

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

Die Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonie-Patienten

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

vorgelegt von
Luisa Ruth Olschewski
aus Berlin

Lübeck 2021

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann

2. Berichterstatter*in: PD Dr. med. Yorck Hellenbroich

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.03.2023

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Krankheitsbild der Dystonie.....	1
1.2 Das Dystonie-Gen <i>ANO3</i>	9
1.3 De-novo Varianten.....	11
1.4 Die klinisch-genetische Datenbank MDSGene.....	12
1.5 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	14
1.6 Fragestellung.....	14
2 Patienten, Material und Methoden.....	16
2.1 Patienten.....	16
2.2 Material.....	18
2.2.1 Chemikalien und Kits.....	18
2.2.2 Lösungen.....	19
2.2.3 Geräte.....	19
2.2.4 Software und Datenbanken.....	20
2.3 Methoden.....	21
2.3.1 <i>Next Generation Sequencing</i>	21
2.3.2 <i>GenePanel</i>	22
2.3.3 Primer-Design.....	24
2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.3.5 Sanger-Sequenzierung.....	29
2.3.6 Mikrosatellitenanalyse.....	32
2.3.7 Systematische Literaturrecherche nach den Kriterien von MDSGene.....	34
2.3.8 Statistik.....	35
3 Ergebnisse.....	37
3.1 <i>GenePanel</i> -Analysen.....	37
3.2 Nachweis einer de-novo Variante.....	45
3.3 Systematische MDSGene-Literaturrecherche für <i>ANO3</i> -Varianten bei Dystonie-Patienten.....	46
3.3.1 Eingeschlossene Publikationen.....	46
3.3.2 Charakteristika, Symptomatik und Therapie eingeschlossener Patienten.....	47
3.3.3 <i>ANO3</i> -Varianten der beschriebenen Patienten.....	51

3.3.4	<i>Screenings</i> nach <i>ANO3</i> -Varianten in der Literatur	53
4	Diskussion	55
4.1	Studiendesign zur Bestimmung der Rolle von <i>ANO3</i> -Varianten bei Dystonie-Patienten	55
4.1.1	Die untersuchte Stichprobe.....	55
4.1.2	Die genetische Untersuchung mittels <i>GenePanel</i>	56
4.1.3	Der Filterungsprozess im Rahmen der Auswertung der <i>GenePanel</i> -Analysen 58	
4.1.4	Die Validierung gefilterter Varianten mittels Sanger-Sequenzierung	60
4.2	Die Suche nach einer de-novo Variante in <i>ANO3</i>	60
4.3	Die systematische Literaturrecherche nach den MDSGene-Kriterien.....	61
4.4	Die Rolle von <i>ANO3</i> -Varianten bei Dystonien	64
5	Zusammenfassung	71
	Literaturverzeichnis	73
	Anhang.....	90
A	Verwendete Primer.....	90
B	Kriterien für das <i>Pathoscoring</i>	91
C	Standardisierte Variablen der MDSGene-Datenbank	94
D	Übersicht über Publikationen der Literaturrecherche	99
E	Übersicht über Patienten mit <i>ANO3</i> -Varianten aus der Literatur.....	100
F	Votum der Ethikkommission	103
	Danksagung	104
	Lebenslauf.....	105

Redaktioneller Hinweis: Im Sinne einer besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit für Personen und personenbezogene Hauptwörter nur die männliche Form verwendet. Dies ist wertfrei und meint gleichermaßen alle Geschlechter.

Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnungen für humane Gene bestehen aus Großbuchstaben und arabischen Zahlen und werden in dieser Arbeit kursiv gedruckt

AT	Adenin-Thymin-Basenpaar
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CADD	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (Desoxynukleotid)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F (-Primer)	<i>Forward</i> (vorwärts)
FAM	Fluoresceinamidite (Carboxyfluorescein)
FastAP	<i>Fast Alkaline</i> Phosphatase
GC	Guanin-Cytosin-Basenpaar
ggf.	gegebenenfalls
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
GPI	<i>Globus Pallidus internus</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i> , humane embryonale Niere
i.d.R.	in der Regel
IFET	Immortalisierte Fetale Thymozyten
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i> , Allelhäufigkeit des selteneren Allels
MDSGene	<i>Movement Disorder Society Genetic mutation database</i>
n.d.	nicht datiert (bei Internet-Zitaten)
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Sequenzierung der nächsten Generation)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PS	Parkinson-Syndrom

R (-Primer)	<i>Reverse</i> (rückwärts)
s.	siehe
s.u.	siehe unten
SBH	<i>Sequencing By Hybridization</i>
SBS	<i>Sequencing By Synthesis</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i> (Veränderung eines einzelnen Nukleotids)
STR	<i>Short Tandem Repeat</i> (Mikrosatellit)
THS	Tiefe Hirn-Stimulation
usw.	und so weiter
UTR	untranslatierte Region
vgl.	vergleiche
vs.	versus
VUS	<i>Variant of Uncertain Significance</i> (Variante unklarer Signifikanz)
z.B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konsensuale Klassifikation der klinischen Charakteristika der Dystonie	3
Tabelle 2: Übersicht über die wichtigsten monogenen Ursachen von Dystonien ...	6
Tabelle 3: Überblick über Charakteristika der Stichprobe.....	17
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Kits	18
Tabelle 5: Verwendete Lösungen.....	19
Tabelle 6: Verwendete Geräte.....	19
Tabelle 7: Verwendete Software und Datenbanken	20
Tabelle 8: Ansatz der Standard-PCR	26
Tabelle 9: Ansatz für die Sequenz-PCR.....	30
Tabelle 10: Ansatz der Mikrosatelliten-PCR.....	33
Tabelle 11: Bedingungen für die Anwendung ausgewählter statistischer Tests ...	36
Tabelle 12: Überblick über die mittels Sanger-Sequenzierung validierten Varianten des <i>GenePanels</i> sowie die zugehörigen Patienten.	39
Tabelle 13: Ergebnisse von <i>Screenings</i> nach <i>ANO3</i> -Varianten in Stichproben von Dystonie-Patienten	54
Tabelle 14: Primer für die PCR und Sanger-Sequenzierung des <i>ANO3</i> -Gens.....	90
Tabelle 15: Primer für die Mikrosatellitenanalyse	90
Tabelle 16: Kriterien für das <i>Pathoscoring</i> der MDSGene-Datenbank	91
Tabelle 17: Kriterien für das <i>Pathoscoring</i> des <i>American College of Medical Genetics (ACMG)</i> und der <i>Association for Molecular Pathology (AMP)</i> sowie verwendete Spezifizierungen	92
Tabelle 18: Einordnung von Varianten je Kombinationen erfüllter Kriterien des <i>Pathoscorings</i> des <i>American College of Medical Genetics (ACMG)</i> und der <i>Association for Molecular Pathology (AMP)</i>	93
Tabelle 19: Standardisierte Variablen der MDSGene-Datenbank	94
Tabelle 20: Publikationen der Literaturrecherche	99
Tabelle 21: Patienten mit <i>ANO3</i> -Varianten aus der Literatur.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel-Fotografie einer Agarose-Gelelektrophorese	27
Abbildung 2: Ausschnitte aus Beispielsequenzen der Sanger-Sequenzierung	32
Abbildung 3: Überblick über die Schritte und jeweiligen Variantenzahlen des Filterungsprozesses	38
Abbildung 4: Mikrosatellitenanalyse der Region D6S305	43
Abbildung 5: Visualisierungen zu der Patientin L-11560 mit der Variante p.Val561Glu.....	44
Abbildung 6: Visualisierungen zu dem Patienten L-11226 mit der Variante p.Ser651Asn.....	46
Abbildung 7: Grafiken zur Klinik der in die MDSGene-Datenbank aufgenommenen Patienten mit <i>ANO3</i> -Varianten	49
Abbildung 8: Darstellung der Position der <i>ANO3</i> -Varianten im Gen und Protein .	53

1 Einleitung

In diesem Kapitel sollen zur Einordnung und zum besseren Verständnis der weiteren Inhalte dieser Arbeit einige Grundlagen und Begriffe zu dem Erkrankungsbild der Dystonie dargestellt werden.

1.1 Das Krankheitsbild der Dystonie

Die Dystonie ist definiert als Bewegungsstörung, die durch anhaltende oder intermittierende Muskelkontraktionen gekennzeichnet ist, welche abnormale, häufig repetitive Bewegungen und/oder Haltungen verursachen. Diese Bewegungen folgen typischerweise einem Muster, sind Drehbewegungen und können mit einem Tremor (unwillkürlichem, rhythmischem Zittern) assoziiert sein. Willkürbewegungen können die Dystonie initiieren und verschlimmern (Albanese et al., 2013).

Eine Metaanalyse ergab eine gemittelte Prävalenz der primären Dystonie¹ von 16,43 pro 100.000 (Steeves et al., 2012). Die verwendeten epidemiologischen Studien wurden jedoch häufig auf der Basis von medizinischer Dokumentation durchgeführt, sodass aufgrund von Faktoren wie z.B. fehlender Inanspruchnahme medizinischer Leistungen die eigentliche Prävalenz deutlich höher anzusetzen ist (Steeves et al., 2012). So ergab die statistische Analyse einer Populationsstudie allein für die Gruppe der über-50-Jährigen eine Prävalenz von 732 pro 100.000, nur ein Drittel der beschriebenen Fällen waren zuvor diagnostiziert (Müller et al., 2002b). Die Prävalenz der Dystonie nimmt im Alter zu. Zwischen den Geschlechtern gibt es überwiegend keine Häufigkeitsunterschiede, Männer erkranken allerdings in der Regel früher und erhalten schneller ihre Diagnose (Steeves et al., 2012). Zudem ist bei ihnen die obere Extremität häufiger betroffen und sie leiden häufiger unter der Kombination mit einem Myoklonus (Bezerra et al., 2018). Bei Myoklonien handelt es sich um „unwillkürliche kurze Zuckungen von Skelettmuskeln“ (Meinck, 2007).

¹ Veralteter Begriff, welcher eine genetische oder idiopathische, isolierte Dystonie ohne pathologisches Korrelat beschrieb (Albanese et al., 2013).

Die verbreitete klinische Einteilung der Dystonien ist Tabelle 1 zu entnehmen. Die Datenbank MDSGene (s. Abschnitt 1.4) weicht insofern von dieser ab, als dass segmentale und multifokale Dystonien in eine Kategorie zusammengefasst werden.

Tabelle 1: Konsensuale Klassifikation der klinischen Charakteristika der Dystonie, modifiziert nach Albanese et al., 2013, Tabelle 3.

Klinisches Merkmal	Einteilung	Beschreibung	Beispiele
Verteilungsmuster	fokal	nur eine Körperregion betroffen	zervikal (Hals) Blepharospasmus (Lidkrampf) axial (Körperstamm) oromandibulär (Unterkiefer, Mund, Zunge)
	segmental	mindestens 2 benachbarte Regionen betroffen	laryngeal/Dysphonie (Kehlkopf) kranial (Blepharospasmus, unteres Gesicht und Kiefer oder Zunge)
	multifokal	mindestens 2 nicht benachbarte Regionen betroffen	
	generalisiert	Körperstamm und mindestens 2 weitere Regionen betroffen	
	Hemidystonie	eine Körperhälfte betroffen	
	zeitlich: Krankheitsverlauf	statisch progressiv	konstante Ausprägung fortschreitender Verlauf
zeitlich: Variabilität	persistierend	Ausmaß der Symptome im Tagesverlauf relativ konstant	
	aktionsspezifisch	Auftreten nur bei bestimmten Tätigkeiten	Schreibkrampf (Hand) Musikerdystonie
	täglich fluktuierend	Auftreten, Schwere und Erscheinungsbild variieren im Tagesverlauf	
assoziierte Symptome	paroxysmal	plötzlich auftretende Episoden der Dystonie, meist durch einen Trigger verursacht	
	isoliert kombiniert	Dystonie als einziges Symptom oder Kombination mit Tremor gemeinsames Auftreten mit anderen Bewegungsstörungen	Auftreten mit Myoklonien oder Parkinsonismus

Verschiedene ätiologische, also ursächliche Hintergründe der Dystonie sind beschrieben. Neben spezifischen genetischen Varianten (s. nächster Absatz) werden zu den hereditären, d.h. erblichen, Formen auch solche vererbaren Erkrankungen gezählt, bei denen eine Dystonie Teil eines komplexen Syndroms sein kann. Dazu zählen unter anderem die autosomal-rezessiv vererbte Kupferspeicherkrankheit Morbus Wilson, bei der ein gemeinsames Auftreten mit anderen neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen und einer Lebererkrankung vorliegt, sowie die Dystonie als Symptom syndromaler neurologischer Erkrankungen wie der Parkinson-Erkrankung. Neben diesen hereditären Ursachen existieren erworbene Formen, die beispielsweise im Zusammenhang mit Infektionen (z.B. einer viralen Enzephalitis), Medikamenteneinnahme (z.B. Levodopa und Dopamin-Agonisten, meist im Rahmen eines PS (Parkinson-Syndroms)), Intoxikationen (z.B. mit Mangan), paraneoplastischen Syndromen, aber auch mit psychogenen Störungen stehen (Albanese et al., 2013). Erworbene Formen weisen häufig ein typisches Muster auf, wie beispielsweise die axiale Dystonie bei Neuroleptikaeinnahme (Albanese et al., 2019). Für einige Dystonien gibt es keine klar identifizierbare Ursache, diese werden als idiopathisch bezeichnet (Albanese et al., 2013).

Schon bei der ersten Beschreibung von Dystonien (damals noch als „dystonia musculorum deformans“) bei vier Patienten im Jahr 1911 durch H. Oppenheim gab dieser an: „Hereditäre Belastung spielt wohl sicher eine Hauptrolle“ (Oppenheim, 1911). Inzwischen sind verschiedene Gene bekannt, für die ein Zusammenhang mit hereditären Dystonien beschrieben wurde (Jinnah und Sun, 2019), und zu denen auch das Gen *ANO3* gehört. Tabelle 2 liefert einen Überblick über die wichtigsten monogenen Ursachen. Alle dort aufgeführten autosomal-dominant vererbten Formen der Dystonie zeigen eine reduzierte Penetranz, d.h. ein Teil der Mutationsträger erkrankt nicht (Lohmann und Klein, 2013). Dies hat ein unterschiedliches Ausmaß, beispielsweise erkranken nur 20-30% der *TOR1A*-Variantenträger, während die Penetranz von *GNAL*-Varianten fast vollständig (ca. 90%) ist (Balint et al., 2018). Für Varianten in *SGCE* ist der Mechanismus der reduzierten Penetranz bekannt: eine Erkrankung entsteht nur bei Vererbung der Variante durch den Vater, da das mütterliche Allel durch den epigenetischen Mechanismus des *Imprintings* ausgeschaltet wird (Müller et al., 2002a). Es gibt allerdings keinen klaren Grenzwert der Penetranz, ab dem ein Gen, in Abgrenzung

zu Risikofaktoren, als krankheitsverursachend bezeichnet werden kann (Marras et al., 2016); Richtlinien geben zur Abschätzung dessen viel mehr die Kriterien des Vorkommens in mehreren, nicht verwandten erkrankten Individuen, die Segregation (gemeinsame Vererbung von Varianten und Erkrankungsstatus innerhalb betroffener Familien) oder statistische Assoziation mit der Erkrankung, die Konservierung in verschiedenen Spezies und die Evidenz der eingeschränkten Funktionalität des Genproduktes an (MacArthur et al., 2014). Gene mit einem vermehrten Vorkommen von häufigen Varianten bei Patienten gegenüber gesunden Kontrollpopulationen werden als genetische Risikofaktoren bezeichnet (Domingo et al., 2021) und haben neben einer Prädisposition zur Dystonie möglicherweise auch einen Einfluss auf Penetranz und resultierenden Phänotyp monogen vererbter Dystonien (Siokas et al., 2018). Für die meisten dieser genetischen Risikofaktoren besteht nur eine geringe oder widersprüchliche Evidenz, nur drei genomweite Assoziationsstudien (GWAS) wurden durchgeführt. Beispielfür genetische Risikofaktoren zu nennen seien hier Varianten in dem Gen *ARSG* bei Musikerdystonie (Lohmann et al., 2014) sowie in *NALCN*, *DENND1A* und strangaufwärts von *COL8A1* bei zervikaler Dystonie (Mok et al., 2014; Sun et al., 2021). Denkbar wäre auch der Einfluss häufiger Varianten in oben genannten monogen vererbten Genen, wie es bei der Parkinson-Erkrankung beschrieben ist (Gan-Or et al., 2019). Trotz all dieser Erkenntnisse bleibt die genetische Ursache bei vielen Fällen noch unbekannt. Eine Suche nach weiteren ursächlichen Genvarianten ist schon allein für die Diagnosestellung sinnvoll, da dies vielen Patienten die Krankheitsbewältigung erleichtert (Lohmann und Klein, 2017).

Tabelle 2: Übersicht über die wichtigsten monogenen Ursachen von Dystonien, modifiziert nach Balint et al., 2018; Lohmann und Klein, 2017; "OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man", n.d.

Gen	Vererbung	typisches Erkrankungsalter (beschriebenes Spektrum)	typisches Verteilungsmuster	zusätzliche Symptome	Proteinfunktion
isolierte Dystonie	TOR1A	AD	generalisiert		ATPase mit diversen zellulären Aktivitäten
	THAP1	AD (selten AR)	breites Spektrum (fokal, segmental und generalisiert)		Transkriptionsfaktor
	GNAL	AD (selten AR)	segmental	AR: schwerer Verlauf mit Intelligenzminderung	Signaltransduktion
	ANO3	AD	segmental		Calcium-gesteuerter Chloridkanal
kombinierte Dystonie	GCH1	AD (selten AR)	meist generalisiert	Dopa-responsiv, Verschlechterung im Tagesverlauf, Parkinsonismus, Spastizität, AR: schwererer Verlauf mit Entwicklungsverzögerung	Tetrahydrobiopterin-Biosynthese
	ATP1A3	AD	generalisiert/segmental	Parkinsonismus (<i>rapid-onset dystonia-parkinsonism</i> , RDP); Pleiotropie (auch verantwortlich für andere neurologische Erkrankungen)	katalytische Untereinheit einer Natrium-/Kalium-Pumpe
	PRKRA	AR	generalisiert	(milder) Parkinsonismus, Hyperreflexie	Proteinkinase in der Stressantwort
	SGCE	AD	fokal/segmental	Verbesserung durch Alkohol, blitzartige Myoklonien, prominente psychiatrische Symptome	Transmembranprotein
	TH	AR	meist generalisiert	Parkinsonismus, Ptose, Myoklonien, Enzephalopathie, Entwicklungsverzögerung, Blickkrampf	Katecholamin-Biosynthese
	SPR	AR	meist generalisiert	Parkinsonismus, axiale Hypotonie, Entwicklungsverzögerung, okulogyre Krise, Muskelschwäche, Intelligenzminderung	Tetrahydrobiopterin-Biosynthese
	KMT2B	AD	i.d.R. generalisiert	Mikrozephalie, kleine Statur, Intelligenzminderung, abnorme Augenbewegungen, Myoklonus, Dysmorphie, Hautläsionen	Genaktivierung durch Histon-H3-Methylierung
	TAF1	XC	generalisiert	Parkinsonismus	Transkriptionsfaktor
	ADCY5	AD (selten AR)	generalisiert	axiale Hypotonie, Entwicklungsverzögerung, Chorea, Myoklonus, okulomotorische Apraxie, faziale Zuckungen	Adenylylzyklase
	TUBB4A	AD	generalisiert	Hypomyelination, Hirnatrophie	Bestandteil der Mikrotubuli (Zytoskelett)

Die Tabelle hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern umfasst lediglich die häufigsten und als bestätigt gewerteten Dystonie-Gene. AD: autosomal-dominant. AR: autosomal-rezessiv. XC: X-chromosomal. N.a.: nicht angegeben. ATPase: Adenosintriphosphatase.

Das Wissen um genetische Ursachen ermöglicht zudem die Erforschung pathophysiologischer Prozesse, welche im nächsten Schritt zu therapeutischen Ansätzen führen kann. In der Pathophysiologie betrachtete man aufgrund fehlender offensichtlicher anatomischer Anomalien Dystonien ursprünglich als psychische Erkrankungen. Heute geht man von einer organischen Störung des basalganglionär-cerebello-thalamo-corticalen Netzwerkes aus aufgrund des Auftretens von Dystonien bei Läsionen in diesen Bereichen und bildgebend veränderter Volumina auch bei genetischen und idiopathischen Formen. Es kommt zu einer reduzierten Erregbarkeit inhibitorischer Verbindungen. Auch Veränderungen der synaptischen Plastizität und damit der Einbau nicht nötiger Bewegungen in erlernte Bewegungsabläufe sind beschrieben. Im Zusammenhang mit einigen genetischen Ursachen steht eine geringere dopaminerge und damit überhöhte cholinerge Aktivität, vornehmlich im Striatum: so ist beispielsweise *GCH1* an der Dopamin-Biosynthese beteiligt, *GNAL* vermittelt unter anderem die Signaltransduktion des Dopamin-D1-Rezeptors und bei *TOR1A*- und *THAP1*-Varianten ist eine verminderte Expression der D2-Rezeptoren, bei vermehrter Expression des Mitglieds *DRD4* in *THAP1*-mutierten Neuronen, nachweisbar (Balint et al., 2018; Baumann et al., 2021). Die regulierte Expression von *THAP1* und *TOR1A* während der Gehirn-Entwicklung wird als Hinweis auf Dystonien als neurologische Entwicklungsstörung gewertet, zumal in Mäusen eine veränderte Synaptogenese bei *TOR1A*-Mutation beschrieben wurde (Domingo et al., 2016). Molekulare Mechanismen der Dystonie umfassen eine abnormale Homöostase des endoplasmatischen Retikulums (*TOR1A*), veränderte Regulation der Gentranskription (*THAP1*, *KMT2B*) (Balint et al., 2018) sowie eine veränderte Calcium-Homöostase mit erhöhter Erregbarkeit im Striatum (*HPCA* als Calcium-Sensor, *ANO3* als Calcium-gesteuerter Chlorid-Kanal, vermehrte Calcium-Kanal-vermittelte Potentiale bei *TOR1A*) (Domingo et al., 2016).

Ein Blick auf die Lebensqualität bei an Dystonie erkrankten Patienten erklärt das Interesse an der Erforschung der Pathophysiologie und damit möglichen Entwicklung neuer Therapien. Die Lebensqualität ist nicht nur gegenüber der Normalbevölkerung signifikant verringert (Lim, 2007). In einer Gruppe von Patienten mit zervikaler Dystonie wurden ähnliche Werte in dem Lebensqualitäts-Score SF36 im Vergleich zu Patienten mit Multipler Sklerose, Parkinson-Erkrankung bzw. Schlaganfall und sogar die im Vergleich geringsten Werte in den Domänen des

psychischen Wohlbefindens und der emotionalen Rollenfunktion erreicht (Camfield et al., 2002). Dies spiegelt sich auch in der Erwerbsfähigkeit wider – finnische Patienten mit isolierter, zervikaler Dystonie gingen signifikant früher in Rente als nicht betroffene Kontrollen (Ortiz et al., 2019). Die Lebensqualität ist neben Einschränkungen durch die motorischen auch durch weitere Symptome beeinflusst, die mit der Dystonie assoziiert sind. So berichten beispielsweise bis zu 70% der Patienten mit zervikaler Dystonie von Schmerzen. Rund 57% der Patienten mit fokalen Dystonien haben psychiatrische Erkrankungen. Diese können schon Jahre vor den motorischen Symptomen beginnen, sind also nicht in jedem Fall vollständig durch Probleme wie Stigmatisierung bei sichtbaren Zeichen der Dystonie erklärbar (Stamelou et al., 2012).

Um Dystonie-Patienten eine höhere Lebensqualität zu ermöglichen, wurden verschiedene Therapieformen entwickelt. Therapie der ersten Wahl ist, vor allem bei der fokalen Dystonie, die Chemodenervation mittels Botulinum-Toxin-A-Injektion. Besonders bei generalisierten Formen ist die medikamentöse orale Therapie eine Alternative, beispielsweise mit Anticholinergika wie Trihexyphenidyl oder GABAergen Substanzen wie Benzodiazepinen oder Baclofen. Eine invasivere Methode ist die Tiefe Hirn-Stimulation (THS). Dabei erfolgt eine Stimulation des *Globus Pallidus internus* (GPi) mittels operativ implantierter Elektroden. Gute Evidenz hierfür gibt es bei therapierefraktären isolierten generalisierten Dystonien (Lizarraga et al., 2019), besonders bei Nachweis einer pathogenen Variante in den Genen *TOR1A*, *TAF1*, *SGCE*, *GNAL*, *KMT2B* und *PANK2* sowie mit variablerem Effekt bei *THAP1*- und *ATP1A3*-Varianten. Hinweise auf einen Behandlungserfolg der THS bestehen zudem bei Nachweis von Varianten in den Genen *GNAO1*, *GNB1* und *VPS16* (Tisch und Kumar, 2020). Auch für zervikale Dystonien wurde ein positiver Effekt gefunden. Weniger gut belegt sind die Effekte neuerer nicht-invasiver Verfahren wie der transkraniellen Magnetstimulation oder der transkraniellen Gleichstromstimulation, sowie physiotherapeutischer Interventionen (Lizarraga et al., 2019).

1.2 Das Dystonie-Gen *ANO3*

Das Gen *ANO3* (*TMEM16C*, *C11ORF25*) kodiert ein Mitglied der Familie der Anoctamine. Anoctamine wurden nach der Funktion von *ANO1* als AN-ionenselektiver Ionenkanal sowie dessen Struktur mit acht (OCT) Transmembrandomänen benannt (Yang et al., 2008). Der als Gemeinsamkeit angenommene Calcium-abhängige Chloridionenstrom konnte allerdings bisher in HEK293 (*human embryonic kidney*, also humanen embryonalen Nieren)-Zellen für die *ANOs* 3-7 nicht nachgewiesen werden (Duran et al., 2012) und für einige *ANOs* wurden bis zu zehn Transmembrandomänen entdeckt (Whitlock und Hartzell, 2016). Dennoch wird der in der Literatur gängige Begriff *ANO3* (HGNC ID 14004, "HUGO Gene Nomenclature Committee", nicht datiert (n.d.)) auch in dieser Arbeit verwendet.

Das Gen *ANO3* befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p14) (Katoh und Katoh, 2003). Es gibt fünf verschiedene Transkripte, wobei für eine einheitliche Nomenklatur in der Literatur und somit auch in dieser Arbeit das längste Transkript ENST00000256737.8 (Referenz-Sequenz: NM_031418.4) verwendet wird. Dieses besteht aus 27 Exons mit 5937 Basenpaaren (bp), die zu einem Protein mit 981 Aminosäuren translatiert werden ("Ensembl genome browser 97", n.d.). Es wird unter anderem in verschiedenen Regionen des Gehirns exprimiert, besonders im Putamen, aber auch im Kortex und dem Kleinhirn. In der Entwicklung von der midfetalen Periode bis zum Jugendalter wurde eine steigende Expression, vor allem im Striatum, nachgewiesen (Charlesworth et al., 2012). Die genaue Funktion von *ANO3* ist noch in großen Teilen ungeklärt, verschiedene Ansätze wurden jedoch verfolgt: In Fibroblasten eines Dystonie-Patienten mit der Variante p.Trp490Cys wurde ein vermindertes ATP-induziertes Calcium-Signal nachgewiesen, welches am ehesten durch einen verringerten Calcium-*Pool* im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu erklären ist (Charlesworth et al., 2012). *ANO3* erhöht zudem die Expression des Natrium-aktivierten Kalium-Kanals *SLACK* in Spinalganglien-Neuronen von Ratten sowie die Leitfähigkeit und die Natrium-Sensitivität jedes einzelnen *SLACK*-Kanals in HEK293-Zellen. Dadurch wird die Erregbarkeit von Neuronen gesteigert (Huang et al., 2013). Eine solche erhöhte Erregbarkeit, unter anderem im Motorkortex, ist für Dystonien im Allgemeinen beschrieben. Allerdings wird diese eher durch eine Disinhibition ausgelöst (Breakefield et al., 2008).

Eine weitere Funktion von *ANO3*, die in IFET-Zellen (Immortalisierten Fetalen Thymozyten) nachgewiesen wurde, ist die Aktivität als Scramblase. Scramblasen sind Enzyme, die eine bidirektionale, energieunabhängige und Calcium-gesteuerte Umverteilung von Membranlipiden ermöglichen (Beyers und Williamson, 2010). Phospholipide und Glykosphingolipide sind asymmetrisch auf die innere und äußere Zellmembran verteilt (Suzuki et al., 2013). Eine Umverteilung dieses Musters ist Teil der Signaltransduktion im Rahmen verschiedener Prozesse, wie dem apoptotischen Zelltod (Nagata et al., 2010). Für *ANO3* wurde eine Internalisierung von Phosphatidylcholin und Galactosylceramid nachgewiesen (Suzuki et al., 2013). Die Lokalisation im ER (Duran et al., 2012) könnte daher auch dem Transport neu synthetisierter Lipide und der Bereitstellung zur N-Glykosylierung von Proteinen dienen (Brunner et al., 2016).

Für nicht-kodierende Varianten in *ANO3* wurden noch weiter zu validierende Assoziationen mit einem erhöhten Risiko für verschiedene Erkrankungen, darunter beispielsweise Cluster-Kopfschmerz (Ran et al., 2019) und Fieberkrämpfe (Feenstra et al., 2014; Wang et al., 2021), beschrieben.

Ein Zusammenhang kodierender *ANO3*-Varianten mit Dystonien wurde zunächst bei Familien mit autosomal-dominanter, kraniozervikaler Dystonie festgestellt (Charlesworth et al., 2012). Die darauf folgende Beschreibung einer ähnlichen Häufigkeit seltener, proteinverändernder Varianten bei gesunden Probanden (0,5%) wie bei Dystonie-Patienten (0,6%) (Zech et al., 2014) hinterließ allerdings Zweifel an der Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonien, da somit die Unterscheidung zwischen pathogener Variante und Zufallsbefund erschwert war.

Im Verlauf der experimentellen Durchführung der vorliegenden Arbeit erschienen relevante Publikationen, die zur Klärung der Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonien beitrugen, unter anderem durch die eigenen Arbeiten (s.u.). So zeigt ein Blick in die aktuellen, auf MDSGene zusammengefassten Daten einige Publikationen mit weiteren Fällen von Dystonie-Patienten mit *ANO3*-Varianten. Die darin beschriebene Symptomatik umfasst insbesondere segmentale und multifokale, isolierte Dystonien, wobei häufig zervikale Dystonien und dystoner Tremor beobachtet werden. Bei dem Erkrankungsalter sind Häufungen sowohl in der Kindheit als auch im Erwachsenenalter zu finden ("MDSGene", n.d.). Eine Erweiterung des klinischen Spektrums sowie Unterstützung von *ANO3* als

Kandidatengen lieferte die Beschreibung von de-novo Mutationen bei Patienten mit generalisierter Dystonie und frühem Erkrankungsbeginn, die unter anderem auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte (Olschewski et al., 2019).

1.3 De-novo Varianten

Neben den klassischen Erbgängen – autosomal-dominant (die Veränderung eines Allels auf einem Autosom löst den Phänotyp aus), autosomal-rezessiv (beide Allele müssen verändert sein, um den Phänotyp zu beeinflussen) und X-chromosomal (i.d.R. dominant auf dem X-Chromosom vererbt) – besteht auch die Möglichkeit, dass genetische Varianten erst während der Keimzellbildung oder postzygotisch entstehen (Acuna-Hidalgo et al., 2016). Diese sogenannten de-novo Varianten sind in den parental Genomen also nicht zu finden, können bei Entstehung in der Keimzellentwicklung aber trotzdem auch bei Geschwistern vorkommen (Rahbari et al., 2016). Ihr Auftreten wird als starkes Kriterium der Pathogenität gewertet (Richards et al., 2015), da sie im Gegensatz zu vererbten Varianten nicht der Selektion unterliegen (Veltman und Brunner, 2012). So betrafen de-novo Varianten auch in einer Studie an Schizophrenie-Patienten Nukleotide mit einer höheren Konservierung, also geringeren evolutionären Veränderung, als privat vererbte Varianten (Xu et al., 2011). Rund 80% der de-novo Varianten liegen auf dem paternalen Allel (Goldmann et al., 2016). Ihre Häufigkeit steigt signifikant mit dem paternalen Alter um 2,87 zusätzliche Varianten pro Lebensjahr (Rahbari et al., 2016) aufgrund von ständigen Zellteilungen der Spermien und damit Häufung genetischer Varianten infolge von z.B. Replikationsfehlern (Acuna-Hidalgo et al., 2016). Ein weiterer Einflussfaktor ist die genomische Lage, mit einem vermehrten Vorkommen beispielsweise in CpG-Inseln oder Stellen mit DNase I – Hypersensitivität (Pranckéniené et al., 2018). Die beschriebene Häufigkeit von de-novo Veränderungen einzelner Nukleotide variiert je nach Methodik von $1,0 \times 10^{-8}$ (Shendure und Akey, 2015) bis $2,74 \times 10^{-8}$ (Pranckéniené et al., 2018) pro Base und Generation, woraus pro Person etwa 1,9 de-novo SNVs (*Single Nucleotide Variants*, Veränderungen eines einzelnen Nukleotids) in exonischen Bereichen resultieren (Pranckéniené et al., 2018). Andere Typen von Varianten sind deutlich seltener, so treten z.B. kleine (1-20 bp) *Indels* (Insertionen und Deletionen) mit einer Häufigkeit

von $0,68 \times 10^{-9}$ pro Base und Generation auf (Kloosterman et al., 2015). Es handelt sich, auf die gesamte Population betrachtet, also nicht um seltene Ereignisse, sodass insgesamt ein relevanter Anteil an der Entstehung auch relativ häufiger Erkrankungen besteht (Veltman und Brunner, 2012). De-novo Varianten haben zudem einen erheblichen Anteil an der Entstehung von Dystonien bei den Genen *KMT2B*, *ADCY5* und *ATP1A3* (Balint et al., 2018) und wurden auch bei anderen Formen, z.B. *TOR1A*, beschrieben (Lange et al., 2021).

