Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Medizinischen Fakultät Charité–Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# Molekulargenetische Charakterisierung von Erkrankungen mit erhöhter Knochenmasse

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa-Marie Quell

aus Offenbach am Main

Datum der Promotion: 02.03.2018

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abstrakt	6
1. Einleitung	10
1.1. Allgemeines und Definitionen	10
1.2. Knochenstoffwechsel und daran beteiligte Zelltypen	11
1.3. Erhöhte Knochenmasse durch verringerten Knochenabbau	15
1.4. Erhöhte Knochenmasse durch vermehrten Knochenaufbau	19
1.5. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Methoden und Material	23
2.1. Richtlinien	23
2.2. Klinische Beschreibung des Phänotyps und Suche geeigneter	
Kandidatengene	23
2.3. Next-Generation-Sequencing	24
2.4. Bewertung der Varianten mittels bioinformatischer Datenbanken und	
Software	25
2.5. Validierung der Kandidatengene im Labor	27
2.5.1. Primer-Design	27
2.5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.5.3. Gelelektrophorese	
2.5.4. Enzymatische Reinigung des PCR-Produkts mit SAP/EXO	31
2.5.5. Sequenzierung nach Sanger	32
2.5.6. Fällung	33
2.5.7. Sequenzierung im Sequencer	33
2.5.8. Auswertung der Sequenzen	
2.6. Quantitative Expressionsanalyse	34

2.6.1. RNA-Isolation	34
2.6.2. cDNA-Synthese / Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	34
2.6.3. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	35
2.7. Materiallisten	37
3. Ergebnisse	43
3.1. Klinische Phänotypisierung der Patienten	43
3.2. Molekulargenetische Charakterisierung der Patienten	53
3.3. Tabellarischer Überblick über die Ergebnisse	68
4. Diskussion	70
4.1. Beurteilung der Mutationen	70
4.2. Diagnosen der Patienten	79
4.3. Bedeutung des Next-Generation-Sequencing	80
4.4. Auswirkungen der Ergebnisse auf zukünftige genetische Diagnostik	80
5. Literaturverzeichnis	82
6. Abbildungsverzeichnis	89
7. Tabellenverzeichnis	91
Eidesstattliche Versicherung	92
Lebenslauf	93
Danksagungen	95

# Abkürzungsverzeichnis

ADO	=	Autosomal dominante Osteopetrose
AP	=	alkalische Phosphatase
ARO	=	Autosomal rezessive Osteopetrose
BMP	=	Bone-Mass-Panel
Cl⁻	=	Chlorid-Ionen
cDNA	=	komplementäre DNA
ddH <sub>2</sub> O	=	doppelt destilliertes Wasser
ddNTPs	=	Didesoxynukleosidtriphosphate
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	=	Desoxyribonukleosidtriphosphate
et al.	=	et alii, lateinisch für: und andere
EXO	=	Exonuclease 1
g	=	Gramm
°C	=	Grad Celsius
HCI	=	Salzsäure, Chlorwasserstoffsäure
HPO	=	Human Phenotype Ontology
kb	=	Kilobase, 1000 Basenpaare
kv	=	krankheitsverursachende Mutation
M-CSF	=	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
ml	=	Milliliter, 10 <sup>-3</sup>
mM	=	Millimol/Liter
hð	=	Mikrogramm, 10 <sup>-6</sup>
μΙ	=	Mikroliter, 10 <sup>-6</sup>
mRNA	=	messenger RNA (englisch)
n.a.	=	nicht anwendbar

NEMO	=	NF-KappaB essenzieller Modulator	
NGS	=	Next-Generation-Sequencing	
OPG	=	Osteoprotegerin	
PCR	=	Polymerase Chain Reaction / Polymerase-Kettenreaktion	
qPCR	=	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	
RANK	=	Rezeptor-Aktivator von NF-KappaB	
RANKL	=	RANK-Ligand	
RT	=	Reverse Transkriptase	
SAP	=	Shrimp Alkaline Phosphatase	
TAE	=	Tris-(hydroxymethyl-aminomethan)-Acetat-EDTA	
Таq	=	Thermus aquaticus	
TRAF6	=	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6	
URL	=	Uniform Resource Locator	
VCF	=	Variante-Call-Format	

# Abstrakt

**Einleitung**: Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das einem ständigen Umbau, Remodelling, unterliegt. Reifung, Funktion und Kommunikation der am Remodelling beteiligten Zellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten, können durch genetische Mutationen gestört werden und somit die Knochendichte beeinflussen. Erkrankungen mit erhöhter Knochenmasse sind eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe, an deren vielfältiger Ausprägung verschiedenste Gene beteiligt sind.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der molekulargenetischen Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen bei drei Familien und sieben Einzelpatienten, die an erhöhter Knochenmasse leiden.

**Methoden und Material:** Anhand Beschwerdebild, Untersuchungsbefunden und Röntgenaufnahmen der Patienten wurde eine Verdachtsdiagnose gestellt. Ursächliche Gene konnten daraufhin mittels Polymerase-Kettenreaktion und Sanger-Sequenzierung überprüft werden. Bei negativen Sequenzierungsergebnissen oder unklaren Phänotypen wurde ein Next-Generation-Sequencing (Bone-Mass-Panel oder Exom-Sequenzierung) durchgeführt, dessen Ergebnisse mit bioinformatischen Programmen (unter anderem GeneTalk, MutationTaster, ExAC, 1000 Genomes Browser, Human Splicing Finder) hinsichtlich ihrer Pathogenität bewertet und letztlich ebenso mittels Sanger-Sequenzierung validiert wurden. Quantitative Expressionsanalysen von Osteoklasten wurden mithilfe von quantitativer Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

Ergebnisse: In den drei Familien war es trotz Next-Generation-Sequencing nicht möglich, die genetische Krankheitsursache sicher zu identifizieren. Das Next-Generation-Sequencing der Patienten 1, 3, 5 und 6 lieferte Varianten, die sich in der Sanger-Sequenzierung bestätigten. Die Mutation (c.415 416GC>AT, p.Ala139lle) im Gen TNFRSF11A ist Auslöser der autosomal rezessiven Osteopetrose bei Patient 1. Die gleiche Erkrankung wird bei Patient 4 durch die Mutation (c.518 521delATTG, p.Asn173lle\*2) im Gen OSTM1 verursacht. Bei Patient 2 konnte eine Pyknodysostose aufgrund von CTSK-Mutation (c.894G>A, p.Trp298\*) diagnostiziert werden. Zwei Fälle Dysosteosklerose Mutationen konnten mit im Gen SLC29A3 von (c.302 303insCTACTTTGAGAGCTACCT, p.Asn101delinsAsnTyrPheGluSerTyrLeu und c.1172C>A, p.Pro391His) assoziiert werden.

**Schlussfolgerung:** Ein Abgleich der Phänotypen und der Segregationsanalysen der Patienten ermöglichte in fünf Fällen eine Diagnosestellung. Keine der ursächlichen Mutationen wurde vorher in der Literatur beschrieben. Folglich konnten in dieser Arbeit fünf neue Mutationen bei Erkrankungen mit erhöhter Knochenmasse gefunden werden. Die Ergebnisse stützen die Vermutung von Campeau et al., dass Mutationen im Gen *SLC29A3* Dysosteosklerose verursachen können. Weitere Überlegungen zeigten, dass in der zukünftigen Forschung mehr Augenmerk auf intronische Bereiche der Gene fallen sollte.

## Abstract

**Introduction:** Bone, being an active tissue, is subject to permanent remodelling. Maturation, function and communication between the bone-cells involved in remodelling (osteoblasts, osteoclasts and osteocytes) can be disrupted by genetic mutations, thus influencing bone density. Diseases resulting in increased bone density make up a very heterogeneous group, as a variety of genes are involved in the process.

This dissertation focuses on the molecular genetic identification of disease-causing genes in three families and seven singular patients, who all suffer from increased bone density.

**Methods and material:** Based on the patients' symptoms, their clinical examinations and radiological reports (X-ray), we made a tentative diagnosis of the suspected condition. Consequently, suspicious genes were verified using polymerase chain reaction and Sanger-sequencing. When negative sequencing results or unclear phenotypes showed up, a next generation sequencing (bone-mass-panel or whole-exome sequencing) was implemented, whose results were assessed with bio-informative programs (e.g. GeneTalk, MutationTaster, ExAC, 1000 Genomes Browser, Human Splicing Finder) regarding their pathogenicity and ultimately validated using Sanger-sequencing. Quantitative expression analyses of osteoclasts were carried out through real-time polymerase chain reaction.

**Results:** Despite using next generation sequencing we were not able to identify the genetic cause of the diseases observed in the three families we examined. Next generation sequencing of patients 1, 3, 5 and 6 revealed variants, which were affirmed through Sanger-sequencing. The mutation (c.415 416GC>AT, p.Ala139lle) in gene TNFRSF11A causes the autosomal recessive osteopetrosis in patient 1. The same disease occurs in patient 4 and is caused by the mutation (c.518 521delATTG, p.Asn173lle\*2) in gene OSTM1. Patient 2 was diagnosed with pycnodysostosis owing to a CTSK-mutation (c.894G>A, p.Trp298\*). Two cases of dysosteosclerosis were associated with mutations in gene SLC29A3 (c.302 303insCTACTTTGAGAGCTACCT, p.Asn101delinsAsnTyrPheGluSerTyrLeu and c.1172C>A, p.Pro391His).

**Conclusion:** By comparing phenotypes and segregation analyses of the patients we were able to make diagnoses for five patients. So far none of the causative mutations has been described in literature. Consequently, five new mutations for diseases with

increased bone mass could be identified in this dissertation. The results support the presumptions of Campeau et al., who claim that mutations in gene *SLC29A3* may cause dysosteosclerosis. Further assessment showed that in future research more focus should be given to intronic regions of genes.

## 1. Einleitung

#### 1.1. Allgemeines und Definitionen

Die Bildung von Knochengewebe bezeichnet wird als Ossifikation bezeichnet (1). Sie findet zum großen Teil in der Fetogenese statt. Man findet Ossifikation aber auch beim erwachsenen Menschen nach Abschluss der Skelettbildung und des Wachstums (1), denn der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das ständigem Umbau (Remodelling) unterliegt (2). Dieser Vorgang ist notwendig, um den Knochen an die aktuelle mechanische Belastung anzupassen, die Zusammensetzung von Mineralien im Blut aufrechtzuerhalten und Strukturdefekte zu reparieren (3). Das Knochenremodelling unterliegt einem streng regulierten Gleichgewicht. Entsteht ein Ungleichgewicht durch Defekte der Knochenzellen oder in der interzellulären Kommunikation, resultiert eine Vielzahl von Skeletterkrankungen (4). Darunter sind besonders Erkrankungen mit verringerter Knochendichte wie Osteoporose, Skelettfehlbildungen (Dysplasien) (5) und sklerosierende Knochenerkrankungen zu nennen. Letztere sind eine heterogene Gruppe mit generalisierter Steigerung der Knochenmasse (6). Erhöhte Knochenmasse kann entweder durch verminderten Knochenabbau oder erhöhten Knochenaufbau bedingt sein (7). Konventionsgemäß spricht man von Osteosklerose oder Hyperostose, je nachdem, ob der trabekuläre oder der kortikale Knochen betroffen ist (6, 7). Hyperostosen können eigenständig und dann meist ohne klinische Relevanz auftreten, oft sind sie allerdings auch Symptom einer sklerosierenden Knochenerkrankung, beispielsweise der Osteopoikilose (8).

In den letzten Jahren konnten viele genomische Mutationen als ursächlich für Erkrankungen mit erhöhter Knochenmasse identifiziert werden. Patienten, die von verschiedenen Mutationen betroffenen sind, unterscheiden sich auch klinisch, was eine Klassifikation der Krankheitsbilder anhand des Genotyps erlaubt (9). Krankheitsbilder mit erhöhter Knochenmasse sind relativ selten. Selbst die häufiger vorkommende autosomal dominante Osteopetrose kommt nur bei einer von 20.000 Geburten vor (8). Dennoch ist es wichtig, Ursachen und Pathomechanismen zu erforschen: Die Identifizierung von krankheitsverursachenden Mutationen kann sowohl wichtige therapeutische als auch prognostische, das Wiederholungsrisiko betreffende, Aussagekraft haben (10). So lassen sich viele Formen der Osteopetrose mit einer Stammzelltransplantation kurativ therapieren. Die RANKL-abhängige Osteopetrose spricht darauf nicht an (7). Diese Patien-

10

ten können gegebenenfalls von einer Transplantation von mesenchymalen Zellen oder der Gabe von löslichem RANKL-Zytokin profitieren (10).

Weiterhin fördern Ergebnisse in der High-Bone-Mass-Forschung das Verständnis von deutlich häufigeren und klinisch sehr relevanten Erkrankungen, vor allem der Osteoporose. Deutlich wird das bei Betrachtung der Entwicklung zweier neuer Osteoporose-Medikamente: Cathepsin K-Inhibitoren und Anti-Sklerostin-Antikörper (11). Cathepsin K ist die wichtigste knochenabbauende Protease und wurde in der High-Bone-Mass-Forschung entdeckt: Das kodierende Gen *CTSK* ist krankheits-verursachend für die sklerosierende Pyknodysostose (11).

#### 1.2. Knochenstoffwechsel und daran beteiligte Zelltypen

Um die Entstehung von Erkrankungen mit erhöhter Knochenmasse zu verstehen, muss man zunächst die molekularen Mechanismen des Knochen-Remodelling und die daran beteiligten Zellen beleuchten. Die am Knochenumbau beteiligten Zellen sind Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten (3). Osteoblasten bauen Knochensubstanz auf. Osteoklasten sind für Abbau der Knochensubstanz zuständig. Osteozyten greifen regulierend in diese Vorgänge ein. Die drei Zelltypen kommunizieren und sind über vielerlei Feedback-Mechanismen miteinander verbunden (12). Osteozyten sind ausdifferenzierte Osteoblasten (13). Sie befinden sich im bereits mineralisierten Knochen und bilden mit ihren Ausläufern ein Netzwerk untereinander (14). Außerdem stehen sie mit den Osteoblasten auf der Knochenoberfläche in Kontakt und detektieren mechanische Belastungen des Knochens. Jüngste Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass sie über Gap Junctions und die Abgabe von Botenstoffen Informationen über den Zustand der Knochenmatrix senden und somit das Remodelling initiieren (3, 14).

Die knochenaufbauenden Osteoblasten entwickeln sich aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen. Damit sich aus Vorläuferzellen reife Osteoblasten entwickeln, ist vor allem der Wnt/ß-Catenin-Signalweg wichtig (siehe Abbildung 1). Der Wnt-Ligand bindet an der Zelloberfläche einen Rezeptor-Komplex aus "frizzled"-Rezeptor und einem Ko-Rezeptor aus der Familie der LDL-Rezeptoren, wie LRP4, LRP5 oder LRP6 (13, 15). Sie werden von den gleichnamigen Genen kodiert. Die Bindung von Wnt führt im Zellinneren über ß-Catenin zur Gentranskription von Proteinen, die für die Zellreifung von Bedeutung sind. (13). Sklerostin und das Dickkopf-Protein 1 sind natürliche Inhibito-

11

ren dieses Signalwegs. Sie binden als Wnt-Antagonisten LRP5 oder LRP6 und verhindern somit die Bindung von Wnt. Das führt dazu, dass ß-Catenin im Proteasom abgebaut wird und keine Gentranskription stattfindet (13). Sklerostin ist das Genprodukt von *SOST* und wird von Osteozyten exprimiert (7).

Reife Osteoblasten sezernieren Kollagen Typ I, das etwa 90% des Knochens ausmacht (13, 16). Auch nicht-kollagene Proteine, wie Osteocalcin, und die alkalische Phosphatase, die für die Mineralisation des Knochens essenziell ist, werden von den Osteoblasten synthetisiert (16). Diese Proteine werden sukzessive mit Hydroxyapatitkristallen mineralisiert (12). Dafür schnüren die Osteoblasten von ihren Ausläufern kleine Matrixvesikel ab, die alkalische Phosphatase (14), Calcium und Phosphat (13) enthalten. So wachsen im Inneren der Matrixvesikel die ersten kleinen Hydroxyapatitkristalle, bis sie die Vesikelmembran zerreißen, extrazellulär weiter wachsen und sich an die Kollagene und Osteocalcin anlagern (14).



**Abbildung 1:** Osteoblastenreifung induziert durch den Wnt/ß-Catenin-Signalweg. Das vom *SOST*-Gen kodierte Sklerostin hemmt die Bindung von Wnt. Reife Osteoblasten sezernieren Kollagene, Osteocalcin, Calcium, Phosphat und alkalische Phosphatase (AP).

Osteoklasten stammen aus der Monozyten-Makrophagen-Familie. Einkernige Vorläuferzellen fusionieren und bilden mehrkernige Riesenzellen (6). Sie befinden sich auf der endostalen und der periostalen Knochenoberfläche (6). Dort bauen sie die mineralisierte Knochenmatrix ab (3). Der reife aktive Osteoklast ist eine polarisierte Zelle (13). Diese Polarisierung ist bei unreifen noch mobilen Vorläufern nicht zu finden. Der Osteoklast bildet an seiner resorptiven, zum Knochen hingewandten Seite eine Plasmamembran mit starkem Faltenbesatz aus ("ruffled border") (14). Durch die ringförmige Versiegelung des Plasmamembranrandes mit der extrazellulären Matrix des Knochens über Integrine (14) entsteht unterhalb des Osteoklasten die sogenannte Resorptionlakune (2), oder Howship-Lakune (14). Sie ist komplett von der Umgebung abgeschlossen. In der Plasmamembran sitzt die Protonenpumpe der Osteoklasten, eine V-ATPase (7). Diese pumpt Protonen (H<sup>+</sup>) in die Resorptionslakune. Im Zellinneren des Osteoklasten werden Protonen durch die enzymatische Reaktion der Carboanhydrase II bereitgestellt (17). Ebenfalls in der Plasmamembran befindlich ist ein ladungsabhängiger, vermutlich mit der V-ATPase gekoppelter (12), Chlorid-Kanal (16). Durch ihn gelangen, parallel zu den Protonen, Chlorid-Ionen (Cl<sup>-</sup>) in die Howship-Lakune. Es entsteht Salzsäure (HCl) (16) und der pH-Wert der Resorptionslakune wird auf etwa 4,5 abgesenkt (14, 16). Durch die Säure wird die anorganische Knochenmatrix aufgelöst, damit im nächsten Schritt durch Sekretion von lysosomalen proteolytischen Enzymen die organischen Matrixbestandteile zerlegt werden können (14). Dabei handelt es sich vorrangig um die lysosomale Protease Cathepsin K (16) und die Proteasen Cathepsin B und L. Die Matrixmetalloproteasen Kollagenase und Gelatinase B sind eher nachrangig an diesem Prozess beteiligt (2, 16). Die zerlegten Matrix-Fragmente werden von den Osteoklasten aufgenommen und durch Transzytose auf der anderen Zellseite wieder freigesetzt (14, 16) (siehe Abbildung 2).

Da Osteoblasten bis zu drei Monaten benötigen können, um den Knochen wieder aufzubauen, den Osteoklasten in zehn Tagen abgebaut haben (18), ist es sinnvoll, dass die Osteoblasten Reifung, Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten mitregulieren (12). Ein Schema der Osteoklastenreifung, sowie der interzellulären Kommunikation findet sich in Abbildung 2.

Osteoblasten sezernieren, zusammen mit lokalen Stromazellen, den Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (M-CSF), den RANK-Liganden (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) (12, 13). M-CSF bindet an den Rezeptor c-fms auf der Zelloberfläche von Osteoklasten-Vorläufern. Über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Fos und PU.1 fördert M-CSF das Überleben und die weitere Proliferation der Vorläuferzellen (12, 13). Ein Mangel von c-Fos im Mausmodell zeigt einen Phänotyp mit deutlicher Osteopetrose (3). RANKL bindet an den Rezeptor-Aktivator von NF-KappaB (RANK) auf Osteoklasten und deren Vorläufern. RANK ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie (16). Nach der Bindung kommt es intrazellulär zur Interaktion mit dem TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 6 (TRAF6) (16) und danach zur Aktivierung des NF-KappaB Signalwegs (12). Dadurch fusionieren und differenzieren die Vorläufer in reife mehrkernige Osteoklasten mit typischen Osteoklastenmerkmalen: die für die Osteoklastenfunktion wichtigen Enzyme TRAP und Cathepsin K, sowie den Calcitonin-Rezeptor zur Regulation ihrer Aktivität (13). Bereits reife Osteoklasten werden durch die Bindung von RANKL direkt zum Knochenabbau stimuliert (13).

