αρχείο 3**, είναι διαθέσιμες οι PRISMA-guidelines [186] (www.prisma-statement.org) για την παρούσα μετά-ανάλυση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελέτη ασθενών-μαρτύρων

Σε αυτή τη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 206 ασθενείς με βλεφαρόσπασμο (54,9% γυναίκες) και 206 υγιείς μάρτυρες (matched για ηλικία και το φύλο). Η μέση ηλικία κατά τη διάρκεια της συλλογής του αίματος ήταν $67,32 \pm 12,02$ έτη και η μέση ηλικία έναρξης του βλεφαρόσπασμου ήταν $61,15 \pm 12,03$ έτη.

Αποτελέσματα για τον rs6265 στο BDNF γονίδιο

Η γονοτύπηση ήταν επιτυχής σε ποσοστό (genotyping call rate) $>98,5\%$. Δεν παρατηρήθηκε απόκλιση από την HWE ($p>0,05$). Σύμφωνα με την ανάλυση της ισχύς της μελέτης, η μελέτη μας για τον rs6265 είχε 80,0% ισχύ για να ανιχνεύσει μια συσχέτιση ενός SNP με γενετικό σχετικό κίνδυνο 1,48, υπό την υπόθεση του multicartivate μοντέλου, συχνότητας ελάσσονος αλληλόμορφου ίση με 23% στους ασθενείς με βλεφαρόσπασμο, επίπεδο σφάλματος τύπου 1 ίσο με 0,05, σε ένα δείγμα αποτελούμενο από από 206 υγιείς μάρτυρες και 206 ασθενείς με βλεφαρόσπασμο.

Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη συχνότητα των και των αλληλίων ($p=0,057$) και των γονότυπων ($p=0,13$), μεταξύ των ασθενών και ασθενών με βλεφαρόσπασμο. Οι συχνότητες αλληλομόρφων και γονότυπων στους ασθενείς με βλεφαρόσπασμο και στους υγιείς μάρτυρες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**.

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του rs6265 και τον βλεφαρόσπασμο βρέθηκε στον dominant μοντέλο [OR (95% CI): 1,52 (1,01-2,29), $p = 0,044$]. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του rs6265 στον κίνδυνο εμφάνισης του βλεφαρόσπασμου στα άλλα μοντέλα κληρονόμησης ($p> 0,05$). Οι τιμές ORs, CIs και p για όλους τα μοντέλα είναι

διαθέσιμα στον **Πίνακα 4**. Τέλος, η ανάλυση με το OR_G, έδειξε ότι υψηλότερο φορτίο του αλληλόμορφου "A" του rs6265 υποδηλώνει μεγαλύτερη πιθανότητα ενός ατόμου να αναπτύξει βλεφαρόσπασμο (OR_G 1,48 95% CI 1,00-2,19).

Πίνακας 3: Συχνότητες αλληλομόρφων και γονότυπων για τον BDNF rs6265 στους υγιείς μάρτυρες, στους ασθενείς με βλεφαρόσπασμο και σε όλο το δείγμα.

SNP	Γονότυπος/ Αλληλόμορφο	Υγιείς μάρτυρες n=206	Ασθενείς με βλεφαρόσπασμο n=206	Όλο το δείγμα n=412	p-value*
rs6265		n (%)	n (%)	n (%)	
Γονότυπος	G/G	142 (0,60)	120 (0,6)	262 (0,65)	0,13
	G/A	55 (0,27)	71 (0,35)	126 (0,31)	
	A/A	8 (0,04)	10 (0,05)	18 (0,04)	
Αλληλίο	G	339 (0,83)	311 (0,77)	650 (0,8)	0,057
	A	71 (0,17)	91 (0,23)	162 (0,2)	

SNP, single nucleotide polymorphism; BDNF, brain-derived neurotrophic factor.

*Η σύγκριση όσον αφορά τη συχνότητα των και των αλληλίων (p=0,057) και των γονότυπων (p=0,13), μεταξύ των ασθενών και ασθενών με βλεφαρόσπασμο Fisher's exact test και Pearson's chi-square test.

Πίνακας 4: Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ του rs6265 (BDNF) και του βλεφαρόσπασμου, στα co-dominant, dominant, recessive, over-dominant και log-additive μοντέλα.

Μοντέλο	Γονότυπος	OR (95%CI)	p-value
Codominant	G/G	1,00	0,13
	G/A	1,53 (1,00-2,34)	
	A/A	1,48 (0,57-3,87)	
Dominant	G/G	1,00	0,044
	G/A-A/A	1,52 (1,01-2,29)	
Recessive	G/G-G/A	1,00	0,6
	A/A	1,29 (0,50-3,34)	
Overdominant	G/G-A/A	1,00	0,064
	G/A	1,49 (0,98-2,27)	
Log-additive	---	1,39 (0,98-1,96)	0,061

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CI, confidence interval; OR, odds ratio; Οι στατιστικά σημαντικές τιμές απεικονίζονται με έντονα γράμματα.

Αποτελέσματα για τον rs75392628 στο TREM2 γονίδιο

Η γονοτύπηση ήταν επιτυχής σε ποσοστό (genotyping call rate) >97,82%. Πιο συγκεκριμένα η γονοτύπηση ήταν επιτυχής σε 403 από τους 412 συμμετέχοντες. Από τους 206 ασθενείς με βλεφαρόσπασμο γονοτυπήθηκαν επιτυχώς οι 199 από τους 206, ενώ από τους υγιείς μάρτυρες οι 204 από τους 206. Όλοι οι συμμετέχοντες, στους οποίους ήταν επιτυχής η γονοτύπηση, ήταν ομοζυγώτες για το C αλληλόμορφο του rs75392628. Δεν ανιχνεύθηκε κανένα αλληλόμορφο T στο δείγμα μας επομένως δεν ήταν δυνατή περαιτέρω ανάλυση για τη συγκεκριμένη γενετική παραλλαγή.

ΣΥΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μέτα-ανάλυση για τον rs6265 στο BDNF γονίδιο

Διαδικασία επιλογής μελετών και χαρακτηριστικά των συμπεριλαμβανόμενων μελετών

Μετά την αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed με βάση τον αλγόριθμο όπως περιγράφηκε και μετά την αφαίρεση των άρθρων που βρέθηκαν δύο φορές, βρέθηκαν 10 μελέτες που δημοσιεύθηκαν μεταξύ τον Δεκέμβριο του 2008 και τον Μαρτίου του 2015 και θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στην μέτα-ανάλυση. Δύο ανεξάρτητοι κριτές (B.Σ. και E.Δ.) εξέτασαν τους τίτλους και τις περιλήψεις, για να εξετασθεί το αν μπορούν να συμπεριληφθούν στην μέτα-ανάλυση. Οκτώ μελέτες κρίθηκαν κατάλληλες για να συμπεριληφθούν. Ωστόσο, η μελέτη των Sako και συν. (2015) [40] δεν συμπεριλήφθηκε, καθώς ήταν μέτα-ανάλυση. Από τις υπόλοιπες 7 μελέτες [38, 39, 77, 83-86], δεν ήταν δυνατή η ανάκτηση των γονοτυπικών συχνοτήτων για τους ασθενείς με βλεφαρόσπασμο σε 3 από αυτές [38, 83, 84]. Ως εκ τούτου, τέσσερις μελέτες [39, 77, 85, 86] μαζί με την παρούσα μελέτη, συμπεριλήφθηκαν τελικά στην μέτα-ανάλυση, με συνολικά 572 ασθενείς με βλεφαρόσπασμο και 1745 υγιείς μάρτυρες. Τα χαρακτηριστικά των μελετών που συμπεριελήφθησαν στην μέτα-ανάλυση (εκτός της τρέχουσας μελέτης), απεικονίζονται στον

Συμπληρωματικό Πίνακα 1.

Συμπληρωματικός Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά των συμπεριλαμβανόμενων μελετών σχετικά με τη δυστονία και τον πολυμορφισμό BDNF rs6265.									
Συγγραφέας (Έτος)/ Πληθυσμός	ΔGAG παθογόνος παραλλαγή/θετικό οικογενειακό ιστορικό/ HWE έλεγχος	Φαινότυποι δυστονίας	Ασθενείς με δυστονία			Υγιείς μάρτυρες			Κύρια αποτελέσματα
			Μέση ηλικία±SD/ Ηλικία έναρξης±SD	N	Άνδρες/ Γυναίκες	Μέση ηλικία±SD	n	Άνδρες/ Γυναίκες	
Martino et al. (2009)/ Ιταλικός	-/- /ασθενείς και μάρτυρες	δυστονία με εκδήλωση στην ενηλίκου ζωή που επηρεάζει τις κρανιακές και/ή τις τραχηλικές περιοχές	59.3+14.5/51.2+14.4	156	53/113	56.3+15.6	170	59/111	Αρνητικά
Chen et al. (2013)/ Νοτιοδυτική Κίνα	Όχι/Ναι/ασθενείς και μάρτυρες	Αυθενική δυστονία, Βλεφαρόσπασμος και κρανιο-αυθενική δυστονία	Μη διαθέσιμο/39.06+17.04	193	69/124	-	216	-	Θετικά
Svetel et al. (2013)/ Σερβικός	-/- /ασθενείς και μάρτυρες	Βλεφαρόσπασμος, τμηματική δυστονία, Βλεφαρόσπασμος σαν τμήμα τμηματικής δυστονίας, εστιακή αυθενική δυστονία, και γραφόσπασμος	51.27+14.68/41.5+15.7	149	-	-	366	-	Αρνητικά
Gomez-Garre et al. (2014)/ Καυκάσιος (Τοποθεσία Ισπανία)	-/- /μάρτυρες	Εστιακή δυστονία (Βλεφαρόσπασμος, αυθενική δυστονία, κράμπα του συγγραφέα, και άλλες επηρεασμένες περιοχές), τμηματική δυστονία, πολυεστιακή δυστονία, γενικευμένη δυστονία και δυστονικός τρόμος	61+15/48+17	680	246/434	56+15	788	324/464	Αρνητικά