1.4 Die klinisch-genetische Datenbank MDSGene

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine systematische Literaturrecherche zu Varianten in *ANO3* bei Dystonie-Patienten nach den Kriterien der MDSGene-Datenbank (*Movement Disorder Society Genetic mutation database*; abzurufen unter www.mdsgene.org) durchgeführt, welche in Grundzügen in diesem Kapitel vorgestellt wird. MDSGene ist eine genetisch-klinische Datenbank, die dem Nutzer einen Überblick über die Studienlage zur Genetik verschiedener Bewegungsstörungen in Verbindung zum jeweiligen Phänotyp bietet. Dabei wird mit der „Genes“-Funktion ein filterbarer Überblick zu phänotypischen Daten sowie Statistiken zu den Trägern von Varianten in einem bestimmten Gen dargestellt. Mit der „Signs and Symptoms“-Funktion sollen umgekehrt zu einem gegebenen Phänotyp passende genetische Diagnosen recherchiert werden können. Aktuell wurden 2464 Varianten in 52 verschiedenen Genen bei 8982 Patienten mit acht unterschiedlichen Bewegungsstörungen aus 1629 Publikationen erfasst (Stand: 07.07.21, („MDSGene,“ n.d.)). Die Diagnosen sowie eingeschlossenen Gene orientieren sich an den Empfehlungen der „*International Parkinson disease and Movement Disorder (MDS) Task Force of Genetic Nomenclature in Movement Disorders*“ (Lill et al., 2016; Marras et al., 2016).

Die Datengewinnung erfolgt nach einem festgelegten Schema. In der Literatur-Datenbank PubMed („PubMed - NCBI“, n.d.) wird mittels standardisierter Suchbegriffe, welche unter anderem den Namen des entsprechenden Gens und dessen Aliase sowie die zugehörige Bewegungsstörung enthalten, nach englischsprachigen Publikationen gesucht. Eingeschlossen werden nur Studien, die mindestens einen Patienten mit mindestens einer Variante in dem entsprechenden

Gen darstellen. Zusätzliche Daten werden in *Reviews* und deren Referenzen gesucht. Ausgeschlossen werden häufige Varianten, definiert als MAF (*minor allele frequency*, Allelhäufigkeit des selteneren Allels) von $\geq 1\%$ in den Datenbanken gnomAD (*Genome Aggregation Database*, ("gnomAD", n.d.)) oder dbSNP ("SNP - NCBI", n.d.) bzw. bei nicht betroffenen Individuen in der Publikation. Aus eingeschlossenen Publikationen werden Angaben zu demographischen (z.B. Geschlecht), genetischen (z.B. Genotyp) sowie klinischen Aspekten (z.B. initiale Symptomatik) extrahiert und in standardisierte Datentabellen eingefügt (Kasten et al., 2018). Die entsprechenden Variablen können dem Anhang C entnommen werden.

Zur besseren Einschätzung der extrahierten Varianten wird jeweils ein *Scoring* der Pathogenität durchgeführt. Diese wird unterteilt in „*benign*“ (benigne, wird dann in der Datenbank nicht aufgeführt), „*possibly pathogenic*“ (möglicherweise pathogen), „*probably pathogenic*“ (wahrscheinlich pathogen) sowie „*definitely pathogenic*“ (definitiv pathogen). Dabei werden für die folgenden Kriterien in unterschiedlicher Gewichtung Punkte vergeben, deren Gesamtwert zu der Kategorisierung führt (Kasten et al., 2018; "MDSGene", n.d.). Ein Überblick über die genauen Punktwerte kann dem Anhang B sowie der Webseite der MDSGene-Datenbank (www.mdsgene.org/methods) entnommen werden.

1. Segregation: Hierbei geht es um die Differenzierung von Varianten, die nur bei einem einzelnen Patienten gefunden wurden, gegenüber Varianten, die innerhalb von einer oder mehreren Familien mit dem Erkrankungsaufreten segregieren.
2. Häufigkeit: Dies beruht auf der Annahme, dass in der Gesamtpopulation häufige Varianten weniger wahrscheinlich Ursache einer seltenen Erkrankung sind. Als Referenz wurden hierzu die rund 140.000 Individuen der Datenbank gnomAD ("gnomAD", n.d.) verwendet.
3. *In-silico*, also computerbasierte, Prädiktion mittels CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*)-Score: Dabei handelt es sich um das Ergebnis einer online verfügbaren Software, welche Varianten anhand verschiedener Parameter, wie der umgebenden Sequenz, epigenetischen Maßen und möglicher funktioneller Konsequenzen einteilt. Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgt die Angabe in einem logarithmierten Wert, welcher

die Einstufung im Vergleich zu ca. neun Milliarden SNVs wiedergibt. Demnach bedeutet ein *Score* von 10 einen Rohwert in den obersten 10% der SNVs, ein *Score* von 20 in den oberen 1% usw. (Rentzsch et al., 2019).

4. Funktionelle Studien: Publierte Studien, die *in vivo* oder *in vitro* einen Effekt der Variante nachweisen, unterstützen die Pathogenität dieser Variante.

1.5 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Da am Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck bereits langjährige Erfahrung mit genetischen Studien besteht, konnte im Rahmen dieser Arbeit auf etablierte Materialien und Methoden (vgl. z.B. Borngreber, 2017; Löchte, 2018) zurückgegriffen werden. Auch die Systematik der Literaturrecherche gemäß der MDSGene-Plattform wurde schon vor Beginn dieser Arbeit erarbeitet (Kasten et al., 2018; Lill et al., 2016).

Die Studien- und Kontrollprobanden für die *GenePanel*-Untersuchung wurden in verschiedenen neurologischen Zentren rekrutiert, von Experten für Bewegungsstörungen untersucht, Blutproben entnommen sowie die DNA extrahiert. Diese wurde für das *GenePanel* aufbereitet und an die Firma *Centogene* versandt. Parallel zu dieser Arbeit wurden Varianten in anderen Dystonie-Genen bei den untersuchten Patienten ausgeschlossen.

1.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonien zu evaluieren, da der Beschreibung von über 50 Patienten mit ähnlichen Phänotypen insbesondere die Häufung von *ANO3*-Varianten auch in Kontrollkollektiven mit möglicherweise ähnlicher Häufigkeit gegenübersteht. Das Wissen über die Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonien ist Grundlage für weitere Forschung zur Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie sowie für die diagnostische Sicherheit und genetische Beratung betroffener Patienten und ihrer Familien.

Zur Beantwortung dieser Frage nach der Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonien sollte auf folgende untergeordnete Fragen eingegangen werden:

1. Wie häufig sind seltene, proteinverändernde *ANO3*-Varianten bei Dystonie-Patienten? Wie häufig treten diese im Vergleich dazu bei Nicht-Dystonie-Patienten auf?

Dazu wurde zunächst ein genetisches *Screening* auf Varianten in *ANO3* mittels *Next Generation Sequencing* (NGS)-basierter *GenePanel*-Analyse bei 729 Dystonie- und 294 PS-Patienten durchgeführt und die gefundenen Varianten im Folgenden gefiltert und mittels Sanger-Sequenzierung validiert.

2. Findet sich eine de-novo Variante in *ANO3* bei einem Patienten mit generalisierter Dystonie?

Dafür wurden die Eltern auf das Vorhandensein einer bei dem Patienten nachgewiesenen *ANO3*-Variante getestet.

3. Wie häufig und in Zusammenhang mit welchen Phänotypen wurden *ANO3*-Varianten bei Dystonie-Patienten in der Literatur beschrieben?

Hierfür wurde eine systematische Literaturrecherche nach den Kriterien der MDSGene-Datenbank durchgeführt.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Zur Einschätzung der Rolle von ANO3-Varianten bei Dystonien wurden neben den Dystonie-Patienten als Kontrollpopulation auch Patienten mit PS aus jeweils verschiedenen Zentren für Bewegungsstörungen rekrutiert.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Referenznummer 04-180, 16-039) genehmigt. Alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Insgesamt wurden 729 Dystonie-Patienten eingeschlossen, davon 562 aus Deutschland (Hannover (n=247), Berlin (n=124), Kassel (n=113), Kiel (n=58) und Lübeck (n=20)), 92 aus Spanien (Sevilla) und 75 aus Korea (Seoul). Das Durchschnittsalter in der Stichprobe lag bei $55,9 \pm 20,3$ Jahren und das Erkrankungsalter im Mittel bei $37,6 \pm 12,1$ Jahren, 401 der Dystonie-Patienten waren männlich (55%). Von 579 Patienten war das Verteilungsmuster der dystonen Symptomatik bekannt. Davon präsentierten sich 478 (82,6%, 478/579) Patienten mit einer fokalen Dystonie, 53 (9,2%) Patienten mit einer segmentalen sowie 51 (8,8%) Patienten mit einer generalisierten Dystonie.

Erwähnenswert ist, dass alle Patienten aus Hannover eine Musikerdystonie sowie ein Großteil der Kieler Patienten (60,3%, 35/58) einen Schreibkrampf zeigten. Insgesamt präsentierten sich von den Patienten mit fokalen Dystonien 248 mit einer Musikerdystonie (51,9%, 248/478), 112 mit einer zervikalen Dystonie (23,4%), 59 mit einer Dystonie der oberen Extremität (12,3%; einschließlich Schreibkrampf) und 43 mit einem Blepharospasmus (9,0%). Jeweils ein Patient wies eine oromandibuläre, laryngeale Dystonie bzw. eine Dystonie des unteren Gesichtes (je 0,2%) auf. Für 13 Patienten (2,7%) ist die betroffene Körperregion bei fokaler Dystonie nicht bekannt. Weitere Daten zu den Patienten je Einsender sind in Tabelle 3 zu finden und wurden in dem Journal *Parkinsonism and Related Disorders* publiziert (Olschewski et al., 2019).

Zudem wurden 294 PS-Patienten aus deutschen Parkinson-Zentren (Universitätskliniken in Berlin, Kiel und Lübeck) eingeschlossen. Diese hatten ein

durchschnittliches Alter von $65,3 \pm 12,6$ Jahren. Darunter waren 156 Männer (61,9% der Patienten mit bekanntem Geschlecht), von 42 Patienten war das Geschlecht nicht bekannt.

Tabelle 3: Überblick über Charakteristika der Stichprobe, modifiziert nach Olschewski et al., 2019, Tabelle 1A.

Stichprobe	Land	Zentrum	Anzahl der Patienten	Alter (Jahre)	Erkrankungsalter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	Verteilung der Dystonie (fokal/segmental/generalisiert/n.a.)
Dystonie	DEU	Hannover	247	$55,5 \pm 12,8$	$27 \pm 2,0$	175/72	247/0/0/0
		Berlin	124	$57,6 \pm 17,8$	$38,2 \pm 20,2$	61/63	38/20/23/43
		Kassel	113	$69,7 \pm 15,6$	$50 \pm 5,4$	39/74	89/7/1/16
		Kiel	58	$60,5 \pm 31,1$	n.a.	28/30	39/1/0/18
		Lübeck	20	$48,3 \pm 22,3$	n.a.	11/9	5/4/3/8
	gesamt	562	$58,7 \pm 21,0$	$41,8 \pm 13,0$	314/248	418/32/27/85	
	ESP	Sevilla	92	$46,3 \pm 18,3$	$21,4 \pm 7,8$	42/50	31/20/20/21
	KOR	Seoul	75	$45,8 \pm 12,7$	n.a.	45/30	29/1/4/41
gesamt	729	$55,9 \pm 20,3$	$37,6 \pm 12,1$	401/328	478/53/51/147		
PS	DEU	Berlin, Kiel, Lübeck	294	$65,3 \pm 12,6$	n.a.	156/96 (42 n.a.)	nicht anwendbar

DEU: Deutschland, ESP: Spanien, KOR: Südkorea, ges.: gesamt (angegebene Mittelwerte wurden aus den Werten der einzelnen Patienten, nicht als Mittelung der Mittelwerte errechnet). N.a.: nicht angegeben

Außerdem erfolgte im Rahmen einer *GenePanel*-Analyse auch die genetische Untersuchung eines dreijährigen Lübecker Patienten (L-11226) mit einer generalisierten Dystonie. Dieser wurde von Frau Dr. Sinem Tunç von dem Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, untersucht und zugewiesen. Beide Eltern sowie ein älteres Geschwisterkind sind gesund. In der Schwangerschaft und der frühen Entwicklung zeigten sich keine Auffälligkeiten. Im Alter von 15 Monaten entwickelte der Patient jedoch motorische Einschränkungen, z.B. des Stehens, aufgrund eines Zitterns der Beine. Die Symptome waren progressiv bis hin zu einer generalisierten Dystonie, die neben den Beinen besonders Hals und Larynx mit einer Dysphonie betraf, und myoklonischen Zuckungen. Metabolische Ursachen konnten ausgeschlossen werden. Ein ausführlicherer Fallbericht kann der Publikation im *Journal of the Neurological Sciences* entnommen werden (Tunc et al., 2019). Für diesen Patienten lagen

zusätzlich DNA-Proben der gesunden Eltern zur Untersuchung der Segregation vor. Eine solche Segregationsanalyse mit zusätzlicher Untersuchung der DNA-Probe eines gesunden Bruders konnte außerdem bei einer *ANO3*-Variantenträgerin aus der *GenePanel*-Analyse erfolgen, welche sich ebenfalls mit einer generalisierten Dystonie mit Beginn im Kindesalter in der unteren Extremität präsentierte (ausführlicherer Fallbericht s. Abschnitt 3.1).

2.2 Material

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in den folgenden Tabellen aufgeführten Substanzen, Geräte sowie Softwares und Datenbanken verwendet.

2.2.1 Chemikalien und Kits

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Kits

Substanz	Hersteller
100 bp DNA ladder [500 µg/ml]	New England Biolabs
Agarose	Biozym
Betain [5M]	Sigma-Aldrich
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Terminatormix)	Applied Biosystems
Desoxyribonukleotide (dNTPs) [je 10mM]	MP
Dimethylsulfoxid (DMSO) [99,9%]	Sigma-Aldrich
Ethanol [99,9%]	J.T.Baker
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Exonuclease I [20U/µl]	Thermo Scientific
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase [1U/µl]	Thermo Scientific
GC-rich PCR System	Roche
GeneScan 600 LIZ dye Size Standard	Applied Biosystems
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems
HPLC grade H ₂ O	J.T.Baker
Midori Green Advance DNA stain	Nippon Genetics
Natrium-Acetat (NaAc) [3M]	Sigma-Aldrich

Oligonukleotide/Primer [10µM]	Eurofins MWG
Q5 Hot Start High Fidelity 2x Master Mix	New England Biolabs
Sequenzpuffer [5x]	Applied Biosystems
Taq DNA-Polymerase [5 U/µl] und Puffer [10x]	MP

2.2.2 Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Lösungen

Substanz	Zusammensetzung
Agarose-Gel (1,5%)	300 ml 1x TBE-Puffer 4,5 g Agarose 15 µl Midori Green
Bromphenolblau-Farbstoff	100 µl DNA ladder 100 µl 10x Glycerin 400 µl dH ₂ O
ExoFast	0,5 µl Exonuclease I [20U/µl] 1 µl FastAP [1 U/µl]
TBE-Puffer (10x)	121,1 g Tris 55 g Borsäure 7,4 g EDTA dH ₂ O bis 1 l

2.2.3 Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Gerätename	Hersteller
Microfuge 16 Centrifuge	Beckman Coulter
Dark Hood DH-50	Biostep
EOS 700D	Canon
Genetic Analyzer ABI 3130XL	Applied Biosystems
Genetic Analyzer ABI 3500XL	Applied Biosystems
Pipetten	Eppendorf
Thermocycler Flex Cycler	Analytik Jena
Thermocycler PTC-100	MJ Research
Thermocycler PTC-200	MJ Research

Thermocycler MJ Mini	BIO-RAD
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf

2.2.4 Software und Datenbanken

Tabelle 7: Verwendete Software und Datenbanken

Bezeichnung (URL)	Hersteller
Combined Annotation Dependent Depletion v1.3 (https://cadd.gs.washington.edu/)	University of Washington, Hudson-Alpha Institute for Biotechnology Berlin Institute of Health
gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org/)	Genome Aggregation Database
MDSGene (https://www.mdsgene.org/)	International Parkinson and Movement Disorder Society
Mutation Surveyor v3.30	Soft Genetics
MutationTaster2 (http://mutationtaster.org/)	Exzellenzcluster NeuroCure, Charité - Universitätsmedizin Berlin
NNSplice Version 0.9 (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)	Berkeley Drosophila Genome Project
Oligo Explorer v.1.1.0	Gene Link
Sequence Analysis 5.3.1	Applied Biosystems
SNPCheck V3 (https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm)	GeneTools
SPSS Statistics Version 27	IBM
UCSC Genome Browser	Genomics Institute, University of California Santa Cruz

2.3 Methoden

2.3.1 *Next Generation Sequencing*

Die erste Sequenzierung eines menschlichen Genoms brauchte zwölf Jahre und fast drei Milliarden Dollar und war damit nicht als verbreitetes Diagnostikum im Rahmen der personalisierten Medizin geeignet. Auf der Suche nach einer effizienteren Methode wurde das *Next Generation Sequencing* (NGS, Sequenzierung der nächsten Generation) entwickelt, das eine solche Sequenzierung innerhalb eines Tages mit Kosten von mittlerweile etwa 1000 Dollar ermöglicht (Muzzey et al., 2015). Dabei gibt es nicht das eine NGS, vielmehr handelt es sich um einen Sammelbegriff verschiedener Methoden, die durch parallel ablaufende Reaktionen auf einer festen Oberfläche einen hohen Durchsatz erreichen (Alekseyev et al., 2018). Unter NGS im engeren Sinne versteht man das *sequencing by synthesis* (SBS), eine weitere Gruppe stellt das *sequencing by hybridization* (SBH) dar. Neuere Methoden zur Sequenzierung längerer Abschnitte oder auf der Basis von Nanoporen werden als Sequenzierungen der dritten Generation bezeichnet (Kumar et al., 2019). Das *Illumina HiSeq*-System, welches für diese Arbeit verwendet wurde, gehört dabei zu der SBS-Gruppe.

Die Durchführung des eigentlichen NGS erfolgte nicht selbstständig im Rahmen der vorliegenden Arbeit, sondern über die Firma *Centogene*, sodass an dieser Stelle lediglich das Grundprinzip erläutert werden soll: Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende DNA fragmentiert und Adapter werden an die 5'- und 3'-Enden der Fragmente gebunden. Auf einer festen Oberfläche sind Oligonukleotide gebunden, die komplementär zu den verwendeten Adaptern sind, sodass diese daran binden. Im Rahmen einer sogenannten Brückenamplifikation werden die gebundenen DNA-Fragmente amplifiziert, sodass klonale *Cluster* entstehen. Die eigentliche Sequenzierung erfolgt dann durch den Einbau unterschiedlich fluoreszierender Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) mithilfe einer Polymerase. Die dNTPs sind mit einem Terminator versehen, sodass nach dem Einbau eines dNTPs zunächst keine weitere Kettenverlängerung möglich ist (Borngräber, 2017; Illumina, 2015; Löchte, 2018). Dadurch kann das spezifische Fluoreszenzsignal des eingebauten dNTPs erfasst werden, bevor der Terminator entfernt wird und das System damit für den Einbau des nächsten Nukleotides bereit ist (Slatko et al., 2018). Dies wird

in einer bestimmten Häufigkeit wiederholt, sodass Basenabfolgen mit einer Länge von 35 bis 300 bp entstehen (Levy und Boone, 2019), die sogenannten *Reads*. Die Anzahl an *Reads*, die eine bestimmte genomische Position abdecken, wird als *depth* bezeichnet (Alekseyev et al., 2018). In großen Teilen der Literatur sowie in dieser Arbeit wird die *Coverage* in der Regel als Synonym für die *depth* verwendet. Es sei an dieser Stelle allerdings darauf hingewiesen, dass einige Autoren die *Coverage* als Begriff für den Anteil der Zielregion, der tatsächlich bei der Sequenzierung erfasst wurde, verwenden (Alekseyev et al., 2018). Die *Coverage* ist ein Qualitätsmerkmal des NGS, da eine höhere Abdeckung jeder Base auch die statistische Wahrscheinlichkeit erhöht, im Falle einer heterozygoten Variante sowohl das Wildtyp- als auch das mutierte Allel zu sequenzieren (Lohmann und Klein, 2017). Auch bei einer ausreichenden *Coverage* ist für die Illumina-Sequenzierer eine Fehlerrate von 0,1% angegeben (Pfeifer, 2017), die in bestimmten genomischen Bereichen mit speziellen Sequenzen bis auf 1% ansteigen kann (Muzzey et al., 2015).

Eine Besonderheit der Illumina-Geräte ist das sogenannte *paired-end sequencing*, bei dem beide Stränge der DNA sequenziert werden, was die weitere Analyse verbessert. Bei der Analyse werden die Sequenzen mit einem Referenzgenom abgeglichen und Abweichungen von diesem, d.h. genetische Varianten, angezeigt (Illumina, 2015).

2.3.2 *GenePanel*

Die Methode des NGS wurde im Rahmen einer *GenePanel*-Untersuchung angewandt, wobei DNA-Proben von 1.023 Patienten (Charakteristika s. Abschnitt 2.1) auf Varianten in allen 27 Exons sowie den Exon-Intron-Grenzen von *ANO3* durch die Firma *Centogene* untersucht wurden. Exons enthalten unter anderem die kodierenden Abschnitte eines Gens, während Introns beim Spleißvorgang entfernt und somit nicht in Aminosäuren umgeschrieben, d.h. translatiert, werden. Ein *GenePanel* ist eine gleichzeitige Untersuchung von mehreren für eine bestimmte Erkrankung relevanten Genen, im genutzten *Panel* von verschiedenen Dystonie- und PS-Genen. Im Rahmen dieser Arbeit werden jedoch nur die Ergebnisse zu *ANO3* betrachtet. Für das *GenePanel* erfolgte zur Kostenreduzierung eine

Zusammenfassung der Proben in zufällige Dreier-*Pools*. Bei den herausgegebenen Varianten wurde auf ihr seltenes Vorkommen ($MAF < 0,005$) in der Gesamtpopulation geachtet. Diese seltenen Varianten wurden zunächst nach ihrem vorhergesagten Effekt gefiltert. Dabei wurden zum einen proteinverändernde, d.h. aminosäureaustauschende (*Missense*-) Varianten oder Veränderungen von Spleißstellen, eingeschlossen. Des Weiteren wurden Veränderungen des Translations-Startcodons AUG (sogenannte *Start-loss*-Mutationen) oder Varianten, die zu einem verfrühten Stop-Codon führen (sogenannte *Nonsense*-Mutationen), im Rahmen dieser Studie weiter betrachtet. Der Effekt von Varianten in Sequenzen der Spleißstellen wurde zusätzlich mittels des online verfügbaren Programmes *NNSPLICE 0.9* (Reese et al., 1997) eingeschätzt. Die einzugebende umgebende Sequenz wurde der UCSC-Datenbank (Kent et al., 2002) entnommen.

Für die auf diese Weise gefilterten Varianten wurde der CADD-Score (Rentzsch et al., 2019) für jede Variante bestimmt (s. Abschnitt 1.4). Es wurde zuvor ein CADD-Score von 15 als Untergrenze für weiter betrachtete Varianten festgelegt. Dies ist der üblicherweise verwendete Wert, der auch den Median für nicht-synonyme und Spleißstellen-Varianten darstellt ("CADD", n.d.). Da in diesen *Score* andere, in der Literatur häufig verwendete Bewertungsalgorithmen (z.B. SIFT, PolyPhen) einfließen, werden diese nicht zusätzlich aufgeführt.

Von den gefilterten Varianten sollte nun derjenige Patient eines Dreier-*Pools* herausgefunden werden, welcher die angegebene Variante trägt, bzw. sollten mit fehlendem Nachweis bei allen drei Patienten falsch-positive Ergebnisse entdeckt werden. Beiden Zwecken diene die Sanger-Sequenzierung. Deren Durchführung sowie die nötigen vorbereitenden Schritte werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Zur Abschätzung der Pathogenität wurden zwei Klassifikationssysteme auf durch die Sanger-Sequenzierung bestätigte Varianten angewandt. Zum einen wurden die MDSGene-Kriterien (s. Abschnitt 1.4 und Anhang B), zum anderen auch die gemeinsamen Kriterien des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) und der *Association for Molecular Pathology* (AMP) (im Folgenden als ACMG-Kriterien bezeichnet, Richards et al., 2015) verwendet. Letztere ermöglichen die Einteilung von Varianten in die fünf Kategorien „*pathogenic*“ (pathogen), „*likely pathogenic*“ (vermutlich pathogen), „*uncertain significance*“ (Variante unklarer

Signifikanz, VUS), „*likely benign*“ (vermutlich benigne) und „*benign*“ (benigne), wobei „*likely*“ jeweils für eine 90%ige Wahrscheinlichkeit der Pathogenität bzw. Benignität der Variante steht. Diese Einteilung geschieht durch Kombinationen aus erfüllten Kriterien der Evidenzgrade „*very strong*“ (pathogen) bzw. „*stand-alone*“ (benigne), „*strong*“, „*moderate*“ (nur pathogen) sowie „*supporting*“ (Richards et al., 2015). Diese lassen jedoch in einigen Punkten Raum für Interpretation oder erlauben eine Herauf- bzw. Herabsetzung des Evidenzgrades in bestimmten Fällen. Im Rahmen des Entwicklungsprozesses der MDSGene-Datenbank wurden zwischenzeitlich die ACMG-Kriterien angewandt und daher von Mitgliedern des Instituts für Neurogenetik der Universität zu Lübeck spezifiziert. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet und ist dem Anhang B zu entnehmen.

2.3.3 Primer-Design

Für die Vervielfältigung und anschließende Sequenzierung der DNA-Abschnitte mit einer bei der *GenePanel*-Analyse ermittelten Variante in *ANO3* wurden, wie bei jeder Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), ein Vorwärts (*forward*, F)- und ein Rückwärts (*reverse*, R)-Primer verwendet. Diese binden an komplementäre Abschnitte der DNA beiderseits der Variante und ermöglichen so als Startabschnitte eine Aktivität der benötigten Enzyme. Für die Erstellung der Primer wurde die Software *Oligo Explorer 1.1.0* (Kuulasma, 2002) verwendet, wobei die dort einzugebende flankierende Sequenz (Variante $\pm 300\text{bp}$) dem *Genome Browser* der UCSC-Datenbank (Kent et al., 2002) entnommen wurde. Bei der Erstellung der F- und R-Primer wurden folgende Vorgaben befolgt:

1. Die Primer sollten jeweils eine Länge von 19 bis 24 bp haben. Die Längen sollten sich dabei um maximal fünf Basenpaare unterscheiden.
2. Die *Annealing*-Temperatur, d.h. die spezifische Temperatur für die Primeranlagerung während der PCR, sollte sich in dem Bereich zwischen 55°C und 65°C befinden und sich zwischen den jeweiligen F- und R- Primern um maximal 1°C unterscheiden.
3. Das 3'-Ende sollte aus dem Basenpaar Guanin-Cytosin (GC) bestehen. Zwischen diesen Basen besteht im Vergleich zu Adenin-Thymin-Basenpaaren (AT)

eine festere Bindung mittels dreier Wasserstoffbrückenbindungen, was eine stabilere Bindung des Primers ermöglichen soll.

4. Die Primer sollten sich innerhalb der Sequenz auf zwei unterschiedlichen Seiten der zu untersuchenden Variante befinden und jeweils mindestens 70 bp von dieser entfernt sein.

Anschließend wurde für die erstellten Primer mithilfe der Webseite *SNPcheck* überprüft, ob sich bekannte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs, Einzelnukleotid-Polymorphismen) innerhalb der Primer-Sequenz befinden. Diese waren möglichst zu vermeiden, in jedem Fall aber innerhalb der letzten fünf Basenpaare am 3'-Ende, da eine feste und spezifische Bindung in diesem Bereich besonders wichtig ist. Außerdem erfolgte ein Test der Primer-Funktion *in silico* mithilfe des online verfügbaren Programmes *UCSC In-silico PCR*. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma *Eurofins Genomics Germany GmbH*. Die verwendeten Primer sind in Anhang A aufgeführt.

2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um bei der Sequenzierung eines spezifischen DNA-Abschnittes diesen von der Gesamt-DNA einer Probe abgrenzen zu können, muss der zu sequenzierende Abschnitt zunächst vervielfältigt (amplifiziert) werden. Eine bewährte Methode dazu stellt die PCR dar. Dabei wird ein durch die zuvor erstellten, spezifisch bindenden Primer genau festgelegtes Fragment amplifiziert. Die PCR besteht aus mehreren Zyklen, wobei in jedem Zyklus die Menge des spezifischen Fragmentes verdoppelt wird und somit eine exponentielle Steigerung über die Zyklen erfolgt. Jeder Zyklus besteht aus den folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung: Durch thermische Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen bei Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 95°C wird der DNA-Doppelstrang in Einzelstränge geteilt.
2. Primeranlagerung („*Annealing*“): In diesem Schritt erfolgt die spezifische Anlagerung der Primer an die zu ihnen komplementären Abschnitte der DNA-Einzelstränge durch Absenken der Temperatur auf die Primer-spezifische *Annealing*-Temperatur (55-61°C, s. Anhang A).

3. Elongation: Durch die hitzestabile *Taq*-Polymerase erfolgt bei Anheben der Temperatur auf 72°C die Synthese des komplementären Stranges in 5'-3'-Richtung unter Verwendung der im Reaktionsgemisch befindlichen dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP). (Borngräber, 2017; Löchte, 2018)

Tabelle 8: Ansatz der Standard-PCR

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

Programm der Standard-PCR mit 35 Zyklen zur Amplifikation auf die 2³⁵fache Menge

5 min	95°C
35x	30 sek 95°C
	30 sek 55-61°C (Primer-spezifische <i>Annealing</i> -Temperatur)
	30 sek 72°C
10 min	72°C
Endtemperatur	4°C

Zur Überprüfung des Erfolges der Amplifikation sowie der Spezifität der Primerbindung diene die Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wird die negative Ladung der in der DNA enthaltenen Phosphatreste genutzt. Bei Anlegen einer elektrischen Spannung besteht eine Anziehung der DNA durch die Anode, wobei es durch die schnellere Bewegung kürzerer Fragmente durch das Gel zu einer

Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer Länge kommt. Der im Gel enthaltene Farbstoff *Midori Green* bindet als Interkalator, also sich einlagerndes Molekül, die DNA-Doppelstränge und fluoresziert bei UV-Bestrahlung, sodass mithilfe einer Kamera die Banden aus DNA-Fragmenten einer Länge sichtbar gemacht werden können. Mithilfe eines Längenstandards kann die ungefähre Länge der in einer Bande enthaltenen Fragmente abgeschätzt und mit der durch *in silico* Analysen (s. Abschnitt 2.3.3) erwarteten Produktgröße abgeglichen werden. Für die Vorbereitung und Durchführung der Gelelektrophorese wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

1. Suspension von 4,5 g Agarose in 300 ml 1x TBE-Puffer (ergibt 1,5%).
2. Aufkochen der Suspension bis zur makroskopisch vollständigen Lösung der Agarose und Zugabe von 15 µl *Midori Green*.
3. Füllung einer mit Kämmen bestückten Gelkammer mit der Lösung. Die Kämmen dienen der Erzeugung von Vertiefungen im Gel für das spätere Einfüllen der PCR-Produkte und werden nach Erkalten des Gels entfernt.
4. Einlegen des erkalteten Gels in eine Elektrophoresekammer, welche mit 1x TBE-Puffer gefüllt ist.
5. Vermischung von 3 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Farbstoff.
6. Einpipettieren von 6 µl des Längenstandards und der jeweils 6 µl der mit Farbstoff versetzten PCR-Produkte in die Geltaschen.
7. Elektrophorese bei 120 V und 400 mA für 20 Minuten.
8. Abfotografieren des Gels bei UV-Licht unter einer Dunkelhaube und Drucken/Speichern des Ergebnisses. (Borngräber, 2017; Löchte, 2018)

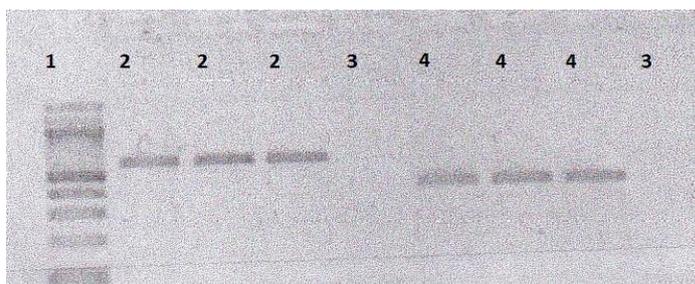


Abbildung 1: Beispiel-Fotografie einer Agarose-Gelelektrophorese. 1: 100 bp-Längenstandard. 2: Banden eines PCR-Produktes mit 575 bp Länge. 3: Leerwerte. 4: Banden eines PCR-Produktes mit einer Länge von 409 bp.

Bei Vorliegen einer einzelnen Bande der richtigen Länge erfolgten die nächsten Schritte der Sanger-Sequenzierung (s. Abschnitt 2.3.5). Bei jeder PCR wurde auch eine Leerprobe ohne Zugabe von DNA verwendet, eine Bande in dieser hätte auf eine Verschmutzung der Produkte mit Fremd-DNA hingedeutet und zu einer Wiederholung geführt. Bei fehlendem PCR-Produkt oder unspezifischer Bindung der Primer und damit mehrfachen Banden wurde die Amplifikation nach dem folgenden Algorithmus optimiert:

1. Anpassen der *Annealing*-Temperatur: Trotz durch den Hersteller berechneter optimaler *Annealing*-Temperatur musste diese in einigen Fällen angepasst werden. Bei mehrfachen Banden wurde die verwendete Temperatur erhöht, um eine unspezifische Bindung der Primer zu verringern. Bei fehlenden Banden wurden mehrere Temperaturen im Abstand von 1-2°C um die ursprünglich verwendete herum mittels des Gradienten-Programmes getestet, um die optimale Temperatur zu ermitteln.
2. Hinzufügen von Betain (Trimethylglycin) bzw. DMSO (Dimethylsulfoxid; jeweils 5% im Ansatz): Dabei handelt es sich um Agenzien, welche die Trennung in Einzelstränge durch Isostabilisierung (Zusatz von Betain) bzw. durch Störung der Basenpaarung (Zusatz von DMSO) erleichtern, was vor allem bei GC-reichen Fragmenten die Amplifikation verbessern kann (Baskaran et al., 1996).
3. Einsatz des *GC-rich* PCR Systems: Dieses besteht aus einer thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase und der *Tgo*-Polymerase, die eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist. Dies verbessert die Amplifikation schwieriger, insbesondere GC-reicher Abschnitte.
4. PCR mit *Q5 Hot Start High-Fidelity* Polymerase: Dabei handelt es sich um eine thermostabile DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonuklease (*proofreading*, also Korrekturlese)-Aktivität. Aptamere (nicht-kovalent bindende Oligonukleotide) verhindern die enzymatische Aktivität und dissoziieren im Rahmen einer sogenannten *Hot Start* („Heißstart“)-PCR erst ab einer Mindesttemperatur ab, sodass bei niedrigen Temperaturen eine unspezifische Bindung von dNTPs und ein Abbau der Primer durch die Exonuklease und damit weniger spezifische Bindung dieser verhindert wird (Nichols und Tanner, n.d.).