Das ebenfalls von Osteoblasten freigesetzte OPG kann RANKL binden. So verhindert es die Bindung an RANK und damit die Reifung und Aktivierung von Osteoklasten (16). Außerdem ist es den Osteoblasten möglich, die Bewegung der Osteoklastenvorläufer zur Knochenoberfläche zu steuern. Dies geschieht über Chemokine wie Osteocalcin und Kollagen Typ I, welche sie in den Knochen einbauen (13).

Auch der Osteoklast kann Signale an die Osteoblasten senden. Das Signalmolekül TGF-ß ist an die Knochenmatrix gebunden und wird beim Abbau dieser durch die Osteoklasten freigesetzt. Es stimuliert sowohl die Osteoblastenproliferation, als auch die Produktion von OPG. So wird im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus der Knochenabbau gedrosselt und erneuter Knochenaufbau gefördert (12). Die Signale der Osteoblasten sind für die Osteoklastenreifung essenziell. Ohne sie sind Osteoklastenreifung und -aktivität deutlich gestört. Die Osteoblasten hingegen können ohne Signale der Osteoklasten Knochen synthetisieren (13).



Abbildung 2: Osteoklastenreifung und interzelluläre Kommunikation

#### 1.3. Erhöhte Knochenmasse durch verringerten Knochenabbau

Der Knochen wird, wie oben erläutert, von Osteoklasten abgebaut. Reduzierten Knochenabbau findet man bei verringerten, fehlenden oder defekten Osteoklasten (10). Daher spielen sie bei der Klassifizierung der Erkrankungen eine wichtige Rolle. So unterscheidet man osteoklastenreiche und osteoklastenarme Formen von erblichen sklerosierenden Knochenerkrankungen (10). Ein Überblick über die wichtigsten sklerosierenden Knochenerkrankungen findet sich in Abbildung 3.

Bei den osteoklastenreichen Formen entwickeln sich reife, mehrkernige Osteoklasten, die allerdings unfähig sind den Knochen abzubauen. Die Anzahl der Osteoklasten in Biopsien oder Autopsien ist normal oder sogar leicht erhöht (10). In diese Gruppe der Erkrankungen gehören die Osteopetrosen, ausgenommen autosomal dominante Osteopetrose (ADO) Typ I und einige rezessive Formen, und die ähnliche sklerosierende Erkrankung Pyknodysostose (7, 19). Bei den osteoklastenarmen Formen liegt ein Defekt in der Osteoklastendifferenzierung und -reifung zugrunde. In Biopsien findet man keine reifen mehrkernigen Osteoklasten (10). Zu dieser Erkrankungsgruppe gehören

die autosomal rezessiven Osteopetrosen aufgrund von *TNFSF11*- oder *TNFRSF11A*-Mutationen (10).

Osteopetrose ist eine Gruppe von seltenen erblichen Erkrankungen mit erhöhter Kno-Defekts chendichte aufgrund eines in der Osteoklastenfunktion oder -differenzierung (13). Diagnostisch ist Osteopetrose durch vermehrte Verschattung auf Röntgenbildern zu erkennen (8). Man unterscheidet 3 Hauptformen: die infantile maligne Osteopetrose, die intermediäre Form und die benigne Osteopetrose (1). Die infantile maligne Form unterliegt einem autosomal rezessiven Vererbungsmodus. Die klinischen Verläufe sind schwer und enden ohne adäquate Behandlung oft letal (12). Die autosomal dominante Osteopetrose (ADO) oder benigne Form präsentiert sich klinisch deutlich milder (1, 8). Die intermediäre Form wird zwar autosomal rezessiv vererbt, jedoch erinnern die milderen Verläufe an die ADO (19).

Die infantile maligne Osteopetrose oder autosomal rezessive Osteopetrose (ARO) manifestiert sich meist innerhalb des ersten Lebensjahres und schränkt die Lebenserwartung der betroffenen Patienten enorm ein (1). Pathognomonisch sind sklerosierte, röntgendichte Knochen, die mit einer erhöhten Frakturrate einhergehen. Häufig kommt es bei den Betroffenen zu Osteomyelitis, einer Entzündung des Knochenmarks (8). Die Markhöhle des Knochens ist eingeengt, was Auswirkungen auf die intramedulläre Blutbildung hat (12). Mögliche Folge ist die lebensgefährliche Panzytopenie, eine gleichzeitige Verminderung von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten im peripheren Blut (1, 10). Durch den Mangel an Leukozyten resultieren häufig rezidivierende Infekte und durch verringerte Erythrozyten eine Anämie (7). Kompensatorisch findet die Blutbildung deshalb extramedullär in Milz und Leber statt. Dies kann eine Organhypertrophie zur Folge haben (8). Weiterhin kommt es zu Kleinwüchsigkeit der Betroffenen. Durch die gestörte Homöostase der Blutmineralien entsteht eine Hypokalziämie, die schlimmstenfalls zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus führen kann (1, 8). Ebenso von klinischer Bedeutung sind neurologische Defizite, darunter Taub- und Blindheit. Diese können, je nach Untertyp der infantilen malignen Osteopetrose, primär oder sekundär auftreten.

Die infantile maligne Osteopetrose kann durch Mutationen in verschiedenen Genen ausgelöst werden. Den größten Anteil mit etwa 50% machen Mutationen im *TCIRG1*-Gen aus (10). *TCIRG1* kodiert für die a3-Untereinheit der V-ATPase, der Protonenpumpe der Osteoklasten. Folglich wird die Ansäuerung in der Howship-Lakune gestört (7).

16

Bei dieser Form treten die neurologischen Defizite sekundär auf: Durch Sklerose und Hyperostose des Schädelknochens werden die Hirnnerven komprimiert und es kommt zu Funktionseinbußen (10).

Eine deutlich schwerere neurologische Beteiligung zeigen Patienten mit *CLCN7*-Mutationen (10). Das Genprodukt von *CLCN7* ist der spannungsgesteuerter Chlorid-Kanal in der "Ruffled membrane" der Osteoklasten (7). Auch Zellen der Retina und des Gehirns exprimieren diesen Chlorid-Kanal. Mutationen in *CLCN7* verändern die Funktion des Kanals ebenfalls im Nervensystem (primäre neurologische Beteiligung) (10). Eine *CLCN7*-Mutation findet sich bei 13-15% der Patienten mit ARO (7, 10).

Eine schlechte Prognose durch primäre neurologische Beteiligung zeigen ebenso Patienten mit Mutationen im *OSTM1*-Gen, früher *GL*-Gen, die in etwa 5% der Fälle gefunden werden (10). *OSTM1* kodiert für das Osteopetrose-assoziierte-Transmembranprotein (8). Gehirnabnormitäten und epileptische Anfälle sind klinisch auffällig (10). Im Allgemeinen ähnelt das klinische Erscheinungsbild der *OSTM1*-Fälle den *CLCN7*-Fällen, was sich durch Interaktion beider Proteine auf molekularer Ebene erklären lässt (10).

Mutationen im Gen *SNX10* verursachen milder ausgeprägte Phänotypen, wobei die Variabilität groß ist. Häufig werden Anämien und sekundäre neurologische Beteiligung beobachtet (20). *SNX10* kodiert für ein Mitglied der Sorting-Nexin-Familie. Diese Proteine sind maßgeblich am intrazellulären Transport von Endosomen beteiligt (20). Ebenfalls autosomal rezessiv vererbt, aber zu den osteoklastenarmen Formen gezählt sind RANK- und RANKL-abhängige Osteopetrosen (10). Osteoklastenarme Formen machen mit etwa 30% den kleineren Anteil der AROs aus (10). Durch Mutationen in den Genen *TNFRSF11A* (kodiert für RANK) und *TNFSF11* (kodiert für RANKL) wird die osteoblastengesteuerte Reifung der Osteoklasten behindert. Die klinischen Erscheinungsbilder ähneln sich: Patienten präsentieren, zusätzlich zur Osteopetrose, Immundefekte (10). Die RANKL-abhängige Osteopetrose wird teilweise als intermediäre Osteopetrose klassifiziert (21).

Ein nur geringer Anteil aller Osteopetrosen wird durch Mutationen im Gen *PLEKHM1* ausgelöst. Das daraus entstehende Protein spielt eine wichtige Rolle im vesikulären Transport der Osteoklasten (10). Die Freisetzung lysosomaler Enzyme ist gestört. *PLEKHM1*-Mutationen gehören zu den intermediären Osteopetrosen. Die Patienten sind klinisch und radiologisch gering betroffen (10).

Eine weitere intermediäre Form ist die Osteopetrose mit renaler tubulärer Azidose, ver-

17

ursacht durch eine Mutation im *CA2*-Gen (1). *CA2* kodiert das Enzym Carboanhydrase 2, welches im Osteoklasten Protonen zur extrazellulären Ansäuerung bereitstellt (7).

Eine x-chromosomal rezessiv vererbte und mit Immundefekten und Lymphödemen assoziierte Form der Osteopetrose entsteht durch Mutationen im *IKBKG*-Gen. Es kodiert für den NF-KappaB essenziellen Modulator (NEMO) (10). Noch ist unklar, ob diese Form der Osteopetrose als osteoklastenreich oder osteoklastenarm eingestuft werden sollte. Obwohl NF-KappaB für die Reifung und Differenzierung der Osteoklasten wichtig ist (12), konnten bei zwei Patienten mit Mutationen im NEMO-Gen Osteoklasten im Biopsat gefunden werden. Ein anderer Patient mit einer ähnlichen Mutation zeigte allerdings keine Osteoklasten (10).

Eine weitere osteoklastenarme Form der Osteopetrose ist die Dysosteosklerose (22). Klinisch zeigen sich diffuse Osteosklerose, Verbreiterung der Diaphysen, Abflachung der Wirbelkörper und kleine Körpergröße. Hauterscheinungen, Zahnschmelzdefekte, Makuladegeneration, Hirnnervenlähmungen und Entwicklungsverzögerung sind möglich (22, 23). Bei zwei Patienten mit Dysosteosklerose konnten Mutationen im Nukleosid-Transporter Gen *SLC29A3* identifiziert werden. Der Transporter ist hauptsächlich in Lysosomen lokalisiert. Es wird vermutet, dass *SLC29A3* für die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten von Bedeutung ist. Der genaue Pathomechanismus, sowie der Vererbungsmodus sind allerdings noch unklar (22, 23).

Neben den autosomal rezessiven Osteopetrosen, gibt es auch autosomal dominante Formen (ADO). Mit einer Inzidenz von 1:20.000 Geburten kommt die dominante Osteopetrose deutlich häufiger vor (8). Klinisch ähnelt die Symptomatik den rezessiven Formen. ADO zeigt im Verhältnis mildere Ausprägungen (8), eine neurologische Beteiligung tritt deutlich seltener auf (12).

Typ I der ADOs beruht auf einer aktivierenden Mutation im *LRP5*-Gen (19). Diese führt zu Gentranskription und letztlich zu vermehrter Reifung und Aktivität der Osteoblasten (13). Somit kann diese Erkrankung eigentlich nicht zu den klassischen Osteopetrosen gezählt werden (19). Osteopetrosen entstehen definitionsgemäß aufgrund von Osteoklastendefekten (8). Vielmehr sollte ADO Typ I als High-Bone-Mass-Syndrom eingeordnet werden (7). Auch Mutationen in *LRP4* konnten als ursächlich für High-Bone-Mass-Syndrome identifiziert werden (15). Der Phänotyp erinnert an Sklerosteose (24, 25). ADO Typ II oder Albers-Schönberg-Krankheit wurde nach dem Erstbeschreiber und deutschen Radiologen Albers Schönberg benannt (19). ADO Typ II wird durch Mutationen im *CLCN7*-Gen ausgelöst. Im Gegensatz zu den rezessiven *CLCN7*-Mutationen handelt es sich hier nicht um Abbruch-, sondern lediglich um Missense-Mutationen, was die mildere Ausprägung erklärt (7). Typisch ist ein Auftreten in der späten Kindheit oder in der Adoleszenz. Radiologisch zeigen sich pathognomonische Sandwich-Wirbel (12). Komplikationen sind häufige Frakturen, schlechte Frakturheilung, Skoliose, Hüft-Osteoarthritis und Osteomyelitis(8, 12). Letztere kann die Mandibula betreffen, zu dentalen Abszessen führen (8) und sogar nekrotische Veränderungen hervorrufen (19). Mit einem Auftreten von 5% sind Taub- und Blindheit selten (12), sollten jedoch nicht vernachlässigt werden.

Eine den Osteopetrosen ähnliche Erkrankung ist die Pyknodysostose, die ebenfalls durch eine Osteoklastendysfunktion ausgelöst wird (12). Ursächlich für die Erkrankung sind Mutationen im Gen *CTSK*, das für die Protease Cathepsin K kodiert (12). Es handelt sich um einen autosomal rezessiven Erbgang (7). Wie bei den Osteopetrosen findet sich auch hier eine erhöhte Frakturrate (7). Beginn der Krankheit liegt im Kleinkind- oder frühen Kindesalter. Typisch sind unproportionierter Kleinwuchs, verstärkte Lumballordose, Genu valgum (x-förmige Beinfehlstellung) und Schädeldeformitäten mit fazialen Fehlbildungen. Die Finger zeigen Akroosteolysen (Knochenauflösungen der Endglieder von Fingern und Zehen) oder völliges Fehlen der Endphalangen, Nägel sind hypoplastisch. Auf Röntgenbildern findet man eine generalisierte Osteosklerose, an den langen Röhrenknochen Hyperostosen des Endost und folglich eingeengte Markkanäle (7, 12).

Neue In-vitro-Untersuchungen zeigen eine schwere Form der Osteopetrose bei *DAP12*-Knockout-Mäusen. DAP12 ist ein Signalmolekül der Osteoklasten, welches zur Ausbildung des osteoklastischen Zytoskeletts und der Matrixresorption erforderlich ist (26).

#### 1.4. Erhöhte Knochenmasse durch vermehrten Knochenaufbau

Gleichermaßen kann erhöhter Knochenaufbau zu erhöhter Knochenmasse führen (7). Ursächlich sind hier hauptsächlich Genmutationen, die Proliferation und Funktion der Osteoblasten regulieren (12). Nach de Vernejoul & Kornak 2010 lassen sich die Erkrankungen durch erhöhten Knochenaufbau anhand dreier betroffener Signalwege klassifizieren: Störungen im TGF-ß-Signalweg, im Wnt-Signalweg und im Eicosanoid-Signalweg (7).

Zur ersten Gruppe gehören Osteopoikilose und die progressive diaphysäre Dysplasie, beziehungsweise Camurati-Engelmann Erkrankung (7).

Osteopoikilose ist eine benigne, meist asymptomatisch verlaufende Erkrankung, die meist als Zufallsbefund in Röntgenbildern festgestellt wird. Röntgenbilder zeigen multiple, kleine sklerotische Verschattungen von runder oder ovaler Form (8). Hauptsächlich betroffen sind die Enden kurzer Röhrenknochen, metaepiphysäre Regionen der langen Röhrenknochen, sowie Becken-, Handwurzel- und Fußwurzelknochen (7). Inaktivierende, autosomal dominant vererbte Mutationen im *LEMD3*-Gen sind ursächlich (21). Das Protein LEMD3 sitzt in der Membran des Zellkerns und übermittelt Informationen über die Bindung von TGF-ß ins Kerninnere (27). Die Camurati-Engelmann Erkrankung beruht auf einer autosomal dominanten Mutation im Gen *TGFB1*. Klinisch findet man endostale und periostale Hyperostosen der langen Röhrenknochen, wobei im Besonderen Tibia und Femur betroffen sind, aber auch Schädelknochen und Becken. Patienten haben starke Knochenschmerzen, meist in den Beinen lokalisiert (7).

Der nächsten Erkrankungsgruppe gemeinsam ist eine Veränderung im Wnt-Signalweg (7), der für die Reifung der Osteoblasten entscheidend ist (13). Das *SOST*-Gen kodiert für den Wnt-Antagonist Sklerostin (7). Durch rezessive Mutationen entstehen sowohl die Erkrankung Sklerosteose, als auch das Van-Buchem-Syndrom (21). Bei beiden ist die Hyperostose rein endostal lokalisiert. Beim Van-Buchem-Syndrom üblich sind eine Verlängerung des Kiefers und eine neurologische Beteiligung. Sklerosteose unterscheidet sich vom Van-Buchem-Syndrom durch Syndaktylie der Finger und Zehen sowie ein großes Körpermaß (7).

Die Erkrankung endostale Hyperostose ist weniger symptomatisch als das Van-Buchem-Syndrom und die Sklerosteose. Radiologische Zeichen von erhöhter Knochenmasse im kortikalen und trabekulären Knochen stehen im Vordergrund. Ursächlich ist eine Mutation im *LRP5*-Gen (7).

Bei Osteopathia striata findet man radiologisch eine longitudinale Streifung der Metaphysen langer Röhrenknochen (8). Osteopathia striata kann isoliert, dann meist symptomlos als radiologische Kuriosität (7), oder in Assoziation mit kranialer Sklerose auftreten (8). Hierbei sind Hirnnervenlähmungen eine häufige Erscheinung (7). Der Vererbungsmodus ist x-chromosomal und man findet Mutationen im Gen *WTX* (21), ein wei-

20

terer Inhibitor im Wnt-Signalweg (7). Typischerweise fehlen bei allen diesen Erkrankungen die rezidivierenden Frakturen (7).

Zwei weitere sklerosierende Erkrankungen beruhen auf Mutationen in Genen des Eicosanoid-Signalwegs (7).

Prostaglandine stimulieren die Synthese von RANKL, gleichermaßen wird die OPG-Produktion gehemmt. Weiterhin beeinflussen sie die Reifung der Osteoklasten (28). Die autosomal dominante Pachydermoperiostose und das autosomal rezessive Ghosal-Syndrom gehören in diese Erkrankungsgruppe (7). Beide gehen mit kortikaler Sklerose und erhöhten Prostaglandin E2-Leveln einher. Patienten mit Pachydermoperiostose haben Mutationen im *HPGD*-Gen, welches für ein wichtiges Prostaglandin-abbauendes Enzym kodiert. Klinisch fallen vor allem Verlängerungen von Händen und Füßen und Gelenkbeschwerden auf (7). Beim Ghosal-Syndrom findet man Mutationen im Gen für die Thromboxan A Synthase 1 (*TBXAS1*) (21). Patienten zeigen eine Osteosklerose und hypoplastische Markkanäle, die eine Anämie, oft transfusionspflichtig, und Splenomegalie nach sich ziehen (29). Blutgerinnungsstörungen wurden bisher nicht beschrieben, obwohl Thromboxan in der Aggregation der Blutplättchen eine wichtige Rolle spielt (7).



**Abbildung 3:** Überblick über die wichtigsten sklerosierenden Knochenerkrankungen, eingeteilt anhand Pathomechanismus. Unter \* finden sich bisher bekannte assoziierte Gene.

#### 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Grundlage der Arbeit sind zehn Fälle, darunter Einzelpatienten und Familien mit mehreren Betroffenen, die an erhöhter Knochenmasse leiden und von klinischen Ärzten dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité vorgestellt wurden. Bei diesen Patienten waren bisher keine krankheitsverursachenden Mutationen bekannt und noch keine Diagnose gestellt worden. Zielsetzung der Arbeit ist die Identifikation der genetischen Krankheitsursache und somit die Diagnosestellung für die Patienten.

Anhand des Phänotyps sollte zunächst eine Einteilung der Patienten erfolgen und mögliche Kandidatengene sollten ermittelt werden. Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sequenzierung nach Sanger sollten vorerst die zum Phänotyp passenden und häufigsten krankheitsverursachenden Gene von High-Bone-Mass-Erkrankungen untersucht werden.

Bisher ist die genetische Ursache erhöhter Knochenmasse in vielen Fällen noch ungeklärt; bei der Osteopetrose lassen sich etwa 70% der Fälle durch bekannte Genmutationen erklären, bei 30% ist die Ursache unbekannt (8). Falls die Sequenzierung der klassischen Diagnostikgene keine relevanten Ergebnisse liefert, sollen aus Daten eines Next-Generation-Sequencing (NGS) unter Verwendung bioinformatischer Programme mögliche Kandidatengene evaluiert und anschließend im Labor ebenso mit PCR und Sanger-Sequenzierung validiert werden.