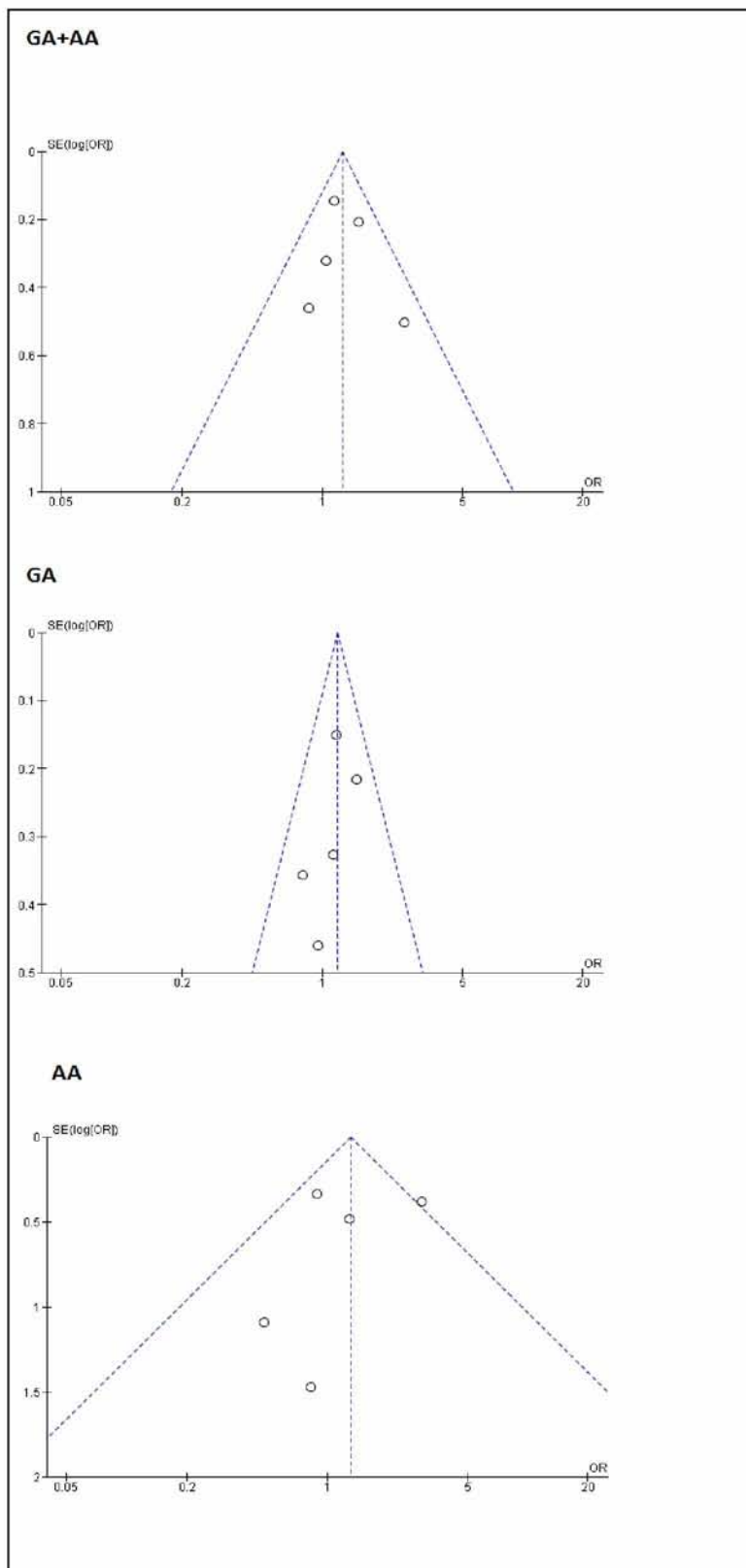
BDNF, brain-derived neurotrophic factor; HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium.

Έλεγχος ετερογένειας

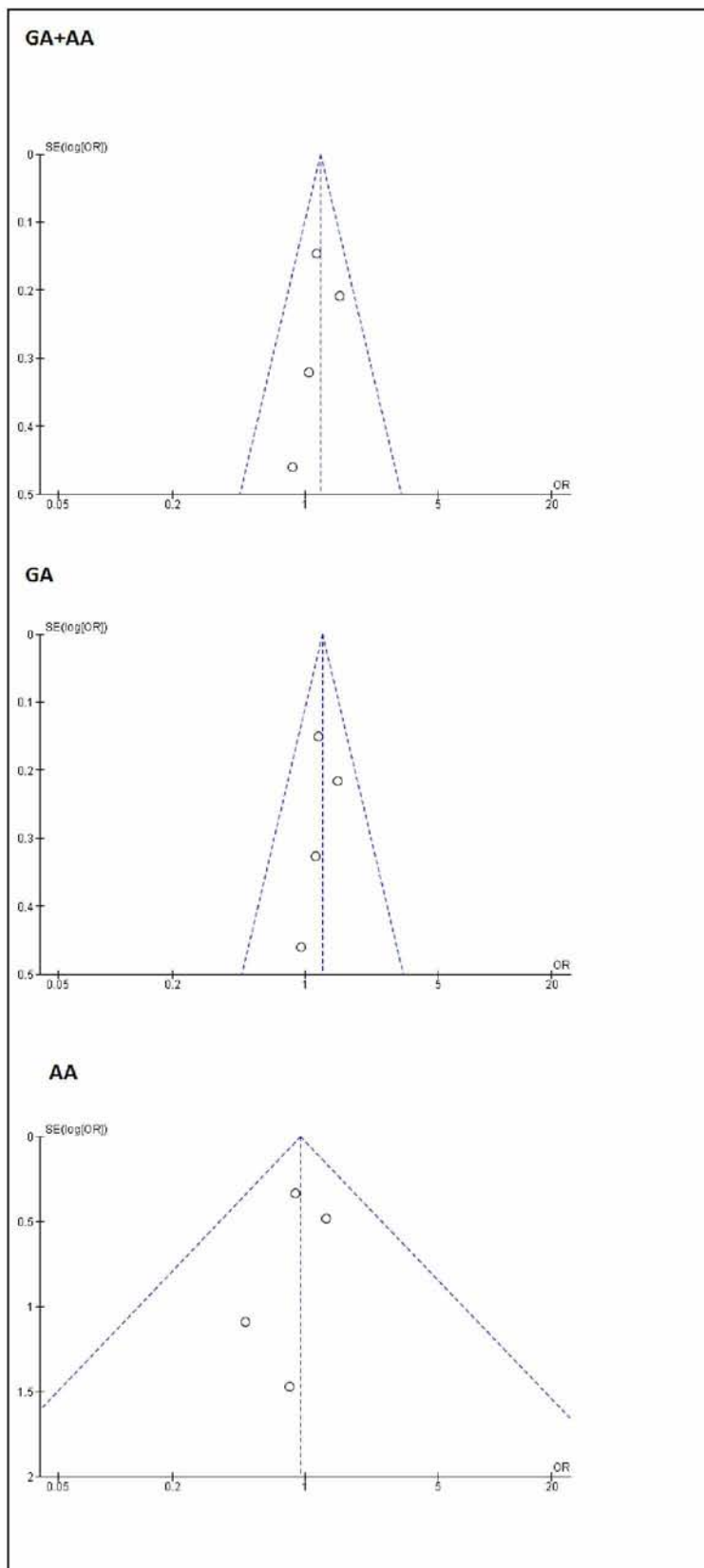
Δεν παρατηρήθηκε σημαντική ετερογένεια σε καμία από τις αναλύσεις ($I^2 \leq 42,28\%$ και $P_Q \geq 0,13$). Ως εκ τούτου, fixed-effect models εφαρμόστηκαν, όπως περιγράφονται εκτενώς στις μεθόδους της ανάλυσης.

Publication Bias

Τα Funnel Plots (**Συμπληρωματική Εικόνα 1** για την συνολική ανάλυση & **Συμπληρωματική Εικόνα 2** για την ανάλυση σε Ευρωπαϊκούς και Καυκάσιους), δεν έδειξαν καμία σημαντική ασυμμετρία, σε καμία από τις συγκρίσεις. Επίσης, δεν προέκυψε καμία ένδειξη για publication bias με βάση τα αποτελέσματα από το Egger's test ($p=0,812$ για τη συνολική ανάλυση και $p=0,778$ για την ανάλυση στην υποομάδα με Ευρωπαϊκούς και Καυκάσιους πληθυσμούς).