5. Erstellung neuer Primer: Bei Versagen aller verfügbaren Möglichkeiten der Optimierung wurden neue Primer-Paare wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben erstellt. Diese sollten nicht mit den ursprünglichen Primern überlappend sein.

2.3.5 Sanger-Sequenzierung

Mithilfe des durch Fred Sanger etablierten Kettenabbruchverfahrens (Sanger et al., 1977) konnte die Basenabfolge des zuvor amplifizierten DNA-Abschnittes bestimmt und damit Varianten als Abweichungen von der referentiellen Abfolge detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sanger-Sequenzierung verwendet, um eine mittels NGS detektierte Variante einem Patienten eines Dreier-Pools zuzuordnen. Dazu musste zunächst eine Aufreinigung des Materials mit 1,5 µl *ExoFast*-Lösung, hergestellt aus 0,5 µl gelöster Exonuclease I und 1 µl gelöster *Fast Alkaline Phosphatase* (FastAP), erfolgen. Dabei wurde das doppelsträngige PCR-Produkt durch die Exonuclease von einzelsträngiger DNA, besonders überschüssigen Primern, und durch die FastAP von verbliebenen dNTPs aus dem Reaktionsgemisch befreit.

Programm für die Aufreinigung

15 min	37°C
15 min	85°C
Endtemperatur	4°C

Zur Vorbereitung der eigentlichen Sequenzierung erfolgte dann die Sequenz-PCR. Der dafür verwendete Terminatormix enthielt neben einer DNA-Polymerase und den dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) auch die jeweiligen Didesoxyribonukleotide (ddNTPs, d.h. ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP). Letztere waren zur späteren Detektion mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxyl-Gruppe konnte nach dem Einbau eines ddNTPs durch die DNA-Polymerase keine Phosphodiesterbindung zu dem nächsten Nukleotid gebildet werden. Eine weitere Elongation in 5'-3'-Richtung konnte also dann nicht

erfolgen, es kam zum Kettenabbruch. Statistisch fand dieser an jeder Stelle des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes statt, sodass Fragmente unterschiedlicher Länge (im Ein-Basen-Abstand) mit verschiedenen endständigen, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten ddNTPs entstanden. Nach der Länge über ein Polymer am Sequenzer aufgetrennt, konnte dann die Basenfolge abgelesen werden. Die Sequenz-PCR diente also im Gegensatz zur vorangegangenen Standard-PCR nicht der reinen Amplifikation gleicher DNA-Abschnitte, sondern der Erzeugung unterschiedlich langer PCR-Produkte mit fluoreszenzmarkierten, endständigen Nukleotiden zur späteren Detektion, also Sequenzierung der Basenabfolge. (Borngräber, 2017; Löchte, 2018)

Zur unabhängigen Kontrolle und Reduktion der unklaren Sequenzstellen wurden beide DNA-Stränge durch Herstellung von separaten Reaktionsgemischen mit dem F- bzw. dem R-Primer sequenziert.

Tabelle 9: Ansatz für die Sequenz-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen in μl
<i>ExoFast</i> -Produkt	-	-	2
Sequenz-Puffer	5x	0,75x	1,5
Primer (F oder R)	10 μM	0,5 μM	0,5
Terminatormix 3.1	-	-	0,5
H ₂ O	-	-	5,5
Gesamtansatz			10

Programm für die Sequenz-PCR

1 min	96°C
25x	10 sek 90°C
	80 sek 60°C
Endtemperatur	4°C

Im nächsten Schritt sollte das Produkt der Sequenz-PCR von den Reagenzien getrennt werden. Dazu wurde eine Natriumacetat-Ethanol-Lösung verwendet, welche eine Verkleinerung der Hydrathülle der DNA bewirkte. Die DNA wurde dadurch weniger löslich und fiel aus. Das nach Zentrifugation entstandene DNA-Pellet wurde mit Ethanol gewaschen. Im Folgenden sind die konkreten Schritte der Aufreinigung aufgeführt:

1. Mischen von 10 µl des Sequenz-PCR-Produktes mit 50 µl Ethanol [99,9%], 2 µl Natriumacetat [3M] und 10 µl dH₂O.
2. Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 15 Minuten.
3. Zentrifugation bei 16.163 g für 15 Minuten.
4. Abpipettieren des Überstandes.
5. Zugabe von 100 µl Ethanol [70%].
6. Zentrifugation bei 16.163 g für 10 Minuten.
7. Abpipettieren des Überstandes.
8. Trocknen bei 55°C unter Lichtausschluss.
9. Zugabe von 15 µl *Hi-Di* Formamid und Lösung bei 4°C über Nacht oder bei 37°C für mindestens eine Stunde.

Für die anschließende Sequenzierung wurden die Geräte *Genetic Analyzer 3130XL* bzw. *3500XL* des Herstellers *Applied Biosystems* verwendet. In diesen Geräten erfolgt das Aufziehen der DNA-Fragmente in gelgefüllte Glaskapillaren sowie die elektrophoretische Auftrennung nach deren Länge. Ein Laser detektiert das Fluoreszenzsignal der markierten, endständigen ddNTPs, welches dann in einer Abfolge von farbigen Kurven, den sogenannten *Peaks*, dargestellt wird, wobei jede Farbe für eine bestimmte Base steht. Heterozygote Varianten werden dabei als zwei unterschiedlich gefärbte, gleich hohe *Peaks* an derselben Position dargestellt. (Borngräber, 2017; Löchte, 2018)

Die Qualität der so erhaltenen Sequenzen wurde mit dem Programm *Sequence Analysis 5.3.1* überprüft. Qualitativ ausreichende Sequenzen zeichneten sich durch ausreichend hohe *Peaks* sowie ein vernachlässigbares Hintergrundrauschen durch unspezifische Zusatzsequenzen aus, welche sich in Form von vielen sehr niedrigen,

von dem regelmäßigen Bild der Basenabfolge abweichenden *Peaks* präsentierten. Niedrige *Peaks*, d.h. zu geringe Mengen an Sequenzierprodukt, konnten durch die Erhöhung der verwendeten Menge an PCR-Produkt im Sequenzansatz oder durch eine Verlängerung der Injektionszeit des Sequenziergeräts verbessert werden. Bei Hintergrundrauschen wurde die PCR wiederholt bzw. wurden bei weiterhin bestehendem Hintergrundrauschen die PCR-Bedingungen nach dem in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Schema optimiert.

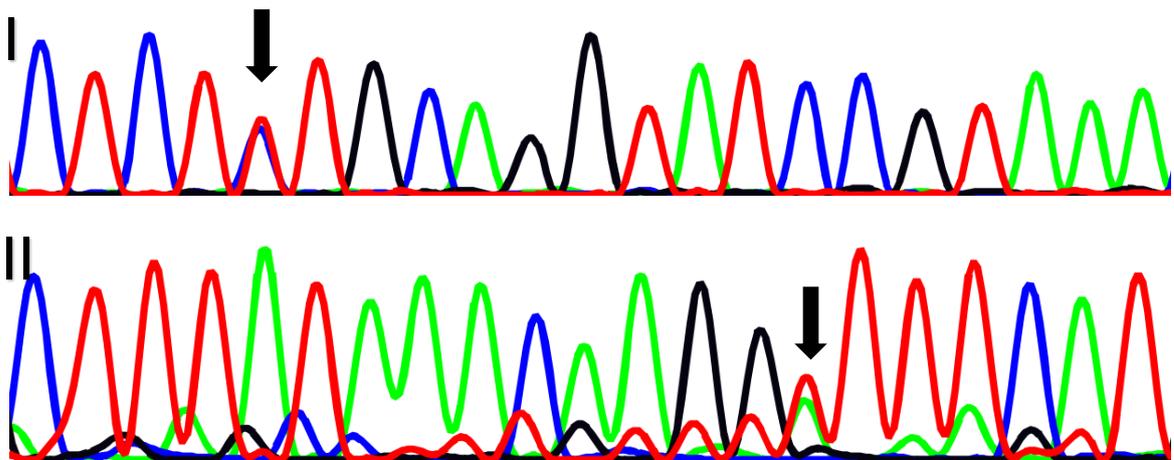


Abbildung 2: Ausschnitte aus Beispielsequenzen der Sanger-Sequenzierung. Jeder *Peak* steht für eine Base in der Sequenz (Adenin: grün, Cytosin: blau, Guanin: schwarz, Thymin: rot), die Sequenz ist von links nach rechts in 5'-3'-Richtung angegeben. I: Saubere Sequenz, Pfeil: heterozygote Variante (Cytosin-Thymin). II: Sequenz mit Hintergrundrauschen, Pfeil: durch das Programm *Sequence Analysis 5.3.1* markierte, aufgrund des Hintergrundrauschens nur fragliche heterozygote Variante.

Aussagekräftige Sequenzen wurden mit dem Programm *Mutation Surveyor v3.30* analysiert, welches die eingefügten Sequenzen mit Referenzsequenzen aus einer Datenbank vergleicht und Abweichungen markiert.

2.3.6 Mikrosatellitenanalyse

Zur Überprüfung der Verwandtschaft in der Familie der Indexpatientin L-11560 wurde eine Analyse der Mikrosatelliten, der sogenannten *short tandem repeats* (STRs), durchgeführt. Dabei handelt es sich um in nicht kodierenden, meist intergenischen Bereichen befindliche repetitive DNA-Abschnitte, bei denen die

Anzahl der Wiederholungen interindividuell unterschiedlich ist und relativ stabil weitervererbt wird.

Für die Analyse wurde zunächst eine PCR mit den im Anhang A aufgeführten Primern durchgeführt, wodurch Regionen mit STRs amplifiziert wurden. Die verwendeten Primer waren bereits im Institut vorhanden und etabliert, mussten also nicht neu designt werden. Dabei waren die jeweiligen F-Primer an ihrem 5'-Ende um die sogenannte M13-Sequenz (s. Anhang A) verlängert. Dies diente der späteren Detektion der PCR-Produkte, indem dem Reaktionsansatz die dazu komplementäre, Carboxyfluorescein (Fluoresceinamidite, FAM) – markierte M13-Sequenz in Form eines dritten PCR-Primers hinzugefügt wurde. Im Gegensatz zur Sequenzier-Reaktion wurde also nicht durch fluoreszenzmarkierte ddNTPs das 3'-Ende des Produktes, sondern durch M13-FAM das 5'-Ende markiert. Das Absorptionsmaximum von FAM liegt bei 494 nm (Thermo Fisher Scientific, 2014).

Tabelle 10: Ansatz der Mikrosatelliten-PCR

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

Für die Amplifikation wurde das Standard-PCR-Programm (s. Abschnitt 2.3.4) mit einer *Annealing*-Temperatur von 55°C verwendet.

Anschließend erfolgte eine Verdünnung von jeweils 1 μl der PCR-Produkte mit 5 μl dH₂O. Um bei der späteren Auswertung im Vergleich der Proben gerätebedingte

Variationen vernachlässigen zu können, wurde je 1 µl der verdünnten PCR-Produkte mit einer Lösung aus 0,3 µl *GeneScan 600 LIZ* als Längenstandard und 9,7 µl *Hi-Di* Formamid versetzt, bei 95°C für 5 Minuten gelöst und anschließend auf Eis gekühlt.

Die Analyse erfolgte mit dem Gerät *Genetic Analyzer 3130XL*. Ähnlich der Sanger-Sequenzierung wurden die PCR-Produkte in Glaskapillaren aufgezogen, elektrophoretisch getrennt und mittels der Fluoreszenzmarkierung detektiert. Das Ergebnis wurde in Form von Banden dargestellt, bei welchen die Menge detektierter Fluoreszenz je Basenpaarlänge (normiert durch den *600 LIZ*-Längenstandard) aufgetragen war. Eine Bande stellte demnach Fragmente mit einer bestimmten Anzahl an STR-Wiederholungen dar. Aufgrund der Vererbung der Wiederholungsanzahl musste für den Nachweis der Elternschaft eine der Banden auf den vermuteten Vater und eine auf die vermutete Mutter zurückzuführen sein. Mittels unterschiedlicher Primer-Paare wurden zwölf STR-Regionen untersucht (s. Anhang A), um die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Auftretens gleicher Wiederholungsanzahlen zu vermindern.

2.3.7 Systematische Literaturrecherche nach den Kriterien von MDSGene

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Literaturrecherche zu Publikationen bezüglich *ANO3*-Varianten bei Dystonie-Patienten nach der MDSGene-Methodik (Kasten et al., 2018; Lill et al., 2016) durchgeführt, welche grundsätzlich in Abschnitt 1.4 erläutert wird. Der verwendete Suchbegriff für die Datenbank PubMed ("PubMed - NCBI", n.d.) lautete:

```
((dystonia* AND (ANO3 OR TMEM16C OR C11ORF25 OR anoctamin OR 11p14.3-  
p14.2) AND (gene* OR genetic* OR mutation* OR mutated))) AND  
"english"[Language]
```

und wurde zuletzt am 15.03.2020 eingegeben. Für die Ergebnisse wurde zunächst anhand des Titels und des Abstrakts, im Verlauf auch anhand des Volltextes überprüft, ob jene für die Datenextraktion geeignet waren, d.h. symptomatische Träger von seltenen *ANO3*-Varianten beschrieben. Bei *Reviews* wurden die Referenzen auf zusätzlich einzuschließende Publikationen durchsucht. Informationen zu diesen Variantenträgern wurden bei erfüllten Einschlusskriterien

(Kasten et al., 2018) anhand von 108 klinischen und 22 genetischen Variablen extrahiert, sowie ein *Scoring* der Pathogenität der beschriebenen Varianten nach den Kriterien der MDSGene-Datenbank durchgeführt (s. Abschnitt 1.4).

Für die einheitliche Nomenklatur der gefundenen Varianten wurde das Referenzgenom GRCh37 (hg19) und für *ANO3* das Transkript NM_031418 verwendet. Bei fehlender Angabe einzelner Informationen (Veränderung der genomischen, cDNA- bzw. Proteinsequenz) zu einer Variante wurden diese mithilfe der online verfügbaren Software *MutationTaster2* (Schwarz et al., 2014) ermittelt.

2.3.8 Statistik

Die statistischen Auswertungen der *GenePanel*-Analysen sowie der Ergebnisse der Literaturrecherche erfolgten mithilfe des Programmes *SPSS Statistics* Version 27 der Firma *IBM* und unter Beratung von Frau Prof. Inke König (Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, Universität zu Lübeck). Dabei wurden die verwendeten Tests nach den in Tabelle 11 aufgeführten Kriterien ausgewählt, wobei zuvor die Normalverteilung mithilfe von *SPSS* überprüft wurde. Für die Nullhypothese H_0 wurde jeweils das Fehlen eines Unterschiedes zwischen den zu vergleichenden Gruppen angenommen, für die Alternativhypothese H_1 ein Bestehen dessen. Für das Signifikanzniveau α wurde ein Wert von 0,05 festgelegt. Eine Korrektur für multiples Testen wurde im Rahmen der deskriptiven Statistik nicht durchgeführt.

Tabelle 11: Bedingungen für die Anwendung ausgewählter statistischer Tests

statistischer Test	Messgröße	Stichprobe	Verteilung	weitere Bedingungen
T-Test für unverbundene Stichproben	Skala	unverbunden	normal	
Mann-Whitney U-Test	Skala	unverbunden	nicht normal	
Kruskal-Wallis H-Test	Skala	unverbunden	nicht normal	mehr als zwei Gruppen
T-Test für verbundene Stichproben	Skala	verbunden	normal	
Wilcoxon-Test	Skala	verbunden	nicht normal	
Chi-Quadrat Test	dichotom	unverbunden	NA	
Exakter Test nach Fisher	dichotom	unverbunden	NA	Werte <5 in der Vierfeldertafel

NA: Kriterium ist nicht anwendbar. Grau hinterlegt sind tatsächlich im Rahmen der Auswertung angewendete Tests. Die Tabelle wurde auf der Grundlage des Kursskriptes zur Lehrveranstaltung *Epidemiologie, Medizinische Biometrie und Medizinische Informatik - Teilgebiet Medizinische Biometrie* des Instituts für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck (Leitung: Univ.-Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke R. König) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 *GenePanel*-Analysen

Dieser Teil der Ergebnisse wurde in dem Journal *Parkinsonism and Related Disorders* (aktueller Impact-Faktor: 4,9) publiziert (Olschewski et al., 2019). Bei der Untersuchung der DNA-Proben von 729 Dystonie- und 294 PS-Patienten auf Varianten in *ANO3* mittels NGS wurden insgesamt 35 verschiedene seltene (MAF < 0,005) Varianten in 68 verschiedenen Dreier-*Pools* mit einer mittleren *Coverage* von 198 ± 103 (Spanne: 8 - 623) gefunden. Es wurden 24 verschiedene Varianten ausgeschlossen, die synonym oder tief intronisch, also nicht proteinverändernd, waren. Zudem wurden zwei Varianten ausgeschlossen, welche im Ausgabe-Datensatz als *Missense*-Varianten angegeben wurden, bei Übertragung auf das in der Literatur üblicherweise verwendete *ANO3*-Transkript (NM_031418) jedoch außerhalb der Exons lagen, d.h. nicht im Haupttranskript enthalten waren. Es fanden sich keine *Start-loss*- oder *Nonsense*-Mutationen in der Stichprobe. Die verbliebenen neun Varianten wurden im nächsten Schritt nach ihrem CADD-Score gefiltert, wobei eine Variante mit einem CADD-Score von 0,003 ausgeschlossen wurde. Acht Varianten aus zehn *Pools* mit einem *Score* über 15 wurden im Weiteren betrachtet. Eine dieser Varianten (c.433-2A>G) war eine potentielle Veränderung einer Spleißstelle, deren möglicher Effekt mithilfe des Programmes *NNSPLICE 0.9* (Reese et al., 1997) zur Abschätzung der Pathogenität *in silico* bestimmt wurde. Dabei ergab sich der Verlust einer Spleißstelle mit einem *Score* von 0,88. Bei einer Spannweite der erreichbaren *Scores* von 0 bis 1 enthält die Referenzsequenz bei diesem Wert mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (falsch-positiv 0,5-0,6% ("NNSPLICE", n.d.)) tatsächlich eine Spleißstelle. Der Verlust dieser aufgrund der Variante bedeutet ein verändertes Transkript. Eine weitere Evaluation *in vitro* mittels Sequenzierung der cDNA aus einer Blutprobe der Patientin nach Validierung der Variante in der Sanger-Sequenzierung war aufgrund des Fehlens einer entsprechenden mRNA-Probe leider nicht möglich.

Mittels Sanger-Sequenzierung sollten die Varianten nicht nur validiert, sondern auch derjenige Patient eines Dreier-*Pools* gefunden werden, der Träger der Variante ist. Es konnten sieben der Varianten bei neun Patienten validiert werden, eine Übersicht zu diesen Varianten und dem klinischen Bild der Patienten liefert

Tabelle 12. Bei der nicht validierten Variante handelt es sich um eine Spleißstellenveränderung (c.242-1G>T) in einem Dreier-*Pool* aus drei PS-Patienten (L-10940, L-11052, L-11013). Der gesamte Filterungsprozess kann anhand von Abbildung 3 nachvollzogen werden. Keine der Varianten war aus der Literatur bereits bekannt.

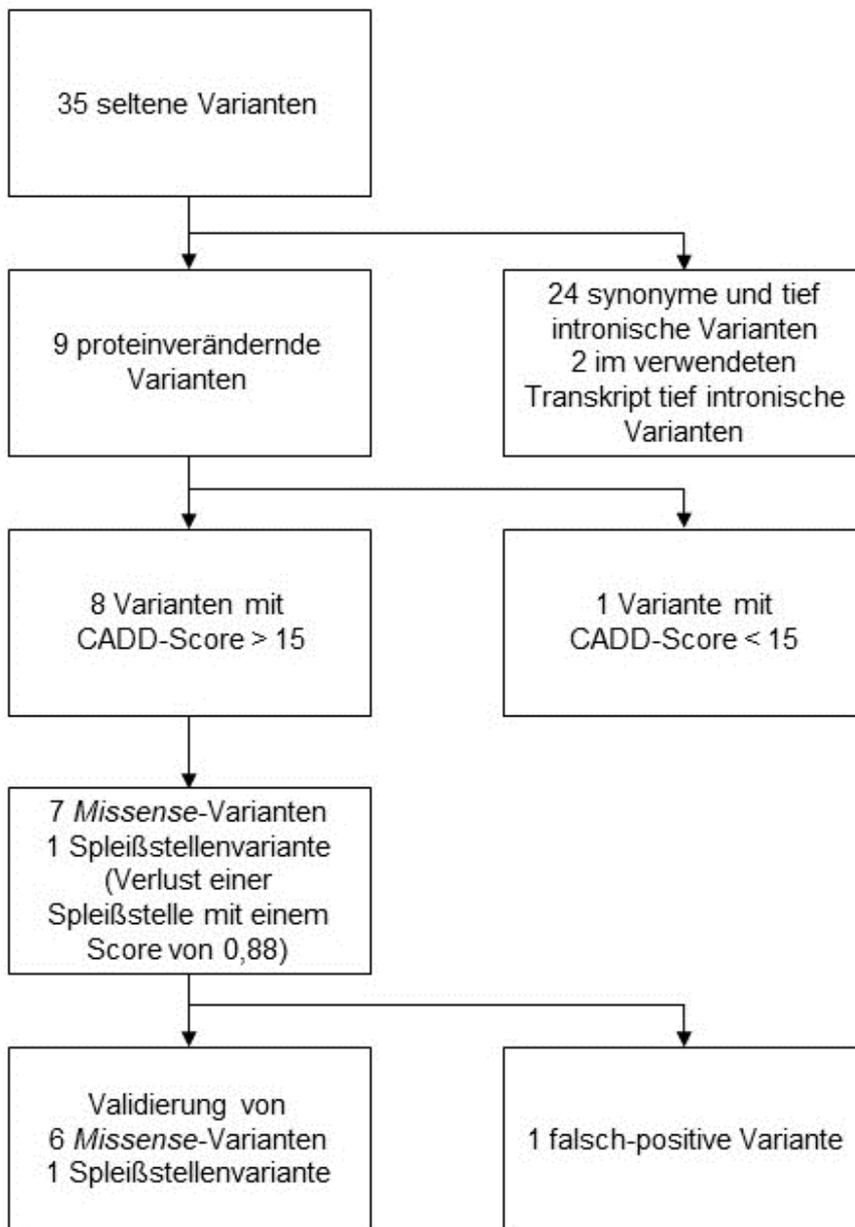


Abbildung 3: Überblick über die Schritte und jeweiligen Variantenzahlen des Filterungsprozesses

Tabelle 12: Überblick über die mittels Sanger-Sequenzierung validierten Varianten des GenePanels sowie die zugehörigen Patienten, modifiziert nach Olschewski et al., 2019.

	Dystonie-Patienten						PS-Patienten			
	L-5698	L-11097	L-11116	L-2706	L-5261	L-11567	L-11560	L-11353	L-7808	Mittelwert
cDNA-Veränderung	c.433-2A>G	c.982C>T	c.982C>T	c.2906G>A	c.2906G>A	c.2894T>G	c.1682T>A	c.787A>G	c.2834G>A	n.a.
Proteinveränderung	Splice Stellen- veränderung	p.Arg328Cys	p.Arg328Cys	p.Arg969Gln	p.Arg969Gln	p.Leu965Tyr	p.Val561Glu	p.Met263Val	p.Arg945Gln	n.a.
CADD-Score	24,7	25	25	32	32	27,5	33	15,13	28,1	21,6 ± 9,2
Häufigkeit bei gnomAD	NA	OA 0,00005 EAS 0,0007	OA 0,00005 EAS 0,0007	OA 0,00003 NFE 0,00005	OA 0,00003 NFE 0,00005	NA	NA	OA 0,00007 NFE 0,000008	OA 0,00002 NFE 0,000009	n.a.
<i>Pathoscore</i>										
ACMG	VUS ^a PrP ¹	VUS ^b PrP ²	VUS ^b PrP ²	VUS ^b PrP ²	VUS ^b PrP ²	VUS ^a Pop ³	LP ^c PrP ⁴	VUS ^d Pop ³	VUS ^b Pop ³	n.a. n.a.
MDSGene	Deutschland	Südkorea	Südkorea	Deutschland	Deutschland	Spanien	Spanien	Deutschland	Deutschland	n.a. n.a.
Herkunft	43	39	44	61	65	46	42	45	78	n.a.
Alter (Jahre)	25	28	36	15	45	21	3	35	56	61,5 ± 23,3
Erkrankungsalter	weiblich	weiblich	männlich	männlich	männlich	weiblich	weiblich	weiblich	männlich	45,5 ± 14,9
Geschlecht	negativ	unbekannt	unbekannt	negativ	negativ	negativ	negativ	unbekannt	negativ	n.a.
Familienanamnese	fokal	segmental	segmental	fokal	fokal	segmental	generalisiert	keine Dystonie (PS-Patient)	keine Dystonie (PS-Patient)	n.a.
Verteilung dystoner Symptome	Hand (Schreibkrampf)	rechter Arm	zervikal, rechte Schulter	Mund (Musikerdystonie)	Hand (Schreibkrampf)	Kiefer, beide Hände	zervikal, Arme, Hände, axial, Extremitäten, Kopftremor	keine Dystonie (PS-Patient)	keine Dystonie	n.a.
betroffene Region/en	Spiegel-Dystonie	dystoner Tremor	z.T. Anspruchen auf Levodopa			statisch unter Behandlung mit Biperiden, Levodopa/Carbidopa	progressiv, gutes Anspruchen auf THS	PS	PS	n.a.
weitere Informationen										

NA: nicht verfügbar. n.a. nicht anwendbar. OA: overall (alle Populationen). EAS: East Asian. NFE: non-Finnish European.

VUS: Variant of uncertain significance (Variante unklarer Signifikanz). LP: likely pathogenic (vermutlich pathogen).

PrP: probably pathogenic (wahrscheinlich pathogen). Pop: possibly pathogenic (möglicherweise pathogen).

Erfüllte ACMG-Kriterien: a: PM2, PP3; b: PP3; c: PS2, PM2, PP3; d: keines.

Alter: zum Zeitpunkt der Publikation (05/19), seitdem keine weitere Erfassung des Krankheitsverlaufes

Die sieben validierten Varianten fanden sich bei neun Variantenträgern. Von diesen waren sieben Dystonie-Patienten und zwei PS-Patienten. Somit wurden seltene, proteinverändernde *ANO3*-Varianten bei 1,0% (7/729) der Dystonie-Patienten in der Stichprobe sowie bei 0,7% (2/294) der PS-Patienten gefunden. Bei einem zuvor festgelegten Signifikanzniveau α von 0,05 bestand kein signifikanter Unterschied der Häufigkeiten von *ANO3*-Varianten bei Dystonie- gegenüber PS-Patienten ($p=1,0$, Exakter Test nach Fisher). Das mittlere Alter aller Variantenträger lag bei $51,4 \pm 12,6$ Jahren, wobei die sieben Dystonie-Patienten im Mittel mit $48,6 \pm 10,1$ Jahren etwas jünger zu sein schienen als die beiden PS-Patienten ($61,5 \pm 23,3$ Jahre), jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,242$, Mann-Whitney U-Test).

Das Erkrankungsalter der Dystonie-Patienten mit *ANO3*-Varianten lag durchschnittlich bei $24,7 \pm 13,7$ Jahren, mit einer Spannweite von 15 bis 45 Jahren. Zu dem etwas höheren Erkrankungsalter der gesamten Dystonie-Stichprobe ($37,6 \pm 12,1$ Jahre) gab es somit keinen signifikanten Unterschied ($p=0,139$, Mann-Whitney U-Test). Das Alter beider PS-Patienten zum Untersuchungszeitpunkt (45 bzw. 78 Jahre) lag bereits über dem durchschnittlichen Alter der dystonen *ANO3*-Variantenträger zu Erkrankungsbeginn und dessen Standardabweichung, beide zeigten aber bei Begutachtung durch Experten für Bewegungsstörungen keine dystonen Symptome.

Von den Dystonie-Patienten waren fünf kaukasischer und zwei asiatischer Abstammung. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Häufigkeiten des Vorkommens von *ANO3*-Varianten bei Dystonie-Patienten kaukasischer (5/654, 0,8%) gegenüber asiatischer (2/75, 2,7%) Herkunft ($p=0,156$, Exakter Test nach Fisher).

Jeweils drei der Variantenträger präsentierten sich mit einer fokalen bzw. segmentalen Dystonie, eine Patientin mit einer generalisierten Dystonie. Damit bestand aufgrund der größeren Studienpopulation von fokalen Dystonien eine signifikante Häufung von *ANO3*-Varianten in der Gruppe der segmentalen Dystonien gegenüber den fokalen Dystonien ($p=0,015$, Exakter Test nach Fisher).

Angaben zu erfolgreichen Therapieformen konnten nur zu einem Teil der Variantenträger gewonnen werden, dabei zeigte sich bei zwei Patienten ein mäßiges Ansprechen auf Levodopa. Eine Patientin sprach gut auf die Behandlung mit einer THS an (s.u.).

Die Varianten waren in einem sehr überwiegenden Teil *Missense*-Varianten (6/7, 85,7%), nur bei einer handelte es sich um die oben genannte Spleißstellen-Veränderung. Der CADD-Score der Varianten lag für die Dystonie-Patienten im Mittel bei $28,5 \pm 3,8$; für die PS-Patienten bei $21,6 \pm 9,2$ ($p=0,38$, Mann-Whitney U-Test). Da dieser jedoch eher als orientierendes Maß der Schädlichkeit denn als Prädiktor der Pathogenität einer Variante zu betrachten ist (Kircher et al., 2014), wurde für ein umfassenderes Gesamtbild zusätzliche Evidenz für die Pathogenität anhand der Kriterien der MDSGene-Datenbank sowie des ACMG zusammengetragen. Dabei resultierten die in Tabelle 12 dargestellten Ergebnisse des *Pathoscorings* aufgrund der ebendort aufgeführten Kriterien. Hervorzuheben ist dabei besonders die Klassifikation der Variante p.Val561Glu (c.1682T>A) als vermutlich pathogen (*likely pathogenic*) mittels der ACMG-Kriterien, mit denen alle anderen Varianten als VUS eingestuft wurden. Mittels der MDSGene-Kriterien wurden ebenfalls die Variante p.Val561Glu (c.1682T>A) sowie außerdem die Varianten p.Arg969Gln (c.2906G>A) und c.433-2A>G als wahrscheinlich pathogen (*probably pathogenic*) klassifiziert, alle anderen Varianten als möglicherweise pathogen (*possibly pathogenic*).

Zwei der Varianten wurden jeweils zweifach gefunden. Die Variante p.Arg328Cys (c.982C>T) wiesen zwei der 75 (2,7%) koreanischen Patienten der Dystonie-Stichprobe auf. Sie konnte zudem in der gnomAD-Datenbank ausschließlich bei ostasiatischen Probanden nachgewiesen werden, allerdings in einer signifikant geringeren Häufigkeit (13/18.394, $p=0.002$, Exakter Test nach Fisher). Beide Patienten aus dem *GenePanel* präsentierten sich mit einem ähnlichen Phänotyp einer segmentalen Dystonie, welche die obere Extremität einschloss und im frühen Erwachsenenalter (mit 28 bzw. 36 Jahren) auffiel.

Bei der zweiten mehrfach nachgewiesenen Variante handelte es sich um die Variante p.Arg969Gln (c.2906G>A), welche in zwei der 562 deutschen Patienten (0,4%) gefunden wurde. Für eine erste Abschätzung der Relevanz wurde hier die Häufigkeit in der ethnisch am ehesten übereinstimmenden Stichprobe der gnomAD-Datenbank, der nicht-finnischen Europäer, genutzt. Diese lag bei 6/113.434, sodass auch hier eine signifikante Häufung der Variante in der Dystonie-Stichprobe gegenüber einer Bevölkerungs-Stichprobe bestand ($p=0,001$). In diesem Fall waren beide Patienten von einer fokalen Dystonie betroffen. Diese umfasste

unterschiedliche Körperregionen, zeigte sich allerdings in beiden Fällen als aktionsspezifisch.

Die Trägerin einer der Varianten (p.Val561Glu, c.1682T>A) zeigte eine generalisierte, isolierte Dystonie und damit eine Symptomatik, welche gegenüber zuvor beschriebenen ANO3-Variantenträgern sehr ausgeprägt war. Diese begann in einem Alter von drei Jahren im linken Unterschenkel, sodass die Patientin zunächst aufgrund von Gangstörungen vorstellig wurde. Im Laufe der Kindheit schritt die Symptomatik bis hin zur Rollstuhlpflichtigkeit fort und die Patientin entwickelte zusätzlich eine axiale und zervikale Dystonie sowie einen Tremor des Kopfes und der Hände. Die Behandlung mit einer THS des GPi beidseits seit 2008 führte zu einer bleibenden Verbesserung der Symptome, sodass der Patientin unter anderem das Gehen mit Unterstützung möglich war. Die bei ihr gefundene Variante p.Val561Glu ist eine *Missense*-Variante, die in den öffentlichen Datenbanken nicht gefunden wurde.