# 2. Methoden und Material

## 2.1. Richtlinien

Die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurde beachtet. Das Labor war mit der Sicherheitsstufe 1 ausgestattet. Die Patienten waren mit der Suche nach krankheitsverursachenden Genmutationen einverstanden.

# 2.2. Klinische Beschreibung des Phänotyps und Suche geeigneter Kandidatengene

Die Patienten, deren DNA in dieser Arbeit analysiert wurde, waren größtenteils keine Patienten der Charité, viele stammten aus dem Ausland. Einige der Patienten waren bereits verstorben oder der Zeitpunkt ihrer Erstvorstellung lag längere Zeit zurück. Kontakt zu den Patienten oder zu den behandelnden Ärzten war somit nicht immer möglich, was leider zu teilweise unvollständigen oder gar fehlenden klinischen Angaben führte. Zunächst wurden die klinischen Befunde der Patienten und gegebenenfalls ihrer Familienmitglieder begutachtet. Wichtige Methoden hierfür waren klinische Inspektion, Erfassung der Beschwerden der Patienten und Befundung von Röntgenbildern. In einigen Fällen lagen Ergebnisse von Blutuntersuchungen vor. Bei betroffenen Familien wurde mit dem Programm CeGat Pedigree Chart Designer ein Stammbaum erstellt. Hier symbolisieren Kreise ein weibliches Geschlecht und Quadrate ein männliches. Bei Betroffenen sind die Symbole schwarz eingefärbt.

Wenn der Phänotyp eine starke Vermutung auf das krankheitsverursachende Gen erlaubte, wurde zunächst dieses Gen bei den Betroffenen nach Sanger sequenziert. Bei negativen Sequenzierungsergebnissen oder klinisch uneindeutigen Phänotypen konnte als nächster Schritt ein Next-Generation-Sequencing durchgeführt werden. Das methodische Vorgehen ist in Abbildung 4 orientierend dargestellt.



Abbildung 4: Methodisches Vorgehen zur Bestimmung der genetischen Krankheitsursache bei Patienten mit High-Bone-Mass-Phänotyp

#### 2.3. Next-Generation-Sequencing

Das Next-Generation-Sequencing ist ein Verfahren, um zeit- und kosteneffizient das gesamte menschliche Genom zu sequenzieren. Man unterscheidet die Sequenzierung des gesamten Genoms, "whole genome sequencing", von der Sequenzierung des gesamten Exoms, "whole exome sequencing", welches nur die kodierenden Bereiche der DNA umfasst. Bei der Suche nach Veränderungen, die die Knochenmasse beeinflussen, kann ein Bone-Mass-Panel (BMP) verwendet werden. Dabei werden gezielt bestimmte Gene, ursächlich für Störungen der Knochendichte, sequenziert. Die im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité im BMP sequenzierten Gene sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Für die Sequenzierung wurden die kodierenden Genabschnitte der gelisteten Gene mit Agilent SureSelect der Firma Genomics nach Herstellerangaben angereichert. Die Sequenzierung erfolgte mit dem HiSeq1500 der Firma Illumina. Die DNA wird in zahlreichen kleinen Abschnitten ("Reads") sequenziert, welche durch bioinformatische Software und durch Abgleich mit einem Referenzgenom in die richtige Reihenfolge gebracht werden ("Alignment"). Die Ergebnisse werden in einer Datei vom Variant-Call-Format (VCF) dargestellt.

ACP5	ESR1	MAFB	SOST
ADAMTS2	FAM123B	MMP2	SP7
ALPL	FAM20C	OSTM1	SPP1
ANKH	FBLN5	PHEX	TBXAS1
ATP6V0A2	FERMT3	PLEKHM1	TCIRG1
BMP1	FGF23	PLOD1	TGFB1
BMP2	FKBP10	PLOD2	ТМЕМ38В
CA2	GJA1	PPIB	TNFRSF11A
CASR	GORAB	PTH1R	TNFRSF11B
CLCN7	HPGD	PYCR1	TNFSF11
COL1A1	IFITM5	RASGRP2	TREM2
COL1A2	IKBKG	RUNX2	TYROBP
CRTAP	LEMD3	SERPINF1	VDR
СТЅК	LEPRE1	SERPINH1	WNT1
DLX3	LMNA	SLC29A3	WNT16
DMP1	LRP4	SLC34A3	ZMPSTE24
EFEMP2	LRP5	SLC39A13	
ENPP1	LRP6	SNX10	

Tabelle 1: Gene des Bone-Mass-Panel in alphabetischer Reihenfolge

# 2.4. Bewertung der Varianten mittels bioinformatischer Datenbanken und Software

BMP und Exom-Sequenzierung liefern eine große Anzahl an Veränderungen im Genom des Patienten. Zur Reduzierung und Priorisierung der hohen Variantenzahl stehen zahlreiche Internetplattformen zur Verfügung. Diese wurden ebenso genutzt, um letztlich gefundene, mit Sanger-Sequenzierung bestätigte Varianten hinsichtlich ihrer Pathogenität zu bewerten. Eine übersichtliche Darstellung aller verwendeten Datenbanken und Software findet sich in den Tabellen 14 und 15.

Für die visuelle Darstellung der NGS-Ergebnisse wurde der Integrative Genomics Viewer (IGV) verwendet. Dieses Programm zeigt die Anzahl der entstandenen Reads an und ermöglicht eine Einschätzung der Qualität des NGS (30). NGS-Ergebnisse mit einer hohen Anzahl an Reads sind qualitativ hochwertiger als solche mit nur geringer Abdeckung. Weiterhin zeigt IGV an, wo in den genomischen Fragmenten die gefundenen Varianten lokalisiert sind. Liegen die Varianten sehr im Randbereich, sind falschpositive und falschnegative Ergebnisse wahrscheinlicher, da die Sequenzierungen im Randbereich oft nicht so sauber sind wie im mittleren Bereich der Fragmente.

GeneTalk ist eine webbasierte Datenbank und Experten-Austausch-Plattform, die zum Filtern und Priorisieren von humanen genetischen Varianten aus dem NGS genutzt werden kann (31). Die Patientendaten wurden in Form einer Datei im Variante-Call-Format (VCF) auf die Plattform hochgeladen. Auf diese Dateien konnten nun verschiedene Filter angewendet werden. Wichtige Filter sind Frequenz des Auftretens einer Variante in der Normalbevölkerung, Ausschluss von bekannten einzelnen Nukleotidpolymorphismen ("single nukleotide polymorphism"/dbSNP) und der Vererbungsmodus, falls eine Familie betrachtet wird. Ähnlich strukturiert ist die Internetplattform Phenix (32). Nach Angabe des Phänotyps mittels Stichwörtern aus Human Phenotype Ontology (HPO), des Vererbungsmodus und der Häufigkeit der Mutation durchsucht das Programm die hochgeladene VCF-Datei. Phenix erstellt nun eine Rangliste der den Phänotyp auslösenden Gene, die in der VCF-Datei Veränderungen aufweisen, sortiert nach ihrer Eintrittswahrscheinlichkeit. Die Plattform MutationTaster erlaubt eine schnelle Einschätzung der genetischen Varianten hinsichtlich ihres krankheitsverursachenden Potenzials. So werden die Varianten in krankheitsverursachend (kv) und Polymorphismen eingeteilt. Darüber hinaus gibt MutationTaster einen AA-Score und den Konservierungsgrad der Proteinsequenz an. Der AA-Score beschreibt wie sehr sich die neu entstandene Aminosäurenseguenz von der ursprünglichen unterscheidet. Ist der AA-Score hoch, so entsteht durch die neue Aminosäure eine andere Raumstruktur des Proteins. Das kann Auswirkungen auf seine Funktion haben. Der Konservierungsgrad beschreibt die Stabilität von Proteinsequenzen in der Evolution. Mutationen in Regionen von hohem Konservierungsgrad haben stärkere Auswirkungen auf den Phänotyp als Mutationen in wenig konservierten Regionen. Dabei werden humane Wildtypsequenzen mit der mutierten Sequenz und Sequenzen verschiedener Spezies verglichen, darunter beispielsweise Schimpanse, Hausmaus und die Fliege. Die in dieser Arbeit aufgeführten

26

Abbildungen zur Proteinsequenz wurden zur besseren Übersichtlichkeit nach der Vorlage von MutationTaster modifiziert. Zusätzlich verweist MutationTaster auf die unten beschriebenen bioinformatischen Datenbanken ExAC und 1000 Genomes Browser.

SIFT und Polyphen geben ebenfalls eine Einschätzung, ob Varianten als schädigend einzustufen sind. Diese beiden Scores lassen sich allerdings nur auf Punktmutationen anwenden, Insertionen und Deletionen können nicht bewertet werden. ExAC Browser und 1000 Genomes Browser sind Online-Datenbanken, die eine Vielzahl sequenzierter Genome mit allen identifizierten Veränderungen enthalten. So lässt sich beurteilen, wie oft eine bestimmt Variante bisher gefunden wurde. Kommt eine Variante in der Allgemeinbevölkerung häufig vor, ist es weniger wahrscheinlich, dass sie pathogene Effekte besitzt. Die Internetplattform Human Splicing Finder beurteilt die Lage der Veränderung im Exon und ermöglicht eine Einschätzung, ob die Variante einen Effekt auf das Spleißen der mRNA, einen wichtigen Zwischenschritt vom Gen zum Protein, hat.

Mit Hilfe von PubMed und OMIM wurde nach Assoziationen der Mutationen mit veränderter Knochenmasse gesucht. PubMed ist eine Online-Datenbank mit Verlinkungen zu medizinischen und bioinformatischen Publikationen. Bei OMIM handelt es sich um eine Internetplattform mit humanen Genen und Phänotypen.

#### 2.5. Validierung der Kandidatengene im Labor

#### 2.5.1. Primer-Design

Für die Untersuchung der menschlichen Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Labor wird diese zunächst vervielfältigt. Die Vervielfältigung der DNA geschieht mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Für diese Reaktion, sowie für die spätere Sequenzierung nach Sanger, werden Primer benötigt. Dabei handelt es sich um Oligonukleotide, die für die DNA-replizierenden Enzyme, die Polymerasen, den Startpunkt der Replikation markieren. Man benötigt für jedes Gen je einen Vorwärts- und einen Rückwärtsprimer.

Für die Gene *CLCN7, LRP5, OSTM1* und *TNFRSF11A*, die bereits im Labor etabliert waren, wurden die vorhandenen Diagnostik-Primer verwendet. Für neue Gene mussten in einem ersten Schritt Primer designt und bestellt werden. Um geeignete Primer zu finden, wurde zunächst die Lokalisation der aus den NGS-Daten entnommenen Punktmutation in der cDNA-Sequenz des Gens auf der Online-Plattform Ensembl gesucht und dem entsprechenden Exon zugeordnet. Die Sequenz des betroffenen Exons

und je ein Teil des vorherigen sowie des nachfolgenden Introns wurden auf einer weiteren Internet-Plattform Primer 3 eingefügt. Die Optionen "Pick Left Primer", Auswahl eines Vorwärtsprimers, und "Pick Right Primer", Auswahl des Rückwärtsprimers, wurden ausgewählt. Primer 3 lieferte daraufhin verschiedene Kombinationsvorschläge, aus denen dasjenige Primer-Paar gewählt wurde, welches für diesen Genabschnitt hoch spezifisch ist und dessen Primer-Bindungstemperaturen sich nicht mehr als 1°C unterscheiden. Bei kurzen Exons und Introns kann ein Primer-Paar für zwei Exons verwendet werden.

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt. Nach Ankunft im Labor wurden die Primer nach Herstellerangaben mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gelöst und danach im Verhältnis 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

#### 2.5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren, um DNA in vitro zu vervielfältigen. Für diese Reaktion benötigt man Thermocycler. Für die hier gezeigten Experimente wurde das Modell Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) genutzt.

Im ersten Schritt der PCR wird die DNA auf 95°C erhitzt. Dadurch wird der DNA-Doppelstrang thermisch denaturiert und es entstehen zwei DNA-Einzelstränge, die komplementär zueinander sind. Nun wird die Temperatur auf 50-65°C abgesenkt, was die Primer-Hybridisierung, also Bindung der Primer an die Einzelstränge, ermöglicht. Die den DNA-Strang amplifizierende Polymerase lagert jetzt in 3'-5'-Richtung Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) mit ihrem 5'-Ende an das 3'-OH-Ende der Primer an. An das 3'-OH-Ende des dNTPs kann nun ein weiteres dNTP angelagert werden. Da die Polymerase sehr hohen Temperaturen ausgesetzt ist, wird eine bei 72°C aktive Polymerase aus dem Bakterium Thermus aquaticus (Taq) verwendet, das natürlicherweise in heißen Quellen lebt. Man spricht daher von Taq-Polymerase. So entstehen zwei DNA-Doppelstränge von der durch die Primer festgelegten Sequenz. Durch zahlreiche Wiederholungen dieses Vorgangs im Thermocycler wird die DNA exponentiell vermehrt.

Für die Inkubation im Thermocycler wurden für alle zu untersuchenden Gene spezielle Reaktionsansätze pipettiert. Dabei benötigt man je einen Ansatz für den Patienten und sowohl eine Positiv-, als auch eine Negativ-Kontrolle. Bei der Positiv-Kontrolle handelt es sich um eine DNA-Probe eines gesunden Menschen, bei der Negativ-Kontrolle wird keine DNA zugegeben, sie dient dem Ausschluss einer Verunreinigung der Reaktionsansätze. Bei vorliegenden Blutproben Angehöriger wurde für jedes Familienmitglied ein zusätzlicher Reaktionsansatz angesetzt. Ein erster Reaktionsansatz enthielt einen Firepol-Mix, einen Vorwärts- und einen Rückwärts-Primer, ddH<sub>2</sub>O und die entsprechende DNA-Probe, ausgenommen der Negativ-Kontrolle. Der Firepol-Mix beinhaltet eine Polymerase, dNTPs, also zu gleichen Teilen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin, und einen Puffer im entsprechenden Mischungsverhältnis. Die genauen Mengenangaben der einzelnen Ingredienzen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Allerdings lieferte die PCR einiger Ansätze kein in der Gelelektrophorese sichtbares PCR-Produkt, weshalb ein zweiter Reaktionsansatz pipettiert wurde. In diesen wurden anstelle des Firepol-Mix die darin enthaltenen Bestandteile einzeln einpippetiert (Tabelle 3). Wenn auch hier die Gelelektrophorese negativ war, wurden 2µl ddH<sub>2</sub>O durch Q-Solution oder DMSO ersetzt. Alle Ansätze wurden im Thermocycler mit dem Programm MS-long inkubiert (siehe Tabelle 4).

#### Tabelle 2: Reaktionsansatz 1

Substrat	Menge pro Ansatz
Firepol-Mix	4 µl
Vorwärtsprimer	0,4 µl
Rückwärtsprimer	0,4 µl
ddH <sub>2</sub> O	14,2 µl
DNA	1 µl

**Tabelle 3:** Reaktionsansatz 2

Substrat	Menge pro Ansatz
Таq	0,2 µl
dNTPs	0,25 µl
Puffer	2,5 µl
Vorwärtsprimer	0,5 µl
Rückwärtsprimer	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	20,05 µl
DNA	1 µl

Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
1	95	180
	95	30
3	61	45
5	72	90
	95	30
2	59	45
5	72	90
	95	30
3	57	45
	72	90
	95	30
33	55	45
55	72	90
1	72	600
	16	×

 Tabelle 4: Ms-long Programm

#### 2.5.3. Gelelektrophorese

Die nach jeder PCR durchgeführte Gelelektrophorese überprüft, ob während der Reaktion ausreichend PCR-Produkt, also DNA, entstanden ist. Es handelt sich hierbei um ein analytisches Verfahren, mit dem verschieden große Moleküle durch elektrische Spannung aufgetrennt werden.

Die Proben wurden hierbei auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Das Agarose-Gel besteht aus 1,5 g Agarose auf 100 ml TAE-Puffer (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-Acetat-EDTA-Puffer). Außerdem hinzugegeben wurden 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml, ein roter Farbstoff, der dem Nachweis von Nukleinsäuren dient. Die Mischung wurde kurz aufgekocht und zum Aushärten in eine Form gegossen. Durch die Form entstehen im Gel kleine Kammern für die Proben, je 26 in einer Reihe. Das fertige Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer gelegt, die mit TAE-Puffer gefüllt war. Um das PCR-Produkt am Ende der Gelelektrophorese größenmäßig einordnen zu können, wird eine DNA-Ladder benötigt. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus DNA- Fragmenten verschiedener Größen. 5 µl GeneRule DNA-Ladder wurden je in die erste und letzte Kammer einer Reihe pipettiert.

Zur späteren Weiterverarbeitung mit SAP/EXO wurden dem PCR-Produkt 7 µl entnommen. Dem verbleibenden PCR-Produkt wurden 3 µl 1xLoading-Dye zugefügt, was die Dichte der Probe erhöht und sie blau anfärbt. Die Dichteerhöhung ist nötig, damit sich das PCR-Produkt am Boden der Kammern absetzt. Die verbleibenden 24 Kammern einer Reihe wurden mit je 10 µl PCR-Produkt befüllt, wobei je auch eine Positivsowie eine Negativ-Kontrolle mitgeführt wurden.

Je nach Größe der Gelelektrophoresekammer wurde eine Spannung von ungefähr 120-150 Volt angelegt. Die elektrische Spannung lässt die negativ geladenen DNA-Fragmente auf die positive Anode des Stroms zu wandern. Dabei bewegen sie sich durch die Poren des Agarose-Gels. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller und somit in der gegebenen Zeit von etwa 20-30 Minuten weiter als größere. Nach Ablauf der Zeit wird die Spannung abgestellt, das Agarose-Gel der Kammer entnommen und für eine Aufnahme in eine G:Box gelegt. Das Ethidiumbromid hat in der Kammer mit den DNA-Fragmenten interkaliert und fluoresziert dadurch im ultravioletten Licht der G:Box, was die einzelnen DNA-Banden sichtbar macht.

#### 2.5.4. Enzymatische Reinigung des PCR-Produkts mit SAP/EXO

Um das PCR-Produkt weiter verarbeiten zu können, ist eine enzymatische Aufreinigung nötig. Dabei dephosphoryliert das Enzym Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) die DNA, während das Enzym Exonuclease 1 (EXO) übrig gebliebene dNTPs und Primer beseitigt. Im Thermocycler wurden die Reaktionsansätze aus SAP, EXO, ddH<sub>2</sub>O und PCR-Produkt (siehe Tabelle 5) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Enzyme zu aktivieren. Die anschließende Inkubation bei 75°C für 15 Minuten deaktiviert die Enzyme.

Reagenz	Menge pro Ansatz
SAP	0,32 µl
EXO	0,09 µl
ddH <sub>2</sub> O	2,59 µl
PCR-Produkt	7 µl

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die enzymatische Aufreinigung des PCR-Produkts

#### 2.5.5. Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung nach Sanger ähnelt vom Ablauf einer normalen PCR. Der Reaktionsansatz für die Sequenzierung bestand aus BigDye®, Sequencing Buffer, ddH<sub>2</sub>O und dem SAP/EXO-Produkt (siehe Tabelle 6) und wurde im Thermocycler mit dem in Tabelle 7 beschriebenen Programm inkubiert. BigDye® ist ein Gemisch, welches neben den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), zusätzlich Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) enthält. Die dNTPs und ddNTPs unterscheiden sich durch das Vorhandensein des 3'-OH-Endes. Da dieses bei den ddNTPs fehlt, kann die Polymerase hier keine weiteren dNTPs anlagern, weshalb die Amplifikation an dieser Stelle unterbrochen wird. Die ddNTPs sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, wobei jede Base einem unterschiedlichen Farbstoff entspricht. Da die normalen dNTPs im Überschuss vorhanden sind, werden die ddNTPs nur gelegentlich nach dem Zufallsprinzip eingebaut. So kommt es an jeder beliebigen Stelle des DNA-Strangs einmal zum Einbau eines ddNTPs und damit zum Kettenabbruch. Folglich wird jede Stelle in der Basenreihe mindestens einmal fluoreszierend markiert.