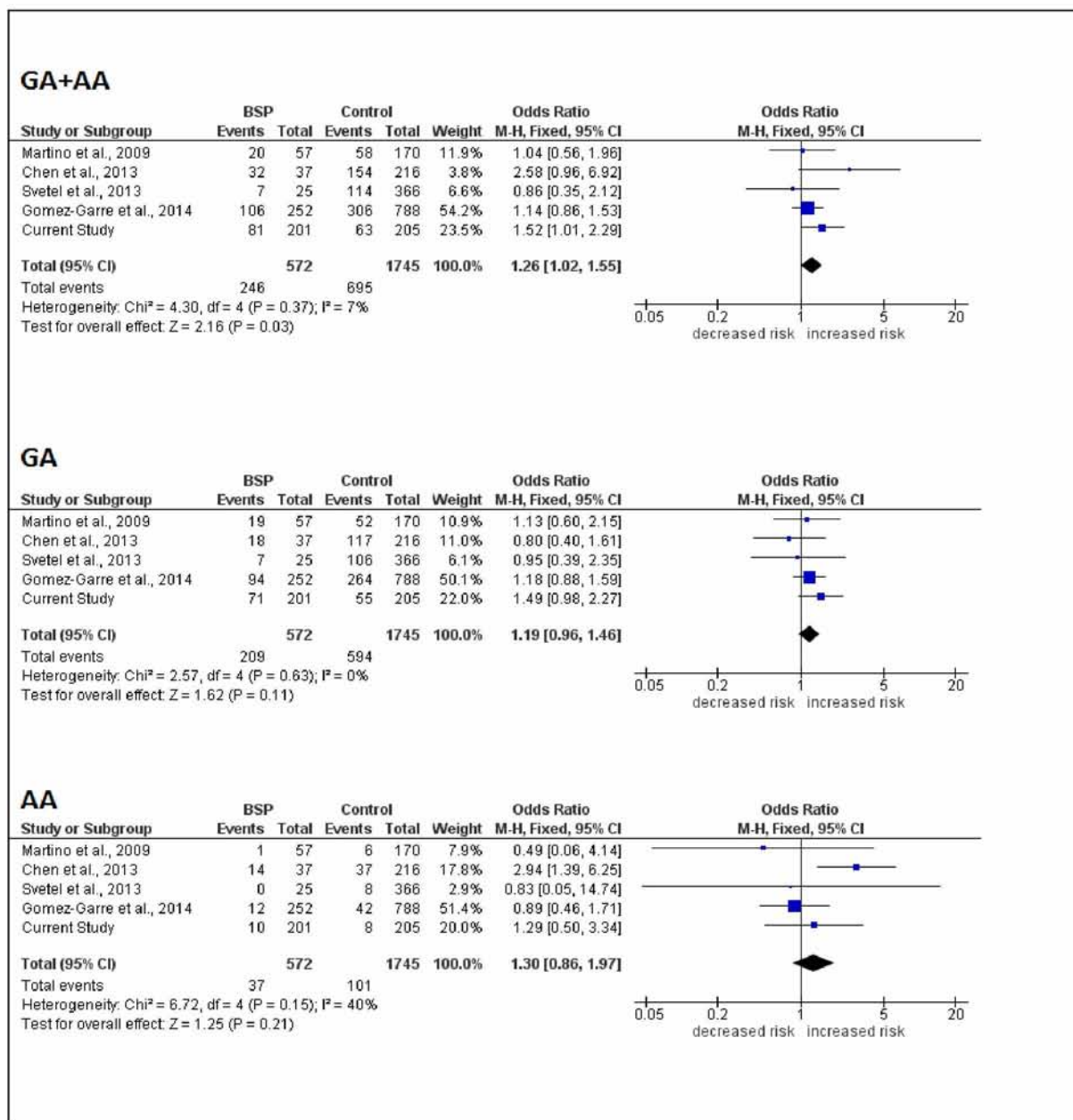
Συμπληρωματική Εικόνα 1



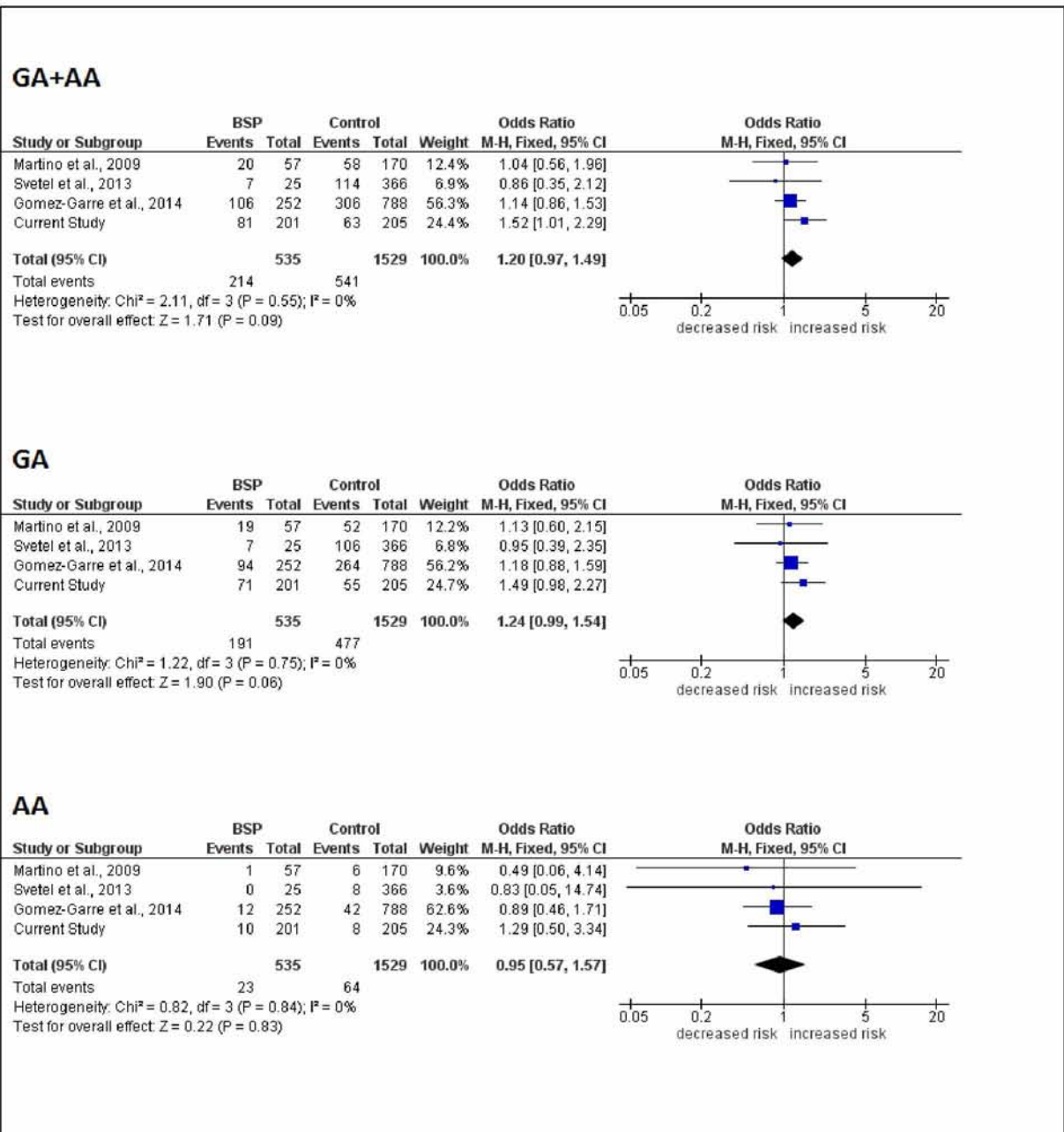
Συμπληρωματική εικόνα 2

Αποτελέσματα

Τα κύρια αποτελέσματα απεικονίζονται με τα Forest Plots στο Συμπληρωματική Εικόνα 3 για τη συνολική ανάλυση, και στο Συμπληρωματική Εικόνα 4 για την ανάλυση στην υποομάδα με Ευρωπαϊκούς και Καυκάσιους πληθυσμούς.



Συμπληρωματική Εικόνα 3



Συμπληρωματική Εικόνα 4

Συσχέτιση μεταξύ του rs6265 και του βλεφαρόσπασμου βρέθηκε στο dominant μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, ο rs6265 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο βλεφαρόσπασμου στο dominant μοντέλο στην συνολική ανάλυση (GA + AA έναντι GG) [OR: 1.26; 95% CI: 1.02-

1.55, $p_z = 0.03$]. Οι γονοτυπικές συχνότητες και τα αντίστοιχα αποτελέσματα με την ανάλυση με τη χρήση των OR_G s, παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 2**. Σύμφωνα με αυτό, το αυξημένο φορτίο ου αλληλόμορφου "A" του rs6265 δηλώνει μεγαλύτερη πιθανότητα ενός υποκειμένου αναπτύξει βλεφαρόσπασμο (OR_G 1,26 95% CI 1,04-1,53).

Συμπληρωματικός Πίνακας 2: Εκτιμήσεις μεμονωμένων μελετών και συγκεντρωτικά αποτελέσματα, για το rs6265 BDNF και τον κίνδυνο BSP, με το generalized odds ratio (OR_G).

Πολυμορφισμός	Συγγραφέας (Έτος)	Υγιείς Μάρτυρες			Ασθενείς με βλεφρόσπασμο			Model-free OR_G (95%CI)	Model	
		wt	ht	mt	wt	ht	mt			
rs6265		wt	ht	mt	wt	ht	mt	OR_G (95%CI)		
	Martino et al. (2009)	112	52	6	37	19	1	1,01 (0,55-1,86)		
	Chen et al. (2013)	62	117	37	5	18	14	2,52 (1,33-4,79)		
	Svetel et al. (2013)	252	106	8	18	7	0	0,92 (0,39-2,18)		
	Gomez-Garre et al. (2014)	482	264	42	146	94	12	1,11 (0,85-1,46)		
	Current study	142	55	8	120	71	10	1,48 (1,00-2,19)		
Συνολική ανάλυση										
	Συγκεντρωτικά δεδομένα	1050	594	101	326	209	37	1,26 (1,04-1,53)	Fixed	
	Heterogeneity I^2								42,28%	
	P_Q								0,13	
Καυκάσιοι/Ευρωπαίοι										
	Συγκεντρωτικά δεδομένα	988	477	64	321	191	23	1,18 (0,96-1,44)	Fixed	
	Heterogeneity I^2								0%	
	P_Q								0,56	

wt, ομοζυγώτες για το wild αλληλίο; ht, ετεροζυγώτες; mt, ομοζυγώτες για το mutant αλληλίο; CI, confidence interval; OR_G , generalized odds ratio; Οι στατιστικά σημαντικές τιμές απεικονίζονται με έντονα

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δυστονία αποτελεί μία κινητική διαταραχή, η οποία μπορεί να προκληθεί από μια σειρά αιτιολογικών παραγόντων και μπορεί να παρουσιαστεί με μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά τη φαινοτυπική εμφάνιση [2, 187, 188]. Παρά την ετερογενή της φύση, φαίνεται να υπάρχει κάποια αλληλεπικάλυψη μεταξύ των υπο-φαινοτύπων της δυστονίας σε κλινικό και γενετικό επίπεδο [72]. Ωστόσο, τα διαφορετικά σύνδρομα δυστονίας δεν φαίνεται να μοιράζονται μια ενιαία αιτιολογία ή παθοφυσιολογία [189]. Επομένως, διαγνωστικά κριτήρια για τη δυστονία είναι δύσκολο να θεσπιστούν, παρά το γεγονός ότι αρκετά έχουν προταθεί με την πάροδο του χρόνου [189]. Επομένως, ένας οδηγός για την κλινική αξιολόγηση της δυστονίας έγκειται στην πρόσφατη επικαιροποιημένη ταξινόμηση της δυστονίας, η οποία βασίζεται σε δύο ξεχωριστούς άξονες: την αιτιολογία της δυστονίας και την κλινική της εμφάνιση [1].