Da eine generalisierte Dystonie bei ANO3-Variantenträgern zuvor vor allem im Zusammenhang mit de-novo Varianten beschrieben wurde (Tunc et al., 2019), erfolgte auch eine Untersuchung der Familie der Patientin. Um die DNA-Proben der gesunden Mutter, Vater und Bruder der Patientin eindeutig als zu ihrer Familie gehörig zuzuordnen, wurde eine Analyse von Mikrosatelliten durchgeführt (siehe beispielhaft Region D6S305 in Abbildung 4). Von den zwölf amplifizierten Regionen hatten neun eine für die Auswertung ausreichende Qualität (s. Abbildung 5A). Eine Elternschaft setzt voraus, dass sich jeweils mindestens ein gleiches Allel, d.h. PCR-Fragmente gleicher Größe aufgrund der gleichen Anzahl von Wiederholungen, zwischen Mutter und Patientin bzw. Vater und Patientin finden lässt. Dabei kann die Gleichheit auch zufällig auftreten, ist aber aufgrund der Verwendung mehrerer Marker in der Gesamtheit unwahrscheinlich. Nachdem diese Voraussetzung bei allen auswertbaren Regionen erfüllt war, wurde das Verfahren zudem auf den potentiellen Bruder der Indexpatientin angewandt. Auch für diesen bestand durch Nachweis der neun passenden STRs eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, zu dieser Familie zu gehören. Die DNA einer gesunden Schwester war für die Untersuchung nicht verfügbar. Bei der Sanger-Sequenzierung der die Variante p.Val561Glu (c.1682T>A) umfassenden Region (s. Abbildung 5B und C) bei den Familienmitgliedern wurde in allen drei Fällen homozygot das Wildtyp-Allel

nachgewiesen. Somit handelt es sich hierbei um eine Variante, die *de novo* entstanden ist. Für die anderen Variantenträger aus der *GenePanel*-Analyse lagen keine DNA-Proben von Familienmitgliedern für eine Segregationsanalyse vor.

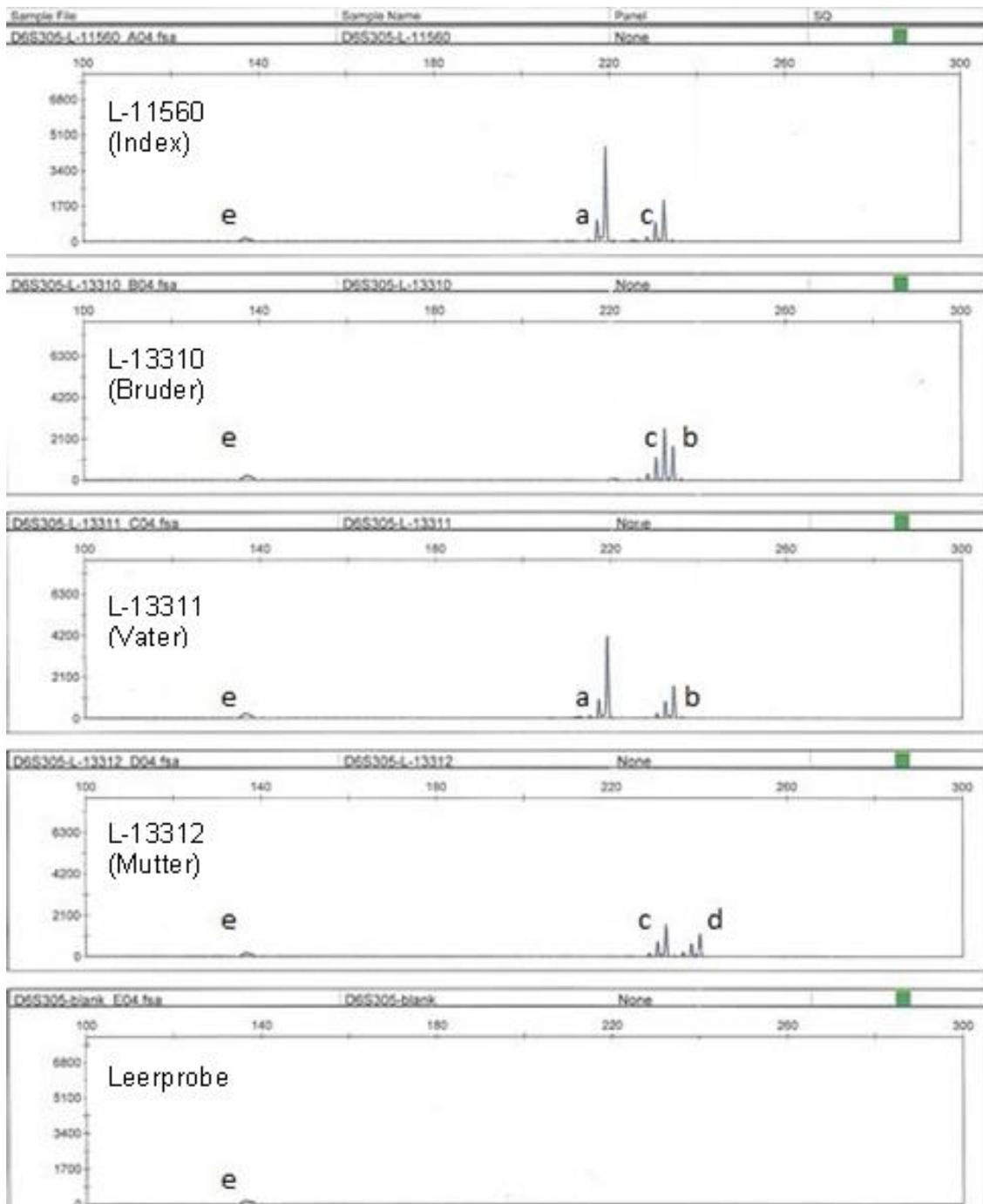


Abbildung 4: Mikrosatellitenanalyse der Region D6S305. Index: Indexpatientin. a-d: Banden unterschiedlicher Allele. e: unspezifisches Nebenprodukt, z.B. Primerdimere (auch in der Leerprobe vorhanden).

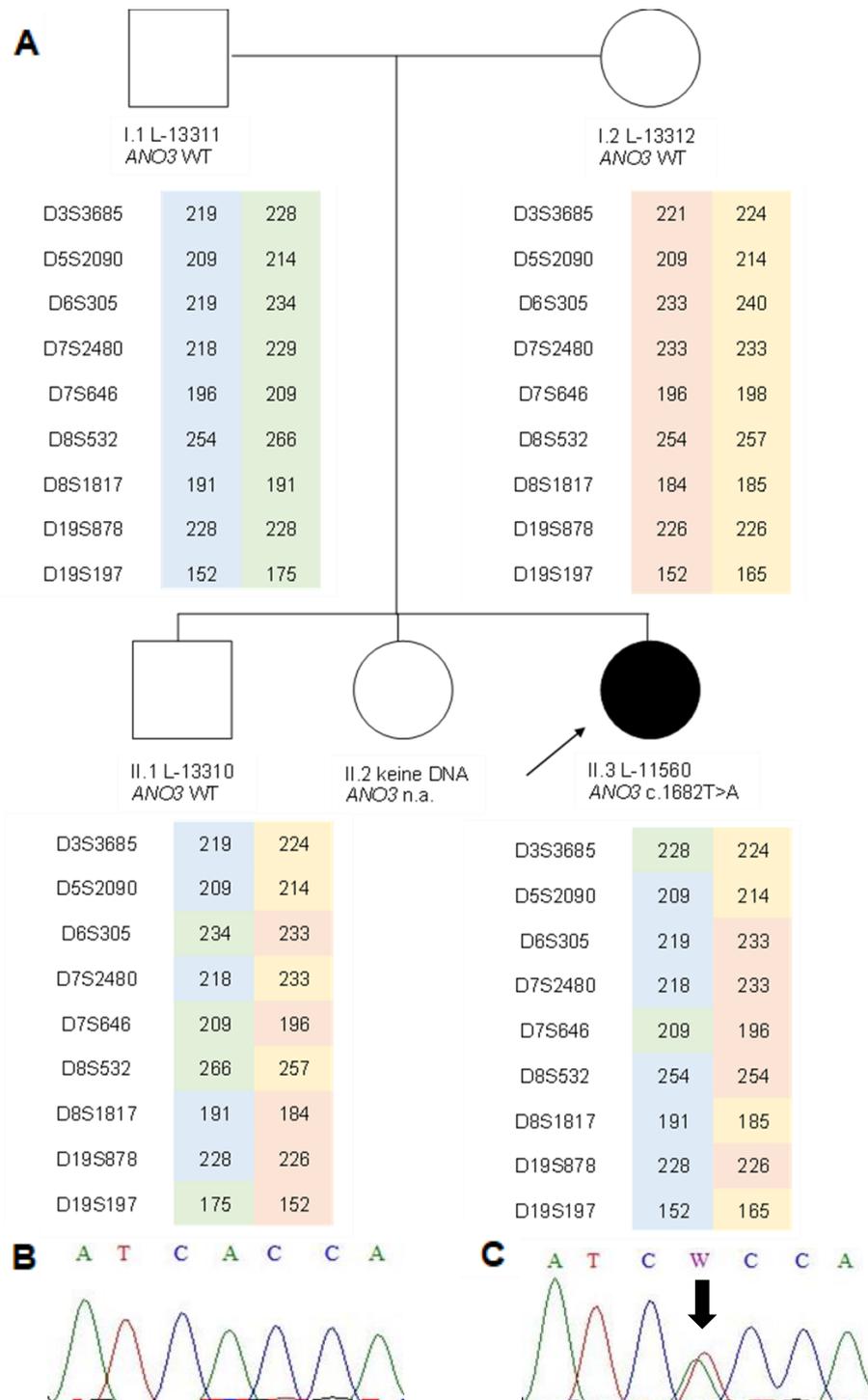


Abbildung 5: Visualisierungen zu der Patientin L-11560 mit der Variante p.Val561Glu. A: Stammbaum der Patientin (Patientin selbst mit Pfeil markiert) mit Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse der neun Regionen mit ausreichender Qualität unter Angabe der Allellängen. WT: Wildtyp. N.a.: nicht angegeben. B: Wildtyp-Sequenz um c.1682. C: Sequenz der Patientin mit der Variante c.1682T>A (mit Pfeil markiert, Reverse-Sequenz).

3.2 Nachweis einer de-novo Variante

Die *GenePanel*-Untersuchung eines weiteren Dystonie-Patienten (L-11226) zeigte eine weitere Variante in *ANO3*. Dieser Fall wurde im *Journal of Neurological Sciences* publiziert (Tunc et al., 2019). Klinische Daten sind dem Abschnitt 2.1 zu entnehmen.

Das *GenePanel* und die validierende Sanger-Sequenzierung ergaben die Variante p.Ser651Asn (c.1952G>A) in *ANO3* (s. Abbildung 6A). Bei den Eltern, deren Elternschaft in Vorarbeit der Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde, konnte die Variante mittels Sanger-Sequenzierung nicht nachgewiesen werden, sie entstand also *de novo*. Der CADD-Score betrug 28,4, worin unter anderem der hohe Grad der Konservierung der Aminosäure in verschiedenen Spezies (s. Abbildung 6C) eingeflossen ist. Das *Scoring* der Pathogenität ergab eine Einordnung als wahrscheinlich pathogen (*probably pathogenic*) nach den MDSGene-Kriterien (gesamt 14 Punkte; 6 Punkte Segregation aufgrund des Auftretens *de novo*, 3 Punkte Frequenz und 5 Punkte CADD) und vermutlich pathogen (*likely pathogenic*) nach den ACMG-Kriterien (mit Erfüllung von PS2, PM2, PM8 und PP3). Es handelt sich zudem um eine sehr seltene Variante, die nicht in den rund 140.000 Probanden der gnomAD Datenbank ("gnomAD", n.d.) zu finden ist. Die Variante wurde allerdings im Verlauf des hier beschriebenen Projekts bereits bei einem sehr ähnlichen Fall eines 17-jährigen koreanischen Patienten mit myoklonischen Zuckungen und einer generalisierten Dystonie beschrieben, die als Gangstörungen durch eine Dystonie des linken Beines begann und inzwischen daneben auch die Arme, Hals und den Körperstamm betraf. Auch dort trat sie *de novo* auf (Yoo et al., 2018a). Beide Patienten profitierten von einer Behandlung mit einer Trihexyphenidyl-haltigen Kombinationstherapie mit Baclofen (Tunc et al., 2019) bzw. Diazepam (Yoo et al., 2018a). Eine THS des GPi, die bei dem externen Patienten deutliche Vorteile brachte (Yoo et al., 2019), erfolgte bei L-11226 bisher nicht.

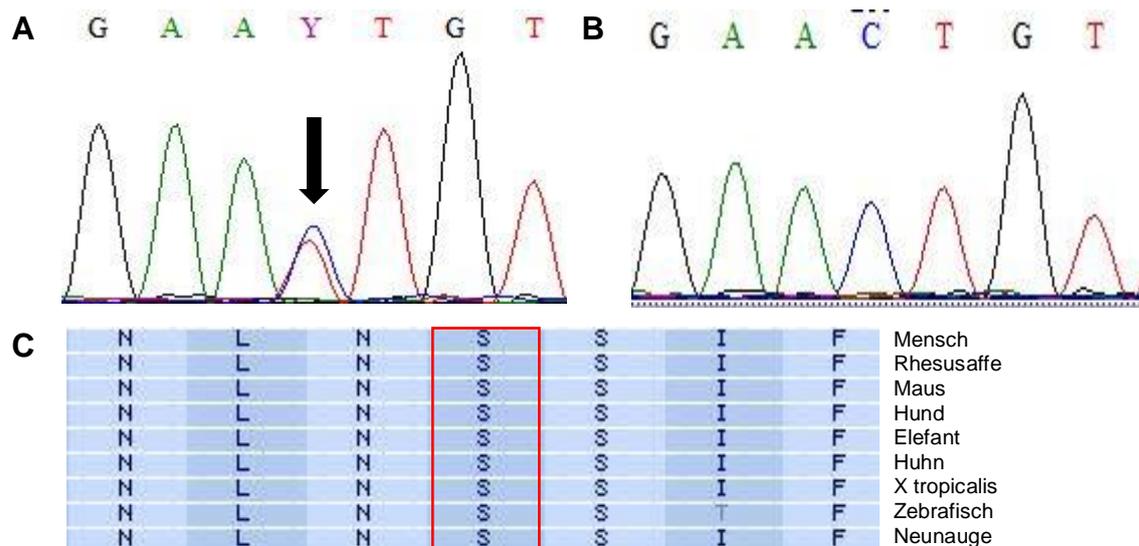


Abbildung 6: Visualisierungen zu dem Patienten L-11226 mit der Variante p.Ser651Asn. A: Sequenz des Reverse-Primers bei L-11226, der Pfeil zeigt auf die Variante c.1952G>A. B: Referenzsequenz um c.1952 mit je drei zusätzlichen Basen zu beiden Seiten. C: Konservierung der bei L-11226 veränderten Aminosäure (Serin, rot umrandet) in verschiedenen Spezies (“The Human Genome Browser at UCSC”, n.d.).

3.3 Systematische MDSGene-Literaturrecherche für ANO3-Varianten bei Dystonie-Patienten

Die Ergebnisse der standardisierten Literaturrecherche nach der Methodik der Datenbank MDSGene wurden auch auf dieser (“MDSGene”, n.d.) sowie in einer Publikation im Journal *Movement Disorders* (Lange et al., 2021) veröffentlicht.

3.3.1 Eingeschlossene Publikationen

Es wurden 34 Publikationen (s. Anhang D, Stand: 15.03.2020) mit dem standardisierten Suchbegriff (s. Abschnitt 2.3.7) gefunden, von denen 19 im Weiteren betrachtet werden. Die restlichen Publikationen wurden ausgeschlossen, da keine neuen Träger von ANO3-Varianten beschrieben wurden bzw. diese keine Dystonie-Patienten waren. Zusätzlich wurde eine Publikation (Münchau et al., 2000) eingeschlossen, welche nicht mittels des standardisierten Suchbegriffes gefunden wurde. Dabei handelt es sich um die klinische Beschreibung einer Familie, bei der ANO3 als genetische Ursache erst später festgestellt und beschrieben wurde (Charlesworth et al., 2012). Auch zwei weitere der eingeschlossenen Publikationen

gaben lediglich zusätzliche Informationen zu vorher beschriebenen Patienten (Stamelou et al., 2014; Yoo et al., 2019).

Unter den eingeschlossenen Studien waren sechs *Screenings* nach Mutationen, drei Familienstudien und vier Fallberichte; sieben Publikationen ließen sich keinem dieser Typen exakt zuordnen.

3.3.2 Charakteristika, Symptomatik und Therapie eingeschlossener Patienten

Insgesamt wurden 57 symptomatische Träger von *ANO3*-Varianten aus 40 Familien beschrieben, wobei vier Patienten aus der Datenbank ausgeschlossen wurden. Bei Letzteren zeigten zwei ausschließlich Symptome eines PS (s. Abschnitt 3.1), zudem wurden die Varianten von zwei Dystonie-Patienten im Rahmen des *Pathoscorings* als benigne eingestuft. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich daher nur auf die eingeschlossenen 53 Dystonie-Patienten (s. Anhang E). Von diesen waren 21 männlich (21/53, 39,6%), von zwei Patienten war das Geschlecht nicht bekannt (3,8%). Die ethnische Zugehörigkeit war nur für 37 Patienten angegeben (69,8%), davon waren 14 asiatisch (14/37, 37,8%) und 23 kaukasisch (62,2%). Zwischen den Geschlechtern und Ethnien bestanden jeweils keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Erkrankungsalters, des Verteilungsmusters und der Erstsymptome.

Das Erkrankungsalter lag durchschnittlich bei $26,0 \pm 18,9$ Jahren bei zwei fehlenden Werten, wobei für einen Patienten zumindest die Einordnung in die späte Jugend erfolgte. Das Erkrankungsalter lag am häufigsten in Säuglingsalter und Kindheit (bis einschließlich 12 Jahre; 18/53, 34,0%), gefolgt vom frühen und späten Erwachsenenalter (21-40 bzw. >40 Jahre, je 13/53, 24,5%) sowie bei acht Patienten (15,1%) im Jugendalter (12-20 Jahre); zu einem Patienten (1,9%) fehlte die Angabe. Von Erkrankungsbeginn bis zur jüngsten Untersuchung sind im Mittel $21,4 \pm 16,9$ Jahre vergangen (bei elf fehlenden Werten).

Die Dystonie begann bei den meisten Patienten (14/53, 26,4%) im Halsbereich (s. Abbildung 7A), gefolgt von der oberen (18,9%) und der unteren Extremität (13,2%). Im weiteren Verlauf war neben dem Hals (34/53 Patienten, 64,2%) und den Extremitäten (30 Patienten, davon 16 mit betroffener Hand) am häufigsten der

kraniofaziale Bereich (21 Patienten, s. Abbildung 7C) betroffen. Aufgrund des Auftretens zervikaler Dystonien als häufige Manifestation einer Dystonie wurde der Anteil zervikaler an allen fokalen Dystonien zwischen *ANO3*-Variantenträgern von *MDS*Gene (5 von 11) mit diesem in einer Kohorte brasilianischer Patienten mit primärer Dystonie (51 von 152) verglichen, welche über 17 Jahre alt waren und sich innerhalb eines Jahres in der Universitätsklinik von São Paulo vorstellten (Bezerra et al., 2018). Bei dem Vergleich wurde keine signifikante Häufung zervikaler Dystonien bei *ANO3*-Variantenträgern festgestellt ($p=0,422$, Chi-Quadrat Test).

Im weiteren Krankheitsverlauf entwickelten die meisten Patienten eine segmentale bzw. multifokale Dystonie (30/53, 56,6%), seltener waren fokale (20,8%) und generalisierte (22,6%) Dystonien (s. Abbildung 7B). Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsalter und dem Verteilungsmuster ($p=0,007$, Kruskal-Wallis H-Test), wobei insbesondere das frühe Erkrankungsalter bei Patienten mit generalisierter Dystonie ($11,7 \pm 11,3$ Jahre) auffiel. Zudem hingen die Erstsymptome und die spätere Verteilung signifikant zusammen ($p=0,000003$, Exakter Test nach Fisher-Freeman-Halton). So generalisierten sich alle Dystonien mit Beginn in der unteren Extremität sowie am Stamm, kraniozervikale Dystonien wurden meist multifokal bzw. segmental.

Eine aktionsspezifische Dystonie bestand bei zehn Patienten, 29 (54,7%) wiesen einen Tremor auf. Davon war für 21 Patienten speziell ein Tremor der Extremitäten und für 19 Patienten ein Kopftremor beschrieben. Die Kombination der Dystonie mit einem Myoklonus kam bei zwölf Patienten vor, davon zwei mit einem zusätzlichen Parkinsonismus. Patienten mit einem Myoklonus zeigten dabei häufiger generalisierte Dystonien ($p=0,008$, Exakter Test nach Fisher) und ein niedrigeres Erkrankungsalter ($p=0,033$, Mann-Whitney U-Test).

Nicht-motorische Symptome wurden selten beschrieben, so trat zum Beispiel eine kognitive Beeinträchtigung bei zwei Patienten auf (bei 75,5% fehlenden Daten).

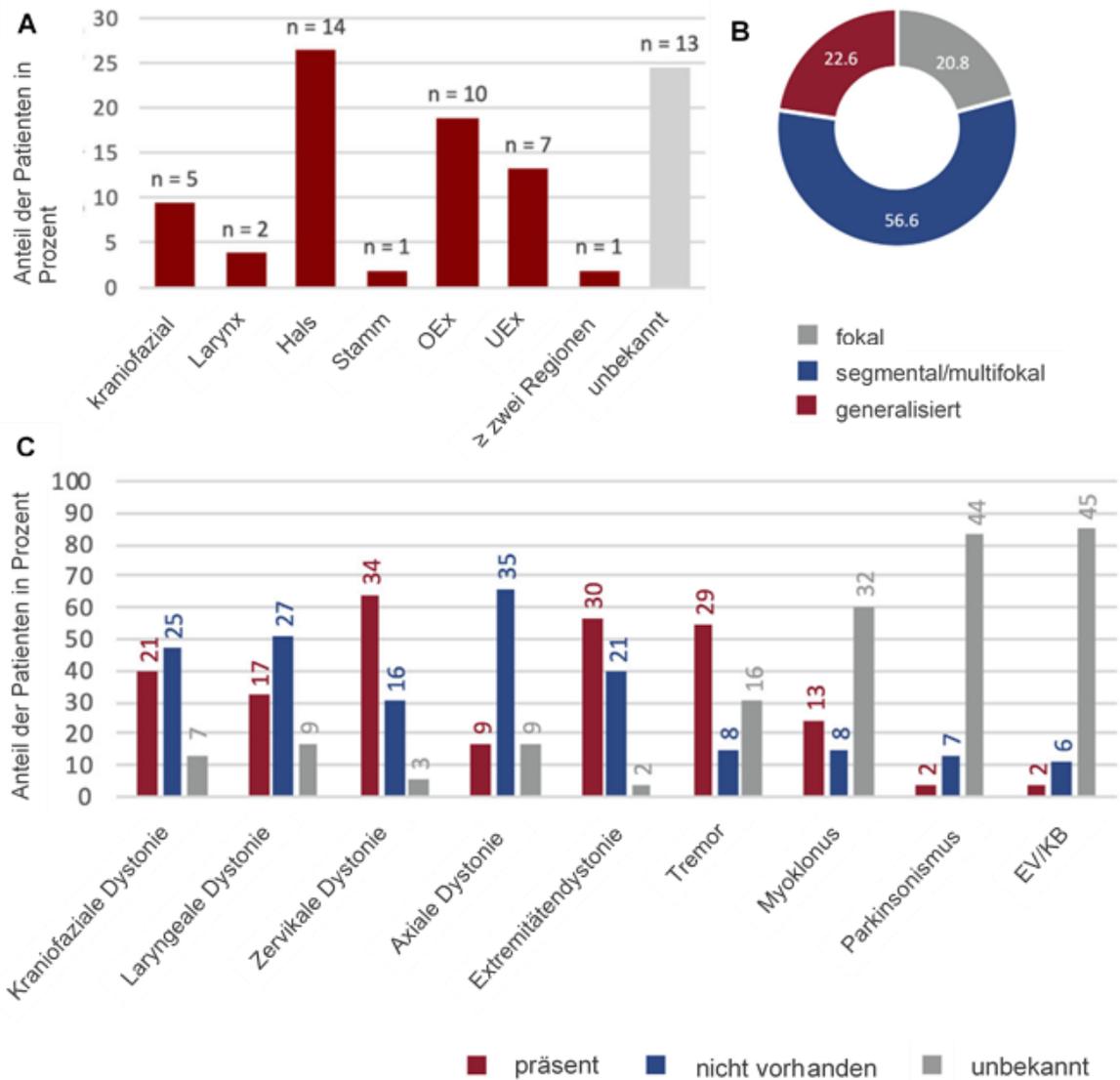


Abbildung 7: Grafiken zur Klinik der in die MDSGene-Datenbank aufgenommenen Patienten mit ANO3-Varianten, modifiziert nach Lange et al., 2021. A: Körperregionen der dystonen Erstsymptome. OEx: Obere Extremität. UEx: Untere Extremität. B: Verteilungsmuster der Dystonie. C: Symptome zum Untersuchungszeitpunkt. EV/KB: Entwicklungsverzögerung/kognitive Beeinträchtigung.

Aussagen zum Ansprechen auf medikamentöse Therapien wurden zu 14 Patienten getroffen. Die meisten Informationen wurden zur Behandlung mit Levodopa oder dopaminergen Substanzen gegeben (zehn Patienten), wobei das Ansprechen von „keines“ bis „exzellent“ eingeordnet wurde. Prädiktoren des Behandlungserfolges waren kaum zu eruieren, es fiel lediglich auf, dass die fünf Patienten mit Beginn in der Kindheit kein oder allenfalls minimales Ansprechen zeigten. Anticholinergika wurden bei acht Patienten, andere Substanzen jeweils nur bei wenigen Patienten mit meist moderatem Effekt angewandt. Anzumerken ist, dass in einigen

Publikationen (Blackburn et al., 2016; Lasky et al., 2019; Nelin et al., 2018; Olschewski et al., 2019) der Gesamteffekt einer Kombinationstherapie mit mehreren verschiedenen Substanzen angegeben wurde (s. Anhang E), der Anteil einer einzelnen Substanz daran also nur schwer einzuschätzen ist. Eine THS des GPi wurde bei sechs Patienten mit generalisierter Dystonie, die in der Kindheit oder Jugend in einer Extremität begann, erfolgreich eingesetzt (Lasky et al., 2019; Laurencin et al., 2019; Li et al., 2019; Olschewski et al., 2019; Yoo et al., 2019; Zech et al., 2017). Vier der ANO3-Varianten traten dabei *de novo* auf.

Ein wichtiger Punkt in der Betrachtung der genannten Patientencharakteristika sind fehlende Angaben in den Publikationen. Deren Anteil reichte bei den dystonen Symptomen von 3,8% (Extremitäten) bis 98,1% (Spiegel-Dystonie), bei PS-Symptomen von 83,0% bis 90,6% und bei den nicht-motorischen Symptomen von 75,5% (kognitive Beeinträchtigung) bis 96,2% (autonome Symptome).

Einige Angaben aus den eingeschlossenen Publikationen konnten dagegen bei den standardisierten Eingabe-Variablen (s. Anhang C) aufgrund ihres vereinzelt Auftretens nicht berücksichtigt werden, sollen aber an dieser Stelle Erwähnung finden. Symptombeschreibungen konnten, bis auf die Spezifizierung eines Tremors als Stimmtremor sowie spezielle zusätzliche Symptome einer einzelnen Patientin, in die Datenbank eingespeist werden. Blackburn und Kollegen beschrieben Lichtempfindlichkeit und Spasmus des Nahreflexes des Auges, choreiforme Bewegungen und komplexe motorische Tics, motorische Impersistenz, Frontallappenbeteiligung (in Form von u.a. Echopraxie) sowie eine pseudobulbäre Komponente (spontanes Weinen) (Blackburn et al., 2016).

Ergebnisse zusätzlicher diagnostischer Untersuchungen wurden jeweils nur für einzelne Patienten beschrieben: sensorische Funktionen eines Patienten waren normal (Tunc et al., 2019) und magnetresonanztomographische Befunde reichten von normal (Li et al., 2019; Yoo et al., 2018b) über unspezifische Veränderungen (Nelin et al., 2018) bis hin zu Intensitätsveränderungen im Putamen (Li et al., 2019). Die nuklearmedizinische Untersuchung zeigte eine Verminderung des Dopamintransporters im Putamen (Kuo et al., 2019), während markierte Glucose dort vermehrt aufgenommen wurde (Yoo et al., 2018b).

3.3.3 ANO3-Varianten der beschriebenen Patienten

Bei den 53 eingeschlossenen Patienten wurden 30 verschiedene Varianten gefunden, davon waren 28 *Missense*-Varianten (28/30, 93,3%). Es wurden außerdem eine Spleißstellen-Veränderung sowie eine Variante beschrieben, deren Effekt als unklar eingestuft wurde, da sie sich in der 5'-UTR (untranslatierten Region) von *ANO3* befand.

Die funktionelle Konsequenz wurde nur für eine Variante (p.Arg490Cys, c.1470G>C) untersucht und nachgewiesen, dass eine Veränderung des ER-abhängigen Calcium-Signals bestand (Charlesworth et al., 2012). Die Variante p.Ser685Gly (c.2053A>G) resultierte nicht in einer verringerten Expression von *ANO3* (Kuo et al., 2019).

Bei dem *Pathoscoring* der Varianten ergaben sich 14 möglicherweise pathogene Varianten sowie 16 wahrscheinlich pathogene Varianten. Nach den ACMG-Kriterien wurden 23 Varianten als VUS eingeordnet, sieben waren vermutlich pathogen (*likely pathogenic*).

Sechs der Varianten wurden bei jeweils zwei Indexpatienten publiziert. Für die Variante p.Tyr847Cys (c.2540A>G) konnten keine symptomatischen Gemeinsamkeiten gefunden werden (Ma et al., 2015), die Patienten mit der Variante p.Ala657Thr (c.1969G>A) hatten nur das ohnehin häufige Symptom der zervikalen Dystonie gemeinsam und unterschieden sich insbesondere im Auftreten von Tremor und der Kombination mit einem Myoklonus (Miltgen et al., 2016; Zech et al., 2017). Die Patienten mit der Variante p.Ser685Gly (c.2053A>G) zeigten alle einen frühen Krankheitsbeginn im Kindes- bzw. Jugendalter (Charlesworth et al., 2012; Kuo et al., 2019). Mehr Gemeinsamkeiten zeigten sich bei der Variante p.Ser651Asn (c.1952G>A) mit progressiver generalisierter, mit Myoklonus kombinierter Dystonie, die im Kindesalter im linken Bein begann (Tunc et al., 2019; Yoo et al., 2018a); sowie bei den Varianten p.Arg328Cys (c.982C>T) und p.Arg969Gln (c.2906G>A) (s. Abschnitt 3.1, Olschewski et al., 2019). Zwei verschiedene Aminosäureaustausche an der gleichen Position 607 (p.Ile607Phe, p.Ile607Thr) wurden beschrieben, wobei sich bei den betroffenen Patienten beider Familien ein früher Erkrankungsbeginn sowie bei jeweils einem Patienten pro

Familie eine Kombination mit Myoklonus zeigte (Laurencin et al., 2019; Nelin et al., 2018).

Bezüglich der Vererbung der *ANO3*-Varianten wurde eine positive Familienanamnese für Dystonien für 26 Patienten aus neun Familien beschrieben, wobei für acht Familien anhand weiterer erkrankter Familienmitglieder die Segregation untersucht wurde. Bei insgesamt sieben Patienten trat die *ANO3*-Variante *de novo* auf. Diese wurden mit solchen Patienten verglichen, deren *ANO3*-Varianten in ihren Familien segregierten. Dabei war für alle *de-novo* Patienten ein früher Beginn beschrieben, sie erkrankten mit einem durchschnittlichen Alter von $5,57 \pm 4,24$ Jahren signifikant früher als bei der familiären Dystonie ($23,32 \pm 16,41$; $p=0,004$, Mann-Whitney U-Test). Die Dystonie begann häufiger in der unteren Extremität ($p=0,008$, Exakter Test nach Fisher), interessanterweise jedoch nie im kraniozervikalen Bereich (im Gegensatz zu vierzehn der als familiär gruppierten Patienten). Im Verlauf entwickelte sich häufiger eine generalisierte Dystonie (7/7 vs. 2/25, $p=0,000011$, Exakter Test nach Fisher). Die Kombination mit einem Myoklonus trat bei Patienten mit *de-novo* Varianten häufiger auf (5/6 vs. 4/10 der Patienten mit vererbten Varianten und klinischer Angabe), allerdings nicht signifikant ($p=0,145$, Exakter Test nach Fisher). Die Häufigkeit des Auftretens von Tremor als Symptom und das Geschlecht unterschieden sich nicht.

Insgesamt ergab sich die in Abbildung 8 dargestellte Position aller Varianten im Gen sowie der *Missense*-Varianten im Protein. Dabei fielen keine Stellen mit Häufungen von *ANO3*-Varianten oder spezielle phänotypische Merkmale bei Zugehörigkeit zu einem ähnlichen Milieu (z.B. intrazellulär) oder in der Dimerisierungsdomäne auf. Nur für die *de-novo* Varianten bestand eine Ansammlung im Bereich der Aminosäuren 510 bis 651. Fünf dieser sechs Varianten lagen in einer Transmembrandomäne. Keine der dargestellten Varianten betraf eine posttranslational modifizierte, also z.B. phosphorylierte Aminosäure ("PhosphoSite", n.d.).