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die Sanger-Sequenzierung

Reagenz	Menge pro Ansatz
BigDye®	0,3 µl
Sequencing Buffer	1,7 µl
ddH <sub>2</sub> O	6,5 µl
SAP/EXO-Produkt	1 µl

Tabelle 7: Sequenzierungs-Programm

Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
1	95	60
	95	10
30	50	5
50	60	240
1	16	8

#### 2.5.6. Fällung

Die Fällung ist ein Verfahren zur Präzipitation und Isolierung der in PCR und Sequenzierung entstandenen DNA. Die Fällung wurde durch den vollautomatisierten Fällungsroboter Biomek NXP durchgeführt. Benötigte Substanzen sind "Magnetic Beads System", Ethanol und 0,1% EDTA. Mit "Magnetic Beads System" wird die DNA sedimentiert und überschüssige Bestandteile wie Primer, dNTPs, ddNTPs, Enzyme und Lösungen können schrittweise herausgewaschen werden.

#### 2.5.7. Sequenzierung im Sequencer

Die terminale Sequenzierung fand im 3730 DNA Analyzer (Firma Applied Biosystems) statt. Zunächst werden die gefällten Kettenabbruch-Produkte aus PCR und Sequenzierungs-Reaktion durch Kapillargelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten ddNTPs werden durch Bestrahlung mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Diese wird vom Computer detektiert und in einen entsprechenden Peak in einem Elektropherogramm umgewandelt, welches die Nukleotidabfolge wiedergibt. Dabei entsteht für Adenin ein grüner, für Cytosin ein blauer, für Guanin ein schwarzer und für Thymin ein roter Peak.

#### 2.5.8. Auswertung der Sequenzen

Im nächsten Schritt wurden die Sequenzen mit entsprechenden Computer-Programmen ausgewertet. Enthielten die Sequenzen sehr hohe Start- oder Schlusspeaks, wurden diese mit dem Programm Sequencing Analysis herausgeschnitten, um die weitere Auswertung zu erleichtern. Zur eigentlichen Auswertung standen zwei Programme zur Verfügung. Für bereits im Labor etablierte Gene wurde das Programm SequencePilot benutzt, für erstmals sequenzierte Gene beziehungsweise Exons das Programm DNA STAR SeqMan. Beide Programme vergleichen die Sequenzen des Patienten mit einer Referenzsequenz und mit der Sequenz der Positivkontrolle. Im Piloten sind diese Sequenzen bereits eingeladen und das Programm markiert auffällige Stellen der Sequenz und ordnet sie einem Exon zu. Referenzsequenzen für DNA STAR SeqMan wurden auf der Internet-Plattform Ensemble.org herausgesucht und unter Verwendung von DNA STAR EditSeq erstellt. Ein Beispiel eines Elektropherogramms in SeqMan ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Beispielhafte Darstellung der Sequenzierungsergebnisse im Programm SeqMan

#### 2.6. Quantitative Expressionsanalyse

#### 2.6.1. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation dient der Herstellung von Ribonukleinsäure (RNA) der menschlichen Zellen, hier der Osteoklasten des Patienten. Dazu werden die Zellen mit Trizol® Reagens gelöst und die RNA nach Anleitung des Quick-RNA MiniPrep Kits von Zymo Research präpariert.

## 2.6.2. cDNA-Synthese / Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die komplementäre DNA (cDNA) wird durch das Enzym Reverse Transkriptase aus Messenger RNA (mRNA) synthetisiert. Das entsprechende Verfahren zur Gewinnung der cDNA wird cDNA-Synthese genannt. Nach Bindung der Reversen Transkriptase an die mRNA wird von ihr ein komplementärer cDNA-Strang synthetisiert. Durch PCR wird die gewonnene cDNA vermehrt. Das Verfahren wurde unter Verwendung des RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #1631 von Thermo Scientific durchgeführt. Zunächst wurde 1 µg RNA mit ddH<sub>2</sub>O und Random Hexamer Primer inku-

biert, um die Primerbindung zu ermöglichen. Nach Zugabe des Reaktionsansatzes (siehe Tabelle 8) wurde der Ansatz erneut inkubiert (siehe Tabelle 9).

Reagenz	Menge pro Ansatz
Puffer	4 µl
Ribonuklease Inhibitor	1 µl
dNTP	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

Tabelle 8: Reaktionsansatz cDNA-Synthese

 Tabelle 9:
 Thermocycler-Programm

Zeit in Minuten	Temperatur in °C	Verfahren	
5	70	DNA + Hexamer Inkubation	
∞	4	Pause + Zugabe Reaktionsansatz	
5	24,8		
10	25		
60	42	PCR-Zyklus	
10	70		
∞	4	Ende	

# 2.6.3. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR ist ein Verfahren zur Messung der tatsächlich exprimierten Genproduktmenge in bestimmten Zellen. Dafür wird die cDNA mittels PCR vervielfältigt. Unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs EvaGreen® lässt sich die gewonnene cDNA-Menge quantifizieren. Der Farbstoff liegt zunächst als nicht fluoreszierendes Dimer vor und wandelt sich bei Bindung an die DNA zu einem fluoreszierenden Monomer um. Bei Anregung durch Licht emittiert EvaGreen® grüne Lichtwellen, die von einem Detektor gemessen werden.

Für den Reaktionsansatz (siehe Tabelle 10) wurde ein Primer-Mix aus je 2,5  $\mu$ l Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 95  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O für jedes zu untersuchende Gen erstellt. Der Reaktionsablauf im ABI Prism 7500 ist Tabelle 11 zu entnehmen. Im Anschluss

wurden die Daten mit dem ABI Prism SDS Softwarepackage analysiert. Die Ergebnisse wurden grafisch in Excel dargestellt.

Reagenz	Menge pro Ansatz	
cDNA-Verdünnung (1:50)	10 µl	
EvaGreen®	2 µl	
Primer-Mix	2 µl	
ddH <sub>2</sub> O	6 µl	

Tabelle 10: Reaktionsansatz qPCR

# Tabelle 11: Programm qPCR-Cycler

Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
1	95	600
40	95	15
	60	60
1	16	œ
# 2.7. Materiallisten

Reagenz	Zusammensetzung	Hersteller
H <sub>2</sub> O	HPLC H <sub>2</sub> O	J.T. Baker
Puffer-Polymerase-Mix	5x FIREPol® MasterMix mit 12,5 mM MgCl2	SOLIS BIODYNE
dNTPs		Bioline
ddNTPs		Bioline
Loading Dye [5x]		Thermo Scientific
Agarose 1,5%	Roti®garose NEEO Ultra Qualität	Carl Roth
Ethiduimbromid Lösung	1% Lösung	Merck
TAE Puffer für Elektro-	400 mM Tris	
phorese	10 mM EDTA	
Gene Rule Ladder	1 kb	Fermentas
Shrimp-Alkaline- Phosphatase (SAP)	1 U/µl	usb®
Agilent SureSelect		Agilent Technologies
Exonuklease 1 (EXO 1)	2.000U [20.000U/ml]	New England BioLabs
Big Dye Terminator Reaktionspuffer [5x]	Version 3.1	Applied Biosystems
Big Dye Terminator	Version 3.1	Applied Biosystems
Ethanol	Absolut Ethanol	J.T. Baker
Trizol® Reagent		Life Technologies
Quick-RNA MiniPrep		Zymo Research
RevertAidTM H Minus		
First Strand cDNA		Thermo Scientific
Synthesis Kit		
EvaGreen ®		SOLIS BIODYNE

## Tabelle 13: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Beschreibung
HiSeq 1500	Illumina	Next-Generation-Sequencing
Microspin FV-2400	lab4you	Laborzentrifuge
Labofuge 400R	Heraeus Instruments	Plattenzentrifuge
GeneAmp PCR Sys- tem 9700	Applied Biosystems	Thermocycler
ST 606T Gibco BRL	Life Technologies	Elektrophorese-Kammer
G:BOX	Syngene	Gelelektrophorese UV-Kamera
Biomek NXP	Beckman Coulter	Roboter zum Fällen von Se- quenzreaktionen
3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems	48 Kapillaren Array
ABI Prism 7500	Applied Biosystems	Cycler für die qPCR

# Tabelle 14: Verwendete Software

Software	Beschreibung
ABI Prism SDS	Auswertung qPCR
DNA STAR EditSequence	Erstellung Referenzsequenzen
DNA STAR SeqMan	Auswertung Sequenzen
Integrative Genomics Viewer	Visuelle Darstellung der NGS-Ergebnisse
Sequence Pilot	Auswertung Sequenzen
Sequencing Analysis	Zuschnitt Sequenzen

Datenbank	URL
Ensemble	http://www.ensembl.org/index.html
ExAC	http://exac.broadinstitute.org/
CeGat Pedigree	http://www.cegat.de/diagpostik/pedigree-chart-designer/
Chart Designer	
GeneTalk	http://www.gene-talk.de/
Human Splicing	http://www.umd.be/HSE3/HSE.html
Finder	
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim
PhenIX	http://compbio.charite.de/PhenIX/
PolyPhen	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Primer3web	http://primer3.ut.ee/
SIFT	http://sift.bii.a-star.edu.sg/
1000 Genomes	http://browser.1000genomes.org/index.html

 Tabelle 15:
 Verwendete Online-Datenbanken, Stand jeweils 27.04.2016

|--|

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
ACAN	3	gaacactgctctggaaaggg	tgggaagcacaaactgtcag
ATP6V1H	9	agagacctgttccattagtgca	ctctcacctatcccactgcc
CHPF2	5	CCCTGTGGACACTCTCTTCT	AGGTAATGAGGTTAGGGCCC
CLCN7	1	gtagtagccggcagtttcca	gtcatcctacacgagcaacta
	2	gagtgagaatccacggagcag	gcatcttagcagagggtgaca
	3+4	ccccatgtgcagttctcttg	ctgaggcctgtggttcgtctg
	5	ctgccagagtgactgcgccag	cagcgtgttccagtgcaggtg
	6	catctgccaggctggtctgtg	gaatcacgtggtccagactca
	7	ggctgcatctgtctcagcctg	gttcaggagcagctctcttgg
	8	gctcaggtccaaagacagcgc	gtcacgcgtgtctctgagcac
	9	gcgtcacgcgtgtctctgagc	cactcagggagatgggcttcc
	10+11	tcagagctgctgactcggttg	gcatgctgcgctctcatttcc
	12	gctctccactggcaagtccag	gatagctgtggagctgagagc
	13	tggacttccgcagcctgcgtg	ctcagctgtgacgtggccata

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	
	14	gtggaggaagcatcttacca	gctgtgtatgcagcgtccttc	
	15	caagatcgcagcactgcactc	ctcgcttaggctacgggagga	
	16	cacggcgacaccaggtttgtg	gatgccttctggctgagtgtc	
	17	ggctcctggaaggtgactgtg	gtcgcacctcacgtggttcac	
	18	gtgtatgtacgcggccacgag	ggtgctgcagagaaggcagtggcc	
	19+20	ggtgctgcagagaaggcagtg	tttcctgtccagcggcttcacacct	
	21	tttcctgtccagcggcttcac	gcacacggcaaggtttgcagga	
	22+23	cgacacagcattccagcgcag	agacagagtcaccgagtcctc	
	24+25	agaggactcggtgactctgtc	gggccgagaaaccagtgactc	
COL9A3	29	accttcctctgttcctctgc	tccgctgttcttgtacccat	
COL10A1	2	ccttctatgggtgggtgtgt	TGGCCCTGTCTCACCTTTAG	
CRTAP	3	agccactgatctgatctctgt	gcttgaaccttctctcagtgatt	
CTSK	1	ctatccccgcctcctcct	tgacctaagaagtgcatctctgt	
	2	gcctagttttcctctgtttccc	gggagtctggaagctaagatga	
	3+4	gcaggctcttaattccatggtta	acctcaagaacaaagcagcag	
	5	gaagactcacaacaatgacaaca	gaggagccaacagagctg	
	6	cctattgctttgtcctagtcct	ctgtataggatcagcagcttct	
	7	gcctcacgctggtagtttg	ctggaggtgaggttgagtgt	
	8	accatcagtacctcgcacaa	tcctccagcacctaacacag	
IKBKG	3	ttctggcctctgacttcctg	ctcaccgtaacctgtgtcct	
	4	ctggggagaaagcagtgc	ccccggtctatcctcatcaa	
	5	gttcgtcctccctgagtctg	atggacccgacacttctcag	
	6	gtgatgcgagggagggaag	ggcaagtctaaggcaggtcta	
	7	agggccactctttcatcctt	gccaaagagactctccaggt	
	8	ctttgttcctgtggtgcctg	agtgagccctaacccagaac	
LRP4	10	CAGGACTCTTGCAGCTTTGG	ACACCGTTCAAATGCCTGAC	
	16	acctaaacccctattccctagtc	tttcccatgacaggcaatcc	
LRP5	1	gaggctccacaggtgacacacc	cgggtgggggagacaaagggc	
	2	ccaggcaacttcctgacaac	acttgggctcatgcaaattc	
	3	cccagcttaaggcaggaatac	tgacgctgttccaagttctg	
	4	gatggctcctccaccccgct	gcgccccagccggcact	
	5	cattcagaaacaagtgacggtcctct	tcgaacgggtttcccgaggt	

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	
	6	ctctcagctgcgtgcataac	gtcacagaggctgcccttac	
	7	atgctgcagagaccagacag	ctcccacctcagtctccaag	
	8	ctagtgaaaacatcatggccg	gcgagtagggcaaggaactac	
	9	agcattcattgtgtggcttg	aaagtgtctgaagcctttgagg	
	10	caagaagagcgaaactccg	gaaggaactccatgacctctg	
	11	gagggctgagctgaagagg	ggaacttgcaggccacag	
	12	atgtggtcgctaggctgc	acccaaccatctatgtacaccc	
	13	tgtcgagtggcgtgctatc	agcagcctggaaaccagc	
	14	agggctctccagccagtg	gtgagaggctggcattcg	
	15	tagtatagaatgtgacctgtcagcc	aaacacgctacacacaaagcc	
	16	ctctgtcctcccaagctgag	gccacacaggatcttgca	
	17	taccctccaggctgtggttc	aaggatgccaggcagcag	
	18	gctgagtccctctcaacttctg	tctccctgcaagcaaagg	
	19	cagaccttggttgctgtgc	tggaaaggcacgtctcctc	
	20	cctccaccagtggcaaag	gtagcacatccctgctccac	
	21	tctgagtctcgtgggtagtgg	agaaagcaagcatgcctcag	
	22	ggtgtgggaggaaggaagg	cctcatcagtggcatggg	
	23	gacaggcctttcccgttc	aagttctcccagccctgc	
NEIL2	3	ctgggtctgtaaggcttgga	cagtatgtccccactgctga	
OSTM1	1	cgagatgcaattgtccaaag	aggatccttcctggcaactc	
	2	acttagttccttgcttggggc	tcgctatttgctcagttgcc	
	3	ccgtgattatgaccttgtgcc	gtgctctaaaaacttggaactgc	
	4	tgccatctgcttcacataccg	actgaaggtacattcaataacactc	
	5	ctggcagaagaagttgtcctc	gccactgcacctagccctg	
	6	tgatgttgttttatttgtactgcttc	gattgttcttgcatgttctg	
PIEZO2	43	tgaatttgttgtctcttccccag	cctcaggaaacacagttgca	
PKD1L1	5	ctttctgcactttccttccca	gcctacatacgggtgagtct	
SLC29A3	3	ttgtttggaggtgggctca	tgcatcctactttggtgacca	
	6	CTGGGCTTCTGTGTCACCTA	CCCTCCTGCACTCTCTTCTC	
SOS1	24	gcatgtttgaaaaccccaac	TCAGTGCTGGCACATTCAGT	
SOST	1	gagcctgtgctactggaagg	cagaggccagcaatcttcac	
	2a	caaaagcctctggagacagg	aagtccttgagctccgactg	

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	
	2b	gtggtggcgacctagtgg	agggcctggaaggtctcag	
TBXAS1	16	gctctgctcctcatctcttct	atcccacacactcacatccc	
TBX15	5	tcacttagttcttcctgggca	gcacccaaaccaaactaaagc	
TGFB3	6	gtgcttggttttatgtggagc	tcgagaggctggaatgatca	
TNFRSF11A	1	gagcttgggcaccacctg	caaaactccggctcctct	
	4	cctctgtaccctctccatgc	atcctgctggctcctaagtg	
VPS51	9	cgggctctgattccttgtct	cctggaagtctgagtcacgt	
ZFHX4	2	TGGTTGTGTTAGCGATGGGA	CATCAGAAACAGTCGCCGAG	

Tabelle 17: Verwendete Primer qPCR

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
CA2	AAAGCTGTGCAGCAACCT	GGAATCCAGCAGATCAACAAC
CLCN7	ACTGTCCTTCTCCCTGTTGC	TGAGGAAGCACTTGATCTGG
DAP12	CGGAAACAGCGTATCACTGAG	ATTTGTAATACGGCCTCTGTGTG
OSTM1	CACACCCTGACCTGCTTTG	ACTCAGAGTTTTGTATGCTTCACG
TCIRG1	AGCTTCCAGGGCATCGTG	CGAACATCACAGCAAACAGG
TNFRSF11A	GGCTGGGTACCACTGGAG	TGCACACTGTGTCCTTGTTG
TRAF6	TCTGAAGGATTGTCCAAGGAG	TGCCAAAGGACAGTTCTGG

# 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klinische Phänotypisierung der Patienten

Familie 1: Die heute 58-jährige Indexpatientin stellte sich mit Verdacht auf eine sklerosierende Knochenerkrankung vor. Sie litt unter chronisch-rezidivierenden Lumbalgien. In röntgenologischen Aufnahmen konnte eine Zunahme sowohl der kortikalen als auch der trabekulären Knochensubstanz gesehen werden. Dabei handelte es sich um generalisierte Osteosklerose, die an Osteopetrose erinnert. Außerdem hatte die Patientin im Abstand von nur einem Jahr eine Zehen- und eine Handgelenksfraktur erlitten. Die Laboruntersuchung der Patientin zeigte eine Störung der Vitamin-D- und der Calcium-Homöostase infolge eines deutlichen Vitamin-D-Mangels. Ein Bruder, eine Schwester, eine Nichte und die Tochter der Patientin klagten über ähnliche Beschwerden. Als weiterer diagnostischer Schritt wurden Knochendichtemessungen von einigen Familienmitgliedern ab der Generation der Indexpatientin durchgeführt. Angaben zu den Eltern der Indexpatientin lagen nicht vor. Dabei lieferten die Untersuchungen der Indexpatientin und ihrer Tochter erhöhte Werte im Bereich der Lendenwirbelsäule, der Hüfte und der Extremitäten. Beim Bruder der Patientin und dessen Tochter (Nichte der Indexpatientin) lagen erhöhte Werte nur im Bereich der Hüfte vor, die Werte der Lendenwirbelsäule waren normwertig.

**Familie 2:** Vorgestellt wurden zwei betroffene Geschwister und drei weitere Familienmitglieder: die nicht betroffenen, allerdings konsanguinen, Eltern (Cousins) und ein gesundes Geschwisterkind (siehe Abbildung 6).

Die Röntgenbilder der Betroffenen zeigten generalisierte Osteopetrose (siehe Abbildung 7). Primär fielen die Patienten durch Kleinwuchs auf. Sie präsentierten weitere Skelettdeformitäten wie Genua valga, bilaterale s-förmige Krümmung der Tibia nach hinten (siehe Abbildung 8) und dicke Handgelenke. Die Beinfehlstellung führte zu einem watschelnden Gangbild. Klinisch zeigten sich weiterhin Strabismus, Ptosis, Exophthalmus beider Augäpfel und ein verringerter Visus. Die Zähne waren brüchig und deformiert. Das Hautkolorit war blass. Leber und Milz waren aufgrund von Hepato- beziehungsweise Splenomegalie tastbar. In der Laboruntersuchung der Patienten war die alkalische Phosphatase erhöht.