Η κατανόηση της γενετικής βάσης των μονογονιδιακών και των σποραδικών μορφών της δυστονίας θα επιτρέψει την κατανόηση και στη βαθύτερη γνώση της παθογένειας της δυστονίας. Αυτό θα προσφέρει στους γιατρούς, πιο εξατομικευμένες προσεγγίσεις, για να διαχειριστούν τη δυστονία στο μέλλον, ακόμα και από τη στιγμή της διάγνωσης. Επίσης θα μπορεί ίσως να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της βιολογικής εξέλιξης της νόσου και για την καθοδήγηση στις θεραπευτικές αποφάσεις [190]. Η ισχυρότερη κατανόηση της γενετικής της δυστονίας θα μπορούσε να βελτιώσει επίπεδο παροχής γενετικών συμβουλών. Μελλοντικά ίσως να είναι δυνατές στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις σε επίπεδο DNA ή/και RNA [71, 90].

Η γενετική αρχιτεκτονική της δυστονίας έχει διερευνηθεί με μελέτες ασθενών-μαρτύρων, μελέτες γενετικής σύνδεσης (linkage analysis), GWASs, WES και μέτα-αναλύσεις

[45-47, 72, 143]. Μέχρι σήμερα, αυτές οι προσπάθειες έχουν φανερώσει μερικές παθογόνες γενετικές παραλλαγές που οδηγούν σε περιπτώσεις μονογονιδιακών δυστονιών [25, 95], καθώς επίσης έχουν αποκαλύψει γενετικές παραλλαγές που θεωρούνται ότι προσδίδουν ευαισθησία για την ανάπτυξη δυστονίας [72].

Προηγούμενες μελέτες ασθενών μαρτύρων, σχετικά με τη δυστονία, σπάνια εξέταζαν την επίδραση γενετικών παραλλαγών έπειτα από ταξινόμηση των συμμετεχόντων ως προς τον φαινότυπο του βλεφαρόσπασμου. Συνεπώς, μόνο μερικοί γενετικοί τόποι έχουν συσχετιστεί με τον βλεφαρόσπασμο. Πιο συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο 2 του DRD5 και το D1.1 του γονιδίου του D1 receptor έχουν συσχετιστεί με τον βλεφαρόσπασμο [34]. Επιπλέον, το ελάσσων αλληλίο του rs1182 του γονιδίου TOR1A έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την εξάπλωση του βλεφαρόσπασμου σε γειτονικές περιοχές του σώματος [130]. Η πιο εκτεταμένα μελετημένος πολυμορφισμός σχετικά με τον βλεφαρόσπασμο, φαίνεται να είναι rs6265 του BDNF. Εκτός από τη συσχέτιση του με την βλεφαρόσπασμο [39], ο rs6265 έχει αναφερθεί ότι συσχετίζεται με αυχενική δυστονία [38] και με αμφοτερόπλευρο τρόμο σε ασθενείς με αυχενική δυστονία [83].

Από όσο γνωρίζουμε, μέχρι σήμερα έχουν υλοποιηθεί δύο GWASs που αφορούν εστιακές δυστονίες [46, 47]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, υπάρχει μια προκαταρκτική ένδειξη ότι οι γενετικές παραλλαγές της ARSG μπορεί να αυξάνουν την ευαισθησία για εμφάνιση της δυστονία του μουσικού, και επίσης γενετικές παραλλαγές του NALCN για εμφάνιση εστιακής αυχενικής δυστονίας [46, 47]. Η ομάδα της Lohmann et al. (2014) ανέφεραν ότι ο ιντρονικός rs11655081 στο γονίδιο ARSG συσχετίστηκε με συγκεκριμένους υπο-φαινότυπους εστιακής δυστονίας (πιο συγκεκριμένα δυστονία του μουσικού και κράμπα συγγραφέα) [46]. Αυτά τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν επίσης σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση, η οποία ανέφερε συσχέτισε τον rs11655081 συνδέεται με την δυστονία του

μουσικού [45]. Όσον αφορά την ίδια μέτα-ανάλυση, οι rs7342975 και rs9972951 στο γονίδιο ARSG παρουσίασαν μια τάση συσχέτιση πριν από τη διόρθωση για πολλαπλές δοκιμές [45]. Τέλος, η παραλλαγή ARSG missense rs61999318 έχει αναφερθεί ότι είναι συχνότερος σε ασθενείς με κράμπα του συγγραφέα σε σύγκριση με δεδομένα από τη βάση δεδομένων EVS [117]. Αντίθετα, το rs11655081 απέτυχε να επιτύχει το κατώτατο όριο στατιστικής σημαντικότητας, όσον αφορά τη σύνδεσή του με άλλους φαινοτύπους (αυχενική δυστονία, βλεφαρόσπασμο και άλλες μορφές εστιακής δυστονίας) [46].

Σύμφωνα με τη GWAS των Mok και συν. αρκετές παραλλαγές κοντά στο εξόνιο 1 του NALCN γονιδίων βρέθηκαν να προσεγγίζουν το όριο στατιστική σημαντικότητας σε έναν βρετανικό πληθυσμό ασθενών με αυχενική δυστονία [47]. Οι στατιστικά πιο σημαντικές παραλλαγές ήταν στο γονίδιο NALCN, στο γονίδιο COL4A1, στο γονίδιο RGL1, στο γονίδιο OR4X2 3, διαγονιδιακά, KIAA1715, OR4B1 [47]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα όμως αυτής της GWAS δεν επιβεβαιώθηκαν σε μετέπειτα μελέτες [120, 121]. Πρόσφατα, ανιχνεύθηκαν επιβλαβείς γενετικές παραλλαγές στα CACNA1A, DNAH17, TRPV4, CAPN11, VPS13C, UNC13B, SPTBN4, MYOD1 και MRPL15 γονίδια με τη μέθοδο WES, σε ασθενείς με βλεφαρόσπασμο [143].

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήσαμε μία μελέτη ασθενών-μαρτύρων, συμπεριλαμβάνοντας έναν αξιοσημείωτο αριθμό συμμετεχόντων, και επιδιώξαμε να διερευνήσουμε την επίδραση του rs6265 BDNF στον κίνδυνο για την εμφάνιση βλεφαρόσπασμου. Με βάση τα αποτελέσματά μας, εντοπίσαμε μία οριακά στατιστικά σημαντική επίπτωση της rs6265 στον κίνδυνο του βλεφαρόσπασμου. Το αποτέλεσμα αυτό επικυρώθηκε επίσης, μετά από τη μέτα-ανάλυση, σύμφωνα με την οποία αναλύσαμε τα αποτελέσματα μας από την μελέτη ασθενών-μαρτύρων, μαζί με τα αντίστοιχα σχετικά αποτελέσματα προηγούμενων μελετών

Η απουσία του rs6265 οδηγεί σε φυσιολογικό BDNF, με βαλίνη (Val) στο κωδικόνιο 66 εντός του prodomain του BDNF, οδηγώντας σε φυσιολογική σηματοδότηση BDNF-TRKB, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε φυσιολογική νευρωνική πλαστικότητα [78-80]. Αντίθετα, ο rs6265 οδηγεί σε αντικατάσταση με Val66Met, εμποδίζει την απελευθέρωση του BDNF από τους νευρώνες, αλλάζοντας ταυτόχρονα τη δομή του BDNF prodomain (Met prodomain) [78-80]. Η μειωμένη απελευθέρωση BDNF οδηγεί σε μειωμένη σηματοδότηση BDNF-TRKB, η οποία οδηγεί σε διαταραγμένη νευρωνική πλαστικότητα [78-80].

Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε κάποια συσχέτιση μεταξύ του rs75392628 στο TREM 2 γονίδιο και του βλεφαρόσπασμου [161]. Δύο φαίνεται πως είναι οι κύριοι ρόλοι της TREM2 στη μικρογλοιακή λειτουργία: α) την προώθηση της φαγοκυττάρωσης των κυτταρικών απομεινاريών και των βακτηριδίων, καθώς και την καταστολή των φλεγμονωδών διεργασιών [162]. Επομένως, οι γενετικές παραλλαγές του TREM2 γονιδίου μπορεί να οδηγήσουν σε ελαττωματική λειτουργία μικρογλοίας και έτσι στην απελευθέρωση φλεγμονωδών διεργασιών με ένα ευρύ φαινοτυπικό φάσμα [163]. Το TREM2 αρχικά αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως γενετική αιτία του Polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS), γνωστή και ως νόσος Nasu-Hakola [165]. Η γενετική παραλλαγή rs75392628, που βρίσκεται στη θέση 41161514, στο εξόνιο 2, στο χρωμόσωμα 6, στο TREM2 γονίδιο, οδηγεί σε αντικατάσταση της γουανίνης από αδερίνη, που οδηγεί στην αντικατάσταση της αργινίνης με την ιστιδίνη (R47H) στην πρωτεΐνη TREM2 [167], και έχει συσχετισθεί, μεταξύ άλλων, με νόσο του Αλτσχάιμερ [168, 169], μετωποκροταφική άνοια [170], σποραδική μορφή της νόσου του κινητικού νευρώνα [171], ιδιοπαθή τρόμο [172], και νόσο του Πάρκινσον [170, 173, 174]. Υποθέσαμε ότι ίσως μπορεί να αποτελεί ένα παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση δυστονίας, λαμβάνοντας υπόψιν, ότι δυστονικές κινήσεις μπορεί να υπάρχουν στη νόσο

Πάρκινσον [175], τις προηγούμενες συσχετίσεις του rs75392628 με κινητικές διαταραχές, και την άγνωστη και πολύπλοκη παθοφυσιολογία της δυστονίας [12]. Όμως, όλοι οι συμμετέχοντες, στους οποίους ήταν επιτυχής η γονοτύπηση, ήταν ομοζυγώτες για το C αλληλόμορφο του rs75392628 και δεν ανιχνεύθηκε κανένα αλληλόμορφο T στο δείγμα μας. Επομένως δεν υπάρχει κάποια ένδειξη πως ο rs75392628 συνδέεται με βλεφαρόσπασμο με βάση τα αποτελέσματά μας.

Η τρέχουσα μελέτη έχει ορισμένους περιορισμούς τους οποίους πρέπει να παραδεχτούμε. Πρώτον, η ανάλυση υλοποιήθηκε ανεξάρτητα από την μετάλλαξης ΔGAG των ασθενών με βλεφαρόσπασμο. Επιπλέον, η συμπερίληψη επιπρόσθετων περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου στα μοντέλα παλινδρόμησης [191] θα είχε δώσει στα αποτελέσματά μας ακόμη μεγαλύτερη ισχύ.