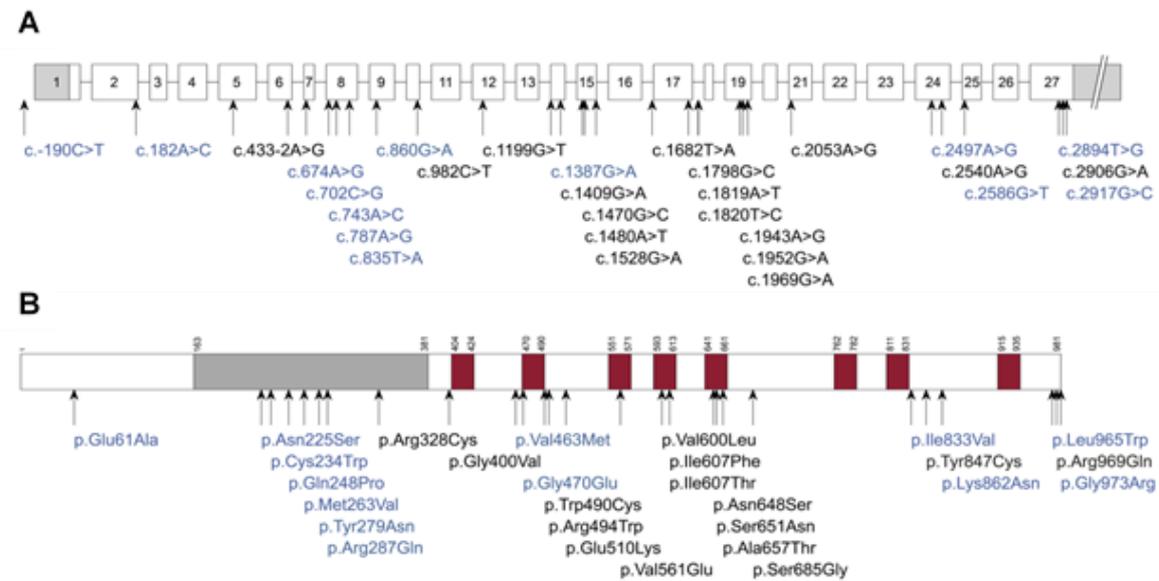


Abbildung 8: Darstellung der Position der ANO3-Varianten im Gen und Protein, übernommen aus Lange et al., 2021. Die Varianten sind jeweils gemäß ihrer Einordnung nach den MDSGene-Kriterien gefärbt (schwarz: wahrscheinlich pathogen, blau: möglicherweise pathogen). A: Darstellung der Basenaustausche. Das Gen ist durch Boxen (Exons) und Striche (Introns) dargestellt. UTRs sind grau markiert. B: Darstellung der Aminosäureaustausche der *Missense*-Varianten. Funktionelle Domänen sind im Protein markiert (grau: Dimerisierungsdomäne, rot: Transmembrandomänen).

3.3.4 Screenings nach ANO3-Varianten in der Literatur

Mehrere Studien haben zusätzlich, ähnlich unserer *GenePanel*-Untersuchung, in Stichproben von Dystonie-Patienten nach Varianten in ANO3 gesucht. Ein Überblick über die Ergebnisse ist Tabelle 13 zu entnehmen. Zudem beschrieben Ma und Kollegen sechs nicht-proteinverändernde ANO3-Varianten bei Dystonie-Patienten, drei von diesen wurden auch in Kontrollen gefunden (Ma et al., 2015).

In einer Kontrollpopulation aus 376 Probanden wurden außerdem zwei seltene, proteinverändernde Varianten gefunden (0,5%) (Zech et al., 2014). Dieselbe Arbeitsgruppe beschrieb zudem ein Vorkommen von Varianten, die mit verschiedenen Algorithmen als pathogen vorhergesagt wurden, bei 0,3% der europäischen Amerikaner der NHLBI-ESP-Datenbank (Zech et al., 2014).

Tabelle 13: Ergebnisse von *Screenings* nach *ANO3*-Varianten in Stichproben von Dystonie-Patienten

Publikation	Anzahl <i>ANO3</i> -Variantenträger/ Studienpopulation	Anteil in Prozent	Ethnie	Einschlusskriterien
Charlesworth et al., 2012	4/188	2,1	kaukasisch	zervikale Dystonie und/oder dystoner Tremor der oberen Extremität, vereinzelt familiärer essentieller Tremor oder Myoklonus-Dystonie, Ausschluss von Varianten in <i>TOR1A</i> und <i>THAP1</i>
Zech et al., 2014	2/342	0,6	kaukasisch	primäre Torsionsdystonie, Ausschluss der Δ GAG-Mutation in <i>TOR1A</i> und Varianten in <i>THAP1</i>
Ma et al., 2015	2/33 Familien	6,1	asiatisch	familiäre, isolierte Dystonie; Ausschluss von Varianten in <i>TOR1A</i> , <i>THAP1</i> , <i>CIZ1</i>
Zech et al., 2017	5/590	0,8	kaukasisch	isolierte Dystonie, Ausschluss von sekundären Ursachen und Varianten in <i>TOR1A</i> (Δ GAG), <i>THAP1</i> , <i>GNAL</i>
Ma et al., 2018	1/65	1,5	asiatisch	Dystonie als einziges oder Hauptsymptom, kein Verdacht auf erworbene Ursachen
Olschewski et al., 2019	7/729	1,0	kaukasisch und asiatisch	Dystonie als Hauptsymptom
Li et al., 2019	4/187	2,1	asiatisch	prädominante Dystonie, Ausschluss erworbener Ursachen und Varianten in <i>TOR1A</i> und <i>THAP1</i>

4 Diskussion

4.1 Studiendesign zur Bestimmung der Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonie-Patienten

In diesem Abschnitt wird die Methodik, welche bei der genetischen Untersuchung von Patienten mit Bewegungsstörungen auf Varianten in *ANO3* angewandt wurde, schrittweise beleuchtet. Hierbei wird zunächst auf die Auswahl der untersuchten Stichprobe sowie im Weiteren auf die angewandte Methodik des *GenePanels*, den anschließenden Filterungsprozess gefundener Varianten sowie deren Validierung mittels Sanger-Sequenzierung eingegangen.

4.1.1 Die untersuchte Stichprobe

Vor Beginn der eigentlichen Analyse musste zunächst eine möglichst repräsentative Stichprobe rekrutiert werden. Nur so konnte der Beitrag von *ANO3*-Varianten zur Pathogenese von Dystonien evaluiert sowie durch die unvoreingenommene Suche die bekannten assoziierten Phänotypen ggf. erweitert werden. An dieser Stelle sollen einige Parameter der Stichprobe mit vorhandenen epidemiologischen Studien verglichen werden. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass letztere häufig in einem bestimmten geographischen Rahmen durchgeführt wurden. Die Ethnie kann zum einen Einfluss auf den Phänotyp haben (Sauerbier et al., 2018). Innerhalb der in MDSGene eingeschlossenen *ANO3*-Variantenträger gab es allerdings keine signifikanten phänotypischen Unterschiede zwischen Patienten kaukasischer und asiatischer Abstammung. Es besteht zum anderen aber auch ein Einfluss der Ethnie auf die Häufigkeit bestimmter Allele (Huang et al., 2015). Dies muss besonders bei dem Vergleich der Dystonie- mit der PS-Stichprobe bedacht werden, da nur die Dystonie-Stichprobe auch asiatische Patienten enthielt.

Ein weiterer Aspekt ist das Alter zu Erkrankungsbeginn. Hierfür stand in der Literatur für alle Verteilungsmuster nur ein Median (44 Jahre) zur Verfügung (Solano Atehortúa et al., 2016), dieser lag in der hier verwendeten Stichprobe mit 45 Jahren in einem ähnlichen Bereich.

Die Stichprobe der vorliegenden Arbeit enthielt jedoch einen größeren Anteil an fokalen (82,1% vs. 64,6%, $p < 0,0001$, Chi-Quadrat Test) und generalisierten Dystonien (8,8% vs. 5,9%, $p = 0,18$, Chi-Quadrat Test) (Bezerra et al., 2018). Der Anteil von Musikerdystonien an den fokalen Dystonien wird in der Literatur mit 2,9% angegeben (Williams et al., 2017) und war damit in der hier verwendeten Stichprobe deutlich erhöht (248/478, 51,9%). Der Anteil der häufig bei ANO3-Varianten vorkommenden zervikalen an allen fokalen Dystonien war dagegen in der untersuchten Stichprobe (112/478; 23,4%) niedriger als in einer epidemiologischen Studie (51/152, 33,6%; $p = 0,013$, Chi-Quadrat Test) (Bezerra et al., 2018). Damit ist eine Diskrepanz zwischen der Häufigkeit von ANO3-Varianten in der untersuchten Stichprobe und dem Vorkommen in der tatsächlichen Gesamtheit der Dystonie-Patienten möglich. Allerdings konnte auf diesem Weg auch das Vorkommen von ANO3-Varianten bei Musikerdystonien untersucht und bei einem Patienten (L-2706) bestätigt werden.

4.1.2 Die genetische Untersuchung mittels *GenePanel*

In dieser Stichprobe von Dystonie-Patienten sowie in einer Kontrollgruppe von PS-Patienten wurde das NGS als Methode zur Detektion von ANO3-Varianten verwendet. Die Entwicklung dieser Technik hat die Sequenzierung deutlich zeit- und kosteneffektiver gemacht (s. Abschnitt 2.3.1). Dies wiederum ermöglichte die Entwicklung vielseitiger Anwendungsgebiete unter anderem in der Krebsdiagnostik, Forensik und Transplantationsmedizin (Salk et al., 2018), hat aber auch die Sequenzierung im Kontext genetischer Erkrankungen deutlich verbessert (Lohmann und Klein, 2014). Ein Problem stellt allerdings in allen Anwendungsgebieten die Interpretation der großen Datenmenge dar, welche das NGS hervorbringt. Im Rahmen meiner Arbeit am Institut für Neurogenetik wurde in weiteren Projekten mittels Exom-Sequenzierung mit NGS versucht, die genetischen Ursachen für neurologische Erkrankungen in mehreren Familien ohne Varianten in bekannten assoziierten Genen zu eruieren. Dies brachte jedoch teils keine weiterführenden Ergebnisse hervor aufgrund fehlender vielversprechender Varianten in Kandidatengenen, Segregation in den Familien oder eindeutiger Nachweise funktioneller Konsequenzen.

Aufgrund der Fragestellung mit Fokus auf Varianten in einem bekannten Krankheits-Gen war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch möglich, die Datenmenge durch Untersuchung von lediglich einem *Panel* bestimmter Gene zu reduzieren. Weitere Vorteile gegenüber einer Exom- oder Genom-Sequenzierung stellten die geringere Bearbeitungszeit und die höhere *Coverage* der einzelnen Nukleotide dar. Letztere bedeutete eine geringere Rate an falsch-positiven oder -negativen Befunden (Fernández-Marmiesse et al., 2018), da hiermit die statistische Wahrscheinlichkeit, sowohl das Wildtyp- als auch das mutierte Allel zu sequenzieren, gesteigert werden konnte (Lohmann und Klein, 2014). Durch die Sequenzierung nur mit der zu untersuchenden Erkrankung assoziierter Gene reduzierte sich zudem die Häufigkeit von Zufallsbefunden im Sinne von Varianten in Genen, welche eine Prädisposition für andere Erkrankungen bedeuten, und damit verbundenen ethischen Konflikten (Fernández-Marmiesse et al., 2018).

Allerdings bestand auf diese Weise nicht die Möglichkeit, im Verlauf in weiteren Projekten noch nicht im *Panel* enthaltene Gene zu untersuchen. Dies wäre z.B. bei Patienten ohne Variante in einem der untersuchten Gene zur offenen Suche nach einer genetischen Ursache oder bei Beschreibung neuer, potenziell krankheitsverursachender Gene, wie dem bei Dystonien kürzlich beschriebenen *VPS16*-Gen (Steel et al., 2020), zum Screening in der Studienpopulation sinnvoll. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war dies jedoch aufgrund des Fokus auf Varianten in *ANO3* nicht nötig.

Eine Alternative bei einem solchen fokussierten Ansatz stellt die Sanger-Sequenzierung dar. Hierbei müsste jedoch allein für jedes der 27 Exons von *ANO3* eine einzelne Reaktion angesetzt werden, während das *GenePanel* alle untersuchten Gene parallel abdeckt und zusätzlich das *Poolen* mehrerer Proben ermöglicht. Dies spiegelt sich zum einen in der benötigten Arbeitszeit wider, die in der Summe der jeweils etwa zwei Stunden pro Reaktion bei der Sanger-Sequenzierung die benötigten insgesamt fünf bis sechs Stunden für das NGS übersteigt (Illumina, 2015). Auch die Kosten der Sanger-Sequenzierung sind deutlich höher (etwa 500\$/Mega-bp im Vergleich zu 0,1\$/Mega-bp für das NGS (Frank et al., 2013)). Somit war die Durchführung eines *GenePanels*, selbst unter Berücksichtigung der zusätzlich notwendigen Validierung, weniger aufwendig und kostengünstiger.

Im Rahmen des *GenePanels* wurde außerdem ein Fokus auf die Exons und Exon-Intron-Grenzen gesetzt. Das Exom macht lediglich ca. 1-2% des Genoms aus (Alfares et al., 2018), umfasst jedoch ca. 89% der als pathogen beschriebenen Varianten (Barbitoff et al., 2020). Die übrigen 11% pathogener Varianten werden im hier angewandten Ansatz übersehen. Auch den so ausgeschlossenen intronischen Varianten können allerdings immer mehr Funktionen zugewiesen werden (Vaz-Drago et al., 2017). Dennoch ist das Überprüfen eines pathogenen Effekts intronischer Varianten erschwert und erfordert tiefergehende Untersuchungen. Auf eine Untersuchung des gesamten Exoms oder Genoms wurde in Zusammenschau mit den zuvor genannten Vorteilen des *GenePanels* und in Hinblick auf die Kosten verzichtet.

4.1.3 Der Filterungsprozess im Rahmen der Auswertung der *GenePanel*-Analysen

Vor der Validierung wurden die mittels NGS ermittelten Varianten nach Qualität und Relevanz gefiltert. Als eines der gesetzten Filterkriterien wurde die MAF mit einem Grenzwert von 0,005 verwendet. Dies resultierte aus der notwendigen Seltenheit der Varianten aufgrund der Einordnung von Dystonien als seltene Erkrankung (Richter et al., 2015; Steeves et al., 2012) und dem dafür verbreiteten Filterbereich (Bamshad et al., 2011; Boycott et al., 2013). Zu diskutieren ist dies besonders aufgrund des sogenannten Gründereffekts, das heißt „[dem] häufige[n] Vorkommen eines seltenen Allels, das sich von einem Gründer ausgehend in Folgegenerationen ausgebreitet hat“ (Tariverdian und Buselmaier, 2013). Unter den Bewegungsstörungen betrifft dies z.B. Varianten im *GBA*-Gen bei PS-Patienten. So tritt beispielsweise die krankheitsverursachende Variante N370S mit 0,2% in einer neuseeländischen PS-Kohorte (Graham et al., 2020) unter dem hier gesetzten Grenzwert von 0,5%, mit 11,8% in aschkenasisch-jüdischen Patienten jedoch deutlich häufiger auf (Ruskey et al., 2019). Solche Varianten würden mit dem hier gesetzten Grenzwert der MAF übersehen werden. Aufgrund der Zusammenstellung der untersuchten Stichprobe ohne zu erwartenden Gründereffekt kann diese Möglichkeit jedoch vernachlässigt werden.

Der nächste Schritt im Filterungsprozess umfasste den erwarteten Effekt der Varianten. Hierbei wurden synonyme Varianten ausgeschlossen, da ihr möglicher Effekt auf das Protein aufgrund der unverändert kodierten Aminosäure primär nicht ersichtlich ist. Dennoch können auch diese Varianten einen nicht unerheblichen Effekt, beispielsweise auf die Transkriptionsfaktorbindung, die Genexpression, die RNA-Struktur und -Stabilität, das Spleißen sowie die Proteinfaltung haben (Im und Choi, 2017). So sind für viele Erkrankungen schon Assoziationen mit synonymen Varianten beschrieben (Sauna und Kimchi-Sarfaty, 2011). Allerdings besteht noch keine gute Strategie zur funktionellen Untersuchung synonyme Varianten (Im et al., 2018), was gerade bei einem zum Untersuchungszeitpunkt mit Unsicherheiten behafteten Kandidatengen wie *ANO3* problematisch erschien. Zudem fehlte es bei vielen, insbesondere von externen Instituten zugewiesenen Patienten an weiteren Untersuchungsmaterialien für entsprechende Testungen, wie beispielsweise Blutproben für Expressionsanalysen, sodass sich für einen Ausschluss synonyme Varianten beim Filterungsprozess entschieden wurde.

Das Herausfiltern von Varianten mit einem CADD-Score unter 15 wurde anschließend angewandt, um einen ersten Hinweis auf die Schädlichkeit der Varianten unter Einbezug mehrerer verschiedener Prädiktionssoftwares zu erhalten. Diese Schädlichkeit wird durch die verwendete Software als Vergleichswert zu ca. neun Milliarden SNVs gesetzt. Der angewandte Grenzwert von 15 entspricht hierbei einem Rohwert der Schädlichkeit in den obersten etwa 3% ($10^{-1.5}$) der SNVs. Es handelt sich außerdem um den Median der Werte für *Missense*- und Spleißstellenvarianten (Kircher et al., 2014) und damit um eine sinnvolle und häufig verwendete Grenze, über der auch alle publizierten und in die MDSGene-Datenbank aufgenommenen Varianten lagen. Der Median bedeutet allerdings auch, dass 50% der Werte darunter liegen. Diese Varianten wurden verpasst, ihr Effekt ist allerdings mit sinkendem CADD-Score auch immer schwieriger einschätzbar und wird unwahrscheinlicher.

Auf diese Weise gefilterte seltene, protein-verändernde Varianten mit einem hohen CADD-Score wurden im nächsten Schritt mittels Sanger-Sequenzierung validiert.

4.1.4 Die Validierung gefilterter Varianten mittels Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung wurde nicht nur zur Identifikation des Variantenträgers aus einem Dreier-*Pool*, sondern auch zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse durchgeführt.

Die Anwendung der Sanger-Sequenzierung zur reinen Validierung von Ergebnissen wird bei etablierten Abläufen und bestimmten Qualitätsparametern (*Coverage* ≥ 35 , Heterozygotenanteil $\geq 35\%$) aufgrund von redundanten oder sogar falsch-negativen Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung bei erhöhten Kosten und Arbeitsaufwand heute nicht mehr empfohlen (Zheng et al., 2019).

Aufgrund des höheren erreichbaren Durchsatzes durch das *Poolen* der Proben und der damit verbundenen Notwendigkeit der anschließenden Identifikation des tatsächlichen Variantenträgers bzw. Anpassung der Häufigkeit von *ANO3*-Varianten im Falle der Validierung einer Variante bei mehreren Patienten eines Dreier-*Pool*s war die Sanger-Sequenzierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit dennoch notwendig. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass es sich bei der nicht zu validierenden Variante um eine falsch-negative Sanger-Sequenzierung handelt. Dies wird allerdings als unwahrscheinlich angesehen, da auch die Werte im *GenePanel* mit einer *Coverage* von 100 für den Dreier-*Pool* und einer Frequenz von 28% bereits grenzwertig waren.

Durch das *Poolen* der Proben und die parallele Untersuchung weiterer Gene für andere Projekte stellte die *GenePanel*-Analyse mit anschließender Validierung nach Qualität und Relevanz gefilterter Varianten insgesamt die effektivste genetische Methode für die Beantwortung der Fragestellung dar.

4.2 Die Suche nach einer de-novo Variante in *ANO3*

In der zweiten Fragestellung wurde ein Patient mit generalisierter Dystonie auf das Vorhandensein einer Variante in *ANO3* sowie das de-novo Auftreten dieser untersucht. Hierzu wurde zunächst eine *GenePanel*-Untersuchung durchgeführt, im Anschluss erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung die Validierung bei dem Patienten

sowie die Testung der Eltern auf die entsprechende Variante. Hierbei gelten die in den Abschnitten 4.1.2 und 4.1.4 diskutierten Vor- und Nachteile dieser Methodik.

Bei de-novo Varianten muss allerdings besonders an die Fehlerrate von Sequenzierplattformen gedacht werden, da eine fälschliche Bezeichnung als *de novo* sowohl bei einem falsch-positiven Befund des Indexpatienten als auch bei einem falsch-negativen Befund der Eltern entstehen kann (Veltman und Brunner, 2012). Die angewandte Methodik mit Validierung der Varianten mittels Sanger-Sequenzierung sowie Faktoren wie im Verlauf festgestellte, phänotypische Gemeinsamkeiten mit einem Träger der gleichen *ANO3*-Variante (s. Abschnitt 3.2) reduzieren jedoch diese Wahrscheinlichkeit im vorliegenden Fall.

Einen weiteren besonderen Aspekt stellen bei der Frage nach dem de-novo Auftreten falsch-positive bzw. -negative Ergebnisse aufgrund von nicht nachgewiesener Elternschaft dar. Die Häufigkeit von Scheinvaterschaften wird in Deutschland mit etwa 1% angegeben (Wolf et al., 2012), durch z.B. Fehler bei Embryonentransfers kann es sich seltener auch bei der sozialen nicht um die biologische Mutter handeln (Richards et al., 2015). Die Relevanz dessen spiegelt sich auch in einer Aufwertung des Kriteriums für de-novo Varianten im ACMG-*Pathoscore* von *moderate* auf *strong* bei nachgewiesener Elternschaft wider (Richards et al., 2015). Im vorliegenden Fall erfolgte der entsprechende Nachweis in Vorarbeit durch die Arbeitsgruppe.

Den speziellen Anforderungen bei der Untersuchung von de-novo Varianten wurde somit im Rahmen der vorliegenden Arbeit insbesondere mit der Validierung mittels Sanger-Sequenzierung und dem Nachweis der Elternschaft begegnet.

4.3 Die systematische Literaturrecherche nach den MDSGene-Kriterien

Um die Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonien besser beurteilen zu können, wurde außerdem eine Literaturrecherche nach der MDSGene-Methodik durchgeführt. Die Datenbank MDSGene ist eine hilfreiche Plattform sowohl für Kliniker, die den Phänotyp oder Genotyp eines Patienten in die bestehende Literatur einordnen wollen, als auch für genetische Wissenschaftler, um beispielsweise zu

Beginn der Forschung einen Überblick über bisherige Ergebnisse zu erlangen. Umso wichtiger ist daher die vollständige Einarbeitung der vorhandenen Informationen aus entsprechenden Publikationen.

Während dies im Rahmen dieser Arbeit bis auf spezielle zusätzliche Symptome in einem einzelnen Fall (Blackburn et al., 2016) gelang, fiel dagegen eine große Anzahl in den Publikationen fehlender Informationen auf. Bei den entsprechenden Symptomen ist jeweils unklar, ob durch die Autoren deren Vorhandensein, deren Fehlen oder das Ausbleiben einer Untersuchung vorausgesetzt wird (Kasten et al., 2018). Dies erschwert die Erstellung eines umfassenden Gesamtbildes. Im Fall von ANO3 reichte der Anteil fehlender Angaben selbst bei den dystonen Symptomen bis 98,1% (Spiegel-Dystonie). Bei den nicht-motorischen Symptomen fehlten die Angaben für den überwiegenden Anteil der Patienten (75,5-96,2%). Diese haben allerdings einen wesentlichen Einfluss auf die Lebensqualität, besonders bei gut eingestellter dystoner Symptomatik (Drexel et al., 2020), und sollten daher nicht missachtet werden. Checklisten mit Empfehlungen für enthaltene Informationen in Publikationen werden aktuell durch das MDSGene-Team erarbeitet (Klein et al., 2018).

Ein wichtiger Schritt neben der vollständigen Datenerhebung aus den Publikationen war das *Scoring* der Pathogenität der beschriebenen Varianten, um die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern. Bei MDSGene wurde auf ein System mit einer geringeren Anzahl an Kriterien als beim „Gold-Standard“ der ACMG-Kriterien (Richards et al., 2015) und klar in Zahlen definierten Abgrenzungen zurückgegriffen. Letzteres ist ein Nachteil der ACMG-Kriterien, die Spielraum für beispielsweise die Nutzung unterschiedlicher Plattformen lassen. So können z.B. für das Kriterium PP3 („Mehrere computerbasierte Methoden unterstützen einen schädigenden Effekt auf das Gen oder Genprodukt“ (Richards et al., 2015)) verschiedene *in silico* Algorithmen (z.B. SIFT, CADD, REVEL) in unterschiedlicher Anzahl zur Anwendung kommen, deren Ergebnisse untereinander sowie im Vergleich zu der Datenbank ClinVar teils diskordant sind (Ghosh et al., 2017). Spielräume wie dieser führten dazu, dass bei dem Vergleich der Klassifikationen mit ACMG zwischen verschiedenen Laboren in einer Studie lediglich eine Übereinstimmung bei rund einem Drittel der Varianten auftrat (Amendola et al., 2016). Die verringerte Anzahl an Kriterien bei MDSGene birgt bei vereinfachter

Anwendbarkeit jedoch die Gefahr der verringerten Trennschärfe. Im Vergleich mit der Klassifikation nach den ACMG-Kriterien ergab sich dennoch im Falle von *ANO3* eine ähnliche Verteilung zwischen jeweils zwei Pathogenitätsstufen. Die ACMG-Klassifikation weist als Nachteil zudem die häufige (bei den *ANO3*-Varianten der MDSGene-Datenbank 23/30, 76,7%) Einordnung als VUS auf, welche insbesondere in der genetischen Beratung ein Problem darstellen (Hoffman-Andrews, 2017). Die MDSGene-Klassifikation bietet eine solche Einordnung nicht und offeriert eine Auftrennung in möglicherweise und wahrscheinlich pathogen, sodass die Information klarer verständlich ist. Auffällig war, dass einige (9/23) der mittels ACMG-Kriterien als VUS eingeordneten *ANO3*-Varianten bei MDSGene sogar als wahrscheinlich pathogen eingestuft wurden, 14 waren möglicherweise pathogen. Den Unterschied in der Kategorisierung machte hierbei das Kriterium der Segregation aus, in dem alle als möglicherweise pathogen eingeordneten Varianten keinen Punkt erzielten. Lediglich fünf der möglicherweise pathogenen Varianten hatten zusätzlich einen niedrigeren CADD-Score (<20).

Bei der weiteren Auswertung der Daten in dieser Arbeit wurden verschiedene deskriptive statistische Tests angewandt, deren Aussagekraft unter anderem von der betrachteten Stichprobengröße abhängt. Zu bedenken ist, dass insbesondere bei Vergleich der (beispielsweise anhand des Erkrankungsalters) in Untergruppen eingeteilten, in MDSGene eingeschlossenen Patienten deren jeweilige Anzahl zu gering für absolute Aussagen sein kann (Mascha und Vetter, 2018). Dies betrifft in höherem Maße ebenfalls die im Rahmen des *GenePanels* durchgeführten statistischen Tests. Zu bedenken ist in diesem Zusammenhang außerdem, dass der p-Wert im Allgemeinen keine absolute dichotome Einteilung in „unterschiedlich“ oder „nicht unterschiedlich“ ermöglicht (Greenland et al., 2016) und mit einem α -Fehler von 5% behaftet ist.

Zudem wurde eine Vielzahl statistischer Tests angewandt. Dabei steigt mit jedem Test die Irrtumswahrscheinlichkeit. Bei dem gewählten Signifikanzniveau α von 0,05 ist statistisch einer von 20 durchgeführten Tests falsch-signifikant (Victor et al., 2011). Dennoch wurde im Rahmen dieser Arbeit keine Korrektur für multiples Testen durchgeführt. Bei einem explorativen Ansatz ist dies durchaus zu rechtfertigen. Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass niedrige p-Werte auch zufällig entstanden sein können und „signifikante“ Ergebnisse für sicherere

Aussagen die Validierung durch konfirmatorische Studien bedürfen (Bender und Lange, 2001; Victor et al., 2011).

Die Literaturrecherche nach den Kriterien der MDSGene-Datenbank lieferte insgesamt aber einen guten Überblick über beschriebene *ANO3*-Varianten und die damit assoziierten Phänotypen. Die Veröffentlichung neuer Fälle mit umfassenden klinischen Beschreibungen ist jedoch notwendig, um spezielle Symptome als Ausnahmen zu bestätigen, Wissenslücken zu füllen und statistisch aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten.

4.4 Die Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonien

In diesem Abschnitt wird die Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonien anhand der Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert. Dabei wird zunächst auf die Aspekte eingegangen, die für einen krankheitsverursachenden Effekt sprechen. Im Anschluss werden dagegensprechende Argumente betrachtet.

Ähnliche Phänotypen bei mehreren Patienten legen einen gemeinsamen genetischen Ursprung nahe. Dystonie-Patienten mit *ANO3*-Varianten präsentierten sich meist mit einer segmentalen bzw. multifokalen Dystonie (56,6%) mit Beteiligung der Halsmuskulatur (64,2%) sowie einem Tremor (54,7%). Dies ähnelt in den Häufigkeiten eines gemeinsamen Verteilungsmusters und betroffenen Körperteils denen bei etablierteren Dystonie-Genen wie *TOR1A* (58,8% generalisierte Dystonie bzw. 71,6% Extremitätendystonie) und *THAP1* (34,6% segmentale/multifokale Dystonie bzw. 63,3% zervikale Dystonie) ("MDSGene", n.d.). Eine eindeutige Zuordnung eines Phänotyps zu einem bestimmten Gen ist bei der Dystonie jedoch wie auch beim PS nicht möglich, sodass bei einer genetischen Ursachenforschung mittels *Gen-Panels* mehrere Gene parallel getestet werden sollten (Lange et al., 2021; Trinh et al., 2018).

Des Weiteren ist ein Kriterium für die Pathogenität genetischer Varianten das rekurrente Vorkommen bei phänotypisch ähnlichen Patienten (Hamdan et al., 2017). Die Rekurrenz einzelner *ANO3*-Varianten konnte sowohl im Rahmen des *GenePanels* als auch in der Literaturrecherche nachgewiesen werden. Bei jeweils nur zwei Indexpatienten je Variante ist ein zufälliges Auftreten jedoch nicht

auszuschließen (Olschewski et al., 2019), insbesondere da die Überlappung der Phänotypen häufig (p.Tyr847Cys, p.Ala657Thr, p.Ser685Cys) gering war. Größere Übereinstimmungen, wie im Fall der beiden im *GenePanel* zweifach gefundenen Varianten (p.Arg328Cys, p.Arg969Gln), machen eine pathogene Rolle dieser Varianten dagegen wahrscheinlicher. Unterstützend zeigte sich für diese Varianten im Vergleich der Häufigkeiten ein signifikant vermehrtes Auftreten in der Patientengruppe dieser Arbeit gegenüber den jeweils ethnisch am ehesten übereinstimmenden Bevölkerungsgruppen in der Datenbank gnomAD. Weitere Studien mit noch größeren Stichproben sind allerdings nötig, um die Häufigkeit dieser Varianten bei Dystonie-Patienten zu validieren.

Da de-novo auftretende Varianten einer weniger strikten Selektion unterliegen als vererbte Varianten (Veltman und Brunner, 2012), ist das de-novo Vorkommen ein starkes Kriterium der Pathogenität (Richards et al., 2015). In dieser Arbeit wurden insgesamt sieben Patienten mit de-novo Varianten in *ANO3* gefunden, davon eine Variante mittels *GenePanel*-Analyse einer Dystonie-Kohorte, eine Variante mittels *GenePanel*-Untersuchung eines Einzelfalls sowie fünf weitere Patienten mit de-novo Varianten in der Literatur (Lange et al., 2021; Olschewski et al., 2019; Tunc et al., 2019). Dabei ergaben sich mehrere phänotypische Gemeinsamkeiten. So zeigten alle beschriebenen Träger von de-novo Varianten eine generalisierte Dystonie mit Erkrankungsbeginn im Kindesalter (durchschnittlich mit 5,6 Jahren). Die Beschreibung eines Auftretens der Dystonie unter anderem in einer Extremität fehlte nur bei einem, die Kombination mit einem Myoklonus bei zwei Patienten. Insgesamt hatten Patienten mit de-novo Varianten in *ANO3* schwerere Verläufe als solche mit vererbten Varianten. Dieses Bild entspricht dem bei anderen vererbten Erkrankungen wie der Osteogenesis imperfecta (Zhytnik et al., 2019) oder kongenitalen Herzerkrankungen (Homsy et al., 2015). Es muss jedoch aufgrund eines Untersuchungsbias kritisch betrachtet werden. So wurde bei der Kohorte von MDSGene bei den übrigen Patienten mit negativer Familienanamnese keine oder keine vollständige Untersuchung weiterer Familienmitglieder durchgeführt. Von diesen hatten 50% (7/14) einen milderen Verlauf (hier definiert als später Erkrankungsbeginn und fokale oder segmentale/multifokale Dystonie). Die fehlende Untersuchung kann beispielsweise dadurch begründet sein, dass bei einem späten Erkrankungsbeginn die Rekrutierung der Eltern erschwert ist (Pamphlett et al., 2011) oder die Frage nach dem Wiederholungsrisiko für die weitere

Familienplanung bei schweren Erkrankungen im Kindesalter häufiger Grund für eine genetische Diagnostik ist (Acuna-Hidalgo et al., 2016). Weiterführende Untersuchungen von Elternteilen auch bei mildereren Verläufen sind nötig, um zudem beispielsweise das Vorkommen von reduzierter Penetranz bei *ANO3*-Varianten zu evaluieren.

Eine der Varianten ist bei zwei Patienten jeweils *de novo* aufgetreten, bei dem Lübecker Patienten L-11226 und bei dem Patienten einer Fallstudie der Arbeitsgruppe um Yoo (Yoo et al., 2018a). Der sehr ähnliche Phänotyp von generalisierten Dystonien mit Beginn in den Beinen im frühen Kindesalter und Myoklonien unterstützt die Annahme des gemeinsamen genetischen Ursprungs und damit der Pathogenität der *ANO3*-Variante bei diesen Patienten.

Weiterhin sei angemerkt, dass trotz des Auftretens von *de-novo* Varianten als Argument für die Pathogenität von *ANO3* im Rahmen von Dystonien bedacht werden muss, dass natürlich nicht jede genetische Variante automatisch als pathogen gewertet werden kann, wenn sie *de novo* auftritt. Weitere Kriterien wie die Frequenz in größeren Populationen müssen hinzugezogen werden (Kosmicki et al., 2017), was im Rahmen dieser Arbeit auch geschehen ist.