Abbildung 6: Stammbaum der Familie 2. Konsanguine Eltern mit zwei betroffenen Kindern



Abbildung 8: Röntgenaufnahmen der Indexpatientin von Wirbelsäule, Thorax, Becken und Extremitäten mit generalisierter Osteopetrose



Abbildung 7: Deformitäten und Fehlstellungen der unteren Extremitäten

Familie 3: In der dritten Familie fand man eine autosomal dominant vererbte Form einer High-Bone-Mass-Erkrankung. Die Patienten litten an erhöhter Knochenmasse mit starken Knochenschmerzen. Betroffen waren der Familienvater und der Sohn. Mutter und Tochter zeigten keine Symptome. Vorstellig am Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité wurde der heute 42-jährige Indexpatient. In seiner Jugend war der Patient sportlich aktiv. Im Alter von 14 Jahren wurde als Zufallsbefund im Zuge einer Röntgenaufnahme bei Knieschmerzen eine Hyperostose diagnostiziert. Die Ärzte vermerkten außerdem eine ungewöhnliche Hypertrophie der Beinmuskulatur. Die alkalische Phosphatase im Serum war erhöht. Im Alter von 28 Jahren beschrieb der Indexpatient zunehmende muskuloskelettale Schmerzen, im Alter von 34 Jahren musste er aufgrund seiner Beschwerden den Beruf aufgeben. Weiterhin klagte der Patient über intermittierende Kopfschmerzen und verschwommene Sicht, was Zeichen von neurologischer Beteiligung sein könnten. Auch der Vater litt seit Jahren an chronischen Knochenschmerzen und nahm dauerhaft Schmerzmedikamente ein. Die Röntgenbilder des Indexpatienten zeigten eine deutliche Sklerosierung im Bereich der Extremitäten (Oberarm), der Hüfte, der Wirbelsäule und des Schädels (siehe Abbildung 10). Es wurde die Verdachtsdiagnose endostale Hyperostose gestellt.

Bei einer nicht mit der Familie verwandten Patientin, Patientin A, lag ein sehr ähnlicher Phänotyp der endostalen Hyperostose vor. Bei der Patientin A waren die Gene *LRP5*, *SOST* und *TGFB1* bereits als genetische Ursache ausgeschlossen worden. Um den Krankheitswert der Varianten von Familie 3 einschätzen zu können, wurden die entsprechenden Varianten ebenso bei Patientin A sequenziert.



Abbildung 9: Stammbaum der Familie 3 mit autosomal dominantem Erbgang



**Abbildung 10:** Deutliche Sklerosierung von Humerus, Schädelknochen, Becken und Wirbelsäule in Röntgenaufnahmen des Indexpatienten aus Familie 3

**Patient 1:** Der Patient präsentierte klinisch eine deutliche Sklerosierung der langen Röhrenknochen, mit Erlenmeyer-Flask-Deformitäten der Femurknochen (röntgenologische Verdickung der Diaphyse bei gleichzeitiger Aufhellung der Metaphyse als Zeichen einer Resorptionsstörung) und eine verdickte Schädelkalotte mit sekundärer Schädigung des Sehnervs bis zur Erblindung (siehe Abbildung 11). Es ergab sich der Verdacht auf eine autosomal rezessive Osteopetrose, einige Symptome sind allerdings auch bei anderen sklerosierenden Knochenerkrankungen zu finden.



**Abbildung 11:** Sklerosierung der langen Röhrenknochen, Erlenmeyer-Flask-Deformitäten der Femora und verdickte Schädelkalotte in den Röntgenaufnahmen von Patient 1

Patient 2: Der zweite Patient stammte aus dem Iran, weshalb es leider nicht möglich war, Bilder zur Darstellung des Phänotyps oder Röntgenbilder zu erhalten. Die klinischen Daten wurden von den behandelnden Ärzten vor Ort erhoben. Die Eltern des Patienten waren gesund, allerdings Cousin und Cousine, es lag eine Konsanguinität vor. Der Patient wurde schon in der Neugeborenenperiode auffällig: Aufgrund eines starken Neugeborenenikterus musste er mit Blutaustausch-Transfusionen behandelt werden. In der weiteren Entwicklung zeigte sich ein disproportionaler Kleinwuchs, eine kraniofasziale Dysproportion mit langem Kopf, kleinem Gesicht und stark hervortretender Stirn. Die große Fontanelle verschloss sich erst verspätet. Die Mandibula war stumpfwinklig, was eine Okklussionsstörung des Bisses zur Folge hatte. Außerdem waren Zahnschmelzdefekte auffällig. Das laterale Ende der Klavikulae war dysplastisch und es zeigte sich eine Brachydaktylie (Verkürzung von einzelnen oder mehreren Fingern und Zehen). In der Laboruntersuchung waren die Wachstumsfaktoren GH und IGF-1 deutlich verringert, Calcium, Phosphat, Natrium, Kalium und die alkalische Phosphatase lagen unter der 50. Perzentile. Die Röntgenbilder wurden von den dortigen Ärzten mit generalisierter Hyperostose, Akroosteolyse der Endphalangen und weit offener Lambdanaht am Schädel beschrieben. Die ortsansässigen Kliniker stellten somit die Verdachtsdiagnose Pyknodysostose und sendeten uns zur molekulargenetischen Bestätigung Blutproben des Patienten.

**Patient 3:** Der Patient war zum Zeitpunkt der Vorstellung an der Charité 14 Jahre alt. Er zeigte röntgenologisch eine erhöhte Knochenmineraldichte, ließ sich anhand der klinischen Symptome jedoch nicht eindeutig einem Genotyp zuordnen. Auch eine Blutprobe der nicht betroffenen Mutter wurde eingereicht, Genmaterial und klinische Angaben zum Vater des Patienten lagen nicht vor.

**Patient 4:** Der Patient wurde bereits im Alter von 5 Monaten vorgestellt, da er bereits in jungem Lebensalter durch Rachitis auffiel. Rachitis kann als paradoxe Komplikation von Osteopetrose auftreten, wenn die Osteoklasten nicht mehr in der Lage sind, den Calcium-Phosphat-Spiegel im Blut aufrecht zu erhalten (33). In den Röntgenbildern zeigte sich Osteosklerose in den langen Röhrenknochen der unteren Extremität mit Einengung der Markkanäle und Aufhellungen der Metaphysen. Die Knochen der oberen Extremität präsentierten sich im Vergleich zur unteren Extremität deutlich aufgehellt. Die anterioren Rippenenden waren verbreitert (siehe Abbildung 12). Die Leber war leicht vergrößert und zeigte in der Biopsie deutlich den Nachweis extramedullärer Blutbildung. Weiterhin zeigten sich eine allgemeine Entwicklungsverzögerung des Säuglings und neuronale Beteiligung in Form von Krampfanfällen und Dystonie der Muskulatur mit Opisthotonus. Opthalmologisch konnte eine bilaterale Makuladegeneration gesichert werden. Es wurde die Verdachtsdiagnose autosomal rezessive Osteopetrose gestellt.



**Abbildung 12:** Osteosklerose der unteren Extremität, verbreiterte Rippenenden anterior und Aufhellung der Knochen der oberen Extremität in den Röntgenaufnahmen von Patient 4

**Patient 5:** Der heute 20-jährige Patient litt an einem High-Bone-Mass-Phänotyp mit röntgenologischer Verdichtung des Skeletts, Erlenmeyer-Flask-Deformitäten des Femurs und erhöhter Frakturrate. In den Röntgenbildern zeigten sich eine Sklerosierung, häufig metaphyseal lokalisiert, sowie wolkige Verschattungen der langen Röhrenknochen (siehe Abbildung 13). Es ergaben sich die Verdachtsdiagnosen Osteopetrose oder Dysosteosklerose.



**Abbildung 13:** Diffuse Osteosklerose, Abflachung der Wirbelkörper, wolkige Aufhellungen in den langen Röhrenknochen in den Röntgenaufnahmen von Patient 5. Osteosynthesematerial im linken Femur auf Grund einer Frakturbehandlung

**Patientin 6:** Die Patientin stammte aus dem Ausland, das Institut für medizinische Genetik und Humangenetik der Charité erhielt lediglich Blutproben zur molekulargenetischen Diagnostik zugesandt. Von den ortsansässigen Ärzten waren bereits Mutationen im Gen *CLCN7* ausgeschlossen worden und es wurde der Verdacht auf eine ARO gestellt. Die Röntgenbilder sind leider von schlechter Qualität, dennoch lassen sich unregelmäßige Sklerosierungen erkennen (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Sichtbare Sklerosierung des proximalen Femurs, des Beckens und der Wirbelsäule in den Röntgenaufnahmen von Patientin 6

**Patient 7:** Der Patient wurde erstmals bereits im Alter von einem Jahr mit einer okzipitalen Abflachung des Schädels auffällig, mit eineinhalb Jahren zeigten sich die ersten röntgenologischen Auffälligkeiten in den Hüftgelenken. Im Alter von zwei Jahren wurden die Schneidezähne des Oberkiefers trotz guter Zahn- und Mundhygiene faulig und zeitgleich kam es zur Osteomyelitis des Oberkiefers. Teile desselben mussten infolgedessen operativ entfernt werden. Zur Zeit der Vorstellung am Institut für medizinische Genetik und Humangenetik der Charité war der Junge fünf Jahre alt. Er zeigte einen grenzwertigen Minderwuchs, Genua valga, Spreiz-Senkfüße und Zeichen der extramedullären Blutbildung bei Hepatosplenomegalie. Das Gesicht zeigte eine Gesichtsasymmetrie mit fliehendem Kinn, weit auseinander stehenden Augen und stark hervortretender Stirn. Zudem ist der Patient einseitig erblindet. In den Laboruntersuchungen konnten eine mikrozytäre Anämie, eine Thrombozytopenie und unreife myeloische Zellen im peripheren Blut festgestellt werden. Im Verlauf kam es zu einer weiteren Osteomyelitis im Bereich der linken Mandibula. Im Alter von fünf Jahren wurden erneut Röntgenbilder von Wirbelsäule, Schädelknochen und oberer Extremität angefertigt (siehe Abbildung 15). Aufgrund der mangelnden Mitarbeit des Patienten sind die Bilder teilweise nicht optimal und die Beurteilung war erschwert. Dennoch lassen sich deutliche Zeichen einer Osteopetrose erkennen: Dabei fanden sich im Bereich der Wirbelsäule "Sandwich-Wirbel" mit der charakteristischen Sklerosierung von Boden- und Deckenplatten. Die Schädelaufnahmen zeigten hyperostotische Veränderungen insbesondere im Bereich des Gesichtsschädels und weitgehend verschlossene Sagittalnähte. Der rechte Unterarm zeigte deutliche osteosklerotische Umwandlungen mit Verdrängung der Spongiosastrukturen. Während der Erstellung dieser Arbeit verstarb der Patient leider an den Folgen seiner Erkrankung. Von den ortsansässigen Ärzten wurde der Verdacht auf eine Osteopetrose gestellt, allerdings konnte das klinische Bild nicht sicher einer intermediären, autosomal rezessiven oder dominanten Form zugeordnet werden.



**Abbildung 15:** Die Röntgenaufnahmen des Patienten 7 von Wirbelsäule, Schädelknochen und oberer Extremität bestätigen den Verdacht auf Osteopetrose.

#### 3.2. Molekulargenetische Charakterisierung der Patienten

**Familie 1:** Es wurde eine Exom-Sequenzierung der Indexpatientin durchgeführt. Mehr als 99% der zu untersuchenden Genabschnitte waren mindestens durch 20 Sequenz-Reads abgedeckt. Die Eingabe der Terms "Generalisierte Osteosklerose" und "Osteopetrose" auf der Internetplattform Phenix und ein dortiger Abgleich mit der aus dem Exom erhaltenen VCF-Datei ergab als wahrscheinlichstes Kandidatengen *LRP4*. In diesem Gen befand sich die im Exon 10 lokalisierte Missense Mutation c.1153C>T (p.Arg385Trp). Von MutationTaster wurde die Mutation als krankheitsverursachend eingestuft. Der AA-Score lag bei 101.

Mittels Sanger-Sequenzierung wurde die *LRP4*-Mutation bei allen Familienmitgliedern überprüft. Von zehn Familienmitgliedern zeigten drei die entsprechende heterozygote Veränderung - die Indexpatientin und ihre Kinder. Bei der ebenfalls betroffenen Schwester, dem betroffenen Bruder und der betroffenen Nichte der Indexpatientin lag die Mutation nicht vor. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16:** Stammbaum von Familie 1 mit Ausschnitten der Sequenzanalyse. Heterozygote Variante c.1153C>T (p.Arg385Trp) bei Indexpatientin, Tochter und Sohn mit Pfeil markiert.

**Familie 2:** Mittels Disease-Associated-Genome nach Zemojtel et al. (32) wurden 2742 Gene der DNA der Indexpatientin angereichert und sequenziert. Dabei waren mehr als 98% der Zielbereiche mit mindestens 20 Reads abgedeckt. Das NGS lieferte eine hohe Anzahl möglicher Varianten, welche mithilfe der Datenbanken priorisiert wurden. Phenix lieferte nach Eingabe der HPO-Terms Kleinwuchs, Biegung der Beine und generalisierte Osteosklerose als erste Kandidatengene *ACAN* und *COL10A1*. Die Eingabe des HPO-Terms Ptosis lieferte als wahrscheinlisten Kandidaten *ZFHX4*. Von MutationTaster wurden alle diese Varianten als krankheitsverursachend eingestuft. GeneTalk lieferte ebenfalls *ACAN* und *COL10A1*, sowie einige andere Kandidatengene. Von diesen wurden zur Validierung im Labor zusätzlich *COL9A3*, *TBX15*, *CRTAP* und *TGFB3* ausgewählt, da sie von Mut-ationTaster als krankheitsverursachend eingestuft worden waren und im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel stehen. Alle Varianten lagen heterozygot vor. Die genauen Lokalisationen der genetischen Veränderungen und die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Lokalisationen de	er genetischen	Varianten i	m Gen und	Ergebnisse	der San-
ger-Sequenzierung bei Famil	e 2				

		Index- Patient	Bruder	Schwester	Mutter	Vater
Gen	Variante					
ACAN	c.394C>T p.Arg132Cys	T/T	C/T	C/C	C/C	C/T
COL9A3	c.1561A>G p.Ser521Gly	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
COL10A1	c.748G>C p.Gly250Arg	G/C	G/C	G/G	G/C	G/G
CRTAP	c.641T>C p.Val214Ala	T/C	T/C	T/C	T/T	C/C
TBX15	c.460C>A p.Pro154Thr	C/C	C/C	C/C	C/C	C/A
TGFB3	c.1054C>T p.Arg352Cys	C/T	C/T	C/T	C/C	C/T
ZFHX4	c.1129G>T p.Ala377Ser	G/T	G/G	G/G	G/T	G/G

**Familie 3:** Zunächst wurden gezielt die Gene *LRP5, SOST* und *TGFB1* nach Sanger sequenziert - In keinem der überprüften Gene konnten relevante Veränderungen gefunden werden. In einem nächsten Schritt wurde eine Exom-Sequenzierung mit der DNA des betroffenen Vaters durchgeführt. Die Daten des Exoms wurden mit GeneTalk gefiltert. Dafür wurden nur autosomal dominant vererbte Varianten ausgewählt, die Frequenz in der Normalbevölkerung musste unter 0,01% liegen, bekannte Single-

Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) wurden ausgeschlossen. Diese Datenfilterung und die anschließende Bewertung lieferten sechs mögliche Kandidatengene: *ATP6V1H, NEIL2, PIEZO2, PKD1L1, VPS51* und *CHPF2*. Mit Ausnahme von *PKD1L1* wurden alle Varianten von MutationTaster als krankheitsverursachend eingestuft. Bis auf die Variante im Gen *CHPF2* konnten alle Varianten sowohl beim betroffenen Vater, als auch beim betroffenen Sohn bestätigt werden. Bei den nicht betroffenen Familienmitgliedern lagen die Veränderungen nicht vor (siehe Tabelle 19).

Bei Patient A waren alle Gene unauffällig, keine der Varianten konnte bestätigt werden.

**Tabelle 19:** Lokalisationen der genetischen Varianten im Gen und Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung bei Familie 3

		Index- Patient	Vater	Mutter	Schwester
Gen	Variante				
ATP6V1H	c.824A>T p.Glu275Val	A/T	A/T	A/A	A/A
NEIL2	c.459C>G p.Asn153Lys	C/G	C/G	C/C	C/C
PIEZO2	c.6805G>A p.G2269R	G/A	G/A	G/G	G/G
PKD1L1	c.485G>A p.Gly162Glu	G/A	G/A	G/G	G/G
VPS51	c.2083A>T p.Asn695Tyr	A/T	A/T	A/A	A/A
CHPF2	c.1935dupC p.Asp645fs	Keine Dupli- kation	Keine Duplika- tion	Keine Dupli- kation	Keine Dupli- kation

**Patient 1:** Zunächst wurden die drei häufigsten ARO-verursachenden Gene mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. In den Genen *TCIRG1, OSTM1 und CLCN7* konnten keine Mutationen nachgewiesen werden. Daher wurde ein Bone-Mass-Panel durchgeführt. Der Datenlauf ergab zwei gegebenenfalls infrage kommende Varianten: *LRP4* c.2173C>T (p.Pro725Ser) und *TNFRSF11A* c.415\_416GC>AT (p.Ala139IIe). Beide Varianten wurden von MutationTaster als krankheitsverursachend gewertet und keine ist bei ExAC oder 1000 Genomes Browser verzeichnet. Das Ergebnis des BMP wurde mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Als Kontrolle wurde die nicht betroffene Mutter

des Patienten mitgeführt. Nur die *TNFRSF11A*-Variante konnte bestätigt werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt.

Die bestätigte Mutation wurde im Anschluss mit Human Splicing Finder im späten exonischen Bereich lokalisiert und hat nach Angaben der Plattform keinen Effekt auf das Spleißen.



**Abbildung 17:** Sequenzierungsergebnisse *TNFRSF11A* von Patient 1. **A:** homozygote Mutation c.415\_416GC>AT, **B:** IGV-File, **C:** Konservierungsgrad der Proteinsequenz um die Mutation p.Ala139IIe

**Patient 2:** Aufgrund der Verdachtsdiagnose Pyknodysostose wurden gezielt alle Exons des Gens *CTSK* mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Dabei wurde im Exon 8 die homozygote Mutation c.894G>A (p.Trp298\*) identifiziert (siehe Abbildung 18). Von MutationTaster wird die Variante als krankheitsverursachend gewertet. Weder in ExAC, noch in 1000 Genomes Browser wird die Variante bisher aufgeführt. Nach Einschätzung von Human Splicing Finder liegt die Variante im frühen exonischen Bereich. Durch die Variante entsteht ein exonischer Splicing Silencer, eine neue exonische Splice Site wird aktiviert, was ein verändertes Spleißen zur Folge hat.



**Abbildung 18:** Sequenzierungsergebnisse *CTSK* von Patient 2. **A:** homozygote Mutation c.894G>A, **B:** Konservierungsgrad der Proteinsequenz um die Mutation p.Trp298\*

**Patient 3:** Es wurde ein BMP durchgeführt. Über 99% der zu untersuchenden Genabschnitte waren mindestens durch 20 Sequenz-Reads abgedeckt und es wurde die *CTSK*-Variante c.830C>T (p.Ala277Val) heterozygot identifiziert, die in weniger als 5% der Allgemeinbevölkerung vorkommt. Bei MutationTaster war diese Variante als bekannte Krankheitsursache von Pyknodysostose angegeben. Laut Human Splicing Finder beeinflusse die Variante das Spleißen der mRNA des Proteins. Weder bei ExAC noch bei 1000 Genoms Browser war die Variante verzeichnet. Mittels Sanger-Sequenzierung konnte die Mutation erfolgreich bestätigt werden (siehe Abbildung 19). Zur Analyse der Vererbung wurde bei der asymptomatischen Mutter des Patienten gezielt das betroffene Exon von *CTSK* sequenziert, um es auf die Mutation zu überprüfen. Das Ergebnis der Sequenzierung war negativ, die Mutation liegt bei der Mutter nicht vor (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Sequenzierungsergebnisse *CTSK* von Patient 3. **A:** heterozygote Mutation c.830C>T, **B:** IGV-File, **C:** Konservierungsgrad der Proteinsequenz um die Mutation p.Ala277Val

**Patient 4:** Für die Sanger-Sequenzierung wurden die Gene *TCIRG1* und *OSTM1* ausgewählt. In *TCIRG1* konnten keine krankheitsverursachenden Sequenzvarianten festgestellt werden. Allerdings zeigte sich in *OSTM1* eine Deletion von vier Basen c.518\_521delATTG (p.Asn173lle\*2). Diese wurde von MutationTaster als krankheitsverursachend bewertet. In ExAC oder 1000 Genomes Browser war die Variante nicht verzeichnet. Human Splicing Finder zeigte ein verändertes Spleißen an. Das Sequenzierungsergebnis ist in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20:** Sequenzierungsergebnisse *OSTM1* von Patient 4. **A:** homozygote Deletion c.518\_521delATTG, **B:** Konservierungsgrad der Proteinsequenz um die Mutation p.Asn173lle\*2

**Patient 5:** Da die Symptome nicht eindeutig waren, wurde ein BMP durchgeführt. Über 98% der zu untersuchenden Genabschnitte waren mindestens durch 20 Sequenz-Reads abgedeckt. Das BMP lieferte die homozygote Insertion *SLC29A3* c.302\_303insCTACTTTGAGAGCTACCT (p.Asn101delinsAsnTyrPheGluSerTyrLeu), welche bei weniger als 1% der Allgemeinbevölkerung vorkommt. Phenix wertete die Variante als pathogen, bei MutationTaster wurde sie als Polymorphismus eingeschätzt.