Στις γενετικές μελέτες θα πρέπει ενδεχομένως να πραγματοποιηθούν αναλύσεις που θα εξετάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ πολλών γενετικών τόπων καθώς επίσης και μεταξύ γενετικών τόπων και περιβαλλοντικών παραγόντων [191]. Επιπλέον η προσέγγιση με tagging SNP, και όχι ενός μεμονωμένου πολυμορφισμού, θα μπορούσε ενδεχομένως να καλύψει μεγαλύτερο εύρος γενετικής ποικιλομορφίας ενός γονιδίου. Εκτός αυτού άλλα πλεονεκτήματα θα ήταν η προοπτική συλλογή δεδομένων και ανάλυση ως προς διάφορες κλίμακες του βλεφαρόσπασμου [1, 192], την ανταπόκριση στις φαρμακευτικές θεραπείες (π.χ. αλλαντική τοξίνη) [192] καθώς και η επέκταση του βλεφαρόσπασμου σε άλλα σημεία του σώματος [130].

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας παρέχουν πρόσθετες αποδείξεις στην υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με τη συμβολή του rs6265 του BDNF γονιδίου στον κίνδυνο ανάπτυξης βλεφαρόσπασμου. Ενώ η υποκείμενη παθοφυσιολογία και η γενετική του βλεφαρόσπασμου και της εστιακής δυστονίας είναι μόνο εν μέρει κατανοητή, φαίνεται ότι ο

BDNF μπορεί να αποτελέσει έναν βασικό παράγοντα κινδύνου που εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό. Τα αποτελέσματα μας πρέπει να αναπαραχθούν σε μελλοντικές συνεργατικές μελέτες και GWASs σε διαφορετικά, κατά προτίμηση μεγαλύτερα, πολυεθνικά δείγματα με βλεφαρόσπασμο, ώστε να διευκρινιστεί περαιτέρω ο ρόλος του BDNF στον βλεφαρόσπασμο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **Albanese A., Bhatia K., Bressman S.B., et al.** "Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update". *Mov. Disord.* 2013;28(7):863-873.
- [2] **Balint B., Mencacci N.E., Valente E.M., et al.** "Dystonia". *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):25.
- [3] **Steeves T.D., Day L., Dykeman J., Jette N., Pringsheim T.** "The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis". *Mov. Disord.* 2012;27(14):1789-1796.
- [4] **Defazio G., Abbruzzese G., Livrea P., Berardelli A.** "Epidemiology of primary dystonia". *Lancet Neurol.* 2004;3(11):673-678.
- [5] **Das S.K., Banerjee T.K., Biswas A., et al.** "Community survey of primary dystonia in the city of Kolkata, India". *Mov. Disord.* 2007;22(14):2031-2036.
- [6] **Jankovic J., Tsui J., Bergeron C.** "Prevalence of cervical dystonia and spasmodic torticollis in the United States general population". *Parkinsonism Relat. Disord.* 2007;13(7):411-416.
- [7] **Valls-Sole J., Defazio G.** "Blepharospasm: Update on Epidemiology, Clinical Aspects, and Pathophysiology". *Front. Neurol.* 2016;7:45.
- [8] **Tinazzi M., Marotta A., Fasano A., et al.** "Aristotle's illusion reveals interdigit functional somatosensory alterations in focal hand dystonia". *Brain.* 2013;136(Pt 3):782-789.
- [9] **Calabresi P., Pisani A., Rothwell J., Ghiglieri V., Obeso J.A., Picconi B.** "Hyperkinetic disorders and loss of synaptic downscaling". *Nat. Neurosci.* 2016;19(7):868-875.
- [10] **Prudente C.N., Pardo C.A., Xiao J., et al.** "Neuropathology of cervical dystonia". *Exp. Neurol.* 2013;241:95-104.
- [11] **Perlmutter J.S., Mink J.W.** "Dysfunction of dopaminergic pathways in dystonia". *Adv. Neurol.* 2004;94:163-170.
- [12] **Jinnah H.A., Neychev V., Hess E.J.** "The Anatomical Basis for Dystonia: The Motor Network Model". *Tremor and other hyperkinetic movements (New York, N.Y.).* 2017;7:506.
- [13] **McNaught K.S., Kapustin A., Jackson T., et al.** "Brainstem pathology in DYT1 primary torsion dystonia". *Ann. Neurol.* 2004;56(4):540-547.
- [14] **Albanese A., Di Giovanni M., Lalli S.** "Dystonia: diagnosis and management". *Eur. J. Neurol.* 2019;26(1):5-17.
- [15] **Jankovic J.** "An update on new and unique uses of botulinum toxin in movement disorders". *Toxicon.* 2018;147:84-88.
- [16] **Jinnah H.A., Albanese A., Bhatia K.P., et al.** "Treatable inherited rare movement disorders". *Mov. Disord.* 2018;33(1):21-35.

- [17] **Counsell C., Sinclair H., Fowlie J., et al.** "A randomized trial of specialized versus standard neck physiotherapy in cervical dystonia". *Parkinsonism Relat. Disord.* 2016;23:72-79.
- [18] **De Pauw J., Van der Velden K., Meirte J., et al.** "The effectiveness of physiotherapy for cervical dystonia: a systematic literature review". *J. Neurol.* 2014;261(10):1857-1865.
- [19] **Meoni S., Fraix V., Castrioto A., et al.** "Pallidal deep brain stimulation for dystonia: a long term study". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2017;88(11):960-967.
- [20] **Vidailhet M., Vercueil L., Houeto J.L., et al.** "Bilateral, pallidal, deep-brain stimulation in primary generalised dystonia: a prospective 3 year follow-up study". *Lancet Neurol.* 2007;6(3):223-229.
- [21] **Brookes A.J.** "The essence of SNPs". *Gene.* 1999;234(2):177-186.
- [22] **Dardiotis E., Fountas K.N., Dardioti M., et al.** "Genetic association studies in patients with traumatic brain injury". *Neurosurg. Focus.* 2010;28(1):E9.
- [23] **Aerts J., Wetzels Y., Cohen N., Aerssens J.** "Data mining of public SNP databases for the selection of intragenic SNPs". *Hum. Mutat.* 2002;20(3):162-173.
- [24] **Lee E.K., Gorospe M.** "Coding region: the neglected post-transcriptional code". *RNA Biol.* 2011;8(1):44-48.
- [25] **Lohmann K., Klein C.** "Update on the Genetics of Dystonia". *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2017;17(3):26.
- [26] **Skogseid I.M.** "Dystonia--new advances in classification, genetics, pathophysiology and treatment". *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 2014(198):13-19.
- [27] **Balint B., Bhatia K.P.** "Isolated and combined dystonia syndromes - an update on new genes and their phenotypes". *Eur. J. Neurol.* 2015;22(4):610-617.
- [28] **Camargo C.H., Camargos S.T., Cardoso F.E., Teive H.A.** "The genetics of the dystonias--a review based on the new classification of the dystonias". *Arquivos de neuro-psiquiatria.* 2015;73(4):350-358.
- [29] **Charlesworth G., Bhatia K.P., Wood N.W.** "The genetics of dystonia: new twists in an old tale". *Brain.* 2013;136(Pt 7):2017-2037.
- [30] **Klein C.** "Genetics in dystonia". *Parkinsonism & related disorders.* 2014;20 Suppl 1:S137-142.
- [31] **LeDoux M.S.** "The genetics of dystonias". *Advances in genetics.* 2012;79:35-85.
- [32] **Lohmann K., Klein C.** "Genetics of dystonia: what's known? What's new? What's next?". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society.* 2013;28(7):899-905.
- [33] **Brancati F., Valente E.M., Castori M., et al.** "Role of the dopamine D5 receptor (DRD5) as a susceptibility gene for cervical dystonia". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2003;74(5):665-666.
- [34] **Misbahuddin A., Placzek M.R., Chaudhuri K.R., Wood N.W., Bhatia K.P., Warner T.T.** "A polymorphism in the dopamine receptor DRD5 is associated with blepharospasm". *Neurology.* 2002;58(1):124-126.

- [35] **Misbahuddin A., Placzek M.R., Warner T.T.** "Focal dystonia is associated with a polymorphism of the dopamine D5 receptor gene". *Adv. Neurol.* 2004;94:143-146.
- [36] **Placzek M.R., Misbahuddin A., Chaudhuri K.R., Wood N.W., Bhatia K.P., Warner T.T.** "Cervical dystonia is associated with a polymorphism in the dopamine (D5) receptor gene". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2001;71(2):262-264.
- [37] **Sibbing D., Asmus F., Konig I.R., et al.** "Candidate gene studies in focal dystonia". *Neurology.* 2003;61(8):1097-1101.
- [38] **Cramer S.C., Sampat A., Haske-Palomino M., Nguyen S., Procaccio V., Hermanowicz N.** "Increased prevalence of val(66)met BDNF genotype among subjects with cervical dystonia". *Neurosci. Lett.* 2010;468(1):42-45.
- [39] **Chen Y., Song W., Yang J., et al.** "Association of the Val66Met polymorphism of the BDNF gene with primary cranial-cervical dystonia patients from South-west China". *Parkinsonism Relat. Disord.* 2013;19(11):1043-1045.
- [40] **Sako W., Murakami N., Izumi Y., Kaji R.** "Val66Met polymorphism of brain-derived neurotrophic factor is associated with idiopathic dystonia". *J. Clin. Neurosci.* 2015;22(3):575-577.
- [41] **Zhou Q., Chen Y., Yang J., et al.** "Association analysis of TOR1A polymorphisms rs2296793 and rs3842225 in a Chinese population with cervical dystonia". *Neurosci. Lett.* 2016;612:185-188.
- [42] **Xiromerisiou G., Dardiotis E., Tsironi E.E., et al.** "THAP1 mutations in a Greek primary blepharospasm series". *Parkinsonism Relat. Disord.* 2013;19(3):404-405.
- [43] **Newman J.R., Sutherland G.T., Boyle R.S., et al.** "Common polymorphisms in dystonia-linked genes and susceptibility to the sporadic primary dystonias". *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012;18(4):351-357.
- [44] **Matsumoto S., Nishimura M., Sakamoto T., et al.** "Modulation of the onset age in primary dystonia by APOE genotype". *Neurology.* 2003;60(12):2003-2005.
- [45] **Ohlei O., Dobricic V., Lohmann K., Klein C., Lill C.M., Bertram L.** "Field synopsis and systematic meta-analyses of genetic association studies in isolated dystonia". *Parkinsonism Relat. Disord.* 2018.
- [46] **Lohmann K., Schmidt A., Schillert A., et al.** "Genome-wide association study in musician's dystonia: a risk variant at the arylsulfatase G locus?". *Mov. Disord.* 2014;29(7):921-927.
- [47] **Mok K.Y., Schneider S.A., Trabzuni D., et al.** "Genomewide association study in cervical dystonia demonstrates possible association with sodium leak channel". *Mov. Disord.* 2014;29(2):245-251.
- [48] **Ozelius L.J., Hewett J.W., Page C.E., et al.** "The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein". *Nat. Genet.* 1997;17(1):40-48.
- [49] **Goodchild R.E., Dauer W.T.** "Mislocalization to the nuclear envelope: an effect of the dystonia-causing torsinA mutation". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(3):847-852.
- [50] **Grillet M., Dominguez Gonzalez B., Sicart A., et al.** "Torsins Are Essential Regulators of Cellular Lipid Metabolism". *Dev. Cell.* 2016;38(3):235-247.