Bemerkenswert ist, dass eine THS bei allen vier damit behandelten Patienten mit *de-novo* Varianten sowie zwei weiteren Patienten mit generalisierter Dystonie und Varianten in *ANO3* erfolgreich war. Eine klare Empfehlung zu dieser Behandlung kann aufgrund der geringen Fallzahl sowie der Invasivität der Behandlungsmaßnahme an dieser Stelle noch nicht gegeben werden. Dies gilt insbesondere, da eine generalisierte Dystonie, wie sie in allen genannten Fällen vorlag, meist unabhängig vom Genotyp oftmals gut auf die THS anspricht (Macerollo et al., 2020). Auch in der Literatur wird empfohlen, trotz der möglichen Abhängigkeit des Behandlungserfolges vom Genotyp die Indikation anhand der Klinik des Patienten zu stellen (Yoo et al., 2019). Dennoch sollte die Erweiterung des anfänglich beschriebenen Phänotyps bei *ANO3*-Varianten (Charlesworth et al., 2012) durch den bei *de-novo* Varianten beobachteten zur genetischen Testung bei Patienten mit generalisierter Dystonie auch bei negativer Familienanamnese führen. Der mögliche Nachweis von *ANO3*-Varianten in solchen Fällen könnte zur Abwägung des Einsatzes einer THS eingesetzt werden.

Es wird davon berichtet, dass Dystonien mit Tremor, wie es bei *ANO3* häufig (57,1%) der Fall ist, ein besseres Ansprechen auf eine Stimulation des Thalamus zeigen (Jinnah et al., 2017). Ob dadurch das Spektrum erfolgreich behandelbarer Patienten tatsächlich erweitert werden kann, wurde bisher nicht geprüft. Insgesamt muss jedoch mit der Invasivität dieser Therapie abgewogen werden. So können neben mit dem Eingriff verbundenen Risiken wie Infektionen auch motorische Nebenwirkungen wie Dysarthrie bis hin zu Parkinsonismus auftreten (Macerollo et al., 2020). Auch bei einem Patienten aus der Literatur zu *ANO3* wurden bei Nachlassen des anfänglichen Erfolges die Elektrodenpositionen auf den Subthalamus und den Gyrus dentatus erweitert, mussten bei Intoleranz und fehlendem Benefit jedoch abgeschaltet werden (Miocinovic et al., 2020).

Bei der genetischen Untersuchung der Familienmitglieder von Variantenträgern wirkt sich nicht nur das Auftreten *de novo*, sondern auch die Segregation einer Variante mit der Erkrankung bestätigend bei der Beurteilung der Pathogenität aus (Richards et al., 2015). Leider war ein solcher Nachweis aufgrund fehlender Proben von (betroffenen) Verwandten der Patienten aus der *GenePanel*-Untersuchung nicht möglich. Von den 53 in die MDSGene-Datenbank eingeschlossenen Patienten stammten allerdings 25 Variantenträger aus acht Familien, für die die Segregation geprüft wurde. Bei fünf dieser Familien wurden sogar drei Generationen betrachtet, bei den restlichen drei Familien nur zwei Generationen. Dabei zeigte sich nur in einer Familie (Miltgen et al., 2016) eine Abweichung in Form eines asymptomatischen Variantenträgers, welcher allerdings zum Untersuchungszeitpunkt jünger als das Erkrankungsalter der betroffenen Familienmitglieder war. Das heißt, es ist nicht auszuschließen, dass der Proband zunächst eine reduzierte Penetranz aufweist und im Verlauf noch erkranken könnte. Das Ergebnis einer Nachuntersuchung wäre daher interessant. Insgesamt kann die Segregation innerhalb mehrerer Familien in der Literatur als Argument für die Rolle dieser *ANO3*-Varianten bei Dystonien gewertet werden.

Diesen Argumenten für eine krankheitsverursachende Rolle bei Dystonien steht die Häufigkeit von *ANO3*-Varianten in Kontrollpopulationen gegenüber. In dieser Arbeit fanden sich seltene, proteinverändernde *ANO3*-Varianten bei 1,0% (7/729) der Dystonie-Patienten und 0,7% (2/294) der PS-Patienten. Damit bestand kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens von *ANO3*-Varianten

zwischen diesen beiden Gruppen ($p=1,0$ bei $\alpha=0,05$), die Häufigkeit bei den PS-Patienten überschritt zudem diese in einer Studienpopulation von Patienten mit primärer Torsionsdystonie (0,5%, (Zech et al., 2014)). In der Diskussion dessen müssen allerdings die Einschlusskriterien bedacht werden. So wurden in einer chinesischen Studienpopulation *ANO3*-Varianten in einem höheren Anteil (2,1%, 4/187, $p=0,25$) der Dystonie-Patienten nachgewiesen (Li et al., 2019). Dies kann teilweise durch den Ausschluss von *TOR1A*- und *THAP1*-Variantenträgern schon vor der Testung erklärt werden, ähnelt jedoch auch dem Anteil von Variantenträgern in der hier getesteten asiatischen Population (2,6%, 2/75). Daher kann ein Einfluss der Ethnizität auf die Häufigkeit von *ANO3*-Varianten als Hypothese gestellt werden. Dies muss wiederum bei der ausschließlich deutschen PS-Stichprobe gegenüber der Dystonie-Population mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft in dieser Arbeit bedacht werden, wobei bei höheren Anteilen in der asiatischen Bevölkerung sogar eher mit einem höheren tatsächlichen Prozentsatz in einer ethnisch gematchten PS-Stichprobe zu rechnen wäre.

Die naheliegendste Erklärung für das Auftreten von seltenen *ANO3*-Varianten bei PS-Patienten ist, dass diese Varianten nicht ursächlich für die Erkrankung, sondern Zufallsbefunde sind. Dies wird durch fehlende Segregation und Rekurrenz dieser Varianten unterstützt (Olschewski et al., 2019). Diese Hypothese schürt allerdings Zweifel an dem Einfluss von *ANO3*-Varianten auf die Entstehung einer Dystonie bei einigen der Dystonie-Patienten, da konsequenterweise auch dort ein zufälliger Befund nicht auszuschließen wäre. Schließlich war kein Unterschied in den verschiedenen angewendeten Pathogenitätsscores (CADD, ACMG, MDSGene) zu eruieren, der die Bedeutung der Varianten der PS-Patienten gemindert hätte. Mehr Klarheit brächten funktionelle Studien. Das Vorhandensein von Varianten in mit Dystonien assoziierten Genen wurde zwar ausgeschlossen, dennoch ist es denkbar, dass Varianten in anderen, bisher noch nicht in diesem Zusammenhang erforschten und daher nicht in das *GenePanel* aufgenommenen Genen, wie z.B. dem kürzlich identifizierten *VPS16*-Gen (Steel et al., 2020), eigentlich krankheitsverursachend und die *ANO3*-Varianten nur zufällige Nebenfunde sind.

S. Miocinovic und Kollegen erklärten den schweren Krankheitsverlauf eines Patienten mit dem gemeinsamen Auftreten von *TOR1A*- und *ANO3*-Varianten (Miocinovic et al., 2020). Ein ähnlicher Ansatz ist auch für die PS-Patienten in dieser

Studie denkbar, insbesondere, da ein Parkinsonismus als Symptom auch für zwei andere *ANO3*-Variantenträger beschrieben wurde (Kuo et al., 2019; Nelin et al., 2018). So könnte hier der Parkinsonismus durch die *ANO3*-Varianten in Verbindung mit einem genetischen oder idiopathischen PS verstärkt sein.

Auffällig war zudem das Auftreten der Variante p.Met263Val (c.787A>G) sowohl bei einer Patientin mit generalisierter, mit Myoklonus kombinierter Dystonie in der Literatur (Li et al., 2019) als auch bei einer PS-Patientin (L-11353) von der *GenePanel*-Untersuchung der vorliegenden Arbeit. Dies kann auch auf eine variable Expressivität hinweisen. Dieser Begriff beschreibt einen unterschiedlichen Phänotyp oder Krankheitsschwere bei gleichem Genotyp (Zlotogora, 2003), in diesem Fall also möglicherweise das Auftreten von Dystonie oder aber von Parkinsonismus als Bewegungsstörung bei einer Variante in *ANO3*. Ein solcher Befund ist bereits bei *GCH1*-Varianten bekannt, welche selbst innerhalb einer Familie sowohl bei Patienten mit Dopa-responsiver Dystonie (DRD) als auch bei an PS Erkrankten vorkamen (Ceravolo et al., 2013; Yoshino et al., 2018). Auch dort wird allerdings das Vorkommen reduzierter Penetranz für *GCH1* mit zusätzlicher Variante in einem anderen Gen bei den PS-Patienten diskutiert (Lewthwaite et al., 2015). Dennoch können diese Ansätze auch für *ANO3* in Betracht gezogen werden, Familienmitglieder der Dystonie-Patientin wurden jedoch nicht beschrieben und standen bei den beiden PS-Patienten weder für neurologische noch für genetische Untersuchungen zur Verfügung.

Eine weitere Möglichkeit des Einflusses auf den Phänotyp, d.h. der Penetranz, wird in anderen Genen, wie beispielsweise *SGCE*, dem *Imprinting* zugeschrieben (Wong et al., 2010). Zudem existieren für einige Erkrankungen modifizierende oder protektive Varianten, die Penetranz und Expressivität pathogener Varianten beeinflussen (Harper et al., 2015). So zeigen beispielsweise Träger der D216H-Variante in *TOR1A* eine deutlich reduzierte Penetranz dystoner Symptome bei GAG-Deletionen, den häufigsten krankheitsverursachenden Varianten in *TOR1A* (Kamm et al., 2008). Die D216H-Variante hat allerdings eine Häufigkeit von 12% in der allgemeinen Bevölkerung (Kamm et al., 2008). Eine Variante mit ähnlichem Effekt würde aufgrund des hier verwendeten Filteralgorithmus (MAF < 0,005) bei den beiden PS-Patienten übersehen werden. Die Suche nach einer möglichen gemeinsamen modifizierenden Variante in einer größeren Kohorte nicht-dystoner

Variantenträger könnte daher Aufschluss über Mechanismen reduzierter Penetranz bei *ANO3* geben, war aber nicht Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit.

Zusammenfassend bleibt es schwierig, die Pathogenität einer einzelnen nachgewiesenen *ANO3*-Variante ohne weitere familienbasierte oder funktionelle Informationen zu interpretieren. Für die weitere Beurteilung muss zusätzlich beispielsweise die Segregation betrachtet oder eine schädliche funktionelle Konsequenz nachgewiesen werden (Olschewski et al., 2019; Richards et al., 2015). Es ist aber mittlerweile unstrittig, dass einige *ANO3*-Varianten zu einer Dystonie führen, wobei ein besseres Verständnis des Pathomechanismus wichtig ist, um die Pathogenität jeder einzelnen Variante besser interpretieren zu können.

5 Zusammenfassung

Die Dystonie ist eine seltene Bewegungsstörung, zu deren vielfältigen Ursachen auch genetische Varianten gehören. Pathogene Varianten im *ANO3*-Gen wurden beispielsweise als Ursache einer Dystonie vorgeschlagen. Vor Beginn dieser Arbeit wurden Varianten in diesem Gen meist mit segmentalen oder multifokalen Dystonien mit Tremor und Beteiligung der Halsmuskulatur sowie einem autosomal-dominanten Erbgang in Verbindung gebracht. Die hohe Prävalenz seltener *ANO3*-Varianten auch in Kontrollpopulationen hinterließ zunächst jedoch Zweifel an deren pathogenen Effekt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle von *ANO3*-Varianten bei Dystonien zu evaluieren.

Dazu kamen zwei Strategien zur Anwendung, und zwar eine Mutationsanalyse bei Dystonie- und Nicht-Dystonie-Patienten sowie eine umfassende und detaillierte Literaturrecherche. Konkret wurde ein Screening nach seltenen, proteinverändernden *ANO3*-Varianten mittels *Next Generation Sequencing*-basierter *GenePanel*-Analyse bei 729 Dystonie- und 294 Patienten mit einem Parkinson-Syndrom (PS) als Nicht-Dystonie-/Kontrollgruppe durchgeführt und gefundene Varianten mittels Sanger-Sequenzierung validiert. Für eine Patientin konnte eine Segregationsanalyse in der Familie durchgeführt werden. Ein weiterer Patient sowie dessen Eltern standen für eine weitere *GenePanel*-Untersuchung zur Verfügung. Außerdem wurde eine systematische Literaturrecherche nach den Kriterien der MDSGene-Datenbank durchgeführt.

Im Rahmen des *GenePanels* konnten sieben verschiedene Varianten bei neun Patienten validiert werden. Dabei handelte es sich um sieben Dystonie- und zwei PS-Patienten. Es gab keinen signifikanten Unterschied der Häufigkeit von *ANO3*-Varianten zwischen diesen beiden Gruppen (1,0% vs. 0,7%). Zwei der Varianten traten bei jeweils zwei Dystonie-Patienten und damit in höherer Häufigkeit als bei den Bevölkerungskontrollen der gnomAD-Datenbank auf (Olschewski et al., 2019). Für eine Patientin mit generalisierter, im Kindesalter beginnender Dystonie konnte das Auftreten der *ANO3*-Variante *de novo* nachgewiesen werden (Olschewski et al., 2019). Auch der zusätzlich untersuchte Patient wies eine *de-novo* Variante und phänotypisch eine generalisierte Dystonie mit frühem Erkrankungsbeginn auf (Tunc et al., 2019). In der Literaturrecherche wurden 53 Patienten mit *ANO3*-Varianten

identifiziert. Hierbei verdeutlichte sich das Bild der meist segmentalen oder multifokalen Dystonie mit Beteiligung des Halses, sowie ein schwererer Verlauf bei de-novo Varianten im Sinne einer generalisierten, früh beginnenden Dystonie in häufiger Assoziation mit einem Myoklonus (Lange et al., 2021).

Insgesamt konnte bestätigt werden, dass einzelne *ANO3*-Varianten eine Dystonie verursachen können. Es wurde allerdings auch deutlich, dass nicht alle seltenen *ANO3*-Varianten pathogen sind und die Interpretation im Einzelfall schwierig ist. Segregationsanalysen in den Familien und funktionelle Untersuchungen wären hierbei ein Schlüssel zu einer verbesserten Interpretation und aussagekräftigen Beratung von betroffenen Patienten und deren Familien.

Literaturverzeichnis

- Acuna-Hidalgo, R., Veltman, J.A., Hoischen, A., 2016. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol* 17, 241.
- Albanese, A., Bhatia, K., Bressman, S.B., DeLong, M.R., Fahn, S., Fung, V.S.C., Hallett, M., Jankovic, J., Jinnah, H.A., Klein, C., Lang, A.E., Mink, J.W., Teller, J.K., 2013. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord* 28, 863–873.
- Albanese, A., Di Giovanni, M., Lalli, S., 2019. Dystonia: diagnosis and management. *Eur J Neurol* 26, 5–17.
- Alekseyev, Y.O., Fazeli, R., Yang, S., Basran, R., Maher, T., Miller, N.S., Remick, D., 2018. A Next-Generation Sequencing Primer—How Does It Work and What Can It Do? *Acad Pathol* 5, 2374289518766521.
- Alfares, A., Aloraini, T., Subaie, L.A., Alissa, A., Qudsi, A.A., Alahmad, A., Mutairi, F.A., Alswaid, A., Alothaim, A., Eyaid, W., Albalwi, M., Alturki, S., Alfadhel, M., 2018. Whole-genome sequencing offers additional but limited clinical utility compared with reanalysis of whole-exome sequencing. *Genet Med* 20, 1328–1333.
- Amendola, L.M., Jarvik, G.P., Leo, M.C., McLaughlin, H.M., Akkari, Y., Amaral, M.D., Berg, J.S., Biswas, S., Bowling, K.M., Conlin, L.K., Cooper, G.M., Dorschner, M.O., Dulik, M.C., Ghazani, A.A., Ghosh, R., Green, R.C., Hart, R., Horton, C., Johnston, J.J., Lebo, M.S., Milosavljevic, A., Ou, J., Pak, C.M., Patel, R.Y., Punj, S., Richards, C.S., Salama, J., Strande, N.T., Yang, Y., Plon, S.E., Biesecker, L.G., Rehm, H.L., 2016. Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *Am J Hum Genet* 98, 1067–1076.
- Balint, B., Bhatia, K.P., 2014. Dystonia: an update on phenomenology, classification, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Neurol* 27, 468–476.
- Balint, B., Bhatia, K.P., 2015. Isolated and combined dystonia syndromes - an update on new genes and their phenotypes. *Eur J Neurol* 22, 610–617.
- Balint, B., Mencacci, N.E., Valente, E.M., Pisani, A., Rothwell, J., Jankovic, J., Vidailhet, M., Bhatia, K.P., 2018. Dystonia. *Nat Rev Dis Primers* 4, 25.

- Bamshad, M.J., Ng, S.B., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Emond, M.J., Nickerson, D.A., Shendure, J., 2011. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 12, 745–755.
- Barbitoff, Y.A., Polev, D.E., Glotov, A.S., Serebryakova, E.A., Shcherbakova, I.V., Kiselev, A.M., Kostareva, A.A., Glotov, O.S., Predeus, A.V., 2020. Systematic dissection of biases in whole-exome and whole-genome sequencing reveals major determinants of coding sequence coverage. *Sci Rep* 10, 2057.
- Baskaran, N., Kandpal, R.P., Bhargava, A.K., Glynn, M.W., Bale, A., Weissman, S.M., 1996. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res* 6, 633–638.
- Baumann, H., Ott, F., Weber, J., Trilck-Winkler, M., Münchau, A., Zittel, S., Kostić, V.S., Kaiser, F.J., Klein, C., Busch, H., Seibler, P., Lohmann, K., 2021. Linking Penetrance and Transcription in DYT-THAP1: Insights From a Human iPSC-Derived Cortical Model. *Mov Disord* 36, 1381–1391.
- Bender, R., Lange, S., 2001. Adjusting for multiple testing—when and how? *J Clin Epidemiol* 54, 343–349.
- Bervers, E.M., Williamson, P.L., 2010. Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett* 584, 2724–2730.
- Bezerra, T.C., Novaretti, N., Cunha, A.L.N., Pereira, M.A.P., Oliveira, D.S. de, Brito, M.C.M., Pimentel, Â.V., Tumas, V., 2018. Epidemiological and clinical aspects of a sample of Brazilian patients with primary dystonia and the impact of the new classification on their clinical evaluation. *Arq Neuropsiquiatr* 76, 821–826.
- Blackburn, P.R., Zimmermann, M.T., Gass, J.M., Harris, K.G., Cousin, M.A., Boczek, N.J., Ross, O.A., Klee, E.W., Brazis, P.W., Van Gerpen, J.A., Atwal, P.S., 2016. A novel ANO3 variant identified in a 53-year-old woman presenting with hyperkinetic dysarthria, blepharospasm, hyperkinesias, and complex motor tics. *BMC Med Genet* 17, 93.
- Borngräber, F., 2017. Identifizierung genetischer Ursachen der Musikerdystonie. *Med. Diss. Lübeck*.
- Boycott, K.M., Vanstone, M.R., Bulman, D.E., MacKenzie, A.E., 2013. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet* 14, 681–691.

- Breakefield, X.O., Blood, A.J., Li, Y., Hallett, M., Hanson, P.I., Standaert, D.G., 2008. The pathophysiological basis of dystonias. *Nat Rev Neurosci* 9, 222–234.
- Brunner, J.D., Schenck, S., Dutzler, R., 2016. Structural basis for phospholipid scrambling in the TMEM16 family. *Curr Opin Struct Biol* 39, 61–70.
- CADD, n.d. URL <https://cadd.gs.washington.edu/info> (Tag des Zugriffs: 26.10.20).
- Camfield, L., Ben-Shlomo, Y., Warner, T.T., Epidemiological Study of Dystonia in Europe Collaborative Group, 2002. Impact of cervical dystonia on quality of life. *Mov Disord* 17, 838–841.
- Ceravolo, R., Nicoletti, V., Garavaglia, B., Reale, C., Kiferle, L., Bonuccelli, U., 2013. Expanding the clinical phenotype of DYT5 mutations: Is multiple system atrophy a possible one? *Neurology* 81, 301–302.
- Charlesworth, G., Bhatia, K.P., 2013. Primary and secondary dystonic syndromes: an update. *Curr Opin Neurol* 26, 406–412.
- Charlesworth, G., Bhatia, K.P., Wood, N.W., 2013. The genetics of dystonia: new twists in an old tale. *Brain* 136, 2017–2037.
- Charlesworth, G., Plagnol, V., Holmström, K.M., Bras, J., Sheerin, U.-M., Preza, E., Rubio-Agusti, I., Ryten, M., Schneider, S.A., Stamelou, M., Trabzuni, D., Abramov, A.Y., Bhatia, K.P., Wood, N.W., 2012. Mutations in ANO3 cause dominant craniocervical dystonia: ion channel implicated in pathogenesis. *Am J Hum Genet* 91, 1041–1050.
- Delamarre, A., Chelly, J., Guehl, D., Drouot, N., Tranchant, C., Anheim, M., Burbaud, P., 2019. Novel anoctamin-3 missense mutation responsible for early-onset myoclonic dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 64, 346–348.
- Domingo, A., Erro, R., Lohmann, K., 2016. Novel Dystonia Genes: Clues on Disease Mechanisms and the Complexities of High-Throughput Sequencing. *Mov Disord* 31, 471–477.
- Domingo, A., Yadav, R., Ozelius, L.J., 2021. Isolated dystonia: clinical and genetic updates. *J Neural Transm (Vienna)* 128, 405–416.
- Drexel, S.C., Kliez, M., Kollwe, K., Paracka, L., Kutschenko, A., Kopp, B., Lange, F., Wegner, F., Dressler, D., 2020. Caregiver burden and health-related quality of life in idiopathic dystonia patients under botulinum toxin treatment: a cross-sectional study. *J Neural Transm (Vienna)* 127, 61–70.

- Duran, C., Qu, Z., Osunkoya, A.O., Cui, Y., Hartzell, H.C., 2012. ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16 Cl⁻ channel family are intracellular proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C482-493.
- Ensembl genome browser 97, n.d. URL <http://www.ensembl.org/index.html> (Tag des Zugriffs: 01.09.19).
- Feenstra, B., Pasternak, B., Geller, F., Carstensen, L., Wang, T., Huang, F., Eitson, J.L., Hollegaard, M.V., Svanström, H., Vestergaard, M., Hougaard, D.M., Schoggins, J.W., Jan, L.Y., Melbye, M., Hviid, A., 2014. Common variants associated with general and MMR vaccine-related febrile seizures. *Nat Genet* 46, 1274–1282.
- Fernández-Marmiesse, A., Gouveia, S., Couce, M.L., 2018. NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research, Diagnosis and Treatment. *Curr Med Chem* 25, 404–432.
- Frank, M., Prenzler, A., Eils, R., Graf von der Schulenburg, J.-M., 2013. Genome sequencing: a systematic review of health economic evidence. *Health Econ Rev* 3, 29.
- Fuchs, T., Ozelius, L.J., 2013. Genetics in dystonia: an update. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13, 410.
- Gan-Or, Z., Mencacci, N.E., Nalls, M.A., 2019. Dystonia; a roadmap is needed for future genetic studies. *Parkinsonism Relat Disord* 58, 9–11.
- Ghosh, R., Oak, N., Plon, S.E., 2017. Evaluation of in silico algorithms for use with ACMG/AMP clinical variant interpretation guidelines. *Genome Biol* 18, 225.
- gnomAD, n.d. URL <https://gnomad.broadinstitute.org/> (Tag des Zugriffs: 26.10.20).
- Goldmann, J.M., Wong, W.S.W., Pinelli, M., Farrah, T., Bodian, D., Stittrich, A.B., Glusman, G., Vissers, L.E.L.M., Hoischen, A., Roach, J.C., Vockley, J.G., Veltman, J.A., Solomon, B.D., Gilissen, C., Niederhuber, J.E., 2016. Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. *Nat Genet* 48, 935–939.
- Graham, O.E.E., Pitcher, T.L., Liao, Y., Miller, A.L., Dalrymple-Alford, J.C., Anderson, T.J., Kennedy, M.A., 2020. Nanopore sequencing of the glucocerebrosidase (GBA) gene in a New Zealand Parkinson's disease cohort. *Parkinsonism Relat Disord* 70, 36–41.
- Greenland, S., Senn, S.J., Rothman, K.J., Carlin, J.B., Poole, C., Goodman, S.N., Altman, D.G., 2016. Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *Eur J Epidemiol* 31, 337–350.

- Hamdan, F.F., Myers, C.T., Cossette, P., Lemay, P., Spiegelman, D., Laporte, A.D., Nassif, C., Diallo, O., Monlong, J., Cadieux-Dion, M., Dobrzeniecka, S., Meloche, C., Retterer, K., Cho, M.T., Rosenfeld, J.A., Bi, W., Massicotte, C., Miguet, M., Brunga, L., Regan, B.M., Mo, K., Tam, C., Schneider, A., Hollingsworth, G., FitzPatrick, D.R., Donaldson, A., Canham, N., Blair, E., Kerr, B., Fry, A.E., Thomas, R.H., Shelagh, J., Hurst, J.A., Brittain, H., Blyth, M., Lebel, R.R., Gerkes, E.H., Davis-Keppen, L., Stein, Q., Chung, W.K., Dorison, S.J., Benke, P.J., Fassi, E., Corsten-Janssen, N., Kamsteeg, E.-J., Mau-Them, F.T., Bruel, A.-L., Verloes, A., Öunap, K., Wojcik, M.H., Albert, D.V.F., Venkateswaran, S., Ware, T., Jones, D., Liu, Y.-C., Mohammad, S.S., Bizargity, P., Bacino, C.A., Leuzzi, V., Martinelli, S., Dallapiccola, B., Tartaglia, M., Blumkin, L., Wierenga, K.J., Purcarin, G., O'Byrne, J.J., Stockler, S., Lehman, A., Keren, B., Nougues, M.-C., Mignot, C., Auvin, S., Nava, C., Hiatt, S.M., Bebin, M., Shao, Y., Scaglia, F., Lalani, S.R., Frye, R.E., Jarjour, I.T., Jacques, S., Boucher, R.-M., Riou, E., Srour, M., Carmant, L., Lortie, A., Major, P., Diadori, P., Dubeau, F., D'Anjou, G., Bourque, G., Berkovic, S.F., Sadleir, L.G., Campeau, P.M., Kibar, Z., Lafrenière, R.G., Girard, S.L., Mercimek-Mahmutoglu, S., Boelman, C., Rouleau, G.A., Scheffer, I.E., Mefford, H.C., Andrade, D.M., Rossignol, E., Minassian, B.A., Michaud, J.L., 2017. High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Am J Hum Genet* 101, 664–685.
- Harper, A.R., Nayee, S., Topol, E.J., 2015. Protective alleles and modifier variants in human health and disease. *Nat Rev Genet* 16, 689–701.
- Hoffman-Andrews, L., 2017. The known unknown: the challenges of genetic variants of uncertain significance in clinical practice. *J Law Biosci* 4, 648–657.
- Homsy, J., Zaidi, S., Shen, Y., Ware, J.S., Samocha, K.E., Karczewski, K.J., DePalma, S.R., McKean, D., Wakimoto, H., Gorham, J., Jin, S.C., Deanfield, J., Giardini, A., Porter, G.A., Kim, R., Bilguvar, K., Lopez, F., Tikhonova, I., Mane, S., Romano-Adesman, A., Qi, H., Vardarajan, B., Ma, L., Daly, M., Roberts, A.E., Russell, M.W., Mital, S., Newburger, J.W., Gaynor, J.W., Breitbart, R.E., Iossifov, I., Ronemus, M., Sanders, S.J., Kaltman, J.R., Seidman, J.G., Brueckner, M., Gelb, B.D., Goldmuntz, E., Lifton, R.P., Seidman, C.E., Chung, W.K., 2015. De novo mutations in Congenital Heart

- Disease with Neurodevelopmental and Other Birth Defects. *Science* 350, 1262–1266.
- Hopfner, F., Bungeroth, M., Pendziwiat, M., Tittmann, L., Deuschl, G., Schneider, S.A., Kuhlenbäumer, G., 2014. Rare variants in ANO3 are not a susceptibility factor in essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 20, 134–135.
- Huang, F., Wang, X., Ostertag, E.M., Nuwal, T., Huang, B., Jan, Y.-N., Basbaum, A.I., Jan, L.Y., 2013. TMEM16C facilitates Na(+)-activated K⁺ currents in rat sensory neurons and regulates pain processing. *Nat Neurosci* 16, 1284–1290.
- Huang, T., Shu, Y., Cai, Y.-D., 2015. Genetic differences among ethnic groups. *BMC Genomics* 16, 1093.
- HUGO Gene Nomenclature Committee, n.d. URL <https://www.genenames.org/> (Tag des Zugriffs: 06.04.21).
- Illumina, 2015. An introduction to next-generation sequencing technology. URL https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf (Tag des Zugriffs: 07.06.20)
- Im, E.-H., Choi, S.S., 2017. Synonymous Codon Usage Controls Various Molecular Aspects. *Genomics Inform* 15, 123–127.
- Im, E.-H., Hahn, Y., Choi, S.S., 2018. Functional relevance of synonymous alleles reflected in allele rareness in the population. *Genomics* 110, 347–354.
- Jinnah, H.A., Alterman, R., Klein, C., Krauss, J.K., Moro, E., Vidailhet, M., Raïke, R., 2017. Deep brain stimulation for dystonia: a novel perspective on the value of genetic testing. *J Neural Transm (Vienna)* 124, 417–430.
- Jinnah, H.A., Sun, Y.V., 2019. Dystonia genes and their biological pathways. *Neurobiol Dis* 129, 159–168.
- Kamm, C., Fischer, H., Garavaglia, B., Kullmann, S., Sharma, M., Schrader, C., Grundmann, K., Klein, C., Borggraefe, I., Lobsien, E., Kupsch, A., Nardocci, N., Gasser, T., 2008. Susceptibility to DYT1 dystonia in European patients is modified by the D216H polymorphism. *Neurology* 70, 2261–2262.
- Kasten, M., Hartmann, C., Hampf, J., Schaake, S., Westenberger, A., Vollstedt, E.-J., Balck, A., Domingo, A., Vulinovic, F., Dulovic, M., Zorn, I., Madoev, H., Zehnle, H., Lembeck, C.M., Schawe, L., Reginold, J., Huang, J., König, I.R., Bertram, L., Marras, C., Lohmann, K., Lill, C.M., Klein, C., 2018. Genotype-

- Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes *Parkin* , *PINK1* , *DJ1*: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord* 33, 730–741.
- Katoh, Masuko, Katoh, Masaru, 2003. FLJ10261 gene, located within the CCND1-EMS1 locus on human chromosome 11q13, encodes the eight-transmembrane protein homologous to C12orf3, C11orf25 and FLJ34272 gene products. *Int J Oncol* 22, 1375–1381.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., Haussler, D., 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12, 996–1006.
- Kircher, M., Witten, D.M., Jain, P., O’Roak, B.J., Cooper, G.M., Shendure, J., 2014. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 46, 310–315.
- Klein, C., 2014. Genetics in dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 20 Suppl 1, S137-142.
- Klein, C., Hattori, N., Marras, C., 2018. MDSGene: Closing Data Gaps in Genotype-Phenotype Correlations of Monogenic Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 8, S25–S30.
- Kloosterman, W.P., Francioli, L.C., Hormozdiari, F., Marschall, T., Hehir-Kwa, J.Y., Abdellaoui, A., Lameijer, E.-W., Moed, M.H., Koval, V., Renkens, I., van Roosmalen, M.J., Arp, P., Karssen, L.C., Coe, B.P., Handsaker, R.E., Suchiman, E.D., Cuppen, E., Thung, D.T., McVey, M., Wendl, M.C., Genome of Netherlands Consortium, Uitterlinden, A., van Duijn, C.M., Swertz, M.A., Wijmenga, C., van Ommen, G.B., Slagboom, P.E., Boomsma, D.I., Schönhuth, A., Eichler, E.E., de Bakker, P.I.W., Ye, K., Guryev, V., 2015. Characteristics of de novo structural changes in the human genome. *Genome Res* 25, 792–801.
- Kosmicki, J.A., Samocha, K.E., Howrigan, D.P., Sanders, S.J., Slowikowski, K., Lek, M., Karczewski, K.J., Cutler, D.J., Devlin, B., Roeder, K., Buxbaum, J.D., Neale, B.M., MacArthur, D.G., Wall, D.P., Robinson, E.B., Daly, M.J., 2017. Refining the role of de novo protein-truncating variants in neurodevelopmental disorders by using population reference samples. *Nat Genet* 49, 504–510.
- Kumar, K.R., Cowley, M.J., Davis, R.L., 2019. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost* 45, 661–673.

- Kunzelmann, K., Cabrita, I., Wanitchakool, P., Ousingsawat, J., Sirianant, L., Benedetto, R., Schreiber, R., 2016. Modulating Ca²⁺ signals: a common theme for TMEM16, Ist2, and TMC. *Pflugers Arch* 468, 475–490.
- Kuo, M.-C., Lin, H.-I., Lin, C.-H., 2019. Craniocervical dystonia with levodopa-responsive parkinsonism co-segregating with a pathogenic ANO3 mutation in a Taiwanese family. *Parkinsonism Relat Disord* 62, 236–238.
- Kuulasma, T., 2002. *Oligo explorer*. University of Kuopio, Kuopio.
- Lange, L.M., Junker, J., Loens, S., Baumann, H., Olschewski, L., Schaake, S., Madoev, H., Petkovic, S., Kuhnke, N., Kasten, M., Westenberger, A., Domingo, A., Marras, C., König, I.R., Camargos, S., Ozelius, L.J., Klein, C., Lohmann, K., 2021. Genotype-Phenotype Relations for Isolated Dystonia Genes: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord* 36, 1086–1103.
- Lasky, L., Bliss, L., Sidiropoulos, C., 2019. Successful Pallidal Deep Brain Stimulation Treatment in a Case of Generalized Dystonia due to a Novel ANO3 Mutation. *Case Rep Neurol Med* 2019, 3154653.
- Laurencin, C., Broussolle, E., Danaila, T., Anheim, M., Chelly, J., Thobois, S., 2019. A novel heterozygous ANO3 mutation responsible for myoclonic dystonia. *J Neurol Sci* 403, 65–66.
- Levy, S.E., Boone, B.E., 2019. Next-Generation Sequencing Strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9, a025791.
- Lewthwaite, A.J., Lambert, T.D., Rolfe, E.B., Olgati, S., Quadri, M., Simons, E.J., Morrison, K.E., Bonifati, V., Nicholl, D.J., 2015. Novel GCH1 variant in Dopa-responsive dystonia and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 21, 394–397.
- Li, S., Wang, L., Yang, Y., Ma, J., Wan, X., 2019. ANO3 Mutations in Chinese Dystonia: A Genetic Screening Study Using Next-Generation Sequencing. *Front Neurol* 10, 1351.
- Lill, C.M., Mashychev, A., Hartmann, C., Lohmann, K., Marras, C., Lang, A.E., Klein, C., Bertram, L., 2016. Launching the movement disorders society genetic mutation database (MDSGene). *Mov Disord* 31, 607–609.
- Lim, V.K., 2007. Health related quality of life in patients with dystonia and their caregivers in New Zealand and Australia. *Mov Disord* 22, 998–1003.
- Lizarraga, K.J., Al-Shorafat, D., Fox, S., 2019. Update on current and emerging therapies for dystonia. *Neurodegener Dis Manag* 9, 135–147.