Allerdings war sie weder im 1000 Genomes Browser, noch in ExAC gelistet. Weiterhin zeigte Human Splicing Finder eine Lage im früh-exonischen Bereich und eine potentielle Veränderung des Spleißens durch das Entstehen eines neuen exonischen Splicing Silencers und die Veränderung eines exonischen Splicing Enhancers.

In der Sanger-Sequenzierung konnte die Insertion beim Patienten in homozygoter Form bestätigt werden. Zur Kontrolle wurde die DNA von vier weiteren, nicht betroffenen Familienmitgliedern mit sequenziert. Die Sequenzanalyse der Mutter zeigte eine klare Sequenzüberlagerung. Die Sequenzen der anderen Familienmitglieder sind unauffällig (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Stammbaum des Patienten 5 mit Ausschnitten aus der Sequenzanalyse. Lokalisation der Insertion in roter Umrandung. Insertion beim Indexpatienten, klare Sequenzüberlagerung bei der Mutter.



#### p.Asn101delinsAsnTyrPheGluSerTyrLeu

**Abbildung 22:** Sequenzierungsergebnisse von *SLC29A3* von Patient 5. **A:** homozygote Insertion c.302\_303insCTACTTTGAGAGCTACCT, **B:** IGV-File, **C:** Konservierungsgrad der Proteinsequenz um Mutation p.Asn101delinsAsnTyrPheGluSerTyrLeu **Patientin 6:** Es wurde ein BMP durchgeführt, dessen zu untersuchende Genabschnitte in über 98% durch mindestens 20 Sequenz-Reads abgedeckt waren. Es lieferte zwei interessante Varianten: die heterozygote Mutation c.1486G>A (p.Glu496Lys) im Gen *TBXAS1* und die homozygote Mutation c.1172C>A (p.Pro391His) im Gen *SLC29A3*.

Beide Varianten wurden von MutationTaster als krankheitsverursachend eingestuft. Die *SLC29A3*-Variante wurde von PolyPhen als wahrscheinlich schädigend und von SIFT als schädlich eingestuft. Sie ist in ExAC in 121392 Allelen zweimal in heterozygoter Form gefunden worden. Assoziationen zu Erkrankungen wurden nicht verzeichnet. Im 1000 Genomes Browser ist sie nicht vermerkt.

Die *TBXAS1*-Variante wurde von PolyPhen und SIFT als möglicherweise schädigend eingeschätzt. Sowohl im 1000 Genomes Browser, als auch in ExAC fand sich diese Variante. Bei ExAC kam sie 1766-mal in 120870 Allelen vor.

Beide Varianten konnten mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden (siehe Abbildungen 23 und 24).



**Abbildung 23:** Sequenzierungsergebnisse von *SLC29A3* von Patientin 6. **A:** homozygote Mutation c.1172C>A, **B:** IGV-File, **C:** Konservierungsgrad der Proteinsequenz um Mutation p.Pro391His



**Abbildung 24:** Sequenzierungsergebnisse von *TBXAS1* von Patientin 6. **A:** heterozygote Mutation c.1486G>A, **B:** IGV-File, **C:** Konservierungsgrad der Proteinsequenz um Mutation p.Glu496Lys **Patient 7:** Im Institut für medizinische Genetik und Humangenetik wurde zunächst ein BMP durchgeführt. Die zu untersuchenden Gene waren in über 98% von mindestens 20 Reads abgedeckt. Allerdings fand sich eine fehlende Sequenzabdeckung der Gene *TNFRSF11A* Exon 1, *CLCN7* Exon 1 und *IKBKG* Exons 3-8. Die entsprechenden Abschnitte wurden daher mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Allerdings waren alle Abschnitte unauffällig und ohne Hinweis auf eine krankheitsverursachende Mutation. Im BMP konnten zwei für Skeletterkrankungen relevante Varianten identifiziert werden, die bei weniger als 1% der Allgemeinbevölkerung zu finden sind. Dabei handelt es sich um die Varianten *COL9A3* c.1036G>T (p.Gly346Cys) heterozygot und *DLX3* c.519G>A (p.Val173Val, Splicing Defekt). Beide Varianten wurden von MutationTaster als krankheitsverursachend eingestuft.

Im Verlauf wurden Osteoklasten des Patienten kultiviert und im Anschluss eine qPCR der häufigsten Osteopetrose verursachenden Gene durchgeführt. Die untersuchten Gene waren: *CA2, CLCN7, DAP12, TNFRSF11A, TRAF6, OSTM1* und *TCIRG1*. Als Kontrollen dienten die cDNAs des Vaters (Kontrolle 1) und eines nicht betroffenen Jungen im selben Alter (Kontrolle 2). Die Ergebnisse der qPCR sind in Abbildung 25 dargestellt. Dabei sah man eine deutliche Verringerung in der Expression von *TCIRG1* im Vergleich zum Vater und noch deutlicher im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrolle.



**Abbildung 25:** Relative Expression von Osteopetrose-verursachenden Genen bei Patient 7 in der qPCR. Vergleich mit dem Vater des Betroffenen (Kontrolle 1) und einem nicht verwandten, gleichaltrigen Jungen (Kontrolle 2).

## 3.3. Tabellarischer Überblick über die Ergebnisse

In Tabelle 20 findet sich ein tabellarischer Überblick aller klinischen, genetischen und bioinformatischen Ergebnisse. Die Online-Datenbanken PolyPhen und SIFT waren bei einigen genomischen Veränderungen nicht anwendbar (n.a.).

SIFT	П.а.	П.а.	n.a.	n.a.	k	ş
Poly Phen	П.а.	П.а.	п.а.	п.а.	k	kv
Mutation Taster	kv	kv	kv	ķ	ĸ	ş
Human Splicing Finder	Keine Veränderung	Verändertes Spleißen	Verändertes Spleißen	Verändertes Spleißen	Keine Veränderung	Verändertes Spleißen
1000 Genomes	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	bekannt
EXAC	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	2/121392	1766/ 120870
Status	homozygot	homozygot	homozygot	homozygot	homozygot	heterozygot
Variante	TNFRSF11A c.415_416GC>AT p.Ala139lle	CTSK c.894G>A p.Trp298*	OSTM1 c.518_521delATTG p.Asn173lle*2	SLC29A3 c.302_303insCTACT TTGAGAGCTACCT p.Asn101delinsAsn TyrPheGluSerTyrLeu	SLC29A3 c.1172C>A p.Pro391His	TBXAS1 c.1486G>A p.Glu496Lys
Klinisch-radiologische Zeichen	Sklerosierung lange Röhrenknochenknochen, Schädel, Erlenmeyer-Flask-Deformitäten, Erblindung	Kraniofasziale Disproportion, Brachydaktylie, Kleinwuchs, generalisierte Hyperostose, Akroosteolysen	Osteosklerose untere Extremität, extramedulläre Blutbildung, Krampfanfälle, Marculardegeneration	Metaphyseale Sklerosierung, wolkige Aufhellung lange Röhrenknochen, Erlenmeyer-Flask-Deformitäten, rezidivierende Frakturen	Unregelmäßige Sklerosierung besonders proximaler Femur, Becken, – Wirbelsäule	
Patient	<del>, -</del>	2	4	5	u	5

# Tabelle 20: Zusammenfassung aller Ergebnisse

# 4. Diskussion

#### 4.1. Beurteilung der Mutationen

Familie 1: Durch die Mutation c.1153C>T (p.Arg385Trp) im Gen LRP4 kommt es zum Austausch der Aminosäure Arginin zu Tryptophan. LRP4 spielt, wie oben erläutert, eine wichtige Rolle in der Homöostase der Knochenmasse. Mutationen des Gens konnten als Auslöser des High-Bone-Mass-Syndroms identifiziert werden (15). Somit wäre die Variante sehr denkbar. Das heterozygote Vorliegen würde gut zu einem autosomal dominanten Erbgang passen, der bei der betrachteten Familie vermutlich vorliegt. Diese Vermutung liegt nahe, da man im Stammbaum weibliche, sowie männliche Betroffene in zwei aufeinanderfolgenden Generationen findet. Leider konnte die Variante nicht bei allen Patienten bestätigt werden. Sie findet sich nur bei der Indexpatientin und ihren Kindern. Die Tochter ist betroffen, der Sohn zeigt keine entsprechenden Veränderungen. Nicht nachzuweisen war die Variante bei den ebenfalls Betroffenen: der Schwester, dem Bruder und der Nichte der Indexpatientin. Die Variante wird folglich von der Mutter an die Kinder weitervererbt, ist als Auslöser der Erkrankung aber auszuschließen. Gegebenenfalls könnte zusätzlich eine Exom-Sequenzierung mit der DNA der weiteren Familienmitglieder durchgeführt werden. Diese Daten und vor allem der Abgleich der VCF-Dateien der Betroffenen könnte helfen, gemeinsame Varianten zu identifizieren, welche als Krankheitsauslöser eher infrage kämen. Da bisher keine genetische Ursache ermittelt werden konnte, ist die Therapieplanung bei den Betroffenen erschwert. Eine kausale Therapie ist aktuell nicht möglich, die Patienten sollten weiterhin symptomatisch behandelt werden. Dabei stehen die Sicherstellung der Vitamin-D- und der Calciumzufuhr im Mittelpunkt. Auch eine Stärkung der Rückenmuskulatur, sowie eine schmerztherapeutische Mitbeurteilung könnten für die Patienten hilfreich sein.

**Familie 2:** Die Konsanguinität der Eltern macht einen autosomal rezessiven Erbgang hoch wahrscheinlich. Jedoch lagen die im NGS ermittelten Varianten alle heterozygot vor. Da sich allerdings jeweils ein direkter Zusammenhang zum Knochenstoffwechsel herstellen ließ, wurde dennoch eine Segregationsanalyse durchgeführt. *ACAN* kodiert für den Knochenbestandteil Aggrecan und Mutationen in diesem Gen sind mit Skelettdysplasien, Kleinwuchs und beschleunigter Skelettreifung assoziiert (34, 35). Das Genprodukt Kollagen 10 aus *COL10A1* ist ein wichtiger Knochenbestandteil. Die Knor-

pelerkrankungen Chondrodysplasie vom Typ Schmid (36) und Spondylometaphysale Dysplasie (37) werden durch verschiedene *COL10A1*-Mutationen ausgelöst. *COL9A3* kodiert wie das verwandte Gen *COL10A1* ebenfalls für ein Kollagen. Im Zusammenhang mit multipler epiphysaler Dysplasie wurden mehrere Mutationen in *COL9A3* beschrieben (38). *TBX15* ist ein Transkriptionsfaktor, welcher für die Skelettentwicklung benötigt wird. Im Mausmodell verursachten Mutationen eine generelle Reduktion der Knochengröße sowie eine veränderte Knochenform (39), was gut mit dem Phänotyp der betrachteten Familie korreliert. *CRTAP* kodiert für ein Knorpel-assoziiertes Protein. Bei den Skeletterkrankungen Osteogenesis imperfecta und dem Cole-Carpenter-Syndrom, welche allerdings mit verringerter Knochenmasse einhergehen, wurde von Mutationen im *CRTAP*-Gen berichtet (40, 41). Das Genprodukt von *TGFB3* (TGF- $\beta$ ) ist, wie bereits in der Einleitung erläutert, ein Mediator des Knochenstoffwechsels (12).

Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zeigen, dass keine der Varianten ausschließlich bei beiden Betroffenen vorliegt. Veränderungen in TBXAS1 ließen sich bei den Betroffenen nicht nachweisen, auch bei ZFHX4 zeigte die Segregationsanalyse des betroffenen Bruders keine Mutation. Die Sanger-Sequenzierung von COL9A3 zeigte sich bei allen Familienmitgliedern unauffällig, hier scheint es sich um einen Fehler im NGS zu handeln. Allerdings sollte die Möglichkeit einer unvollständigen Penetranz des Erbgangs nicht außer Acht gelassen werden. Die Variante im Gen COL10A1 beispielsweise kommt bei den betroffenen Geschwistern und der Mutter vor. Bei dieser könnte der Phänotyp aufgrund unvollständiger Penetranz nicht ausgeprägt sein. Die Variante CRTAP findet sich bei allen drei Geschwistern in heterozygoter Form und beim Vater homozygot. Die Mutter ist somit die einzige Person ohne die Veränderung. Es ist anzunehmen, dass der Phänotyp bei homozygotem Vorliegen der Mutation stärker ausgeprägt wäre. Da der Vater nicht von Knochenveränderungen betroffen ist, lässt sich diese Variante mit großer Sicherheit ausschließen. Die im Gen TGFB3 lokalisierte Variante findet sich mit Ausnahme der Mutter bei allen Familienmitgliedern. Vermutlich wurden die letzten beiden Varianten vom Vater an die Kinder weitergegeben. Sie sind jedoch nicht Ursache der Erkrankung der beiden Geschwister. Die ACAN-Variante zeigte sich beim Index homozygot, Vater und betroffener Bruder zeigen einen heterozygoten Phänotyp. Der normale Phänotyp des Vaters schließt diese Variante aus. Somit ist keine der ermittelten Varianten als ursächlich für den Phänotyp der Betroffenen anzusehen. Um weitere mögliche Varianten zu identifizieren, sollte als nächster diagnostischer Schritt ein BMP der DNA des betroffenen Bruders durchgeführt werden. Ein Abgleich

71

der Ergebnisse der beiden Geschwister könnte die Suche deutlich eingrenzen. Aufgrund des vermuteten autosomal-rezessiven Erbgangs sind hauptsächlich homozygote Veränderungen zu beachten. Weiterhin könnte bei beiden Patienten eine Sequenzierung des gesamten Exoms durchgeführt werden.

**Familie 3:** Das Gen *LRP5* wurde zur Sequenzierung ausgewählt, da es das typische Kandidatengen bei endostaler Hyperostose ist. Da ebenso Mutationen im *SOST*-Gen den Wnt-Signalweg beeinflussen, wurde dieses Gen mitsequenziert. Ebenso sequenziert wurde das Gen *TGFB1*, welches häufiger Auslöser osteoblastenbedingter sklerosierender Knochenerkrankungen ist.

Auch die im NGS gefundenen Varianten stehen im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel. Das Gen *ATP6V1H* kodiert für die V1H-Untereinheit der V-ATPase eukaryontischer Zellen (42), wie sie in der Plasmamembran der Osteoklasten zu finden ist. Sie ist beteiligt an der Ansäuerung der Howship-Lakune (7). *NEIL2* kodiert für eine Endonuklease, die zur Klasse der DNA-Glykosylasen gehört. Diese sind dafür zuständig, durch oxidativen Stress geschädigte Basen aus der DNA herauszuschneiden und so die DNA-Reparatur zu ermöglichen (43).

Der mechanoinduzierte, nicht selektive Kationenkanal PIEZO2 ist das Genprodukt des gleichnamigen Gens (44). Eine gestörte Funktion des Kanals führt zu der Erkrankung Arthrogryposis multiplex congenita, einer angeborenen Gelenkversteifung. Zusätzlich wurden Effekte auf die Augenmuskulatur, die Lungenfunktion, sowie die Knochenentwicklung und das Remodelling beschrieben (45). *PKD1L1*-Veränderungen scheinen Auslöser für polyzystische Nierenerkrankungen und Situs inversus zu sein, Assoziationen zum Knochenstoffwechsel sind bisher nicht bekannt (46). Das von *VPS51* kodierte Protein spielt eine wichtige Rolle im intrazellulären Transport von Endosomen im Golgi-Apparat-System (47). Transzellulärer Transport ist, wie in der Einleitung erläutert, ein wichtiger Bestandteil der Osteoklastenfunktionen. Das Gen *CHPF2* kodiert für eine humane Glykosyltransferase (48).

Aufgrund der Proteinfunktionen kommen als mögliche Kandidatengene am ehesten *ATP6V1H, PIEZO2* und *VPS51* infrage, da sich ein Zusammenhang zum Knochenstoffwechsel ergibt. Bei beiden Betroffenen konnten in der Sanger-Sequenzierung diese Varianten bestätigt werden und könnten somit potentiell als Krankheitsauslöser fungieren. Allerdings werden in der Literatur keine Fälle mit diesen oder ähnlichen Varianten
beschrieben. Hätte eine der Varianten bei der nicht verwandten Patientin A mit ähnlichem Phänotyp bestätigt werden können, wäre eine Korrelation zwischen Variante und Phänotyp deutlich wahrscheinlicher geworden. Letztlich lässt sich keine der Varianten sicher als genetische Ursache der Erkrankung identifizieren. Genfunktionsanalysen der Varianten könnten einen wichtigen Schritt zur Sicherung des Verdachts darstellen.

Patient 1: Durch die Mutation zweier benachbarter Basen c.415\_416GC>AT im Gen TNFRSF11A kommt es zum Austausch der Aminosäure Alanin zu Isoleucin (p.Ala139lle). TNFRSF11A kodiert den für die Osteoklastenfunktion essenziellen Rezeptor RANK, was die Variante stark pathogen erscheinen lässt, obwohl der Aminosäurenaustausch keine sehr große Veränderung darstellt. Die Mutation des Patienten wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Allerdings sind zwei nah benachbarte Mutationen p.Arg129Cys und p.Tyr141His krankheitsverursachend für eine osteoklastenarme Form der Osteopetrose (49). Die Einschätzung von MutationTaster und die Tatsache, dass die Variante weder in ExAC noch in 1000 Genomes Browser gelistet ist, sprechen für einen krankheitsverursachenden Wert. Die heterozygote Mutation c.2173C>T (p.Pro725Ser) im Gen LRP4 konnte mittels Sanger-Sequenzierung nicht bestätigt werden, obwohl sie im BMP angezeigt wurde, und kommt somit nicht als Ursache der Erkrankung in Betracht. Heterozygote LRP4-Mutationen konnten bereits bei einigen Patienten mit sklerotischem Phänotyp beschrieben werden (25), weshalb es eine wahrscheinliche Variante gewesen wäre. Letztlich scheint die TNFRSF11A-Mutation die genetische Ursache der Erkrankung zu sein.

Therapeutisch kommen für Patienten mit RANK-abhängigen Osteopetrosen hämatopoetische Stammzelltransplantationen infrage (20). Werden diese in der Kindheit durchgeführt, sind sie in der Lage die Erkrankung fast vollständig zu heilen (50). Unser Patient könnte nun mit der gefundenen Mutation in *TNFRSF11A* von einer Stammzelltransplantation profitieren. Knochen- und Blutbildveränderungen sind danach in der Regel rückläufig, während neurologische Beeinträchtigungen erhalten bleiben (20).

**Patient 2:** Bei der bestätigten homozygoten Variante c.894G>A (p.Trp298\*) im Gen *CTSK* handelt es sich um eine Punktmutation. Die Aminosäure Tryptophan wird aufgrund der Punktmutation durch ein Stoppcodon ersetzt. Diese Mutation wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Bekannt als Auslöser der Pyknodysostose ist allerdings eine ähnliche Mutation im selben Aminosäurentriplett: p.Trp298Arg (51). Da eine Stoppmutation die Struktur des Proteins entscheidend verändert, ist es hoch wahrscheinlich, dass es sich bei der identifizierten Mutation um die Ursache der Pyknodysostose von Patient 2 handelt. Unterstrichen wird das krankheitsverursachende Potenzial der Variante durch ihr Fehlen in den Online-Datenbanken. Der homozygote Status der Mutation passt außerdem gut zur Konsanguinität der Eltern.

Pyknodysostose ist keine akut lebensbedrohliche Erkrankung und bisher gibt es keine spezifische, beziehungsweise kurierende Therapie. Dennoch ist die Lebensqualität unseres Patienten deutlich eingeschränkt. Die Diagnose ist wichtig, um zukünftig Vorsorgeuntersuchungen am Patienten durchzuführen, symptomatisch zu behandeln und so Komplikationen der Erkrankung zu verhindern (51).