- [51] **Cascalho A., Jacquemyn J., Goodchild R.E.** "Membrane defects and genetic redundancy: Are we at a turning point for DYT1 dystonia?". *Mov. Disord.* 2017;32(3):371-381.
- [52] **Hettich J., Ryan S.D., de Souza O.N., et al.** "Biochemical and cellular analysis of human variants of the DYT1 dystonia protein, TorsinA/TOR1A". *Hum. Mutat.* 2014;35(9):1101-1113.
- [53] **Sosa B.A., Demircioglu F.E., Chen J.Z., Ingram J., Ploegh H.L., Schwartz T.U.** "How lamina-associated polypeptide 1 (LAP1) activates Torsin". *eLife.* 2014;3:e03239.
- [54] **Demircioglu F.E., Sosa B.A., Ingram J., Ploegh H.L., Schwartz T.U.** "Structures of TorsinA and its disease-mutant complexed with an activator reveal the molecular basis for primary dystonia". *eLife.* 2016:5.
- [55] **Naismith T.V., Dalal S., Hanson P.I.** "Interaction of torsinA with its major binding partners is impaired by the dystonia-associated DeltaGAG deletion". *The Journal of biological chemistry.* 2009;284(41):27866-27874.
- [56] **Wang L., Duan C., Gao Y., et al.** "Lack of association between TOR1A and THAP1 mutations and sporadic adult-onset primary focal dystonia in a Chinese population". *Clinical neurology and neurosurgery.* 2016;142:26-30.
- [57] **Timerbaeva S.L., Abramycheva N.Y., Rebrova O.Y., Illarioshkin S.N.** "TOR1A polymorphisms in a Russian cohort with primary focal/segmental dystonia". *The International journal of neuroscience.* 2015;125(9):671-677.
- [58] **Caputo M., Irisarri M., Perandones C., et al.** "Analysis of D216H polymorphism in Argentinean patients with primary dystonia". *Journal of neurogenetics.* 2013;27(1-2):16-18.
- [59] **Groen J.L., Ritz K., Tanck M.W., et al.** "Is TOR1A a risk factor in adult-onset primary torsion dystonia?". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society.* 2013;28(6):827-831.
- [60] **Chen Y., Chen K., Burgunder J.M., et al.** "Association of rs1182 polymorphism of the DYT1 gene with primary dystonia in Chinese population". *Journal of the neurological sciences.* 2012;323(1-2):228-231.
- [61] **Chen Y., Burgunder J.M., Song W., Huang R., Shang H.F.** "Assessment of D216H DYT1 polymorphism in a Chinese primary dystonia patient cohort". *European journal of neurology.* 2012;19(6):924-926.
- [62] **Sharma N., Franco R.A., Jr., Kuster J.K., et al.** "Genetic evidence for an association of the TOR1A locus with segmental/focal dystonia". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society.* 2010;25(13):2183-2187.
- [63] **Bruggemann N., Kock N., Lohmann K., et al.** "The D216H variant in the DYT1 gene: a susceptibility factor for dystonia in familial cases?". *Neurology.* 2009;72(16):1441-1443.
- [64] **Cheng F.B., Wan X.H., Zhang Y., et al.** "TOR1A sequence variants and the association with early-onset primary dystonia in the Chinese Han population". *Parkinsonism & related disorders.* 2013;19(3):399-401.

- [65] **Kamm C., Asmus F., Mueller J., et al.** "Strong genetic evidence for association of TOR1A/TOR1B with idiopathic dystonia". *Neurology*. 2006;67(10):1857-1859.
- [66] **Naiya T., Biswas A., Neogi R., et al.** "Clinical characterization and evaluation of DYT1 gene in Indian primary dystonia patients". *Acta neurologica Scandinavica*. 2006;114(3):210-215.
- [67] **Clarimon J., Asgeirsson H., Singleton A., et al.** "Torsin A haplotype predisposes to idiopathic dystonia". *Annals of neurology*. 2005;57(5):765-767.
- [68] **Clarimon J., Brancati F., Peckham E., et al.** "Assessing the role of DRD5 and DYT1 in two different case-control series with primary blepharospasm". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2007;22(2):162-166.
- [69] **Hague S., Klaffke S., Clarimon J., et al.** "Lack of association with TorsinA haplotype in German patients with sporadic dystonia". *Neurology*. 2006;66(6):951-952.
- [70] **Li J., Long Y., Huang X., et al.** "Deletion variant rs35153737 in TOR1A is associated with isolated dystonia in a Southwestern Chinese Population". *Neuroscience letters*. 2017;657:1-4.
- [71] **Long Y., Chen Y., Qian Y., et al.** "A rare variant in TOR1A exon 5 associated with isolated dystonia in southwestern Chinese". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2017;32(7):1083-1087.
- [72] **Siokas V., Dardiotis E., Tsironi E.E., et al.** "The Role of TOR1A Polymorphisms in Dystonia: A Systematic Review and Meta-Analysis". *PloS one*. 2017;12(1):e0169934.
- [73] **Kamm C., Fischer H., Garavaglia B., et al.** "Susceptibility to DYT1 dystonia in European patients is modified by the D216H polymorphism". *Neurology*. 2008;70(23):2261-2262.
- [74] **Risch N.J., Bressman S.B., Senthil G., Ozelius L.J.** "Intragenic Cis and Trans modification of genetic susceptibility in DYT1 torsion dystonia". *American journal of human genetics*. 2007;80(6):1188-1193.
- [75] **Kojovic M., Parees I., Kassavetis P., et al.** "Secondary and primary dystonia: pathophysiological differences". *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 7):2038-2049.
- [76] **Quartarone A., Morgante F., Sant'angelo A., et al.** "Abnormal plasticity of sensorimotor circuits extends beyond the affected body part in focal dystonia". *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2008;79(9):985-990.
- [77] **Martino D., Muglia M., Abbruzzese G., et al.** "Brain-derived neurotrophic factor and risk for primary adult-onset cranial-cervical dystonia". *Eur. J. Neurol*. 2009;16(8):949-952.
- [78] **Notaras M., Hill R., van den Buuse M.** "The BDNF gene Val66Met polymorphism as a modifier of psychiatric disorder susceptibility: progress and controversy". *Mol. Psychiatry*. 2015;20(8):916-930.
- [79] **Hempstead B.L.** "Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions". *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc*. 2015;126:9-19.

- [80] **Anastasia A., Hempstead B.L.** "BDNF function in health and disease (Poster)". *Nat. Rev. Neurosci.* 2014;15(2).
- [81] **Cheeran B., Talelli P., Mori F., et al.** "A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS". *The Journal of physiology.* 2008;586(23):5717-5725.
- [82] **Kleim J.A., Chan S., Pringle E., et al.** "BDNF val66met polymorphism is associated with modified experience-dependent plasticity in human motor cortex". *Nature neuroscience.* 2006;9(6):735-737.
- [83] **Groen J.L., Ritz K., Velseboer D.C., et al.** "Association of BDNF Met66Met polymorphism with arm tremor in cervical dystonia". *Mov. Disord.* 2012;27(6):796-797.
- [84] **Ma L., Chen Y., Wang L., et al.** "Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism is not associated with primary dystonia in a Chinese population". *Neurosci. Lett.* 2013;533:100-103.
- [85] **Svetel M.V., Djuric G., Novakovic I., et al.** "A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene in patients with adult-onset primary focal and segmental dystonia". *Acta Neurol. Belg.* 2013;113(3):243-245.
- [86] **Gomez-Garre P., Huertas-Fernandez I., Caceres-Redondo M.T., et al.** "BDNF Val66Met polymorphism in primary adult-onset dystonia: a case-control study and meta-analysis". *Mov. Disord.* 2014;29(8):1083-1086.
- [87] **Lash T.L.** "The Harm Done to Reproducibility by the Culture of Null Hypothesis Significance Testing". *American journal of epidemiology.* 2017;186(6):627-635.
- [88] **Ikegame T., Bundo M., Murata Y., Kasai K., Kato T., Iwamoto K.** "DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders". *J Hum Genet.* 2013;58(7):434-438.
- [89] **Terracciano A., Piras M.G., Lobina M., et al.** "Genetics of serum BDNF: meta-analysis of the Val66Met and genome-wide association study". *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry.* 2013;14(8):583-589.
- [90] **Nagahara A.H., Tuszynski M.H.** "Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders". *Nature reviews. Drug discovery.* 2011;10(3):209-219.
- [91] **Longo F.M., Massa S.M.** "Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease". *Nature Reviews Drug Discovery.* 2013;12:507.
- [92] **Deng P., Anderson J.D., Yu A.S., Annett G., Fink K.D., Nolte J.A.** "Engineered BDNF producing cells as a potential treatment for neurologic disease". *Expert opinion on biological therapy.* 2016;16(8):1025-1033.
- [93] **Mahley R.W., Rall S.C., Jr.** "Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein". *Annual review of genomics and human genetics.* 2000;1:507-537.