- Löchte, T., 2018. Untersuchungen zur Identifizierung genetischer Ursachen des Parkinson-Syndroms. Med. Diss. Lübeck.
- Lohmann, K., Klein, C., 2013. Genetics of dystonia: what's known? What's new? What's next? *Mov Disord* 28, 899–905.
- Lohmann, K., Klein, C., 2014. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics* 11, 699–707.
- Lohmann, K., Klein, C., 2017. Update on the Genetics of Dystonia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17, 26.
- Lohmann, K., Schmidt, A., Schillert, A., Winkler, S., Albanese, A., Baas, F., Bentivoglio, A.R., Borngräber, F., Brüggemann, N., Defazio, G., Del Sorbo, F., Deuschl, G., Edwards, M.J., Gasser, T., Gómez-Garre, P., Graf, J., Groen, J.L., Grünewald, A., Hagenah, J., Hemmelmann, C., Jabusch, H.-C., Kaji, R., Kasten, M., Kawakami, H., Kostic, V.S., Liguori, M., Mir, P., Münchau, A., Ricchiuti, F., Schreiber, S., Siegesmund, K., Svetel, M., Tijssen, M.A.J., Valente, E.M., Westenberger, A., Zeuner, K.E., Zittel, S., Altenmüller, E., Ziegler, A., Klein, C., 2014. Genome-wide association study in musician's dystonia: a risk variant at the arylsulfatase G locus? *Mov Disord* 29, 921–927.
- Ma, J., Wang, L., Yang, Y.-M., Wan, X.-H., 2018. Targeted gene capture sequencing in diagnosis of dystonia patients. *J Neurol Sci* 390, 36–41.
- Ma, L.-Y., Wang, L., Yang, Y.-M., Feng, T., Wan, X.-H., 2015. Mutations in ANO3 and GNAL gene in thirty-three isolated dystonia families. *Mov Disord* 30, 743–744.
- MacArthur, D.G., Manolio, T.A., Dimmock, D.P., Rehm, H.L., Shendure, J., Abecasis, G.R., Adams, D.R., Altman, R.B., Antonarakis, S.E., Ashley, E.A., Barrett, J.C., Biesecker, L.G., Conrad, D.F., Cooper, G.M., Cox, N.J., Daly, M.J., Gerstein, M.B., Goldstein, D.B., Hirschhorn, J.N., Leal, S.M., Pennacchio, L.A., Stamatoyannopoulos, J.A., Sunyaev, S.R., Valle, D., Voight, B.F., Winckler, W., Gunter, C., 2014. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 508, 469–476.
- Macerollo, A., Sajin, V., Bonello, M., Barghava, D., Alusi, S.H., Eldridge, P.R., Osman-Farah, J., 2020. Deep brain stimulation in dystonia: State of art and future directions. *J Neurosci Methods* 340, 108750.

- Marras, C., Lang, A., van de Warrenburg, B.P., Sue, C.M., Tabrizi, S.J., Bertram, L., Mercimek-Mahmutoglu, S., Ebrahimi-Fakhari, D., Warner, T.T., Durr, A., Assmann, B., Lohmann, K., Kostic, V., Klein, C., 2016. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov Disord* 31, 436–457.
- Mascha, E.J., Vetter, T.R., 2018. Significance, Errors, Power, and Sample Size: The Blocking and Tackling of Statistics. *Anesth Analg* 126, 691–698.
- MDSGene, n.d. URL <http://mdsgene.org/> (Tag des Zugriffs: 07.07.21).
- Meinck, H.-M., 2007. Myoklonien. *Nervenarzt* 78, 209–223.
- Miltgen, M., Blanchard, A., Mathieu, H., Kreisler, A., Jean-Pierre-Desvignes, null, Salgado, D., Roubertie, A., Barre, L., Rai, G., Blanck, V., Frederic, M., Douay, X., Mazzolenni, R., Charpentier, P., Gonzalez, V., Destée, A., Béroud, C., Collod-Bérout, G., 2016. Novel heterozygous mutation in ANO3 responsible for craniocervical dystonia. *Mov Disord* 31, 1251–1252.
- Miocinovic, S., Vengoechea, J., LeDoux, M.S., Isbaine, F., Jinnah, H.A., 2020. Combined occurrence of deleterious TOR1A and ANO3 variants in isolated generalized dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 73, 55–56.
- Mok, K.Y., Schneider, S.A., Trabzuni, D., Stamelou, M., Edwards, M., Kasperaviciute, D., Pickering-Brown, S., Silverdale, M., Hardy, J., Bhatia, K.P., 2014. Genomewide association study in cervical dystonia demonstrates possible association with sodium leak channel. *Mov Disord* 29, 245–251.
- Morgante, F., Klein, C., 2013. Dystonia. *Continuum (Minneapolis Minn)* 19, 1225–1241.
- Müller, B., Hedrich, K., Kock, N., Dragasevic, N., Svetel, M., Garrels, J., Landt, O., Nitschke, M., Pramstaller, P.P., Reik, W., Schwinger, E., Sperner, J., Ozelius, L., Kostic, V., Klein, C., 2002a. Evidence That Paternal Expression of the ϵ -Sarcoglycan Gene Accounts for Reduced Penetrance in Myoclonus-Dystonia. *Am J Hum Genet* 71, 1303–1311.
- Müller, J., Kiechl, S., Wenning, G.K., Seppi, K., Willeit, J., Gasperi, A., Wissel, J., Gasser, T., Poewe, W., 2002b. The prevalence of primary dystonia in the general community. *Neurology* 59, 941–943.
- Münchau, A., Valente, E.M., Davis, M.B., Stinton, V., Wood, N.W., Quinn, N.P., Bhatia, K.P., 2000. A Yorkshire family with adult-onset cranio-cervical primary torsion dystonia. *Mov Disord* 15, 954–959.

- Muzzey, D., Evans, E.A., Lieber, C., 2015. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep* 3, 158–165.
- Nagata, S., Hanayama, R., Kawane, K., 2010. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* 140, 619–630.
- Nelin, S., Hussey, R., Faux, B.M., Rohena, L., 2018. Youngest presenting patient with dystonia 24 and review of the literature. *Clin Case Rep* 6, 2070–2074.
- Nichols, N.M., Tanner, N.A., n.d. Using aptamers to control enzyme activities: Hot Start Taq and beyond. URL <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/using-aptamers-to-control-enzyme-activities-hot-start-taq-and-beyond> (Tag des Zugriffs: 05.09.19).
- NNSPLICE, n.d. URL https://fruitfly.org/seq_tools/spliceHelp.html (Tag des Zugriffs: 23.08.21).
- Olschewski, L., Jesús, S., Kim, H.-J., Tunc, S., Löns, S., Junker, J., Zeuner, K.E., Kühn, A.A., Kuhlenbäumer, G., Schäffer, E., Berg, D., Kasten, M., Ferbert, A., Altenmüller, E., Brüggemann, N., Bauer, P., Rolfs, A., Jeon, B., Bäumer, T., Mir, P., Klein, C., Lohmann, K., 2019. Role of ANO3 mutations in dystonia: A large-scale mutational screening study. *Parkinsonism Relat Disord* 62, 196–200.
- OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man, n.d. URL <https://omim.org/> (Tag des Zugriffs: 17.01.21).
- Oppenheim, H., 1911. Über eine eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica progressiva, Dystonia musculorum deformans). *Neurol Centrabl* 30, 1090–1107.
- Ortiz, R.M., Scheperjans, F., Mertsalmi, T., Pekkonen, E., 2019. Comorbidity and retirement in cervical dystonia. *J Neurol* 266, 2216–2223.
- Pamphlett, R., Morahan, J.M., Yu, B., 2011. Using case-parent trios to look for rare de novo genetic variants in adult-onset neurodegenerative diseases. *J Neurosci Methods* 197, 297–301.
- Petrucci, S., Valente, E.M., 2013. Genetic issues in the diagnosis of dystonias. *Front Neurol* 4, 34.
- Pfeifer, S.P., 2017. From next-generation resequencing reads to a high-quality variant data set. *Heredity (Edinb)* 118, 111–124.

- PhosphoSite, n.d. URL <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=13591&showAllSites=true#appletMsg> (Tag des Zugriffs: 26.10.20).
- Pranckėnienė, L., Jakaitienė, A., Ambrozaitytė, L., Kavaliauskienė, I., Kučinskas, V., 2018. Insights Into de novo Mutation Variation in Lithuanian Exome. *Front Genet* 9, 315.
- PubMed - NCBI, n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Tag des Zugriffs: 01.09.19).
- Rahbari, R., Wuster, A., Lindsay, S.J., Hardwick, R.J., Alexandrov, L.B., Turki, S.A., Dominiczak, A., Morris, A., Porteous, D., Smith, B., Stratton, M.R., UK10K Consortium, Hurles, M.E., 2016. Timing, rates and spectra of human germline mutation. *Nat Genet* 48, 126–133.
- Ran, C., Fourier, C., Arafa, D., Liesecke, F., Sjöstrand, C., Waldenlind, E., Steinberg, A., Belin, A.C., 2019. Anoctamin 3: A Possible Link between Cluster Headache and Ca²⁺ Signaling. *Brain Sci* 9, E184.
- Reese, M.G., Eeckman, F.H., Kulp, D., Haussler, D., 1997. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 4, 311–323.
- Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G.M., Shendure, J., Kircher, M., 2019. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 47, D886–D894.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., 2015. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17, 405–424.
- Richter, T., Nestler-Parr, S., Babela, R., Khan, Z.M., Tesoro, T., Molsen, E., Hughes, D.A., 2015. Rare Disease Terminology and Definitions—A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Health* 18, 906–914.
- Ruskey, J.A., Greenbaum, L., Roncière, L., Alam, A., Spiegelman, D., Liang, C., Levy, O.A., Waters, C., Fahn, S., Marder, K.S., Chung, W., Yahalom, G., Israeli-Korn, S., Livneh, V., Fay-Karmon, T., Alcalay, R.N., Hassin-Baer, S.,

- Gan-Or, Z., 2019. Increased yield of full GBA sequencing in Ashkenazi Jews with Parkinson's disease. *Eur J Med Genet* 62, 65–69.
- Salk, J.J., Schmitt, M.W., Loeb, L.A., 2018. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nat Rev Genet* 19, 269–285.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467.
- Sauerbier, A., Aris, A., Lim, E.W., Bhattacharya, K., Ray Chaudhuri, K., 2018. Impact of ethnicity on the natural history of Parkinson disease. *Med J Aust* 208, 410–414.
- Sauna, Z.E., Kimchi-Sarfaty, C., 2011. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet* 12, 683–691.
- Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M., Seelow, D., 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11, 361–362.
- Shendure, J., Akey, J.M., 2015. The origins, determinants, and consequences of human mutations. *Science* 349, 1478–1483.
- Siokas, V., Aloizou, A.-M., Tsouris, Z., Michalopoulou, A., Mentis, A.-F.A., Dardiotis, E., 2018. Risk Factor Genes in Patients with Dystonia: A Comprehensive Review. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 8, 559.
- Slatko, B.E., Gardner, A.F., Ausubel, F.M., 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 122, e59.
- SNP - NCBI, n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> (Tag des Zugriffs: 19.01.21).
- Solano Atehortúa, J.M., Isaza Jaramillo, S.P., Rendón Bañol, A., Buritica Henao, O., 2016. Prevalence of Dystonia in Antioquia, Colombia. *Neuroepidemiology* 46, 137–143.
- Stamelou, M., Charlesworth, G., Cordivari, C., Schneider, S.A., Kägi, G., Sheerin, U.-M., Rubio-Agusti, I., Batla, A., Houlden, H., Wood, N.W., Bhatia, K.P., 2014. The phenotypic spectrum of DYT24 due to ANO3 mutations. *Mov Disord* 29, 928–934.
- Stamelou, M., Edwards, M.J., Hallett, M., Bhatia, K.P., 2012. The non-motor syndrome of primary dystonia: clinical and pathophysiological implications. *Brain* 135, 1668–1681.

- Steel, D., Zech, M., Zhao, C., Barwick, K.E.S., Burke, D., Demailly, D., Kumar, K.R., Zorzi, G., Nardocci, N., Kaiyrzhanov, R., Wagner, M., Iuso, A., Berutti, R., Škorvánek, M., N MCPál, J., Davis, R., Wiethoff, S., Mankad, K., Sudhakar, S., Ferrini, A., Sharma, S., Kamsteeg, E.-J., Tijssen, M.A., Verschuuren, C., van Egmond, M.E., Flowers, J.M., McEntagart, M., Tucci, A., Coubes, P., Bustos, B.I., Gonzalez-Latapi, P., Tisch, S., Darveniza, P., Gorman, K.M., Peall, K.J., Bötzel, K., Koch, J.C., Kmiec, T., Plecko, B., Boesch, S., Haslinger, B., Jech, R., Garavaglia, B., Wood, N., Houlden, H., Gissen, P., Lubbe, S.J., Sue, C.M., Cif, L., Mencacci, N.E., Anderson, G., Kurian, M.A., Winkelmann, J., Genomics England Research Consortium, 2020. Loss-of-Function Variants in HOPS Complex Genes VPS16 and VPS41 Cause Early Onset Dystonia Associated with Lysosomal Abnormalities. *Ann Neurol* 88, 867–877.
- Steeves, T.D., Day, L., Dykeman, J., Jette, N., Pringsheim, T., 2012. The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 27, 1789–1796.
- Sun, Y.V., Li, C., Hui, Q., Huang, Y., Barbano, R., Rodriguez, R., Malaty, I.A., Reich, S., Bambarger, K., Holmes, K., Jankovic, J., Patel, N.J., Roze, E., Vidailhet, M., Berman, B.D., LeDoux, M.S., Espay, A.J., Agarwal, P., Pirio-Richardson, S., Frank, S.A., Ondo, W.G., Saunders-Pullman, R., Chouinard, S., Natividad, S., Berardelli, A., Pantelyat, A.Y., Brashear, A., Fox, S.H., Kasten, M., Krämer, U.M., Neis, M., Bäumer, T., Loens, S., Borsche, M., Zittel, S., Maurer, A., Gelderblom, M., Volkmann, J., Odorfer, T., Kühn, A.A., Borngreber, F., König, I.R., Cruchaga, C., Cotton, A.C., Kilic-Berkmen, G., Freeman, A., Factor, S.A., Scorr, L., Bremner, J.D., Vaccarino, V., Quyyumi, A.A., Klein, C., Perlmutter, J.S., Lohmann, K., Jinnah, H.A., 2021. A Multi-center Genome-wide Association Study of Cervical Dystonia. *Mov Disord* 36, 2795–2801.
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., Nagata, S., 2013. Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *J Biol Chem* 288, 13305–13316.
- Tariverdian, G., Buselmaier, W., 2007. Populationsgenetik. In: *Humangenetik*. 4. Auflage, 365. Springer-Verlag, Berlin.
- The Human Genome Browser at UCSC, n.d. URL <https://genome-euro.ucsc.edu/cgi->

bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr11%3A26655814%2D26655843&hgsid=280846347_t0doH5P9VfFxSQqAZORjOGdeSGaH (Tag des Zugriffs: 28.08.19).

Thermo Fisher Scientific, 2014. DNA fragment analysis by capillary electrophoresis. URL

<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/fragment-analysis-chemistry-guide.pdf> (Tag des Zugriffs: 26.10.20)

Tisch, S., Kumar, K.R., 2020. Pallidal Deep Brain Stimulation for Monogenic Dystonia: The Effect of Gene on Outcome. *Front Neurol* 11, 630391.

Trinh, J., Zeldenrust, F.M.J., Huang, J., Kasten, M., Schaake, S., Petkovic, S., Madoev, H., Grünwald, A., Almuammar, S., König, I.R., Lill, C.M., Lohmann, K., Klein, C., Marras, C., 2018. Genotype-phenotype relations for the Parkinson's disease genes SNCA, LRRK2, VPS35: MDSGene systematic review. *Mov Disord* 33, 1857–1870.

Tunc, S., Denecke, J., Olschewski, L., Bäumer, T., Münchau, A., Lessel, D., Lohmann, K., 2019. A recurrent de-novo ANO3 mutation causes early-onset generalized dystonia. *J Neurol Sci* 396, 199–201.

Vaz-Drago, R., Custódio, N., Carmo-Fonseca, M., 2017. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet* 136, 1093–1111.

Veltman, J.A., Brunner, H.G., 2012. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 13, 565–575.

Victor, A., Elsässer, A., Hommel, G., Blettner, M., 2011. Wie bewertet man die p-Wert-Flut? Hinweise zum Umgang mit dem multiplen Testen—Teil 10 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. *Dtsch Zahnärztl Z* 66, 366.

Wang, T.A., Chen, C., Huang, F., Feng, S., Tien, J., Braz, J.M., Basbaum, A.I., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2021. TMEM16C is involved in thermoregulation and protects rodent pups from febrile seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2023342118.

Whitlock, J.M., Hartzell, H.C., 2016. A Pore Idea: the ion conduction pathway of TMEM16/ANO proteins is composed partly of lipid. *Pflugers Arch* 468, 455–473.

- Williams, L., McGovern, E., Kimmich, O., Molloy, A., Beiser, I., Butler, J.S., Molloy, F., Logan, P., Healy, D.G., Lynch, T., Walsh, R., Cassidy, L., Moriarty, P., Moore, H., McSwiney, T., Walsh, C., O’Riordan, S., Hutchinson, M., 2017. Epidemiological, clinical and genetic aspects of adult onset isolated focal dystonia in Ireland. *Eur J Neurol* 24, 73–81.
- Wolf, M., Musch, J., Enczmann, J., Fischer, J., 2012. Estimating the prevalence of nonpaternity in Germany. *Hum Nat* 23, 208–217.
- Wong, S.H., Steiger, M.J., Larner, A.J., Fletcher, N.A., 2010. Hereditary myoclonus dystonia (DYT11): a novel SGCE gene mutation with intrafamilial phenotypic heterogeneity. *Mov Disord* 25, 956–957.
- Xiao, J., Vemula, S.R., LeDoux, M.S., 2014. Recent advances in the genetics of dystonia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 462.
- Xu, B., Roos, J.L., Dexheimer, P., Boone, B., Plummer, B., Levy, S., Gogos, J.A., Karayiorgou, M., 2011. Exome sequencing supports a de novo mutational paradigm for schizophrenia. *Nat Genet* 43, 864–868.
- Yang, Y.D., Cho, H., Koo, J.Y., Tak, M.H., Cho, Y., Shim, W.-S., Park, S.P., Lee, J., Lee, B., Kim, B.-M., Raouf, R., Shin, Y.K., Oh, U., 2008. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210–1215.
- Yoo, D., Kim, H.-J., Chae, J.-H., Paek, S.H., Jeon, B., 2019. Successful Pallidal Deep Brain Stimulation in a Patient with Childhood-Onset Generalized Dystonia with ANO3 Mutation. *J Mov Disord* 12, 190–191.
- Yoo, D., Kim, H.-J., Lee, J.S., Lee, S., Kim, S.Y., Choi, M., Chae, J.-H., Jeon, B., 2018a. Early-onset generalized dystonia starting in the lower extremities in a patient with a novel ANO3 variant. *Parkinsonism Relat Disord* 50, 124–125.
- Yoo, H.S., Lee, H., Chung, S.J., Lee, J.S., Hong, S.K., Lee, P.H., Kim, Y.J., Sohn, Y.H., Shin, H.W., 2018b. A Novel Heterozygous ANO3 Mutation with Basal Ganglia Dysfunction in a Patient with Adult-Onset Isolated Segmental Dystonia. *J Clin Neurol* 14, 596–597.
- Yoshino, H., Nishioka, K., Li, Y., Oji, Y., Oyama, G., Hatano, T., Machida, Y., Shimo, Y., Hayashida, A., Ikeda, A., Mogushi, K., Shibagaki, Y., Hosaka, A., Iwanaga, H., Fujitake, J., Ohi, T., Miyazaki, D., Sekijima, Y., Oki, M., Kusaka, H., Fujimoto, K., Ugawa, Y., Funayama, M., Hattori, N., 2018. GCH1

- mutations in dopa-responsive dystonia and Parkinson's disease. *J Neurol* 265, 1860–1870.
- Zech, M., Boesch, S., Jochim, A., Weber, S., Meindl, T., Schormair, B., Wieland, T., Lunetta, C., Sansone, V., Messner, M., Mueller, J., Ceballos-Baumann, A., Strom, T.M., Colombo, R., Poewe, W., Haslinger, B., Winkelmann, J., 2017. Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up. *Mov Disord* 32, 549–559.
- Zech, M., Gross, N., Jochim, A., Castrop, F., Kaffe, M., Dresel, C., Lichtner, P., Peters, A., Gieger, C., Meitinger, T., Haslinger, B., Winkelmann, J., 2014. Rare sequence variants in ANO3 and GNAL in a primary torsion dystonia series and controls. *Mov Disord* 29, 143–147.
- Zheng, J., Zhang, H., Banerjee, S., Li, Y., Zhou, J., Yang, Q., Tan, X., Han, P., Fu, Q., Cui, X., Yuan, Y., Zhang, M., Shen, R., Song, H., Zhang, X., Zhao, L., Peng, Z., Wang, W., Yin, Y., 2019. A comprehensive assessment of Next-Generation Sequencing variants validation using a secondary technology. *Mol Genet Genomic Med* 7, e00748.
- Zhytnik, L., Maasalu, K., Duy, B.H., Pashenko, A., Khmyzov, S., Reimann, E., Prans, E., Kõks, S., Märtson, A., 2019. De novo and inherited pathogenic variants in collagen-related osteogenesis imperfecta. *Mol Genet Genomic Med* 7, e559.
- Zlotogora, J., 2003. Penetrance and expressivity in the molecular age. *Genet Med* 5, 347–352.
- Zorzi, G., Carecchio, M., Zibordi, F., Garavaglia, B., Nardocci, N., 2018. Diagnosis and treatment of pediatric onset isolated dystonia. *Eur J Paediatr Neurol* 22, 238–244.

Anhang

A Verwendete Primer

Tabelle 14: Primer für die PCR und Sanger-Sequenzierung des ANO3-Gens (nur für Exons, in denen Varianten detektiert wurden)

Name des Primers	Basenabfolge	Annealing-Temperatur in °C
Ex1 F	CTTGCCTATGTCTTCACTTAGC	58
Ex1 R	GTTCCAGTTGACTAGAATCACC	
Ex3 F	CCTGAAACAGGTATCACAAG	55
Ex3 R	TGGTGTACTGGTCTCCTTT	
Ex4 F	GGCCATCATTGTCCATCTA	57 ^a
Ex4 R	ATGGGCCAGGATAGAATCTC	
Ex5 F	TCGCTAATGTGGCTCCTAT	58 ^a
Ex5 R	CCTTCTGCTCTGAGGTTCTT	
Ex9 F	GTGGGAACAGAAGCAATG	55
Ex9 R	GAAAAAGAGGGGAACTCAC	
Ex11 F	GGTGATGTGGCTATGGAAG	57
Ex11 R	TTGAAGACAGGCTTTGAGG	
Ex18 F	ACCTTCAATTCTTGGGGACAGTAG	61
Ex18 R	GACAGCAGCAGCAGATGTTG	
Ex20 F	GGCAACAGAGAGTGAGACT	58
Ex20 R	GATAGGTAGAAGAGGTTCCAC	
Ex28 F	CATGTTGCAGCAATAAGAGG	55
Ex28 R	GCTTCTGCAATGTCAATC	

a: Verwendung des *GC-rich* PCR Systems

Tabelle 15: Primer für die Mikrosatellitenanalyse

Region	F-Primer	R-Primer
D3S3559	XXX CGC TCT ACA TCA GGC AAC C	AAA AAT AAT TGG ACC TGT AAA AAC
D3S3685	XXX CAA CAA CCC AGC TCT TTG	AAT ACA GGT AAC CCT GCC C
D5S2090	XXX CCA TGG GCA TGT TTC AAA	AGT ACC TCC TTA GTA ACT CTG GGC
D6S305	XXX CCA CCA GCG TTA GAG ACT	GCA AAT GGA GCA TGT CAC T
D7S2480	XXX CAC CTT GAC TGT GGT AGT TGG	GTT CAC CTC ATA GGA AAA TCT TG
D7S646	XXX CCT GTC TGC TTA TCC TAT	GTT GAG TGT CCA CCT GAG ATT TAT
D8S532	XXX CGC TCA AAG CCT CCA ATC AC	GAC TTC GTG ATC CAC CTG C
D8S1745	XXX CAA AAG TTC ACA CCA AAT GCC	GAA CCC ACT AAT TGC GGA C
D8S1817	XXX CGC ACG TTC AAT ATG ACT GTT GAT TC	ACT GAG GGC CAA GTC CCT A
D19S878	XXX CGC CTG GGC GAC AGA GAA	GGT TGC CCG CAG AGT G
D19S197	XXX CTC CTC AGC AGG TCT CCT CAT	CAC CAG GGA AAT GCC AAT
DXS8101	XXX CCT GGG CGA CAG AGA CTC TT	CTG CCC GAT AGT GAA ATG A
M13 (XXX)	CAC GAC GTT GTA AAA CGA	GGA TAA CAA CAC ACA GG

B Kriterien für das *Pathoscoreing*

Tabelle 16: Kriterien für das *Pathoscoreing* der MDSGene-Datenbank, modifiziert nach "MDSGene", n.d.

Evidenz	Segregation	Frequenz (gnomAD)	CADD-Score	funktionelle Studien
gering	nur ein einziger heterozygoter Patient (0 Punkte)	≥0,01 (0 Punkte)	<10 (0 Punkte)	nur negative Berichte oder Fehlen von Studien (0 Punkte)
mäßig	≥1 biallelscher Patient bei rezessivem Erbgang ¹ oder ≥2 einzelhe heterozygote Patienten bei dominanten Erbgängen oder 1 Familie (d.h. ≥2 betroffene Variantenträger) (2 Punkte)	0,001-0,009 (1 Punkt)	10 bis <15 (1 Punkt)	1 positive Studie (2 Punkte)
stark	2 Familien (3 Punkte)	0,0001-0,0009 (2 Punkte)	15-20 (3 Punkte)	2 positive Studien oder Nullallel (4 Punkte)
höchst	>2 Familien oder ≥1 de novo (6 Punkte)	<0,0001 (3 Punkte)	>20 (5 Punkte)	>2 positive Studien (6 Punkte)

Ergebnis nach Gesamtpunktzahl: <5 Punkte: *benign* (benigne); 5-9 Punkte: *possibly pathogenic* (möglicherweise pathogen); 10-14 Punkte: *probably pathogenic* (wahrscheinlich pathogen); > 14 Punkte: *definitely pathogenic* (definitiv pathogen).

1: nicht zutreffend für ANO3, da dominante Vererbung

Tabelle 17: Kriterien für das *Pathoscore* des *American College of Medical Genetics* (ACMG) und der *Association for Molecular Pathology* (AMP) sowie verwendete Spezifizierungen, modifiziert nach Richards et al., 2015, Tabellen 3 und 4

Kriterium	Beschreibung nach ACMG	Spezifikation
PVS1	"null variant" (<i>Nonsense</i> , <i>Frameshift</i> , Spleißstelle, Initiationskodon, Deletion eines/mehrerer Exons) in einem Gen, in dem LOF (<i>loss of function</i>) ein bekannter Mechanismus bei Erkrankungen ist	
PS1	Der gleiche Aminosäureaustausch wurde bereits als pathogen etabliert (unabhängig von dem zugrundeliegenden Nukleotid-Austausch).	Auflistung bei ClinVar
PS2	Die Variante kommt (bei bestätigter Vater- und Mutterschaft) <i>de novo</i> in einem Patienten mit negativer Familienanamnese vor.	
PS3	Bewährte funktionelle Studien <i>in vivo/in vitro</i> unterstützen den schädigenden Effekt auf das Gen oder Genprodukt.	Als bewährt wurde hier anerkannt, wenn es mindestens zwei unabhängige Studien gab.
PS4	Die Variante kommt signifikant häufiger bei erkrankten Individuen als bei Kontrollen vor.	
PM1	Die Variante befindet sich in einem Mutations-"Hot Spot" und/oder einer wichtigen und gut etablierten funktionellen Domäne (z.B. aktiven Stelle eines Enzyms), die keine benigne Variante beinhalten.	
PM2	Die Variante kommt nicht (oder in einer sehr geringen Häufigkeit bei rezessiven Erbgängen) in Kontrollen des <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1000 Genomes Project</i> oder <i>Exome Aggregation Consortium</i> vor. (CAVE bei Insertionen und Deletionen, die durch NGS weniger sicher detektiert werden)	Hier wurde aufgrund größerer Stichproben auf die Datenbank gnomAD zurückgegriffen. Auch für ANO3 mit autosomal-dominantem Erbgang wurde eine Häufigkeit von <0,00001 als extrem selten anerkannt.
PM3	Bei rezessiven Erkrankungen: die Variante tritt in <i>trans</i> (d.h. in einer anderen Genkopie) mit einer pathogenen Variante auf.	
PM4	Die Proteinlänge wird durch <i>in-frame</i> Insertionen oder Deletionen in einer nicht-repetitiven Region oder durch <i>Stop-loss</i> -Varianten (Verlust eines Stop-Codons) verändert.	
PM5	Die Variante ist eine neue <i>Missense</i> -Variante an einer Position, an der ein anderer Aminosäureaustausch als pathogen beschrieben wurde.	
PM6	Ein <i>de-novo</i> Auftreten der Variante wird angenommen, jedoch sind Vater- und Mutterschaft nicht bestätigt.	
PM7		Die Variante kommt bei mehr als zwei erkrankten Mitgliedern einer Familie vor (als stärkere Evidenz als PP1).
PM8		Die Variante kommt bei zwei bis fünf Patienten, aber nicht bei gnomAD vor (als schwächere Evidenz als PS4)
PP1	Die Variante segregiert mit der Erkrankung in einer Familie mit mehreren erkrankten Mitgliedern und befindet sich in einem Gen, das definitiv die Erkrankung auslöst. Stärkeres Kriterium mit zunehmenden Daten zur Segregation.	Dieses Kriterium wurde bei zwei betroffenen Variantenträgern in einer Familie verwendet, bei mehreren wurde PM7 verwendet.
PP2	Es handelt sich um eine <i>Missense</i> -Variante in einem Gen, in dem benigne <i>Missense</i> -Varianten selten sind und in dem <i>Missense</i> -Varianten ein häufiger Erkrankungsmechanismus sind.	
PP3	Mehrere computerbasierte Methoden unterstützen einen schädigenden Effekt auf das Gen oder Genprodukt (Konservierung, Evolution, Spleißeffekt etc.).	Hier wurden der CADD-Score bzw. die <i>Fruitfly</i> -Prädiktion von Spleißstellenveränderungen verwendet.
PP4	Der Phänotyp oder die Familienanamnese sind sehr spezifisch für eine Erkrankung mit einer einzigen genetischen Ätiologie.	
PP5	Die Variante wurde von einer seriösen Quelle als pathogen beschrieben, die Evidenz ist dem Labor jedoch nicht zur unabhängigen Evaluation verfügbar.	
BA1	Die Allelhäufigkeit ist >5% im <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1000 Genomes Project</i> oder <i>Exome Aggregation Consortium</i> .	
BS1	Die Allelhäufigkeit ist höher, als für die Erkrankung zu erwarten ist.	
BS2	Die Variante wurde homozygot (rezessiv), heterozygot (dominant) oder hemizygot (X-chromosomal) bei einem gesunden Erwachsenen gefunden, obwohl eine vollständige Penranz in einem jungen Alter zu erwarten ist.	
BS3	Bewährte funktionelle Studien <i>in vivo/in vitro</i> zeigen keinen schädigenden Effekt auf das Gen oder Genprodukt.	Hier war bereits eine funktionelle Studie ausreichend.
BS4	Die Variante segregiert nicht in einer Familie mit mehreren erkrankten Mitgliedern.	Hier wurde eine Phänokopie akzeptiert.

Kriterium	Beschreibung nach ACMG	Spezifikation
BP1	Es handelt sich um eine <i>Missense</i> -Variante in einem Gen, bei dem besonders trunkierende Varianten als krankheitsauslösend beschrieben sind.	
BP2	Die Variante wurde in <i>trans</i> mit einer pathogenen Variante bei einer vollständig penetranten, dominanten Erkrankung oder in <i>cis</i> mit einer pathogenen Variante bei jeglichem Erbgang gefunden.	
BP3	Die Variante ist eine <i>in-frame</i> Deletion oder Insertion in einer repetitiven Region ohne bekannte Funktion.	
BP4	Mehrere computerbasierte Methoden sagen keinen Effekt auf das Gen oder Genprodukt voraus (Konservierung, Evolution, Spleißeffekt etc.).	Hierfür wurde ein CADD-Score <10 festgelegt.
BP5	Die Variante wurde bei einem Patienten gefunden, bei dem eine andere molekulare Ursache bekannt ist.	
BP6	Die Variante wurde von einer seriösen Quelle als benigne beschrieben, die Evidenz ist dem Labor jedoch nicht zur unabhängigen Evaluation verfügbar.	
BP7	Es handelt sich um eine synonyme Variante ohne vorhergesagte veränderte oder zusätzliche Spleißstelle, bei der das Nukleotid nicht hoch konserviert ist.	

Tabelle 18: Einordnung von Varianten je Kombinationen erfüllter Kriterien des *Pathoscorings* des *American College of Medical Genetics (ACMG)* und der *Association for Molecular Pathology (AMP)*, modifiziert nach Richards et al., 2015, Tabelle 5.