Patient 3: Durch die Punktmutation c.830C>T kommt es zum Austausch der Aminosäure Alanin zu Valin (p.Ala277Val). Diese CTSK-Mutation wurde bereits als Auslöser der Pyknodysostose beschrieben (51, 52). Die Mutationen lagen homozygot oder in Kombination mit weiteren CTSK-Mutationen compound heterozygot vor (52, 53). Bei Patient 3 liegt die Mutation heterozygot vor, was in der Literatur bisher nicht bei Betroffenen beschrieben wurde. Die Sanger-Sequenzierung der gesamten CTSK-Exons lieferte jedoch keine weiteren Varianten. Somit scheint es unwahrscheinlich, dass der Phänotyp durch die identifizierte Variante verursacht wird. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass sich eine weitere Mutation im intronischen Bereich des Gens befindet. Eine gesonderte Analyse der nicht kodierenden, intronischen Bereiche wäre nötig. Da die Mutation bei der Mutter nicht vorliegt, wurde sie vermutlich vom Vater vererbt, von dem uns kein genetisches Material vorlag, oder ist de novo entstanden. Im Verlauf stellte sich heraus, dass das klinische Bild des Patienten nicht zum Bild einer Pyknodysostose passt. Somit wurde darauf verzichtet, die intronischen Bereiche des Gens zu untersuchen. Falls beim Vater keine Symptome vorliegen, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer De-novo-Mutation ausgegangen werden. Um mögliche auslösende Varianten zu identifizieren, könnten als nächster Schritt Exom-Datenläufe des Patienten und der Mutter durchgeführt werden.

**Patient 4:** Die Auswahl der Kandidatengene wurde getroffen, da *TCIRG1* das häufigste ARO-verursachende Gen ist. Da Patienten mit Mutationen im *OSTM1*-Gen häufig unter Epilepsien leiden, wurde dieses Gen mitsequenziert.

Durch die Deletion c.518\_521delATTG im Gen *OSTM1* kommt es zu einem Frameshift in der Aminosäurensequenz. Die Wildtyp-Aminosäure Asparagin wird durch Isoleucin ersetzt, darauf folgt ein Stoppcodon, das zum Abbruch der Aminosäurensequenz führt. Dieser Abbruch hat deutliche Auswirkungen auf die Proteinstruktur. Das bestätigt auch Human Splicing Finder. Die detektierte Deletion in *OSTM1* wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben, andere *OSTM1*-Mutationen sind als genetische Ursache für ARO bekannt. Der homozygote Status, die Bewertung durch MutationTaster, ExAC, 1000 Genomes Browser und vor allem der klinisch passende Phänotyp machen es hochwahrscheinlich, dass es sich bei der Deletion c.518\_521delATTG um die Ursache der Erkrankung handelt. Die Diagnose autosomal rezessive Osteopetrose konnte folglich gesichert werden. Für den Patienten bedeutet dies leider aufgrund der starken neurologischen Beurteilung eine schlechte Prognose (54). Da unser Patient eine starke neurologische Beteiligung vorweist, wäre eine hämatopoetische Stammzelltransplantation in seinem Fall nicht sinnvoll. Eine Therapie ist letztlich nur symptomatisch und supportiv möglich (20).

**Patient 5:** Die Insertion c.302\_303insCTACTTTGAGAGCTACCT im *SLC29A3*-Gen wurde bei Patient 5 homozygot bestätigt. Die Sequenzüberlagerung bei der Mutter des Patienten spricht für ein heterozygotes Vorliegen der Insertion. Ein ebenso heterozygotes Vorliegen beim Vater, welches den homozygoten Status des Patienten erklären würde, ließ sich allerdings nicht nachweisen. Eine Erklärung für den dennoch homozygoten Status des Patienten könnte eine heterozygote Deletion sein. Durch die Kombination der Deletion und der vererbten Insertion der Mutter liegt beim Patienten nur der veränderte Abschnitt vor. Dass genau diese Insertion in beim Patienten de novo entstanden ist, ist eher unwahrscheinlich, besonders im Hinblick auf die Länge der identifizierten Insertion. Interessant wären klinische und anamnestische Angaben der Mutter, um zu beurteilen, ob auch ein heterozygoter Status eine erhöhte Knochenmasse verursacht.

Die gefundene Insertion wurde bisher nicht beschrieben. Mutationen im *SLC29A3*-Gen sind ursächlich für das Histiocytose-Lymphadenopathie-Plus-Syndrom(23), H-Syndrom

und pigmentierte Hypertrichose mit Insulin-abhängigem Diabetes mellitus (55). Campeau et al. beschrieben zwei Dysosteosklerose-Patienten mit SLC29A3-Mutationen (23). Das klinische Erscheinungsbild unseres Patienten erinnert an den Phänotyp bei Dysosteosklerose. Durch die Insertion kommt es im Gen SLC29A3 zu einem Einbau von 18 Basenpaaren in die Nukleotidsequenz des Exons 3. Da es sich um 18 Basenpaare handelt, kommt es zu keinem Frameshift, lediglich zu einem Einbau von sechs zusätzlichen Aminosäuren. Da die Insertion verhältnismäßig lang und nahe der SpliceSite lokalisiert ist, ist es wahrscheinlich, dass diese einen pathogenen Effekt besitzt. Human Splicing Finder unterstützt diese These. Allerdings wird die Insertion von MutationTaster als Polymorphismus bewertet. Hierzu ist anzumerken, dass die Dysosteosklerose verursachenden Mutationen noch nicht allzu lange bekannt sind. Dass die Variante in ExAC und 1000 Genomes Browser nicht zu finden ist, spricht für seltenes Vorkommen und legt einen pathogenen Effekt nahe. Zudem macht die Betrachtung der Proteinsequenz die Pathogenität der Mutation wahrscheinlicher: Die Region ist über verschiedene Spezies stark konserviert. Mutationen in stark konservierten Regionen haben stärkere Auswirkungen auf den Phänotyp als Mutationen in wenig konservierten Bereichen. Dass selbst bei Frosch und Kugelfisch Übereinstimmungen zur menschlichen Sequenz vorhanden sind, lässt vermuten, dass die Konservierung des entsprechenden Bereichs für die Proteinfunktion wichtig ist. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse sehen wir in der vorliegenden Variante den Auslöser für die Erkrankung des Patienten.

Die Prognose für Patienten mit Dysosteosklerose ist unklar (22), allerdings berichteten Lemire et al. im Jahr 2007 von einem inzwischen 44-jährigen Patienten mit Dysosteosklerose (56). Therapeutisch sind orthopädische Betreuung und kalziumarme Diät empfehlenswert. Durch Regulierung des Calcium-Spiegels soll der Parathormon-Spiegel im Blut konstant hoch gehalten werden, damit verstärkt Osteoklasten aktiviert werden und ihre Reifung induziert wird (22). Als osteoklastenarme Form der Osteopetrose kommt bei Dysosteosklerose eine Knochenmarkstransplantation weniger infrage (22).

**Patientin 6:** Durch die Mutation in *SLC29A3* wird die neutrale Aminosäure Prolin durch die basische Aminosäure Histidin ersetzt (p.Pro391His). Diese Mutation wurde bisher nicht beschrieben. Wie oben erläutert, wurden Mutationen im Gen *SLC29A3* bei Patienten mit Dysosteosklerose entdeckt (23). Die unregelmäßige Sklerosierung der Patientin

erinnert an den Phänotyp bei Dysosteosklerose. Es ist daher durchaus wahrscheinlich, dass es sich bei der Mutation um die Ursache für die Beschwerden der Patientin handelt. Dass die Mutation von MutationTaster, PolyPhen und SIFT als krankheitsverursachend eingestuft wurde, unterstützt diese Vermutung. Bei ExAC war die Variante jeweils nur in heterozygoter Form vorliegend, Patientin 6 trägt die Mutation homozygot, daher ist auch das Vorliegen der Mutation bei gesunden Personen in ExAC kein Ausschlusskriterium. Der genaue Pathomechanismus bleibt noch ungeklärt.

Mutationen im Gen *TBXAS1* sind bekannte Auslöser des Ghosal-Syndroms. Die sehr typische Anämie konnte bei der Patientin jedoch nicht beobachtet werden. Ihre Mutation führt zum Austausch der Aminosäure Glutaminsäure in Lysin. MutationTaster schätzt die Variante als krankheitsverursachend ein. Allerdings ist das Ghosal-Syndrom eine autosomal-rezessive Erkrankung; bei Patientin 6 konnte nur eine heterozygote Veränderung nachgewiesen werden. Weiterhin ist sie laut ExAC häufiger in der Allgemeinbevölkerung zu finden. Es ist somit eher unwahrscheinlich, dass die Patientin am Ghosal-Syndrom leidet und die *TBXAS1*-Variante allein den Phänotyp verursacht.

Eine weitere Überlegung ist, dass beide Varianten an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt sind. Dass die klinischen Erscheinungsbilder von Patienten mit Dysosteosklerose deutlich variieren, könnte diese Vermutung bekräftigen. Die Erkrankung könnte folglich oligogen verursacht sein.

Die TBXAS1-Variante kann noch nicht mit vollkommener Sicherheit ausgeschlossen werden, auch wenn es sehr wahrscheinlich ist, dass die SLC29A3-Variante die Erkrankung des Patienten bedingt. Wichtig zur Unterscheidung und somit zur endgültigen Diagnosestellung wären weitere klinische Angaben und Untersuchungen des Patienten. Das Ghosal-Syndrom beruht auf einem Fehler der Osteoblasten-, Dysosteosklerose auf einem Fehler der Osteoklastenfunktion. Hier wären Knochenbiopsien und gegebenenfalls Anzüchtungen und In-vitro-Untersuchungen der entsprechenden Zellen nötig. Für den Patienten könnte ebendiese Diagnosesicherung wichtig sein, da beide Erkrankungen unterschiedliche therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen. Bei Patienten mit dem Ghosal-Syndrom verbessern sich sowohl die Knochensymptome als auch und im Besonderen die Anämie unter Therapie mit Steroiden. Letztlich benötigen viele Patienten unter dieser Behandlung keine Transfusionen mehr (29, 57). Das therapeutische Management bei Dysosteosklerose wurde bereits bei Patient 5 erläutert.

77

**Patient 7**: Durch die heterozygote Variante *COL9A3* c.1036G>T wird in der Aminosäurensequenz die Aminosäure Glycin durch Cystein ersetzt. Mutationen in diesem Gen verursachen multiple epiphysäre Dysplasie (38). Da sich der Phänotyp multipler epiphysärer Dysplasie allerdings deutlich von dem einer Osteopetrose unterscheidet, muss diese Variante als Krankheitsursache bei Patient 7 ausgeschlossen werden. Bei der zweiten Variante *DLX3* c.519G>A kommt es in der Aminosäurensequenz zu einem Defekt im Spleißprozess der mRNA. Mutationen im *DLX3*-Gen sind für das Tricho-Dento-Osseous-Syndrom (58) verantwortlich, bei welchem es zwar zur Knochenverdickungen, insbesondere des Schädelknochens, kommt, allerdings sind ebenso Zahnfehlbildungen und Störungen des Haarwachstums und der Haarstruktur obligat (58), die bei Patient 7 nicht zu beobachten sind. Somit stellt diese Variante keine zufriedenstellende genetische Ursache für den Phänotyp des Patienten dar. Da die mit den veränderten Genen assoziierten Erkrankungen nicht zum Phänotyp des Patienten passen, wurde auf eine Sequenzierung nach Sanger verzichtet.

Die Ergebnisse der qPCR zeigen bei den Genen *CA2* und *OSTM1* sehr hohe Fehlerindikatoren bei Kontrolle 2 an. Maximaler und minimaler Wert der Auswertung unterscheiden sich folglich so stark, dass keine klare Aussage über die tatsächliche Expression des Gens getroffen werden kann. Bei diesen beiden Genen sollte Kontrolle 2 somit nicht als Referenzwert herangezogen werden. Eine erneute qPCR dieser Gene wäre nötig, lässt sich aufgrund der Knappheit des verbleibenden genetischen Materials des Patienten allerdings nicht umsetzen. In der qPCR des Gens *TCIRG1* wurde eine verringerte Expression beim Indexpatienten gefunden. Expression der anderen Gene sind bei den Kontrollen und Index annähernd ähnlich. Beachtet werden sollte, dass keine Signifikanz der Verringerung errechnet wurde.

Wie bereits in der Einleitung erläutert, kodiert das Gen *TCIRG1* für die a3-Untereinheit der V-ATPase, der Protonenpumpe der Osteoklasten. Bei verringerter Expression kommt es zur gestörten Ansäuerung in den Howship-Lakunen, der Knochen kann nicht demineralisiert werden. Das BMP des Gens zeigte allerdings keine Veränderungen. Da es sich beim BMP um ein relativ neues Verfahren handelt, können gelegentlich Fehler auftreten: Einige in der Sanger-Sequenzierung gefundene Mutationen werden nicht angezeigt, andererseits tauchen falsch-positive Varianten auf (59). Somit könnte das BMP fehlerhaft gewesen sein. Allerdings werden Fehler unwahrscheinlicher, mit je mehr Reads die Sequenzen abgedeckt werden. *TCIRG1* war bei unserem Patienten mit über

20 Reads abgedeckt, was einen Fehler eher unwahrscheinlich macht. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die verringerte *TCIRG1*-Expression bei unauffälligem BMP liefern Palagano et al. (60) in ihrem 2015 veröffentlichten Paper: Die Arbeitsgruppe identifizierte intronisch liegende homozygote Mutationen bei Patienten mit leicht ausgeprägter ARO. Das hier verwendete BMP erfasst allerdings nur die exonischen Bereiche der Gene, weshalb intronische Veränderungen nicht angezeigt werden. Bei unserem Patienten könnte folglich eine Veränderung im Intron von *TCIRG1* die verringerte Expression und somit den sklerotischen Phänotyp erklären. Um dies zu bestätigen, wären Sequenzierungen aller intronischen Bereiche des Gens nötig. So könnte die Diagnose autosomal rezessive Osteopetrose gesichert werden, was zwar für den verstorbenen Patienten keinerlei Nutzen mehr bringen würde, allerdings durchaus für die zukünftige Forschung und Diagnostik, für die Behandlung weiterer Betroffener, sowie für die Eltern des Betroffenen im Falle eines erneuten Kinderwunsches von Bedeutung wäre.

### 4.2. Diagnosen der Patienten

Durch Abgleich der Phänotypen und der Segregationsanalysen gelang es für fünf Patienten eine Diagnose zu stellen. Die Patienten, die genetischen Ursachen und die Diagnosen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Patient	Gen	Variante	Bewertung MutationTaster	Diagnose
1	TNFRSF11A	c.415_416GC>AT p.Ala139lle	kv	RANK-abhängige Osteopetrose
2	CTSK	c.894G>A p.Trp298*	kv	Pyknodysostose
4	OSTM1	c.518_521delATTG p.Asn173lle*2	kv	ARO
5	SLC29A3	c.302_303insCTACT TTGAGAGCTACCT p.Asn101delinsAsn TyrPheGluSerTyrLeu	Polymor- phismus	Dysosteosklerose
6	SLC29A3	c.1172C>A p.Pro391His	kv	Dysosteosklerose
	TBXAS1	c.1486G>A p.Glu496Lys	kv	Dysosieoskierose

#### 4.3. Bedeutung des Next-Generation-Sequencing

Durch ständige Weiterentwicklungen im Next-Generation-Sequencing in den letzten Jahren wurden Exom-Sequenzierung und Bone-Mass-Panel nicht nur technisch praktikabel, sondern auch extrem kosteneffizient. Zahlreiche neue kausale Mutationen und an der Krankheitsentstehung beteiligte Gene konnten mittels NGS bereits identifiziert werden (61). Weiterhin bringt das NGS im Vergleich zu alten Sequenzierungsmethoden eine enorme Zeiteinsparung mit sich (62).

In dieser Arbeit wurden zehn Fälle betrachtet, teilweise Einzelpatienten, teilweise Familien mit mehreren Betroffenen. Von diesen zehn Fällen konnten nur zwei ohne Hilfe eines NGS molekulargenetisch charakterisiert werden. Somit war bei der deutlichen Mehrzahl der Fälle das NGS ein nötiges Hilfsmittel für die Diagnosestellung. Obwohl NGS die oben genannten Vorteile liefert, ergeben sich noch zahlreiche Schwierigkeiten. Häufig sind bestimmte Genabschnitte nicht durch ausreichend Reads abgedeckt. So mussten in dieser Arbeit acht Exons per Sanger-Sequenzierung überprüft werden, da sie im BMP nicht abgedeckt waren. Weiterhin kann, wie oben bereits angesprochen, das NGS sowohl falsch-positive, als auch falsch-negative Ergebnisse liefern. 27 im NGS angezeigte Varianten wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Davon ließen sich fünf nicht bestätigen, die restlichen 22 allerdings schon. Unter den nicht bestätigten Varianten fanden sich eine Duplikation und Punktmutationen. Mit einer Quote von fünf aus 27, sind etwa 18,5% der Varianten falsch-positiv, was bei der Bewertung von NGS-Ergebnissen Beachtung finden sollte. Zukünftige Herausforderungen im Hinblick auf NGS sind folglich der Umgang mit der immens großen Menge an genomischen Veränderungen durch eine effiziente Datenanalyse, sowie eine Verbesserung des methodischen Ablaufs, um möglichst alle zu analysierenden Bereiche mit ausreichend Reads abzudecken und dadurch die Zahl an falsch-positiven beziehungsweise falschnegativen Varianten zu reduzieren. So würde das NGS noch mehr an Bedeutung gewinnen und letztlich alte Sequezierungsmethoden vollständig ersetzen.

#### 4.4. Auswirkungen der Ergebnisse auf zukünftige genetische Diagnostik

Im Zuge dieser Arbeit konnten die bisher nicht beschrieben Mutationen *TNFRSF11A* c.415\_416GC>AT (p.Ala139IIe), *CTSK* c.894G>A (p.Trp298\*) und *OSTM1* 

c.518\_521delATTG (p.Asn173lle\*2) als genetische Ursache für sklerosierende Knochenerkrankungen identifiziert werden. Zukünftig können diese Gene oder sogar Varianten gezielt in phänotypisch ähnlichen Patienten untersucht werden.

Bei einem Osteopetrose-Patienten konnte eine verringerte Expression von *TCIRG1* festgestellt werden, ohne dass sich im BMP Veränderungen dieses Gens zeigten. Wie bereits oben besprochen, legt dies eine ursächliche Mutation in den intronischen Genbereichen nahe. Zukünftig könnten somit intronische Bereiche verschiedener Gene mehr Beachtung bei der Suche nach genetischen Ursachen der High-Bone-Mass-Erkrankungen finden.

Außerdem wurden bei zwei Patienten mit Dysosteosklerose homozygte Mutationen im Gen *SLC29A3* identifiziert. Bis vor einigen Jahren waren die Ursachen von Dysosteosklerose unklar. In 2012 gelang es Campeau et al. bei zwei nicht miteinander verwandten Kindern mit Dysosteosklerose Mutationen im Gen *SLC29A3* zu identifizieren. Auch hier lagen die Mutationen homozygot beziehungsweise compound-heterozygot vor (23). Es kann folglich vermutet werden, dass nur homozygotes Vorliegen den Phänotyp der Dysosteosklerose hervorruft. Weitere Untersuchungen von Campeau et al. suggerierten die wichtige Rolle des Gens *SLC29A3* in Osteoklastenfunktion und –reifung (23). Die in dieser Arbeit gefundenen Varianten wurden bisher nicht beschrieben, dennoch ist es naheliegend, dass es sich hierbei um Dysosteosklerose verursachende Mutationen handelt. Zukünftig empfiehlt es sich somit, bei Patienten mit Verdacht auf diese Erkrankung Sequenzierungen des Gens *SLC29A3* in Osteoklasten ist ein wichtiger Schritt in Richtung kurierender oder symptomatischer Therapien bei Dysosteosklerose-Patienten.

### 5. Literaturverzeichnis

- 1. De Gruyter. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2011. Berlin (u.a.): Editorial Office De Gruyter; 2010.
- 2. Hill PA. Bone remodelling. British journal of orthodontics. 1998;25(2):101-7.
- 3. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. The Journal of biological chemistry. 2010;285(33):25103-8.
- 4. Phan TC, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. Histology and histopathology. 2004;19(4):1325-44.
- 5. Savarirayan R, Rimoin DL. The skeletal dysplasias. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2002;16(3):547-60.
- Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. American journal of human genetics. 2003;72(3):763-71.
- De Vernejoul MC, Kornak U. Heritable sclerosing bone disorders: presentation and new molecular mechanisms. Annals of the New York Academy of Sciences. 2010;1192:269-77.
- Stark Z, Savarirayan R. Osteopetrosis. Orphanet journal of rare diseases. 2009;4:5.
- 9. Aggarwal S. Skeletal dysplasias with increased bone density: evolution of molecular pathogenesis in the last century. Gene. 2013;528(1):41-5.
- 10. Villa A, Guerrini MM, Cassani B, Pangrazio A, Sobacchi C. Infantile malignant, autosomal recessive osteopetrosis: the rich and the poor. Calcified tissue international. 2009;84(1):1-12.
- Lazarus S, Zankl A, Duncan EL. Next-generation sequencing: a frameshift in skeletal dysplasia gene discovery. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2014;25(2):407-22.
- 12. Kornak U, Mundlos S. Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. American journal of human genetics. 2003;73(3):447-74.