- [94] **Liu C.C., Liu C.C., Kanekiyo T., Xu H., Bu G.** "Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy". *Nature reviews. Neurology*. 2013;9(2):106-118.
- [95] **Xiomerisiou G., Houlden H., Scarmeas N., et al.** "THAP1 mutations and dystonia phenotypes: genotype phenotype correlations". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2012;27(10):1290-1294.
- [96] **Gavarini S., Cayrol C., Fuchs T., et al.** "Direct interaction between causative genes of DYT1 and DYT6 primary dystonia". *Annals of neurology*. 2010;68(4):549-553.
- [97] **Houlden H., Schneider S.A., Paudel R., et al.** "THAP1 mutations (DYT6) are an additional cause of early-onset dystonia". *Neurology*. 2010;74(10):846-850.
- [98] **Groen J.L., Yildirim E., Ritz K., et al.** "THAP1 mutations are infrequent in spasmodic dysphonia". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011;26(10):1952-1954.
- [99] **Golanska E., Gajos A., Sieruta M., et al.** "Screening for THAP1 Mutations in Polish Patients with Dystonia Shows Known and Novel Substitutions". *PloS one*. 2015;10(6):e0129656.
- [100] **Xiao J., Zhao Y., Bastian R.W., et al.** "Novel THAP1 sequence variants in primary dystonia". *Neurology*. 2010;74(3):229-238.
- [101] **Djarmati A., Schneider S.A., Lohmann K., et al.** "Mutations in THAP1 (DYT6) and generalised dystonia with prominent spasmodic dysphonia: a genetic screening study". *The Lancet. Neurology*. 2009;8(5):447-452.
- [102] **Giri S., Naiya T., Equbal Z., et al.** "Genetic screening of THAP1 in primary dystonia patients of India". *Neuroscience letters*. 2017;637:31-37.
- [103] **Vemula S.R., Xiao J., Zhao Y., et al.** "A rare sequence variant in intron 1 of THAP1 is associated with primary dystonia". *Molecular genetics & genomic medicine*. 2014;2(3):261-272.
- [104] **Xiao J., Zhao Y., Bastian R.W., et al.** "The c.-237_236GA>TT THAP1 sequence variant does not increase risk for primary dystonia". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011;26(3):549-552.
- [105] **Dardiotis E., Xiomerisiou G., Hadjichristodoulou C., Tsatsakis A.M., Wilks M.F., Hadjigeorgiou G.M.** "The interplay between environmental and genetic factors in Parkinson's disease susceptibility: the evidence for pesticides". *Toxicology*. 2013;307:17-23.
- [106] **Fuchs T., Saunders-Pullman R., Masuho I., et al.** "Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia". *Nature genetics*. 2013;45(1):88-92.
- [107] **Miao J., Wan X.H., Sun Y., Feng J.C., Cheng F.B.** "Mutation screening of GNAL gene in patients with primary dystonia from Northeast China". *Parkinsonism & related disorders*. 2013;19(10):910-912.
- [108] **Carapito R., Paul N., Untrau M., et al.** "A de novo ADCY5 mutation causes early-onset autosomal dominant chorea and dystonia". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2015;30(3):423-427.

- [109] **Newman J.R., Todorovic M., Silburn P.A., Sutherland G.T., Mellick G.D.** "Lack of reproducibility in re-evaluating associations between GCH1 polymorphisms and Parkinson's disease and isolated dystonia in an Australian case--control group". *Parkinsonism & related disorders*. 2014;20(6):668-670.
- [110] **Opladen T., Hoffmann G., Horster F., et al.** "Clinical and biochemical characterization of patients with early infantile onset of autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011;26(1):157-161.
- [111] **Hwu W.L., Chiou Y.W., Lai S.Y., Lee Y.M.** "Dopa-responsive dystonia is induced by a dominant-negative mechanism". *Annals of neurology*. 2000;48(4):609-613.
- [112] **Tanabe L.M., Kim C.E., Alagem N., Dauer W.T.** "Primary dystonia: molecules and mechanisms". *Nature reviews. Neurology*. 2009;5(11):598-609.
- [113] **Ichinose H., Ohye T., Takahashi E., et al.** "Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene". *Nature genetics*. 1994;8(3):236-242.
- [114] **Zeuner K.E., Acewicz A., Knutzen A., Dressler D., Lohmann K., Witt K.** "Dopamine DRD2 polymorphism (DRD2/ANKK1-Taq1A) is not a significant risk factor in writer's cramp". *Journal of neurogenetics*. 2016;30(3-4):276-279.
- [115] **Groen J.L., Simon-Sanchez J., Ritz K., et al.** "Cervical dystonia and genetic common variation in the dopamine pathway". *Parkinsonism & related disorders*. 2013;19(3):346-349.
- [116] **Groen J.L., Ritz K., Warner T.T., Baas F., Tijssen M.A.** "DRD1 rare variants associated with tardive-like dystonia: a pilot pathway sequencing study in dystonia". *Parkinsonism & related disorders*. 2014;20(7):782-785.
- [117] **Nibbeling E., Schaake S., Tijssen M.A., et al.** "Accumulation of rare variants in the arylsulfatase G (ARSG) gene in task-specific dystonia". *Journal of neurology*. 2015;262(5):1340-1343.
- [118] **Sardiello M., Annunziata I., Roma G., Ballabio A.** "Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship". *Human molecular genetics*. 2005;14(21):3203-3217.
- [119] **Abitbol M., Thibaud J.L., Olby N.J., et al.** "A canine Arylsulfatase G (ARSG) mutation leading to a sulfatase deficiency is associated with neuronal ceroid lipofuscinosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14775-14780.
- [120] **Gomez-Garre P., Huertas-Fernandez I., Caceres-Redondo M.T., et al.** "Lack of validation of variants associated with cervical dystonia risk: a GWAS replication study". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2014;29(14):1825-1828.
- [121] **Zhou Q., Yang J., Cao B., et al.** "Association Analysis of NALCN Polymorphisms rs1338041 and rs61973742 in a Chinese Population with Isolated Cervical Dystonia". *Parkinsons Dis*. 2016;2016:9281790.
- [122] **Topalidou I., Cooper K., Pereira L., Ailion M.** "Dopamine negatively modulates the NCA ion channels in *C. elegans*". *PLoS genetics*. 2017;13(10):e1007032.

- [123] **Domingo A., Erro R., Lohmann K.** "Novel Dystonia Genes: Clues on Disease Mechanisms and the Complexities of High-Throughput Sequencing". *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2016;31(4):471-477.
- [124] **Defazio G., Hallett M., Jinnah H.A., Conte A., Berardelli A.** "Blepharospasm 40 years later". *Mov. Disord.* 2017;32(4):498-509.
- [125] **Defazio G., Hallett M., Jinnah H.A., et al.** "Development and validation of a clinical scale for rating the severity of blepharospasm". *Mov. Disord.* 2015;30(4):525-530.
- [126] **Krack P., Marion M.H.** "'Apraxia of lid opening," a focal eyelid dystonia: clinical study of 32 patients". *Mov. Disord.* 1994;9(6):610-615.
- [127] **Lamberti P., De Mari M., Zenzola A., Aniello M.S., Defazio G.** "Frequency of apraxia of eyelid opening in the general population and in patients with extrapyramidal disorders". *Neurol. Sci.* 2002;23 Suppl 2:S81-82.
- [128] **Bentivoglio A.R., Daniele A., Albanese A., Tonali P.A., Fasano A.** "Analysis of blink rate in patients with blepharospasm". *Mov. Disord.* 2006;21(8):1225-1229.
- [129] **Conte A., Defazio G., Ferrazzano G., et al.** "Is increased blinking a form of blepharospasm?". *Neurology*. 2013;80(24):2236-2241.
- [130] **Defazio G., Matarin M., Peckham E.L., et al.** "The TOR1A polymorphism rs1182 and the risk of spread in primary blepharospasm". *Mov. Disord.* 2009;24(4):613-616.
- [131] **Weiss E.M., Hershey T., Karimi M., et al.** "Relative risk of spread of symptoms among the focal onset primary dystonias". *Mov. Disord.* 2006;21(8):1175-1181.
- [132] **Martino D., Berardelli A., Abbruzzese G., et al.** "Age at onset and symptom spread in primary adult-onset blepharospasm and cervical dystonia". *Mov. Disord.* 2012;27(11):1447-1450.
- [133] **Barahona-Correa B., Bugalho P., Guimaraes J., Xavier M.** "Obsessive-compulsive symptoms in primary focal dystonia: a controlled study". *Mov. Disord.* 2011;26(12):2274-2278.
- [134] **Fabbrini G., Berardelli I., Moretti G., et al.** "Psychiatric disorders in adult-onset focal dystonia: a case-control study". *Mov. Disord.* 2010;25(4):459-465.
- [135] **Fontenelle L.F., Pacheco P.G., Nascimento P.M., et al.** "Obsessive-compulsive symptoms among patients with blepharospasm and hemifacial spasm". *Gen. Hosp. Psychiatry*. 2011;33(5):476-481.
- [136] **Aleman G.G., de Erausquin G.A., Micheli F.** "Cognitive disturbances in primary blepharospasm". *Mov. Disord.* 2009;24(14):2112-2120.
- [137] **Romano R., Bertolino A., Gigante A., Martino D., Livrea P., Defazio G.** "Impaired cognitive functions in adult-onset primary cranial cervical dystonia". *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014;20(2):162-165.
- [138] **Defazio G., Livrea P., De Salvia R., et al.** "Prevalence of primary blepharospasm in a community of Puglia region, Southern Italy". *Neurology*. 2001;56(11):1579-1581.
- [139] **Defazio G., Martino D., Aniello M.S., et al.** "A family study on primary blepharospasm". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2006;77(2):252-254.