Kategorie	erfüllte Kriterien
<i>pathogenic</i> (pathogen)	PVS1 und a) ≥ 1 <i>strong</i> (PS1-PS4) oder b) ≥ 2 <i>moderate</i> (PM1-PM8) oder c) 1 <i>moderate</i> (PM1-PM8) und 1 <i>supporting</i> (PP1-PP5) oder d) ≥ 2 <i>supporting</i> (PP1-PP5) ≥ 2 <i>strong</i> (PS1-PS4) 1 <i>strong</i> (PS1-PS4) und a) ≥ 3 <i>moderate</i> (PM1-PM8) oder b) 2 <i>moderate</i> (PM1-PM8) und ≥ 2 <i>supporting</i> (PP1-PP5) oder c) 1 <i>moderate</i> (PM1-PM8) und ≥ 4 <i>supporting</i> (PP1-PP5)
<i>likely pathogenic</i> (vermutlich pathogen)	PVS1 und 1 <i>moderate</i> (PM1-PM8) 1 <i>strong</i> (PS1-PS4) und 1-2 <i>moderate</i> (PM1-PM8) 1 <i>strong</i> (PS1-PS4) und ≥ 2 <i>supporting</i> (PP1-PP5) ≥ 3 <i>moderate</i> (PM1-PM8) 2 <i>moderate</i> (PM1-PM8) und ≥ 2 <i>supporting</i> (PP1-PP5) 1 <i>moderate</i> (PM1-PM8) und ≥ 4 <i>supporting</i> (PP1-PP5)
<i>benign</i> (benigne)	1 <i>stand-alone</i> (BA1) ≥ 2 <i>strong</i> (BS1-BS4)
<i>likely benign</i> (vermutlich benigne)	1 <i>strong</i> (BS1-BS4) und 1 <i>supporting</i> (BP1-BP7) ≥ 2 <i>supporting</i> (BP1-BP7)
<i>uncertain significance</i> (Variante unklarer Signifikanz, VUS)	andere Kriterien (s. o.) werden nicht erfüllt die Kriterien für " <i>benign</i> " und " <i>pathogenic</i> " sind widersprüchlich

C Standardisierte Variablen der MDSGene-Datenbank

Tabelle 19: Standardisierte Variablen der MDSGene-Datenbank

Variable	Beschreibung
PMID	PubMed-ID
Author, year	Autor und Jahr der Publikation
study_design	Studiendesign
genet_methods	genetische Methodik
lower_age_limit	untere Altersgrenze als Einschlusskriterium
upper_age_limit	obere Altersgrenze als Einschlusskriterium
comments_study	zusätzliche Kommentare zur Studie
family_ID	Familien-ID
individual_ID	ID des Patienten
disease_abbrev	Abkürzung der Erkrankung (DYT für Dystonie)
clinical_info	klinische Info vorhanden? (Voraussetzung für Einschluss in MDSGene)
ethnicity	Ethnizität des Patienten
country	Herkunftsland des Patienten
sex	Geschlecht
index_pat	Ist der Patient Indexpatient einer Familie?
famhx	Familienanamnese (positiv/negativ)
num_het_mut_affected	Anzahl betroffener, heterozygoter Familienmitglieder
num_hom_mut_affected	Anzahl betroffener, homozygoter Familienmitglieder
num_het_mut_unaffected	Anzahl nicht betroffener, heterozygoter Familienmitglieder
num_hom_mut_unaffected	Anzahl nicht betroffener, homozygoter Familienmitglieder
num_wildtype_affected	Anzahl betroffener Familienmitglieder ohne Variante
num_wildtype_unaffected	Anzahl nicht betroffener Familienmitglieder ohne Variante
status_clinical	klinischer Status (z.B. "klinisch betroffen")
aae	Alter zum Untersuchungszeitpunkt
aa0	Alter zu Erkrankungsbeginn
aa0_classify	Klassifikation des Alters zu Erkrankungsbeginn (z.B. Kindheit)

duration	Erkrankungsdauer (Erkrankungsbeginn bis Untersuchungszeitpunkt)
age_dx	Alter zum Diagnosezeitpunkt
age_death	Alter zum Todeszeitpunkt
hg_version	Version des humanen Genoms (normiert auf hg19)
genome_build	verwendetes Transkript (bei ANO3 normiert auf NM_031418)
gene1	betroffenes Gen (in diesem Fall immer ANO3)
physical_location1	Position der Variante im Genom
reference_allele1	Referenzallel
observed_allele1	verändertes Allel
mut1_g	Variante in genomischer Nomenklatur
mut1_c	Variante in kodierender Nomenklatur
mut1_p	Variante in Protein-Nomenklatur
mut1_alias_original	Alias der Variante wie in Publikation angegeben
mut1_alias	Alias der Variante
mut1_genotype	Genotyp (homozygot, heterozygot)
mut1_type	Mutationstyp (z.B. <i>Missense</i>)
mut1_sporadic	sporadisches Auftreten der Variante?
ExAC, dbSNP	Vorkommen der Variante in ExAC (aktuell: gnomAD) oder dbSNP
exac_1	Häufigkeit der Variante in ExAC (aktuell: gnomAD)
<i>dystonia_HP:0001332</i>	<i>Dystonie</i>
<i>generalized_dystonia_HP:0007325</i>	<i>generalisierte Dystonie</i>
<i>segmental_multifocal_dystonia_symp</i>	<i>segmentale oder multifokale Dystonie</i>
<i>focal_dystonia_HP:0004373</i>	<i>fokale Dystonie</i>
<i>craniofacial_dystonia_HP:0012179</i>	<i>kraniofaziale Dystonie</i>
<i>blepharospasm_symp</i>	<i>Blepharospasmus</i>
<i>dyst_lower_face_symp</i>	<i>Dystonie des unteren Gesichts</i>
<i>oromandibular_dystonia_HP:0012048</i>	<i>oromandibuläre Dystonie</i>
<i>dyst_tongue_symp</i>	<i>Zungendystonie</i>
<i>dyst_jaw_symp</i>	<i>Schlunddystonie</i>
<i>laryngeal_dystonia_HP:0012049</i>	<i>laryngeale Dystonie</i>
<i>dysphonia_HP:0001618</i>	<i>Dysphonie</i>
<i>dysarthria_HP:0001260</i>	<i>Dysarthrie</i>
<i>anarthria_HP:0002425</i>	<i>Anarthrie</i>
<i>cervical_dystonia_HP:0000473</i>	<i>zervikale Dystonie</i>
<i>torticollis_HP:0000473</i>	<i>Torticollis</i>
<i>retrocollis_HP:0002544</i>	<i>Retrocollis</i>

<i>axial_dystonia_HP:0002530</i>	<i>axiale Dystonie</i>
<i>limb_dystonia_HP:0002451</i>	<i>Extremitätendystonie</i>
<i>dyst_arm_symp</i>	<i>Armdystonie</i>
<i>dyst_hand_symp</i>	<i>Handdystonie</i>
<i>dyst_leg_symp</i>	<i>Beindystonie</i>
<i>dyst_foot_symp</i>	<i>Fußdystonie</i>
<i>dyst_action_symp</i>	<i>aktionspezifische Dystonie</i>
<i>mirror_symp</i>	<i>Spiegeldystonie</i>
<i>tremor_HP:0001337</i>	<i>Tremor</i>
<i>dystonic_tremor_HP:0030185</i>	<i>dystoner Tremor</i>
<i>action_tremor_HP:0002345</i>	<i>Aktionstremor</i>
<i>postural_tremor_HP:0002174</i>	<i>posturaler Tremor</i>
<i>head_tremor_HP:0002346</i>	<i>Kopftremor</i>
<i>limb_tremor_HP:0200085</i>	<i>Extremitätentremor</i>
<i>myoclonus_HP:0001336</i>	<i>Myoklonus</i>
<i>allev_maneuvers_symp</i>	<i>symptomlindernde Bewegungen</i>
<i>alc_response_symp</i>	<i>Veränderung der Symptomatik bei Alkoholkonsum</i>
<i>parkinsonism_HP:0001300</i>	<i>Parkinsonismus</i>
<i>bradykinesia_HP:0002067</i>	<i>Bradykinesie</i>
<i>rigidity_HP:0002063</i>	<i>Rigidität (Steifheit)</i>
<i>postural_instability_HP:0002172</i>	<i>posturale Instabilität</i>
<i>resting_tremor_HP:0002322</i>	<i>Ruhetremor</i>
<i>muscular_hypotonia_HP:0001252</i>	<i>muskuläre Hypotonie</i>
<i>spasticity_HP:0001257</i>	<i>Spastizität</i>
<i>hyperreflexia_HP:0001347</i>	<i>Hyperreflexie</i>
<i>dyskinesia_HP:0100660</i>	<i>Dyskinesie</i>
<i>diurnal_fluctuations_symp</i>	<i>im Tagesverlauf fluktuierend</i>
<i>motor_fluctuations_symp</i>	<i>fluktuierende motorische Symptome</i>
<i>dysmorphic_features_symp</i>	<i>Dysmorphie</i>
<i>microcephaly_HP:0000252</i>	<i>Mikrozephalie</i>
<i>short_stature_HP:0004322</i>	<i>Kleinwuchs</i>
<i>seizures_HP:0001250</i>	<i>Krampfanfälle</i>
<i>global_developmental_delay_HP:0001263</i>	<i>globale Entwicklungsverzögerung</i>
<i>mild_global_developmental_delay_HP:0011342</i>	<i>milde globale Entwicklungsverzögerung</i>
<i>moderate_global_developmental_delay_HP:0011343</i>	<i>moderate globale Entwicklungsverzögerung</i>
<i>severe_global_developmental_delay_HP:0011344</i>	<i>schwere globale Entwicklungsverzögerung</i>
<i>profound_global_developmental_delay_HP:0012736</i>	<i>ausgeprägte globale Entwicklungsverzögerung</i>
<i>motor_delay_HP:0001270</i>	<i>verzögerte motorische Entwicklung</i>
<i>cognitive_impairment_HP:0100543</i>	<i>kognitive Einschränkung</i>

<i>delayed_speech_and_language_development_HP:000750</i>	<i>verzögerte Sprech- und Sprachentwicklung</i>
<i>autonomic_symp</i>	<i>autonome Symptome</i>
<i>sleep_disorder_symp</i>	<i>Schlafstörung</i>
<i>sleep_benefit_symp</i>	<i>Besserung der Symptomatik durch Schlaf</i>
<i>depression_HP:0000716</i>	<i>Depression</i>
<i>anxiety_HP:0000739</i>	<i>Angststörung</i>
<i>psychosis_HP:0000709</i>	<i>Psychose</i>
<i>dyst_onset_body_1</i>	zuerst von Dystonie betroffenes Körperteil
<i>dyst_onset_side</i>	Seite (links/rechts) des zuerst von Dystonie betroffenen Körperteils
<i>body_distr</i>	Verteilungsmuster der Dystonie
<i>patt_dis_course</i>	Krankheitsverlauf (z.B. progressiv)
<i>patt_variab</i>	Variabilität (z.B. persistierend, paroxysmal)
<i>assoc_feat</i>	isolierte oder kombinierte Dystonie
<i>dyst_instrument1</i>	verwendeter <i>Score</i> der Symptomschwere (z.B. GDRS)
<i>dyst_score1</i>	Ergebnis des <i>Scorings</i>
<i>dyst_instrument2</i>	weiterer verwendeter <i>Score</i> der Symptomschwere (z.B. TWSTRS)
<i>dyst_score2</i>	Ergebnis des <i>Scorings</i>
<i>medication_treatment</i>	Auflistung der verwendeten Medikamente
<i>medication_response_quantification</i>	Behandlungserfolg der verwendeten Medikamente
<i>botulinum_toxin_treatment</i>	Behandlung mit dem jeweiligen Medikament und Erfolg dessen
<i>botulinum_toxin_response_quantification</i>	
<i>anticholinergics_treatment</i>	
<i>anticholinergics_response_quantification</i>	
<i>muscle_relaxants_treatment</i>	
<i>muscle_relaxants_response_quantification</i>	
<i>baclofen_oral_treatment</i>	
<i>baclofen_oral_response_quantification</i>	
<i>baclofen_intrathecal_treatment</i>	
<i>baclofen_intrathecal_response_quantification</i>	
<i>benzodiazepines_treatment</i>	
<i>benzodiazepines_response_quantification</i>	
<i>vmat2_inhibitors_treatment</i>	
<i>vmat2_inhibitors_response_quantification</i>	
<i>dopaminergic_drugs_treatment</i>	
<i>dopaminergic_drugs_response_quantification</i>	
<i>amantadine_treatment</i>	

amantadine_response_quantification	
other_med_treatment	
other_med_response_quantification	
stereotactic surgery	Behandlung mit stereotaktischer Chirurgie (z.B. THS)
stereotactic surgery response_quantification	Antwort auf die Behandlung mit stereotaktischer Chirurgie
initial_sympt1	erstes Symptom
initial_sympt2	erstes Symptom (wenn mehrere Symptome zu Erkrankungsbeginn)
initial_sympt3	erstes Symptom (wenn mehrere Symptome zu Erkrankungsbeginn)
comments_pat	zusätzliche Kommentare zum Patienten
pathogenicity1	Pathogenität der ersten Variante
pathogenicity2	Pathogenität der zweiten Variante
pathogenicity3	Pathogenität der dritten Variante
num_index_pat_two_mut1	Zahl der Indexpatienten mit zwei Varianten
num_index_pat_het_mut1	Zahl der Indexpatienten mit heterozygoter Variante
num_fam_with_segregation1	Anzahl der Familien mit Segregation der Variante
cadd_1	CADD-Score der ersten Variante
fun_evidence_pos_1	funktionelle Evidenz der Variante
points_segregation1	Punkte für die Segregation (Pathogenitäts-Scoring)
points_frequency_controls1	Punkte für die Häufigkeit in Kontrollen (Pathogenitäts-Scoring)
points_CADD_score1	Punkte für den CADD-Score (Pathogenitäts-Scoring)
points_functional_studies1	Punkte für funktionelle Studien (Pathogenitäts-Scoring)
final_score1	finaler Score (Pathogenitäts-Scoring)
mdsgene_decision	MDSGene-Entscheidung (Einschluss/Ausschluss)

Kursiv gedruckte Symptome: jeweils Frage nach dem Vorhandensein

D Übersicht über Publikationen der Literaturrecherche

Tabelle 20: Publikationen der Literaturrecherche

PMID	Erstautor und Jahr der Publikation	Einschluss in MDSGene?
32116979	Li et al., 2019	ja
31871801	Lasky et al., 2019	ja
31309772	Yoo et al., 2019	ja
31228765	Laurencin et al., 2019	ja
30712998	Olschewski et al., 2019	ja
30692049	Kuo et al., 2019	ja
31053532	Delamarre et al., 2019	ja
30502610	Tunc et al., 2019	ja
30455893	Nelin et al., 2018	ja
30284773	Yoo et al., 2018b	ja
29801903	Ma et al., 2018	ja
29449182	Yoo et al., 2018a	ja
29396174	Zorzi et al., 2018	nein ^a
28283962	Lohmann und Klein, 2017	nein ^a
27919237	Blackburn et al., 2016	ja
27666935	Zech et al., 2017	ja
27392807	Miltgen et al., 2016	ja
26991507	Domingo et al., 2016	nein ^a
26700940	Kunzelmann et al., 2016	nein ^a
25847575	Ma et al., 2015	ja
25643588	Balint und Bhatia, 2015	nein ^a
24978640	Balint und Bhatia, 2014	nein ^a
24952478	Xiao et al., 2014	nein ^a
24442708	Stamelou et al., 2014	ja
24262166	Klein, 2014	nein ^a
24151159	Zech et al., 2014	ja
24136457	Fuchs und Ozelius, 2013	nein ^a
24094724	Hopfner et al., 2014	nein ^b
24092288	Morgante und Klein, 2013	nein ^a
23893446	Lohmann und Klein, 2013	nein ^a
23775978	Charlesworth et al., 2013	nein ^a
23757263	Charlesworth und Bhatia, 2013	nein ^a
23596437	Petrucci und Valente, 2013	nein ^a
23200863	Charlesworth et al., 2012	ja

Begründung für Ausschluss: a: Review ohne neue Patienten, b: keine Dystonie-Patienten.

E Übersicht über Patienten mit ANO3-Varianten aus der Literatur

Tabelle 21: Patienten mit ANO3-Varianten aus der Literatur

Publikation	ID	m/w	Ethnie	Alter	AAO	FA	zuerst betroffene Region	Verteilungsmuster	betroffene Region/en	Zusatzinformationen	Behandlung (Ansprechen)	cDNA-Veränderung	Proteinveränderung	CADD	gnomAD	MDSGene	ACMG*
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F1I-III-7	w	kauk.	36	19	pos.	Hals	multifokal	LD, CD, ED, KT	n.a.	n.a.	c.1480A>T	p.Arg494Trp	30	NA	PrP	VUS
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F1I-I-2	w	kauk.	n.a.	27	pos.	Hals	multifokal	LD, CD, ET, KT	n.a.	n.a.	c.1480A>T	p.Arg494Trp	30	NA	PrP	VUS
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F1I-II-1	m	kauk.	67	40	pos.	Hals	multifokal	KFD, LD, CD, ET, KT	kognitive Einschränkung, milde Stammataxie, Wernicke-Korsakow-Syndrom	n.a.	c.1480A>T	p.Arg494Trp	30	NA	PrP	VUS
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F1I-II-4	m	kauk.	69	30	pos.	Larynx	multifokal	KFD, LD, CD, ED, ET, KT	n.a.	n.a.	c.1480A>T	p.Arg494Trp	30	NA	PrP	VUS
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F1I-II-7	w	kauk.	n.a.	30	pos.	Hals	multifokal	LD, CD, ET, KT	n.a.	n.a.	c.1480A>T	p.Arg494Trp	30	NA	PrP	VUS
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F2I-IV-2	w	kauk.	39	5	pos.	Larynx	multifokal	KFD, LD, CD, ED, ET	MK, prog	n.a.	c.1470G>C	p.Trp490Cys	32	NA	PrP	VUS
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F2I-IV-1	m	kauk.	37	30	pos.	Arm	multifokal	ED, ET	ST	n.a.	c.1470G>C	p.Trp490Cys	32	NA	PrP	VUS
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F2I-III-1	m	kauk.	65	4	pos.	Hals	multifokal	KFD, LD, CD, ET, KT	prog. Verschlechterung des Kopftremors bei Stress	Botulinumtoxin (gut)	c.1470G>C	p.Trp490Cys	32	NA	PrP	VUS
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F3I-II-1	w	kauk.	31	6	pos.	Hals	multifokal	LD, CD, ED, ET, KT	ST, prog	β-Blocker (kein), Benzodiazepin (kein)	c.2053A>G	p.Ser685Gly	22	NA	PrP	LP
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F3I-III-1	m	kauk.	9	6	pos.	Arm	fokal	ED, ET	MK	n.a.	c.2053A>G	p.Ser685Gly	22	NA	PrP	LP
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F5I-11	n.a.	kauk.	n.a.	n.a.	pos.	n.a.	segmental	KFD, CD	n.a.	n.a.	c.2586G>T	p.Lys862Asn	16	0,000004	PoP	VUS
Charlesworth, 2012 und Stamelou, 2014	F6I-11	n.a.	kauk.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	multifokal	CD, ET	MK	n.a.	c.-190C>T	NA	21	NA	PoP	VUS

Publikation	ID	m/w	Ethnie	Alter	AAO	FA	Zuerst betroffene Region	Verteilungsmuster	betroffene Regionen	Zusatzinformationen	Behandlung (Ansprechen)	cdNA-Veränderung	Protein-Veränderung	CADD	gnomAD	MDSCGene	ACMG*
Zech, 2014	F1l-1	w	kauk.	56	40	neg.	Hals	fokal	CD, KT	n.a.	n.a.	c.2497A>G	p.Ile833Val	16	0,00002	PoP	VUS
Zech, 2014	F2l-1	w	kauk.	71	69	neg.	oberes Gesicht	segmental	KFD	n.a.	n.a.	c.2917G>C	p.Gly973Arg	26	0,00001	PoP	VUS
Ma, 2015	N-III-6	w	asiat.	n.a.	44	pos.	Hals	fokal	CD, KT	n.a.	n.a.	c.2540A>G	p.Tyr847Cys	28	NA	PrP	LP
Ma, 2015	N-III-3	m	asiat.	n.a.	41	pos.	Hals	fokal	CD, KT	n.a.	n.a.	c.2540A>G	p.Tyr847Cys	28	NA	PrP	LP
Ma, 2015	N-III-5	m	asiat.	n.a.	39	pos.	Hals	fokal	CD, KT	n.a.	n.a.	c.2540A>G	p.Tyr847Cys	28	NA	PrP	LP
Ma, 2015	N-III-4	w	asiat.	n.a.	50	pos.	Hals	multifokal	LD, CD, ED, ET, KT	n.a.	n.a.	c.2540A>G	p.Tyr847Cys	28	NA	PrP	LP
Ma, 2015	R-III-2	m	asiat.	n.a.	56	n.a.	kraniofazial	segmental	KFD	n.a.	n.a.	c.2540A>G	p.Tyr847Cys	28	NA	PrP	LP
Blackburn, 2016	F1l-1	w	n.a.	53	52	neg.	Hand	multifokal	KFD, LD, CD, ED, ET	prog, diverse zusätzliche Symptome (s. Abschnitt 3.3.2)	Clonazepam, Carbidopa/Levodopa, Trazodon, Naproxen, HCT (insgesamt moderat)	c.702C>G	p.Cys234Trp	26	NA	PoP	VUS
Milgen, 2016	F1l-1	w	kauk.	73	53	pos.	n.a.	segmental	KFD, CD	n.a.	n.a.	c.1969G>A	p.Ala657Thr	33	0,000004	PrP	LP
Milgen, 2016	F1l-1	w	kauk.	90	40	pos.	n.a.	segmental	KFD, CD	n.a.	n.a.	c.1969G>A	p.Ala657Thr	33	0,000004	PrP	LP
Milgen, 2016	F1l-1	m	kauk.	64	40	pos.	Hals	fokal	CD	n.a.	n.a.	c.1969G>A	p.Ala657Thr	33	0,000004	PrP	LP
Zech, 2017	F7-7	m	n.a.	44	9	neg. (de novo)	Hand	generalisiert	KFD, CD, AD, ED, ET	MK, prog	THS (gut)	c.1528G>A	p.Glu510Lys	34	NA	PrP	VUS
Zech, 2017	F13-13	w	n.a.	42	12	neg.	Fuß	generalisiert	KFD, LD, CD, AD, ED, ET	MK, prog	n.a.	c.1969G>A	p.Ala657Thr	33	0,000004	PrP	LP
Zech, 2017	F1l-1	m	n.a.	48	7	pos.	Hals	segmental	KFD, LD, CD, ED, KT	prog	n.a.	c.1199G>T	p.Gly400Val	32	NA	PrP	VUS
Zech, 2017	F1l-1	w	n.a.	69	8	pos.	n.a.	segmental	KFD, LD, ED, ET, KT	prog, ST, KT verstärkt bei Stress und Fatigue	Botulinumtoxin (gut bei Kopftremor)	c.1199G>T	p.Gly400Val	32	NA	PrP	VUS
Zech, 2017	F1l-1	m	n.a.	44	5	pos.	n.a.	multifokal	LD, ED, ET, KT	prog, ST	n.a.	c.1199G>T	p.Gly400Val	32	NA	PrP	VUS
Zech, 2017	F1l-1	m	n.a.	20	11	pos.	n.a.	multifokal	KFD, LD, CD, ED, KT	n.a.	n.a.	c.1199G>T	p.Gly400Val	32	NA	PrP	VUS
Zech, 2017	F2l-1	w	n.a.	n.a.	44	neg.	oberes Gesicht	segmental	KFD, CD	n.a.	n.a.	c.674A>G	p.Asn225Ser	17	NA	PoP	VUS
Zech, 2017	F3l-1	w	n.a.	n.a.	65	n.a.	Hals	segmental	KFD, CD	n.a.	n.a.	c.835T>A	p.Tyr279Asn	29	NA	PoP	VUS
Zech, 2017	F4l-1	w	n.a.	n.a.	50	neg.	oberes Gesicht	fokal	KFD	n.a.	n.a.	c.1387G>A	p.Val463Met	24	NA	PoP	VUS
Yoo, 2018	F1l-1	m	n.a.	17	3	neg. (de novo)	Bein	generalisiert	CD, AD, ED	MK, prog	Antiepileptika (minimal), Diazepam/Trihexphenidyl (moderat), Levodopa (minimal), THS (gut)	c.1952G>A	p.Ser651Asn	28	NA	PrP	LP
Ma, 2018	F11-1	m	asiat.	16	15	neg.	Hand	fokal	ED	paroxysmales Auftreten	n.a.	c.1409G>A	p.Gly470Glu	25	NA	PoP	VUS
Yoo, 2018	F1l-1	w	asiat.	60	54	neg.	Arm	segmental	CD, ED, ET	n.a.	n.a.	c.860G>A	p.Arg287Gln	34	NA	PoP	VUS

Publikation	ID	m/w	Ethnie	Alter	AAO	FA	zuerst betroffene Region	Verteilungsmuster	betroffene Region/en	Zusatzinformationen	Behandlung (Ansprachen)	CDNA-Veränderung	Protein-Veränderung	CADD	gnomAD	MDSGene	ACMG*
Tunc, 2019	F1-1i	m	kauk.	3	1	neg. (de novo)	Bein	generalisiert	ZD, LD, CD, ED	MK, prog, Spastizität, Hyperreflexie, motorische Entwicklungsrückbildung prog. MK,	Levodopa (kein), Baclofen/Trihexyphenidyl (moderat)	c.1952G>A	p.Ser651Asn	28	NA	PIP	LP
Nelin, 2018	F1-1i	m	n.a.	8	2	neg. (de novo)	n.a.	generalisiert	ED, Tremor	Parkinsonismus, muskuläre Hypotonie, Dysmorphie, (motorische) Entwicklungsverzögerung, kognitive Einschränkung	Trihexyphenidyl (moderat), Baclofen/Diazepam (n.a.), Clonazepam (n.a.), Botulinumtoxin (moderat), Levodopa (minimal)	c.1819A>T	p.Ile607Phe	31	NA	PIP	VUS
Delamarre, 2019	F1-1i	m	n.a.	19	10	neg. (de novo)	Stamm	generalisiert	AD	MK, prog	Levodopa (kein), Zonisamid (moderat), Neuroleptika (Aripiprazol, kein)	c.1943A>G	p.Asn648Ser	26	NA	PIP	LP
Kuo, 2019	F1-1i	w	asiat.	24	15	pos.	n.a.	generalisiert	CD, ED	MK, prog, Parkinsonismus	Levodopa (exzellent, insb. Parkinsonismus), Trihexyphenidyl (moderat), Clonazepam (moderat)	c.2053A>G	p.Ser685Gly	22	NA	PIP	LP
Kuo, 2019	F1-2i	w	asiat.	50	5	pos.	n.a.	segmental	LD, CD, ED	prog	n.a.	c.2053A>G	p.Ser685Gly	22	NA	PIP	LP
Olschewski, 2019	F7-L-11560	w	kauk.	42	3	neg. (de novo)	Bein	generalisiert	CD, AD, ED, KT	prog, Handtremor	THS (gut)	c.1682T>A	p.Val661Glu	32	NA	PIP	LP
Olschewski, 2019	F1-L-5698	w	kauk.	43	25	neg.	Hand	fokal	ED	Spiegelgdistonie	n.a.	c.433-2A>G	NA	33	NA	PIP	VUS
Olschewski, 2019	F2-L-11097	w	asiat.	39	28	n.a.	Arm	segmental	ED, ET	n.a.	n.a.	c.982C>T	p.Arg328Cys	23	0,00005	PIP	VUS
Olschewski, 2019	F3-L-11116	m	asiat.	44	36	n.a.	n.a.	segmental	CD, ED	n.a.	Levodopa (moderat)	c.982C>T	p.Arg328Cys	23	0,00005	PIP	VUS
Olschewski, 2019	F4-L-2706	m	kauk.	61	15	neg.	kraniofazial	fokal	KFD	n.a.	n.a.	c.2906G>A	p.Arg969Gln	28	0,00003	PIP	VUS
Olschewski, 2019	F5-L-5261	m	kauk.	65	45	neg.	Hand	fokal	ED	n.a.	n.a.	c.2906G>A	p.Arg969Gln	28	0,00003	PIP	VUS
Olschewski, 2019	F6-L-11567	w	kauk.	46	21	neg.	n.a.	multifokal	KFD, ED	n.a.	Levodopa (gut), Biperiden (gut)	c.2894T>G	p.Leu965Trp	31	NA	PoP	VUS
Laurencin, 2019	F1-III-3	w	n.a.	36	16	pos.	n.a.	segmental	AD, ED, ET, KT	prog	Levodopa (kein)	c.1820T>C	p.Ile607Thr	25	NA	PIP	VUS
Laurencin, 2019	F1-IV-5	w	n.a.	33	12	pos.	Bein	generalisiert	AD, ED	MK, prog, Aktionstremor	Zonisamid (moderat), Levodopa (kein), THS (gut)	c.1820T>C	p.Ile607Thr	25	NA	PIP	VUS
Lasky, 2019	F1-1i	w	n.a.	46	19	n.a.	Bein	generalisiert	KFD, CD, ED	prog, Bradykinesie	Botulinumtoxin (kein), Baclofen (n.a.), Benzatropin (n.a.), Diazepam (n.a.), Duloxetine (n.a.), THS (gut)	c.743A>C	p.Gln248Pro	17	0,00001	PoP	VUS
Li, 2019	F1i-1	w	asiat.	12	11	neg. (de novo)	Bein	generalisiert	AD, ED	n.a.	Trihexyphenidyl (minimal), THS (gut)	c.1798G>C	p.Val600Leu	26	NA	PIP	LP
Li, 2019	F2i-2	w	asiat.	45	43	neg.	Arm	generalisiert	CD, AD, ED, KT	MK	n.a.	c.787A>G	p.Met263Val	22	0,00007	PoP	VUS
Li, 2019	F3i-3	w	asiat.	14	13	neg.	Hand	multifokal	ED	prog	Trihexyphenidyl (moderat)	c.182A>C	p.Glu61Ala	19	0,00004	PoP	VUS

N.a.: nicht angegeben, m/w: Geschlecht, m: männlich, w: weiblich, kauk.: kaukasisch, asiat.: asiatisch, AAO: age at onset (Erkrankungsalter), FA: Familienanamnese, pos.: positiv, neg.: negativ, KFD: kraniofaziale Dystonie, LD: laryngeale Dystonie, CD: zervikale Dystonie, ED: Extremitätendystonie, ET: Extremitätentremor, KT: Kopftremor, ZD: Zungendystonie, AD: axiale Dystonie, MK: Myoklonus, prog: progressiv, ST: Stimmtremor, *: das ACMG-Pathoscore wurde nicht in die Datenbank eingeschlossen

F Votum der Ethikkommission

Die im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit durchgeführten Untersuchungen wurden durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck auf Grundlage des Antrags „Einfluss genetischer Faktoren auf den Erkrankungsverlauf bei Patienten mit primärem Dystonie-Syndrom“ (Aktenzeichen 04-180) in dem Genehmigungsschreiben vom 01.07.2005 genehmigt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Promotionsarbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein Dank gilt in erster Linie meiner Doktormutter Prof. Dr. Katja Lohmann für das Überlassen des spannenden Themas, die geduldige Einarbeitung, guten Ratschläge und die wortwörtlich jederzeit offen stehende Tür. Vielen Dank für die Möglichkeit und Unterstützung dabei, meine Ergebnisse zu publizieren und auf einem Kongress vorzustellen.

Ich möchte mich außerdem bei dem gesamten Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck, vor allem bei der Direktorin Prof. Dr. Christine Klein für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien bedanken. Vielen Dank für die freundliche und unterstützende Zusammenarbeit. Besonders möchte ich Frauke Hinrichs und Hauke Baumann für die Einarbeitung in die Labormethoden und das stete Angebot von Hilfe bei Problemen oder Fragen danken.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für die immerwährende Unterstützung, auch weit über diese Promotionsarbeit hinaus, bedanken.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Version der Dissertation nicht veröffentlicht.

Publikationen

Tunc, S., Denecke, J., Olschewski, L., Bäumer, T., Münchau, A., Lessel, D., Lohmann, K., 2019. A recurrent de-novo ANO3 mutation causes early-onset generalized dystonia. *J Neurol Sci* 396, 199–201.

Olschewski, L., Jesús, S., Kim, H.-J., Tunc, S., Löns, S., Junker, J., Zeuner, K.E., Kühn, A.A., Kuhlenbäumer, G., Schäffer, E., Berg, D., Kasten, M., Ferbert, A., Altenmüller, E., Brüggemann, N., Bauer, P., Rolfs, A., Jeon, B., Bäumer, T., Mir, P., Klein, C., Lohmann, K., 2019. Role of ANO3 mutations in dystonia: A large-scale mutational screening study. *Parkinsonism Relat Disord* 62, 196–200.

Klein, C., Baumann, H., Olschewski, L., Hanssen, H., Münchau, A., Ferbert, A., Brüggemann, N., Lohmann, K., 2019. De-novo KMT2B mutation in a consanguineous family: 15-Year follow-up of an Afghan dystonia patient. *Parkinsonism Relat Disord* 64, 337–339.

Lange, L.M., Junker, J., Loens, S., Baumann, H., Olschewski, L., Schaake, S., Madoev, H., Petkovic, S., Kuhnke, N., Kasten, M., Westenberger, A., Domingo, A., Marras, C., König, I.R., Camargos, S., Ozelius, L.J., Klein, C., Lohmann, K., 2021. Genotype-Phenotype Relations for Isolated Dystonia Genes: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord* 36, 1086–1103.

Vortrag

Olschewski, L., Tunc, S., Löns, S., Junker, J., Mir, P., Jesús, S., Jeon, B., Kim, H.-J., Kuhlenbäumer, G., Zeuner, K.E., Kühn, A.A., Ferbert, A., Altenmüller, E., Brüggemann, N., Klein, C., Lohmann, K. Role of ANO3 in dystonia: A large-scale mutational screening study and literature review. *Neurowoche 2018 in Berlin*.