- 13. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. Clinical biochemistry. 2012;45(12):863-73.
- Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009.
- Xiong L, Jung JU, Wu H, Xia WF, Pan JX, Shen C, Mei L, Xiong WC. Lrp4 in osteoblasts suppresses bone formation and promotes osteoclastogenesis and bone resorption. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015;112(11):3487-92.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science (New York, NY). 2000;289(5484):1504-8.
- Laitala T, Vaananen HK. Inhibition of bone resorption in vitro by antisense RNA and DNA molecules targeted against carbonic anhydrase II or two subunits of vacuolar H(+)-ATPase. The Journal of clinical investigation. 1994;93(6):2311-8.
- Stagi S, Cavalli L, Iurato C, Seminara S, Brandi ML, de Martino M. Bone metabolism in children and adolescents: main characteristics of the determinants of peak bone mass. Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases. 2013;10(3):172-9.
- Bollerslev J, Henriksen K, Nielsen MF, Brixen K, Van Hul W. Autosomal dominant osteopetrosis revisited: lessons from recent studies. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies. 2013;169(2):R39-57.
- Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. Nat Rev Endocrinol. 2013;9(9):522-36.
- 21. Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimoin DL, Robertson S, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. American journal of medical genetics Part A. 2011;155a(5):943-68.
- 22. Whyte MP, Wenkert D, McAlister WH, Novack DV, Nenninger AR, Zhang X, Huskey M, Mumm S. Dysosteosclerosis presents as an "osteoclast-poor" form of osteopetrosis: comprehensive investigation of a 3-year-old girl and literature

review. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2010;25(11):2527-39.

- 23. Campeau PM, Lu JT, Sule G, Jiang MM, Bae Y, Madan S, Hogler W, Shaw NJ, Mumm S, Gibbs RA, Whyte MP, Lee BH. Whole-exome sequencing identifies mutations in the nucleoside transporter gene SLC29A3 in dysosteosclerosis, a form of osteopetrosis. Human molecular genetics. 2012;21(22):4904-9.
- 24. Gregson CL, Wheeler L, Hardcastle SA, Appleton LH, Addison KA, Brugmans M, Clark GR, Ward KA, Paggiosi M, Stone M, Thomas J, Agarwal R, Poole KE, McCloskey E, Fraser WD, Williams E, Bullock AN, Davey Smith G, Brown MA, Tobias JH, Duncan EL. Mutations in Known Monogenic High Bone Mass Loci Only Explain a Small Proportion of High Bone Mass Cases. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2016;31(3):640-9.
- Leupin O, Piters E, Halleux C, Hu S, Kramer I, Morvan F, Bouwmeester T, Schirle M, Bueno-Lozano M, Fuentes FJ, Itin PH, Boudin E, de Freitas F, Jennes K, Brannetti B, Charara N, Ebersbach H, Geisse S, Lu CX, Bauer A, Van Hul W, Kneissel M. Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. The Journal of biological chemistry. 2011;286(22):19489-500.
- 26. Zou W, Teitelbaum SL. Absence of Dap12 and the alphavbeta3 integrin causes severe osteopetrosis. The Journal of cell biology. 2015;208(1):125-36.
- Ben-Asher E, Zelzer E, Lancet D. LEMD3: the gene responsible for bone density disorders (osteopoikilosis). The Israel Medical Association journal : IMAJ. 2005;7(4):273-4.
- 28. Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2010;21(5):294-301.
- 29. John RR, Boddu D, Chaudhary N, Yadav VK, Mathew LG. Steroid-responsive anemia in patients of Ghosal hematodiaphyseal dysplasia: simple to diagnose and easy to treat. Journal of pediatric hematology/oncology. 2015;37(4):285-9.
- Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Briefings in bioinformatics. 2013;14(2):178-92.

- Kamphans T, Krawitz PM. GeneTalk: an expert exchange platform for assessing rare sequence variants in personal genomes. Bioinformatics (Oxford, England). 2012;28(19):2515-6.
- 32. Zemojtel T, Kohler S, Mackenroth L, Jager M, Hecht J, Krawitz P, Graul-Neumann L, Doelken S, Ehmke N, Spielmann M, Oien NC, Schweiger MR, Krüger U, Frommer G, Fischer B, Kornak U, Flöttmann R, Ardeshirdavani A, Moreau Y, Lewis SE, Haendel M, Smedley D, Horn D, Mundlos S, Robinson PN. Effective diagnosis of genetic disease by computational phenotype analysis of the disease-associated genome. Science translational medicine. 2014;6(252):252ra123.
- 33. Kirubakaran C, Ranjini K, Scott JX, Basker M, Sridhar G. Osteopetrorickets. Journal of tropical pediatrics. 2004;50(3):185-6.
- 34. Nilsson O, Guo MH, Dunbar N, Popovic J, Flynn D, Jacobsen C, Lui JC, Hirschhorn JN, Baron J, Dauber A. Short stature, accelerated bone maturation, and early growth cessation due to heterozygous aggrecan mutations. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2014;99(8):E1510-8.
- 35. Quintos JB, Guo MH, Dauber A. Idiopathic short stature due to novel heterozygous mutation of the aggrecan gene. Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM. 2015;28(7-8):927-32.
- Bateman JF, Wilson R, Freddi S, Lamande SR, Savarirayan R. Mutations of COL10A1 in Schmid metaphyseal chondrodysplasia. Human mutation. 2005;25(6):525-34.
- 37. Ikegawa S, Nishimura G, Nagai T, Hasegawa T, Ohashi H, Nakamura Y.
   Mutation of the type X collagen gene (COL10A1) causes spondylometaphyseal dysplasia. American journal of human genetics. 1998;63(6):1659-62.
- Jeong C, Lee JY, Kim J, Chae H, Park HI, Kim M, Kim OH, Kim P, Lee JK, Jung J. Novel COL9A3 mutation in a family diagnosed with multiple epiphyseal dysplasia: a case report. BMC musculoskeletal disorders. 2014;15:371.
- Singh MK, Petry M, Haenig B, Lescher B, Leitges M, Kispert A. The T-box transcription factor Tbx15 is required for skeletal development. Mechanisms of development. 2005;122(2):131-44.
- 40. Wang Y, Cui Y, Zhou X, Han J. Development of a high-throughput resequencing array for the detection of pathogenic mutations in osteogenesis imperfecta. PloS one. 2015;10(3):e0119553.

- Balasubramanian M, Pollitt RC, Chandler KE, Mughal MZ, Parker MJ, Dalton A, Arundel P, Offiah AC, Bishop NJ. CRTAP mutation in a patient with Cole-Carpenter syndrome. American journal of medical genetics Part A. 2015;167a(3):587-91.
- 42. Molina MF, Qu HQ, Rentfro AR, Nair S, Lu Y, Hanis CL, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Decreased expression of ATP6V1H in type 2 diabetes: a pilot report on the diabetes risk study in Mexican Americans. Biochemical and biophysical research communications. 2011;412(4):728-31.
- 43. Sarker AH, Chatterjee A, Williams M, Lin S, Havel C, Jacob P 3rd, Boldogh I, Hazra TK, Talbot P, Hang B. NEIL2 protects against oxidative DNA damage induced by sidestream smoke in human cells. PloS one. 2014;9(3):e90261.
- Woo SH, Lukacs V, de Nooij JC, Zaytseva D, Criddle CR, Francisco A, Jessell TM, Wilkinson KA, Patapoutian A. Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. Nature neuroscience. 2015;18(12):1756-62.
- 45. Okubo M, Fujita A, Saito Y, Komaki H, Ishiyama A, Takeshita E, Kojima E, Koichihara R, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Yamazaki H, Kusaka K, Tanaka H, Miyake N, Matsumoto N, Sasaki M. A family of distal arthrogryposis type 5 due to a novel PIEZO2 mutation. American journal of medical genetics Part A. 2015;167a(5):1100-6.
- 46. Field S, Riley KL, Grimes DT, Hilton H, Simon M, Powles-Glover N, Siggers P, Bogani D, Greenfield A, Norris DP. Pkd1l1 establishes left-right asymmetry and physically interacts with Pkd2. Development (Cambridge, England).
  2011;138(6):1131-42.
- Reggiori F, Wang CW, Stromhaug PE, Shintani T, Klionsky DJ. Vps51 is part of the yeast Vps fifty-three tethering complex essential for retrograde traffic from the early endosome and Cvt vesicle completion. The Journal of biological chemistry. 2003;278(7):5009-20.
- Filipek-Gorniok B, Holmborn K, Haitina T, Habicher J, Oliveira MB, Hellgren C, Eriksson I, Kjellen L, Kreuger J, Ledin J. Expression of chondroitin/dermatan sulfate glycosyltransferases during early zebrafish development. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists. 2013;242(8):964-75.
- 49. Guerrini MM, Sobacchi C, Cassani B, Abinun M, Kilic SS, Pangrazio A, Moratto D, Mazzolari E, Clayton-Smith J, Orchard P, Coxon FP, Helfrich MH, Crockett

JC, Mellis D, Vellodi A, Tezcan I, Notarangelo LD, Rogers MJ, Vezzoni P, Villa A, Frattini A. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. American journal of human genetics. 2008;83(1):64-76.

- 50. Pangrazio A, Cassani B, Guerrini MM, Crockett JC, Marrella V, Zammataro L, Strina D, Schulz A, Schlack C, Kornak U, Mellis DJ, Duthie A, Helfrich MH, Durandy A, Moshous D, Vellodi A, Chiesa R, Veys P, Lo Iacono N, Vezzoni P, Fischer A, Villa A, Sobacchi C. RANK-dependent autosomal recessive osteopetrosis: characterization of five new cases with novel mutations. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2012;27(2):342-51.
- 51. Turan S. Current research on pycnodysostosis. Intractable & rare diseases research. 2014;3(3):91-3.
- 52. Gelb BD, Willner JP, Dunn TM, Kardon NB, Verloes A, Poncin J, Desnick RJ. Paternal uniparental disomy for chromosome 1 revealed by molecular analysis of a patient with pycnodysostosis. American journal of human genetics. 1998;62(4):848-54.
- Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Itoh Y, Hattori T, Ishiguro N. Novel Compound Heterozygous Mutations in the Cathepsin K Gene in Japanese Female Siblings with Pyknodysostosis. Molecular syndromology. 2012;2(6):254-8.
- 54. Pangrazio A, Poliani PL, Megarbane A, Lefranc G, Lanino E, Di Rocco M, Rucci F, Lucchini F, Ravanini M, Facchetti F, Abinun M, Vezzoni P, Villa A, Frattini A. Mutations in OSTM1 (grey lethal) define a particularly severe form of autosomal recessive osteopetrosis with neural involvement. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2006;21(7):1098-105.
- de Jesus J, Imane Z, Senee V, Romero S, Guillausseau PJ, Balafrej A, Julier C. SLC29A3 mutation in a patient with syndromic diabetes with features of pigmented hypertrichotic dermatosis with insulin-dependent diabetes, H syndrome and Faisalabad histiocytosis. Diabetes & metabolism. 2013;39(3):281-5.

- Lemire EG, Wiebe S. Clinical and radiologic findings in an adult male with dysosteosclerosis. American journal of medical genetics Part A. 2008;146a(4):474-8.
- 57. Arora R, Aggarwal S, Deme S. Ghosal hematodiaphyseal dysplasia-a concise review including an illustrative patient. Skeletal radiology. 2015;44(3):447-50.
- 58. Al-Batayneh OB. Tricho-dento-osseous syndrome: diagnosis and dental management. International journal of dentistry. 2012;2012:514692.
- 59. Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. 2014;11(4):699-707.
- 60. Palagano E, Blair HC, Pangrazio A, Tourkova I, Strina D, Angius A, Cuccuru G, Oppo M, Uva P, Van Hul W, Boudin E, Superti-Furga A, Faletra F, Nocerino A, Ferrari MC, Grappiolo G, Monari M, Montanelli A, Vezzoni P, Villa A, Sobacchi C. Buried in the Middle but Guilty: Intronic Mutations in the TCIRG1 Gene Cause Human Autosomal Recessive Osteopetrosis. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2015;30(10):1814-21.
- Ku CS, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R. Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. Annals of neurology. 2012;71(1):5-14.
- 62. Pickrell WO, Rees MI, Chung SK. Next generation sequencing methodologies-an overview. Advances in protein chemistry and structural biology. 2012;89:1-26.

# 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Osteoblastenreifung induziert durch den Wnt/ß-Catenin-Signalweg. Das
vom SOST-Gen kodierte Sklerostin hemmt die Bindung von Wnt. Reife Osteoblasten
sezernieren Kollagene, Osteocalcin, Calcium, Phosphat und alkalische Phosphatase
(AP) <b>12</b>
Abbildung 2: Osteoklastenreifung und interzelluläre Kommunikation
Abbildung 3: Überblick über die wichtigsten sklerosierenden Knochenerkrankungen,
eingeteilt anhand Pathomechanismus. Unter * finden sich bisher bekannte assoziierte
Gene
Abbildung 4: Methodisches Vorgehen zur Bestimmung der genetischen
Krankheitsursache bei Patienten mit High-Bone-Mass-Phänotyp
Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung der Sequenzierungsergebnisse im Programm
SeqMan
Abbildung 6: Stammbaum der Familie 2. Konsanguine Eltern mit zwei betroffenen
Kindern44
Abbildung 7: Deformitäten und Fehlstellungen der unteren Extremitäten44
Abbildung 8: Röntgenaufnahmen der Indexpatientin von Wirbelsäule, Thorax, Becken
und Extremitäten mit generalisierter Osteopetrose44
Abbildung 9: Stammbaum der Familie 3 mit autosomal dominantem Erbgang45
Abbildung 10: Deutliche Sklerosierung von Humerus, Schädelknochen, Becken und
Wirbelsäule in Röntgenaufnahmen des Indexpatienten aus Familie 346
Abbildung 11: Sklerosierung der langen Röhrenknochen, Erlenmeyer-Flask-
Deformitäten der Femora und verdickte Schädelkalotte in den Röntgenaufnahmen von
Patient 1
Abbildung 12: Osteosklerose der unteren Extremität, verbreiterte Rippenenden
anterior und Aufhellung der Knochen der oberen Extremität in den Röntgenaufnahmen
von Patient 4
Abbildung 13: Diffuse Osteosklerose, Abflachung der Wirbelkörper, wolkige
Aufhellungen in den langen Röhrenknochen in den Röntgenaufnahmen von Patient 5.
Osteosynthesematerial im linken Femur auf Grund einer Frakturbehandlung50
Abbildung 14: Sichtbare Sklerosierung des proximalen Femurs, des Beckens und der
Wirbelsäule in den Röntgenaufnahmen von Patientin 6

Abbildung 15: Die Röntgenaufnahmen des Patienten 7 von Wirbelsäule,
Schädelknochen und oberer Extremität bestätigen den Verdacht auf Osteopetrose52
Abbildung 16: Stammbaum von Familie 1 mit Ausschnitten der Sequenzanalyse.
Heterozygote Variante c.1153C>T (p.Arg385Trp) bei Indexpatientin, Tochter und Sohn
mit Pfeil markiert53
Abbildung 17: Sequenzierungsergebnisse TNFRSF11A von Patient 1. A: homozygote
Mutation c.415_416GC>AT, B: IGV-File, C: Konservierungsgrad der Proteinsequenz
um die Mutation p.Ala139IIe57
Abbildung 18: Sequenzierungsergebnisse CTSK von Patient 2. A: homozygote
Mutation c.894G>A, B: Konservierungsgrad der Proteinsequenz um die Mutation
p.Trp298* <b>58</b>
Abbildung 19: Sequenzierungsergebnisse CTSK von Patient 3. A: heterozygote
Mutation c.830C>T, <b>B:</b> IGV-File, <b>C:</b> Konservierungsgrad der Proteinsequenz um die
Mutation p.Ala277Val60
Abbildung 20: Sequenzierungsergebnisse OSTM1 von Patient 4. A: homozygote
Deletion c.518_521delATTG, <b>B:</b> Konservierungsgrad der Proteinsequenz um die
Mutation p.Asn173lle*261
Abbildung 21: Stammbaum des Patienten 5 mit Ausschnitten aus der
Sequenzanalyse. Lokalisation der Insertion in roter Umrandung. Insertion beim
Indexpatienten, klare Sequenzüberlagerung bei der Mutter
Abbildung 22: Sequenzierungsergebnisse von SLC29A3 von Patient 5. A: homozygote
Insertion c.302_303insCTACTTTGAGAGCTACCT, B: IGV-File, C: Konservierungsgrad
der Proteinsequenz um Mutation p.Asn101delinsAsnTyrPheGluSerTyrLeu63
Abbildung 23: Sequenzierungsergebnisse von SLC29A3 von Patientin 6. A:
homozygote Mutation c.1172C>A, <b>B:</b> IGV-File, <b>C:</b> Konservierungsgrad der
Proteinsequenz um Mutation p.Pro391His65
Abbildung 24: Sequenzierungsergebnisse von TBXAS1 von Patientin 6. A:
heterozygote Mutation c.1486G>A, <b>B:</b> IGV-File, <b>C:</b> Konservierungsgrad der
Proteinsequenz um Mutation p.Glu496Lys66
Abbildung 25: Relative Expression von Osteopetrose-verursachenden Genen bei
Patient 7 in der qPCR. Vergleich mit dem Vater des Betroffenen (Kontrolle 1) und einem
nicht verwandten, gleichaltrigen Jungen (Kontrolle 2)68

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gene des Bone-Mass-Panel in alphabetischer Reihenfolge	25
Tabelle 2: Reaktionsansatz 1	29
Tabelle 3: Reaktionsansatz 2	29
Tabelle 4: Ms-long Programm	30
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die enzymatische Aufreinigung des PCR-Produkts	31
Tabelle 6: Reaktionsansatz für die Sanger-Sequenzierung	32
Tabelle 7: Sequenzierungs-Programm	32
Tabelle 8: Reaktionsansatz cDNA-Synthese	35
Tabelle 9:         Thermocycler-Programm	35
Tabelle 10: Reaktionsansatz qPCR	36
Tabelle 11: Programm qPCR-Cycler	36
Tabelle 12: Verwendete Reagenzien	37
Tabelle 13: Verwendete Geräte	38
Tabelle 14:         Verwendete         Software	38
Tabelle 15:         Verwendete Online-Datenbanken, Stand jeweils 27.04.2016	39
Tabelle 16:         Verwendete Primer in PCR und Sequenzierung	39
Tabelle 17: Verwendete Primer qPCR	42
Tabelle 18: Lokalisationen der genetischen Varianten im Gen und Ergebnisse der	
Sanger-Sequenzierung bei Familie 2	54
Tabelle 19:         Lokalisationen der genetischen Varianten im Gen und Ergebnisse der	
Sanger-Sequenzierung bei Familie 3	55
Tabelle 20:         Zusammenfassung aller Ergebnisse	69
Tabelle 21: Diagnosen der Patienten	79

## **Eidesstattliche Versicherung**

"Ich, Lisa-Marie Quell, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Molekulargenetische Charakterisierung von Erkrankungen mit erhöhter Knochenmasse" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE *-www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) ent-sprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum

Unterschrift

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

### Danksagungen

Für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie Hilfestellung bei dessen Bearbeitung und kontinuierliche Betreuung möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Kornak bedanken.

Für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor danke ich im Besonderen Anja Lekaj, Claire Schlack und Julia Mrosk, sowie der gesamten Arbeitsgruppe Kornak und allen weiteren Mitarbeitern des Berlin-Brandenburger Centrums für Regenerative Therapien, die mir jederzeit mit wertvollen Hinweisen zur Seite standen.

Für die Hilfe bei der grafischen Gestaltung danke ich Selina Streitenberger.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und Lucas Pritchard bedanken. Ohne ihre Unterstützung, Hilfe und ständige Motivation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.