- [140] **Martino D., Livrea P., Giorelli M., Masi G., Aniello M.S., Defazio G.** "Menopause and menarche in patients with primary blepharospasm: an exploratory case-control study". *Eur. Neurol.* 2002;47(3):161-164.
- [141] **Tsubota K., Fujihara T., Kaido M., Mori A., Mimura M., Kato M.** "Dry eye and Meige's syndrome". *Br. J. Ophthalmol.* 1997;81(6):439-442.
- [142] **Defazio G., Martino D., Abbruzzese G., et al.** "Influence of coffee drinking and cigarette smoking on the risk of primary late onset blepharospasm: evidence from a multicentre case control study". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2007;78(8):877-879.
- [143] **Tian J., Vemula S.R., Xiao J., et al.** "Whole-exome sequencing for variant discovery in blepharospasm". *Molecular genetics & genomic medicine.* 2018.
- [144] **Belviranli M., Okudan N.** "Exercise Training Protects Against Aging-Induced Cognitive Dysfunction via Activation of the Hippocampal PGC-1alpha/FNDC5/BDNF Pathway". *Neuromolecular Med.* 2018;20(3):386-400.
- [145] **You H.J., Park J.H., Pareja-Galeano H., Lucia A., Shin J.I.** "Targeting MicroRNAs Involved in the BDNF Signaling Impairment in Neurodegenerative Diseases". *Neuromolecular Med.* 2016;18(4):540-550.
- [146] **Cattaneo A., Cattane N., Begni V., Pariante C.M., Riva M.A.** "The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders". *Translational psychiatry.* 2016;6(11):e958.
- [147] **Pruunsild P., Kazantseva A., Aid T., Palm K., Timmusk T.** "Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters". *Genomics.* 2007;90(3):397-406.
- [148] **Liu M.E., Huang C.C., Chen M.H., et al.** "Effect of the BDNF Val66Met polymorphism on regional gray matter volumes and cognitive function in the Chinese population". *Neuromolecular Med.* 2014;16(1):127-136.
- [149] **Shen T., You Y., Joseph C., et al.** "BDNF Polymorphism: A Review of Its Diagnostic and Clinical Relevance in Neurodegenerative Disorders". *Aging Dis.* 2018;9(3):523-536.
- [150] **Chen J., Liang X., Li B., Jiang X., Xu Z.** "Gender-related association of brain-derived neurotrophic factor gene 196A/G polymorphism with Alzheimer's disease--a meta-analysis including 6854 cases and 6868 controls". *The International journal of neuroscience.* 2014;124(10):724-733.
- [151] **Chen K., Wang N., Zhang J., et al.** "Is the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene associated with panic disorder? A meta-analysis". *Asia-Pacific psychiatry : official journal of the Pacific Rim College of Psychiatrists.* 2017;9(2).
- [152] **Zintzaras E.** "Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and schizophrenia: a meta-analysis". *Psychiatric genetics.* 2007;17(2):69-75.
- [153] **Zintzaras E., Hadjigeorgiou G.M.** "The role of G196A polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene in the cause of Parkinson's disease: a meta-analysis". *Journal of Human Genetics.* 2005;50(11):560-566.

- [154] **Li M., Chang H., Xiao X.** "BDNF Val66Met polymorphism and bipolar disorder in European populations: A risk association in case-control, family-based and GWAS studies". *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2016;68:218-233.
- [155] **Xiomerisiou G., Dardiotis E., Tsimourtou V., et al.** "Genetic basis of Parkinson disease". *Neurosurgical focus*. 2010;28(1):E7.
- [156] **Mirowska-Guzel D., Mach A., Gromadzka G., Czlonkowski A., Czlonkowska A.** "BDNF A196G and C270T gene polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis in the Polish population. Gender differences". *J. Neuroimmunol.* 2008;193(1-2):170-172.
- [157] **Olin D., MacMurray J., Comings D.E.** "Risk of late-onset Alzheimer's disease associated with BDNF C270T polymorphism". *Neurosci. Lett.* 2005;381(3):275-278.
- [158] **Weinstock-Guttman B., Benedict R.H., Tamano-Blanco M., et al.** "The rs2030324 SNP of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with visual cognitive processing in multiple sclerosis". *Pathophysiology*. 2011;18(1):43-52.
- [159] **Fukumoto N., Fujii T., Combarros O., et al.** "Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: New data and meta-analysis". *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2010;153b(1):235-242.
- [160] **Colonna M.** "TREMs in the immune system and beyond". *Nature reviews. Immunology*. 2003;3(6):445-453.
- [161] **Paloneva J., Manninen T., Christman G., et al.** "Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype". *Am. J. Hum. Genet.* 2002;71(3):656-662.
- [162] **Hsieh C.L., Koike M., Spusta S.C., et al.** "A role for TREM2 ligands in the phagocytosis of apoptotic neuronal cells by microglia". *Journal of neurochemistry*. 2009;109(4):1144-1156.
- [163] **Dardiotis E., Siokas V., Pantazi E., et al.** "A novel mutation in TREM2 gene causing Nasu-Hakola disease and review of the literature". *Neurobiol. Aging*. 2017;53:194.e113-194.e122.
- [164] **Ghani M., Sato C., Kakhki E.G., et al.** "Mutation analysis of the MS4A and TREM gene clusters in a case-control Alzheimer's disease data set". *Neurobiol. Aging*. 2016;42:217.e217-217.e213.
- [165] **Jay T.R., von Saucken V.E., Landreth G.E.** "TREM2 in Neurodegenerative Diseases". *Mol. Neurodegener.* 2017;12(1):56.
- [166] **Satoh J., Tabunoki H., Ishida T., et al.** "Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains". *Neuropathology*. 2011;31(4):363-375.
- [167] **Cuyvers E., Bettens K., Philtjens S., et al.** "Investigating the role of rare heterozygous TREM2 variants in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia". *Neurobiol. Aging*. 2014;35(3):726.e711-729.
- [168] **Guerreiro R., Wojtas A., Bras J., et al.** "TREM2 variants in Alzheimer's disease". *The New England journal of medicine*. 2013;368(2):117-127.

- [169] **Jonsson T., Stefansson H., Steinberg S., et al.** "Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease". *The New England journal of medicine*. 2013;368(2):107-116.
- [170] **Rayaprolu S., Mullen B., Baker M., et al.** "TREM2 in neurodegeneration: evidence for association of the p.R47H variant with frontotemporal dementia and Parkinson's disease". *Molecular neurodegeneration*. 2013;8:19.
- [171] **Cady J., Koval E.D., Benitez B.A., et al.** "TREM2 variant p.R47H as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis". *JAMA neurology*. 2014;71(4):449-453.
- [172] **Ortega-Cubero S., Lorenzo-Betancor O., Lorenzo E., et al.** "TREM2 R47H variant and risk of essential tremor: a cross-sectional international multicenter study". *Parkinsonism & related disorders*. 2015;21(3):306-309.
- [173] **Benitez B.A., Cruchaga C.** "TREM2 and neurodegenerative disease". *The New England journal of medicine*. 2013;369(16):1567-1568.
- [174] **Jonsson T., Stefansson K.** "TREM2 and neurodegenerative disease". *The New England journal of medicine*. 2013;369(16):1568-1569.
- [175] **Tolosa E., Compta Y.** "Dystonia in Parkinson's disease". *J. Neurol.* 2006;253 Suppl 7:Vii7-13.
- [176] **Siokas V., Dardiotis E., Sokolakis T., et al.** "Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Tag Single-Nucleotide Polymorphisms in Patients with Diabetes Mellitus Type 2 and Diabetic Retinopathy". *Curr. Eye Res.* 2017;42(7):1048-1053.
- [177] **Siokas V., Fotiadou A., Dardiotis E., et al.** "SLC2A1 Tag SNPs in Greek Patients with Diabetic Retinopathy and Nephropathy". *Ophthalmic Res.* 2017.
- [178] **Skol A.D., Scott L.J., Abecasis G.R., Boehnke M.** "Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies". *Nat. Genet.* 2006;38(2):209-213.
- [179] **Sole X., Guino E., Valls J., Iniesta R., Moreno V.** "SNPStats: a web tool for the analysis of association studies". *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929.
- [180] **Zintzaras E.** "The generalized odds ratio as a measure of genetic risk effect in the analysis and meta-analysis of association studies". *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 2010;9:Article21.
- [181] **Zintzaras E.** "The power of generalized odds ratio in assessing association in genetic studies with known mode of inheritance". *Journal of Applied Statistics*. 2012;39(12):2569-2581.
- [182] **DerSimonian R., Laird N.** "Meta-analysis in clinical trials". *Control. Clin. Trials*. 1986;7(3):177-188.
- [183] **Theuns J., Verstraeten A., Sleegers K., et al.** "Global investigation and meta-analysis of the C9orf72 (G4C2)_n repeat in Parkinson disease". *Neurology*. 2014;83(21):1906-1913.
- [184] **Mantel N., Haenszel W.** "Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease". *J. Natl. Cancer Inst.* 1959;22(4):719-748.

- [185] **Egger M., Davey Smith G., Schneider M., Minder C.** "Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test". *BMJ*. 1997;315(7109):629-634.
- [186] **Moher D., Liberati A., Tetzlaff J., Altman D.G.** "Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement". *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000097.
- [187] **Hallett M.** "The dystonias: a heterogeneous collection". *European journal of neurology*. 2015;22(5):741-742.
- [188] **Albanese A., Di Giovanni M., Lalli S.** "Dystonia: diagnosis and management". *European journal of neurology*. 2018.
- [189] **Albanese A.** "How Many Dystonias? Clinical Evidence". *Frontiers in neurology*. 2017;8:18.
- [190] **Oterdoom D.L.M., van Egmond M.E., Ascencao L.C., et al.** "Reversal of Status Dystonicus after Relocation of Pallidal Electrodes in DYT6 Generalized Dystonia". *Tremor and other hyperkinetic movements (New York, N.Y.)*. 2018;8:530.
- [191] **Dardiotis E., Siokas V., Sokratous M., et al.** "Genetic polymorphisms in amyotrophic lateral sclerosis: Evidence for implication in detoxification pathways of environmental toxicants". *Environ. Int.* 2018;116:122-135.
- [192] **Lee R.M., Chowdhury H.R., Hyer J.N., Smith H.B., Jones C.A.** "Patient-reported benefit from botulinum toxin treatment for essential blepharospasm: using 2 assessment scales". *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 2013;29(3):196-197.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

PRISMA-guidelines

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	1
ABSTRACT			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	8-11
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	37-41
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	47-48
METHODS			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	-
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	62
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	62
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	62
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	62

Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	62-65
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	62-65
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	-
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	66-67
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I^2) for each meta-analysis.	66-67

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	-
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	-
RESULTS			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	71
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	Συμπληρωματικός Πίνακας 1
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	-
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	76-78, Συμπληρωματική Εικόνα 3 και 4, Συμπληρωματικός Πίνακας 2
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency.	76-78, Συμπληρωματική Εικόνα 3 και 4,

			Συμπληρωματικός Πίνακας 2
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	-
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	-
DISCUSSION			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	81-82
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	83
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	83-84
FUNDING			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	-